

Eric Nishimura Kiyomoto

**Busca de parceiros físicos da proteína CRABP2, utilizando o sistema de duplo-híbrido
em *Saccharomyces cerevisiae***



Araraquara – 2011

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

**Busca de parceiros físicos da proteína CRABP2, utilizando o sistema de duplo-híbrido
em *Saccharomyces cerevisiae***

Esta monografia foi consequência de um projeto de iniciação científica na área de Biologia Celular e Molecular de Microrganismos apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista – UNESP, como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Farmacêutico – Bioquímico.

Eric Nishimura Kiyomoto

Orientador: Prof. Dr. Cleslei Fernando Zanelli

Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP

Setembro de 2011

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1. RESUMO | 4 |
| 2. LISTA DE ILUSTRAÇÕES | 5 |
| 3. LISTA DE TABELAS | 6 |
| 4. LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS | 7 |
| 5. INTRODUÇÃO | 10 |
| 5.1. Câncer de Cabeça e Pescoço..... | 10 |
| 5.2. A proteína CRABP2..... | 12 |
| 5.3. Sistema de duplo-híbrido de levedura na procura de interações físicas proteína-proteína | 16 |
| 6. DESENVOLVIMENTO | 20 |
| 6.1. Objetivo..... | 20 |
| 6.2. Materiais Utilizados..... | 20 |
| 6.3. Metodologia..... | 22 |
| 6.3.1. Subclonagem de DNA..... | 22 |
| 6.3.2. Transformação de bactéria – Competência..... | 24 |
| 6.3.3. Clonagem empregando Reação de Polimerase em Cadeia (PCR)..... | 25 |
| 6.3.4. Clonagem utilizando o sistema Gateway (Invitrogen)..... | 26 |
| 6.3.5. Isolamento de DNA plasmidial a partir de bactéria..... | 26 |
| 6.3.6. Isolamento de DNA plasmidial a partir de levedura..... | 27 |
| 6.3.7. Transformação de leveduras..... | 28 |
| 6.3.8. Transformação de leveduras de alta eficiência..... | 28 |
| 6.3.9. Western blot..... | 30 |

| | |
|--|-----------|
| 6.3.10. Rastreamento por duplo-híbrido..... | 30 |
| 6.4. Resultados e Discussão..... | 31 |
| 6.4.1. Clonagem de <i>CRABP2</i> em vetor pBTM116 e análise da expressão produção da proteína de fusão gerada..... | 31 |
| 6.4.2. Ensaio de autoativação da isca LexA-CRABP2..... | 35 |
| 6.4.3. Rastreamento de duplo-híbrido pelo sistema da linhagem L40..... | 37 |
| 7. CONCLUSÃO..... | 43 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 44 |

1. RESUMO

A metilação de ilhas CpG em regiões regulatórias de vários genes tem sido descrita como um processo importante no silenciamento de genes supressores de tumor e diretamente envolvida no processo de carcinogênese de uma série de tumores. O estudo desses genes afetados pela metilação em tumores visa à procura de marcadores moleculares para o diagnóstico, prognóstico e tratamento de tumores, e também a caracterização do seu papel no processo biológico do câncer. O nosso grupo de pesquisa participou de um Projeto Temático que visa a identificação de genes metilados em tumores de cabeça e pescoço (processo 03/09497-3) e foi então proposta a utilização do sistema de duplo-híbrido de levedura como ferramenta no início da análise funcional destes genes. Dessa maneira, utilizando como isca o gene *CRABP2* identificado como diferencialmente metilado em câncer de cabeça e pescoço, foi realizado o rastreamento de duplo-híbrido para a identificação de interações físicas proteína-proteína. Foram rastreados aproximadamente $2,1 \times 10^5$ transformantes neste sistema, dos quais 550 foram inicialmente positivos para His⁺. Desses, 182 transformantes confirmaram a marca His⁺ e foram testados para β-galactosidase. Em seguida, 19 foram selecionados para passar pela etapa do “plasmid linkage”. Após esse teste, 9 clones confirmaram a ligação dos marcadores His⁺ e β-gal⁺ com a presença do plasmídeo *LEU2*. Assim, após o sequenciamento dos insertos contidos nos clones identificados, ciclina D3 (*CCND3*), alfa-macroglobulina 2 (*A2M*) (2 clones), canal aniônico dependente de voltagem 2 (*VDAC2*), tubulina alfa 1 (*TUBA1*), tubulina alfa 2 (*TUBA2*), tubulina beta (*TUBB*), fator de ligação ao “enhancer” do gene interleucina 2 (*ILF2*) e desoxi-hipusina sintase (*DHPS*) emergiram como ligantes de *CRABP2*.

2. LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | |
|---|----|
| FIGURA 1. Princípio do duplo-híbrido em levedura..... | 19 |
| FIGURA 2. Caracterização da construção plasmidial pBTM116 + <i>CRABP2</i> | 33 |
| FIGURA 3. Análise da expressão do gene da proteína de fusão LexA-CRABP2 na linhagem L40..... | 34 |
| FIGURA 4. Avaliação da expressão dos genes repórteres (<i>HIS3</i> e <i>lacZ</i>) do sistema de duplo-híbrido da linhagem L40..... | 36 |
| FIGURA 5. Ligantes da proteína CRABP2 revelados no rastreamento de duplo-híbrido utilizando o sistema da linhagem L40..... | 41 |
| FIGURA 6. Modelo da ação de CRABP2 na célula, incluindo seus novos ligantes identificados neste trabalho..... | 42 |

3. LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| TABELA 1- Linhagens de leveduras utilizadas nos experimentos deste relatório..... | 20 |
| TABELA 2 - Plasmídeos utilizados nos experimentos deste relatório..... | 21 |
| TABELA 3- Oligonucleotídeos utilizados nos experimentos deste relatório..... | 22 |

4. LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- CpG: Ilhas CpG
- *CRABP2*: cellular retinoic acid binding protein 2
- AR: O ácido retinóico
- RAR: receptor de ácido retinóico
- RXR: receptor retinóide X
- CRABP1 e CRABP2: proteínas ligantes de ácido retinóico
- ILBPs: proteínas ligantes de lipídios intracelulares
- NLS, "nuclear localization signal": sinal de localização nuclear
- HL-60: leucemia promielocítica humana
- BD: domínio de ligação ao DNA
- AD: domínio de ativação da transcrição
- UASG: Gal-Upstream Activating Sequences
- LB: extrato de levedura 5 g/L; NaCl 10 g/L; triptona 10 g/L
- SOB: triptona 20 g/L, extrato de levedura 5 g/L, NaCl 10 mM, KCl 2,5 mM, MgCl₂.4H₂O 10 mM e MgSO₄.7H₂O 10 mM
- TB: Pipes pH7,0 10 mM, MnCl₂.4H₂O 55 mM, CaCl₂.2H₂O 15 mM e KCl 250 mM
- PCR: Reação de Polimerase em Cadeia
- Tampão TAE: Tris 40mM, ácido acético glacial 0,11% e EDTA 1mM
- Tampão TE: Tris 10 mM e EDTA 1 mM
- Tampão Z (Na₂HPO₄ 60 mM, NaH₂PO₄ 40 mM, KCl 10 mM, MgSO₄ 1 mM pH7,0)
- CCND3: ciclina D3
- A2M: alfa-macroglobulina 2
- VDAC2: canal aniônico dependente de voltagem 2

- TUBA1: tubulina alfa 1
- TUBA2: tubulina alfa 2
- TUBB: tubulina beta
- ILF2: fator de ligação ao “enhancer” do gene interleucina 2
- DHPS: desoxi-hipusina sintase
- VDACs: canais aniônicos dependentes de voltagem
- BAK: proteína pró-morte
- Erastin: agente anti-câncer seletivo
- NCOA6: co-ativador 6 de receptor nuclear
- NF45: proteína chamada fator nuclear 45
- μg : micrograma
- μL : microlitro
- $^{\circ}\text{C}$: graus Celcius
- DNA: ácido desoxirribonucleico
- dNTPs: mistura dos desoxirribonucleotídeos trifosfatados (dATP, dCTP, dGTP e dTTP)
- D.O.: densidade ótica
- EDTA: ácido etilenodiaminotetracético
- kb: quilobase
- kDa: quilodalton

- M: molar
- mg: miligrama
- min: minuto
- mL: mililitro
- mm: milímetro
- mM: milimolar
- eIF5A: fator de início de tradução 5A
- ng: nanograma
- nm: nanômetro
- pb: pares de base
- PEG: polietilenoglicol
- pH: potencial hidrogeniônico
- RNA: ácido ribonucleico
- Rpm: rotação por minuto
- SC: meio sintético completo para levedura
- SDS-PAGE: eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS
- SDS: dodecil sulfato de sódio
- s: segundo
- YPD: *Yeast extract, Peptone, Dextrose media*
- PBS: solução salina tamponada com fosfato

5. INTRODUÇÃO

5.1. Câncer de cabeça e pescoço

O termo câncer de cabeça e pescoço descreve uma diversidade de tipos de câncer de histologias distintas que ocorrem em vários sítios anatômicos (Dawson e Okamura, 1990). Esta terminologia tem sido aplicada primariamente aos tumores que ocorrem em regiões como a cavidade oral, a orofaringe, a hipofaringe e a laringe. Por causa da variabilidade de sítios anatômicos, da origem dos tecidos, da biologia do crescimento do tumor, dos padrões de metástases e dos limites da extensão do tumor, os sinais e sintomas dessa doença são muito variados (Bast *et al.*, 2000).

O processo da carcinogênese de cabeça e pescoço envolve interações dinâmicas entre vários fatores de risco. Aproximadamente 90% destes tumores ocorrem depois da exposição aos conhecidos carcinógenos como o tabaco, o fumo e substâncias como o betel. Sabe-se que o uso de álcool está intimamente ligado ao tabaco na carcinogênese e faz parte do grupo de agentes que podem potencializar a carcinogênese relacionada ao tabaco. Outros fatores importantes são os vírus, predisposição genética, ocupação, radiação e dieta (Kulkarni e Saranath, 2004).

Nos últimos anos, têm sido intensamente investigados marcadores moleculares que possam ser utilizados como alvos terapêuticos ou que auxiliem no diagnóstico precoce desse grupo de neoplasias, no seu prognóstico e na identificação de populações de risco. No entanto, muitos dos eventos genéticos responsáveis pela doença permanecem desconhecidos e poucos marcadores moleculares são comumente utilizados na prática médica (Greenman *et al.*, 2000; Ransohoff, 2003).

A carcinogênese constitui um processo em múltiplos passos, caracterizando-se pela

ocorrência ou acúmulo de alterações genéticas como: aneuploidia, perda de heterozigose, deleções, inserções, mutações pontuais, amplificação gênica e, pelas alterações epigenéticas, as quais se caracterizam por um processo herdado durante a divisão celular, sem a ocorrência de alterações na seqüência do DNA (Esteller, 2000; Esteller *et al.*, 2000; Feinberg, 2001; Smiraglia e Plass, 2002).

A metilação de citosinas em dinucleotídeos CpG é um evento epigenético que resulta na repressão da expressão gênica e está envolvida em vários processos biológicos normais tais como controle de desenvolvimento, proteção do genoma contra elementos transponíveis, *imprinting* genômico e inativação do cromossomo X (Hendrich e Bird, 1998). As seqüências ricas em CpG (ilhas CpG) são geralmente localizadas no promotor gênico, mas também estão presentes em regiões internas do gene (Jones e Laird, 1999). A metilação dessas seqüências é introduzida enzimaticamente por DNA metiltransferases que exibem uma interação seqüência específica com o DNA e utilizam a S-adenosil-L-metionina (AdoMet) como doador de grupos metila (Cheng e Roberts, 2001).

A metilação anormal do DNA é fortemente implicada no desenvolvimento do câncer (Esteller *et al.*, 2001) e afeta a expressão de mais de uma centena de genes supressores de tumor ou relacionados com a regulação da proliferação e apoptose e com o reparo do DNA.

Em tumores de cabeça e pescoço, alguns genes estão comumente hipermetilados, como o *p16*, o *DAPK*, o *E-cad*, o *RASSF1A* e o *RAR α 2* (Rosas *et al.*, 2001; Hasegawa *et al.*, 2002; Kwong *et al.*, 2002). A recorrência desses tumores parece ser mais freqüente quando há inativação do gene *p16* (Kresty *et al.*, 2002) enquanto a invasão óssea está associada com hipermetilação do gene *DCC* (Ogi *et al.*, 2002). Tais resultados abrem a possibilidade de utilização de painéis de genes hipermetilados para o prognóstico desses pacientes.

Realmente, as alterações epigenéticas podem ser empregadas como marcadores no monitoramento da gênese e da progressão do câncer e constituem alvos terapêuticos

potenciais em função de sua reversibilidade. Tratamentos com inibidores da metilação do DNA podem restaurar a atividade de genes silenciados e diminuir a taxa de crescimento de células tumorais em um modo herdável. Portanto, é possível a reversão parcial do fenótipo tumoral pelo uso de inibidores da metilação (Brown e Strathdee, 2002; Christman, 2002; Worm e Guldborg, 2002).

Pelo exposto, o estudo da metilação do DNA e a caracterização cuidadosa dos padrões de metilação no câncer humano são muito importantes. A precisa quantificação do status de metilação de ilhas CpG pode, sem dúvida, resultar no desenvolvimento de um marcador molecular poderoso para diagnóstico e prognóstico de neoplasias e, ainda, levar à identificação de novos alvos terapêuticos.

O nosso grupo de pesquisa está coordenando o Projeto Temático “Identificação e Caracterização Funcional de Marcadores Moleculares Envolvidos no Processo de Formação de Tumores de Cabeça e Pescoço por Meio da Análise do Padrão Diferencial de Metilação” (Processo 03/09497-3). O objetivo geral desse projeto é investigar o perfil de metilação de ilhas CpG em tumores de cabeça e pescoço e identificar biomarcadores candidatos para diagnóstico e prognóstico desses tumores. Um dos genes identificados como diferencialmente metilado neste Projeto Temático foi *CRABP2*.

5.2. A proteína CRABP2

Entre os genes diferencialmente metilados sob análise no Projeto Temático, encontra-se *CRABP2* (cellular retinoic acid binding protein 2), que codifica uma proteína homônima também designada CRABP-II ou RBP6. *CRABP2* é uma proteína muito interessante, pois está envolvida com o metabolismo, estocagem e transporte de ácido retinóico (Vetterman *et al.*, 1997).

A vitamina A e os seus derivados biológicos (retinol, retinaldeído e ácido retinóico),

coletivamente chamados de retinóides, são responsáveis pela regulação de múltiplos processos biológicos, incluindo embriogênese, apoptose, proliferação e diferenciação celular (DeLuca, 1991). O ácido retinóico (AR), principalmente, tem sido apontado por muitos estudos ser útil na prevenção e tratamento de diferentes tipos de cânceres humanos. Esses estudos têm demonstrado a sua eficácia no tratamento de cânceres de cabeça e pescoço (Hong *et al.*, 1990; Jetten *et al.*, 1990), de pulmão (Pastorino *et al.*, 1993), de pele (Kraemer *et al.*, 1988), de mama (Jing *et al.*, 1997) e também no tratamento da leucemia promielocítica aguda (Chomienne *et al.*, 1996).

A ação biológica do AR é mediada por receptores específicos que fazem parte da superfamília de receptores nucleares, o receptor de ácido retinóico (RAR) e o receptor retinóide X (RXR). Cada família apresenta os subtipos α , β e γ . Além disso, início de transcrição e "splicing" alternativos dão origem a diferentes isoformas dos subtipos de RAR e RXR. O receptor RXR, assim como suas múltiplas isoformas, é ativado pelo isômero *9-cis*-AR, enquanto que todas as isoformas do receptor RAR respondem tanto ao isômero *9-cis*-AR, como também ao *all-trans*-AR (Chambon, 1996).

O ácido retinóico é uma molécula hidrofóbica que deve ser solubilizada no citoplasma e transferida para o núcleo onde se ligará aos seus receptores. Duas proteínas chamadas de proteínas ligantes de ácido retinóico (CRABP1 e CRABP2) se ligam ao AR no citoplasma e regulam sua concentração efetiva dentro da célula, seja pela ligação ao excesso de AR e/ou aumentando a metabolização de AR na célula através de interações com enzimas catabolizantes (Napoli *et al.*, 1999).

Essas proteínas pertencem à família de proteínas ligantes de lipídios intracelulares (iLBPs), que é caracterizada por uma estrutura tridimensional em forma de barril- β , altamente conservada, a qual permite a sua ligação com moléculas hidrofóbicas específicas (Banaszak *et al.*, 1994). CRABPs são proteínas solúveis pequenas, constituídas por aproximadamente 136

aminoácidos, com o peso molecular de aproximadamente 15-16 kDa (Astrom *et al.*, 1991).

Elas são altamente conservadas ao longo da evolução, sendo que CRABP1 de rato apresenta uma identidade de 99,3% com a proteína de humano, enquanto que CRABP2 possui uma identidade de 94%. Já as proteínas CRABP1 e CRABP2 de humanos são 74% idênticas entre si, sugerindo uma diferença de função entre essas duas proteínas (Donovan *et al.*, 1995). Além disso, as duas CRABPs exibem padrões de expressão distintos com relação a diferentes células e estágios de desenvolvimento. Em adultos, CRABP1 é altamente expressa, enquanto que a expressão de CRABP2 é restrita à pele, útero, ovário, plexus coróide e em células hematopoiéticas. Ambas são expressas durante a embriogênese, porém não nas mesmas células. Esses padrões distintos de expressão fortalecem a hipótese de que as duas CRABPs apresentam funções diferentes no metabolismo do ácido retinóico (Dong *et al.*, 1999). De fato, experimentos mostram que CRABP1 aumenta a atividade de enzimas que catalisam a degradação do AR (Boylan *et al.* 1991), enquanto CRABP2 aumenta a atividade transcricional de AR (Dong *et al.*, 1999). Esse último estudo mostra que a produção na célula de CRABP2, mas não de CRABP1, aumenta a transcrição de gene repórteres dirigidos pelos elementos responsivos ao AR (RARE) (Dong *et al.*, 1999). Foi também demonstrado, tanto *in vivo* como *in vitro*, que CRABP2 associa-se fisicamente com RAR α e RXR α , e na presença do ligante, CRABP2 aumenta a transcrição do heterodímero RAR α -RXR α (Delva *et al.*, 1999).

Interações diretas entre CRABP2 e receptores nucleares requerem que esses dois tipos de proteínas localizem-se no mesmo compartimento celular. Uma vez que a atividade dos receptores RAR e RXR ocorre no núcleo e a proteína CRABP2 é predominantemente citoplasmática, na presença do ligante CRABP2 deve ser transportada até o núcleo para associar-se com RAR α (Budhu e Noy, 2002). O transporte de proteínas do citoplasma celular

para núcleo ocorre devido ao reconhecimento de um sinal de localização nuclear (NLS, "nuclear localization signal"). O NLS é reconhecido por um grupo de proteínas citoplasmáticas, as importinas α , que se ligam à proteína a ser importada e a conduz até o núcleo (Stryer, 1988). Uma vez que CRABP2 não contém um NLS clássico em sua seqüência primária, esse sinal deve ser reconhecido em sua estrutura terciária. Dessa maneira, foi verificada a presença deste NLS na conformação holo-CRABP2, mas não na apo-CRABP2. Análises subseqüentes demonstraram que o AR induz a associação de CRABP2 com uma importina α , a qual é responsável pela localização nuclear dessa proteína (Sessler e Noy, 2005).

Assim, após sua ligação com o ácido retinóico no citoplasma, a holo-CRABP2 desloca-se para o núcleo, onde irá associar-se com apo-RAR para formar um complexo que possibilita a passagem direta do AR, facilitando assim a ligação do AR com RAR e aumentando a sua atividade transcricional (Budhu e Noy, 2002). Apesar de este mesmo estudo propor que CRABP2 deve-se desligar de RAR α após a transferência do AR para que ocorra ativação transcricional por RAR α -RXR α (Budhu e Noy, 2002), outro estudo mostra que a associação da proteína ciclina D3 ao complexo CRABP2-RAR α aumenta a estabilidade desse complexo e também modula positivamente a ativação transcricional de CRABP2 mediada por AR *in vivo* (Despouy *et al.*, 2003). Dessa forma, permanece indeterminado se a ligação de CRABP2 à RAR α -RXR α , após transferência do AR, afeta a atividade transcricional desse heterodímero.

Como em doses farmacológicas o AR é altamente tóxico (Maden, 1994), essa atividade da proteína CRABP2 é de fundamental importância, uma vez que o ácido retinóico pode inibir a proliferação celular de vários tipos de cânceres (Kraemer *et al.*, 1988; Hong *et al.*, 1990; Jetten *et al.*, 1990; Pastorino *et al.*, 1993; Jing *et al.*, 1997 e Chomienne *et al.*,

1996). Dessa maneira, em um estudo da efetividade de CRABP2 em camundongos com câncer de mama, verificou-se que a injeção de um adenovírus expressando CRABP2 dentro de células da linhagem SC115 de carcinoma mamário desses camundongos resultou em um aumento da habilidade do AR de suprimir a proliferação celular, mesmo na ausência de administração de AR exógeno. A expressão de *CRABP2* nestas células elevou a atividade transcricional de RAR e, ao mesmo tempo, reduziu o potencial tumorigênico celular. As células que super expressavam CRABP2 foram capazes de causar poucos tumores e estes apresentaram uma taxa de crescimento mais lenta. (Manor *et al.*, 2003).

Visto a relevante importância da proteína CRABP2, adicionado à participação do AR nos tratamentos de diversos cânceres humanos, a identificação de proteínas que interagem com CRABP2 pode ajudar a compreender o controle da sinalização do AR dentro da célula. Como já citado, foi observado que a proteína ciclina D3 interage fisicamente com CRABP2. Utilizando o sistema de duplo-híbrido, CRABP2 foi usado como isca em um rastreamento de proteínas ligantes a partir de uma biblioteca de cDNA humano de linhagem celular de leucemia promielocítica humana (HL-60). Foi verificado que a ciclina D3 forma um complexo ternário com CRABP2 e o receptor RAR α . Além da ciclina D3, também já foi visto que CRABP2 pode funcionar como um homodímero, interagindo com outra proteína CRABP2 (Rual *et al.*, 2005). Assim, a procura de novas interações de CRABP2 com fatores celulares e o posterior estudo do papel dessas interações físicas na função de CRABP2, poderão contribuir de maneira importante no entendimento do complexo mecanismo celular de sinalização por ácido retinóico.

5.3. Sistema de duplo-híbrido de levedura na procura de interações físicas proteína-proteína

O sistema de duplo-híbrido é baseado na importante característica modular de uma série

de fatores de transcrição eucarióticos, bastante estudados durante os anos 80 (Fields e Sternglanz, 1994). Esses estudos mostraram que o domínio de ligação ao DNA (binding domain - BD) e o domínio de ativação da transcrição (activation domain - AD) desses fatores podem ser separados fisicamente, mantendo sua funcionalidade (Brent e Ptashne, 1985; Hope e Struhl, 1986; Keegan *et al.*, 1986). O domínio BD é responsável pela ligação do fator a seqüências específicas do DNA genômico, enquanto o domínio AD recruta a maquinaria de transcrição para ativar a transcrição gênica. Além de não ser necessário que ambos os domínios BD e AD pertençam ao mesmo fator, para que a transcrição seja ativada, eles não precisam estar presentes no mesmo polipeptídeo (Brent e Ptashne, 1985; Ma e Ptashne, 1988). Assim, se separados os domínios BD e AD de um fator de transcrição, a transcrição de um determinado gene não pode ser mais ativada. No entanto, se os domínios BD e AD forem novamente aproximados através da sua fusão com outras proteínas que interagem fisicamente, a ativação transcricional é reconstituída no local do DNA onde existe o sítio de ligação do domínio BD (Figura 1).

O princípio do duplo-híbrido foi inicialmente demonstrado utilizando os domínios BD e AD do fator de transcrição Gal4 fundidos às proteínas, que conhecidamente interagem fisicamente, Snf1 e Snf4, e o gene para beta-galactosidase de *Escherichia coli* como repórter da interação (Fields e Song, 1989). Gal4 contém dois domínios essenciais: na porção amino, um domínio de ligação a seqüências específicas de DNA (BD) e na porção carboxila, um domínio com regiões acídicas que é necessário para a ativação da transcrição (AD). Os domínios são independentes e podem ser fusionados separadamente a outras proteínas que, quando interagem, reconstituem a sua proximidade natural e podem ativar a transcrição de genes regulados por UASG (Gal-Upstream Activating Sequences). O rastreamento pelo sistema de duplo-híbrido utiliza uma biblioteca genômica ou de cDNA fusionada ao domínio de ativação de Gal4, e a proteína de interesse fusionada a um domínio de ligação ao DNA, de forma que proteínas que interagem com a proteína de interesse possam ser identificadas.

O sistema de duplo-híbrido tem sido utilizado para a procura de novas interações, assim como para análise direta de duas proteínas de interesse. Além disso, esse sistema tem sido modificado constantemente no intuito de reduzir as limitações dos sistemas de duplo-híbrido tradicionais que utilizam os domínios BD e AD de Gal4. Principalmente, a utilização de um sistema de duplo-híbrido com mais de um gene repórter e diferentes níveis de sensibilidade tem possibilitado a sua utilização para proteínas de diferentes funções celulares, e os mais variados tipos de interação física (Causier, 2004; Gietz, 2005).

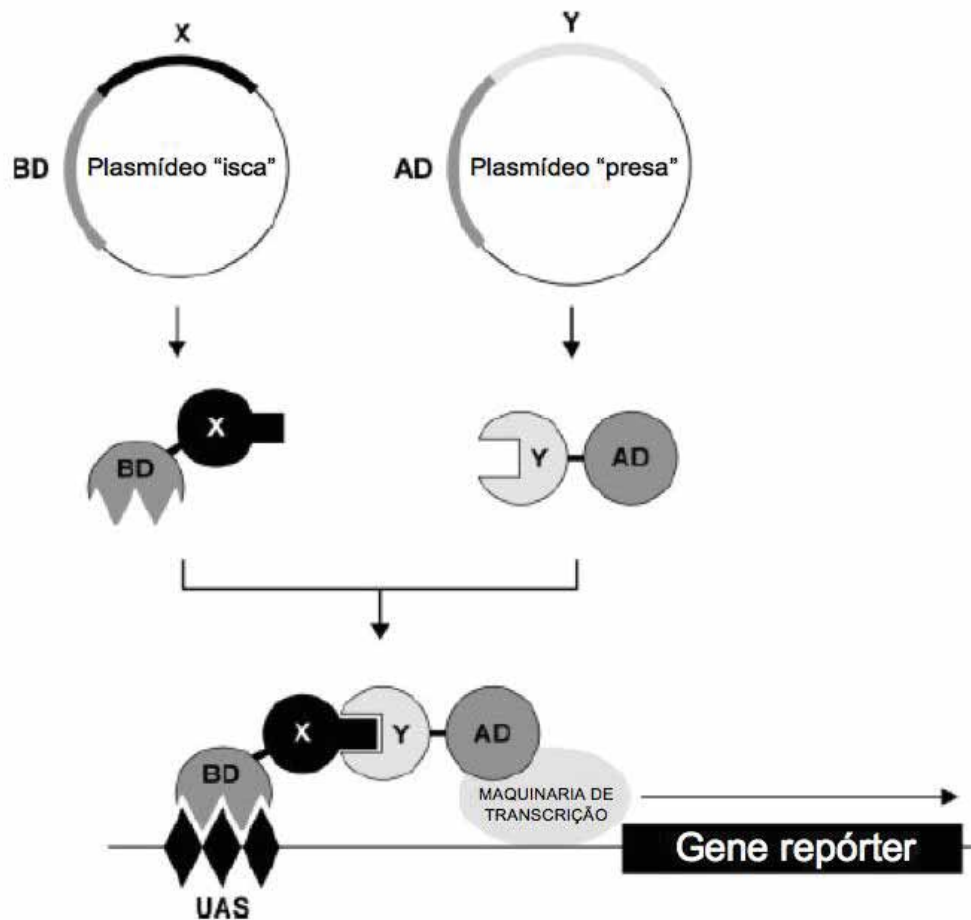


FIGURA 1. Princípio do duplo-híbrido em levedura. Dois plasmídeos são construídos: um que irá codificar a proteína “isca” em fusão com o C-terminal do BD do fator de transcrição e outro que irá codificar a proteína “presa” em fusão com o C-terminal do AD do fator de transcrição. No caso de um rastreamento de proteínas ligantes por duplo-híbrido, Y pode ser representado por uma biblioteca de expressão. BD e AD somente são aproximados se X e Y interagirem fisicamente, reconstituindo um fator de transcrição funcionalmente ativo que se liga às seqüências de ativação específicas na região promotora (UAS - upstream activation sequences) e levam à expressão do gene repórter (Modificado de Causier, 2004).

6. DESENVOLVIMENTO

6.1. OBJETIVO

Os objetivos específicos do projeto abordados neste período foram:

- Clonagem do gene codificador de *CRABP2* em vetor para duplo-híbrido e análise da produção proteica de fusão gerada;
- Ensaios preliminares à utilização da isca: ensaio de autoativação e teste de expressão;
- Rastreamento de duplo-híbrido: isolamento e identificação inicial dos clones.

6.2. MATERIAIS UTILIZADOS

As leveduras utilizadas nos experimentos estão listadas na Tabela 1. Os plasmídeos e os oligonucleotídeos utilizados estão listados nas Tabelas 2 e 3, respectivamente. A composição dos meios de cultura e soluções está apresentada ao longo do texto, de acordo com a ordem de aparecimento nos protocolos.

TABELA 1- Linhagens de leveduras utilizadas nos experimentos deste relatório

| <i>Linhagem</i> | <i>Descrição</i> | <i>Referência</i> |
|-----------------|--|-------------------|
| L40 | MATa <i>trp1 his3 leu2 ade2 LYS2::lexAop(4x)-HIS3</i> | MacDonald, |
| (VZL86) | <i>URA3::lexAop(8x)-lacZ</i> | 2001 |
| VZL804 | VZL86 transformada com o plasmídeo isca (pBTM116- <i>CRABP2</i>) para o sistema de duplo-híbrido da linhagem L40 | Este trabalho |
| VZL831 | VZL86 transformada com os plasmídeos pBTM116- <i>CRABP2</i> e pACT. Controle negativo da isca do sistema de duplo-híbrido do sistema da linhagem L40 | Este trabalho |

TABELA 2 - Plasmídeos utilizados nos experimentos deste relatório

| <i>Plasmídeos</i> | <i>Descrição</i> | <i>Origem</i> |
|-------------------------|--|--------------------------------|
| pBTM116 (pVZ148) | Vetor de expressão em levedura de proteína de fusão com a proteína de ligação ao DNA LexA (<i>TRP1</i> , 2μ , <i>Ampicilina</i> ^R) | Bartel e Fields, 1995 |
| pVZ943 (pBTM-CRABP2) | <i>CRABP2</i> clonado no plasmídeo pBTM116 | Este trabalho |
| pVZ278 | <i>TIF51A</i> clonado no vetor pBTM116 | Thompson, <i>et al.</i> , 2003 |
| pVZ549 | <i>DYSI</i> clonado no vetor pBTM116 | Thompson, <i>et al.</i> , 2003 |
| pACT (pVZ149) | Vetor de expressão em levedura de proteína de fusão com o domínio de ativação da transcrição de Gal4 (<i>LEU2</i> , 2μ , <i>Ampicilina</i> ^R) | Bartel e Fields, 1995 |
| pVZ940 | <i>LIA1</i> clonado no vetor pACT | Thompson, <i>et al.</i> , 2003 |
| pVZ558 | <i>DYSI</i> clonado no vetor pACT | Thompson, <i>et al.</i> , 2003 |

TABELA 3- Oligonucleotídeos utilizados nos experimentos deste relatório

| <i>Oligonucleotídeo</i> | <i>Descrição</i> | <i>Sítio de restrição</i> |
|-------------------------|--|---------------------------|
| SVO536 | 5' CCG GAA TTC ATG CCC AAC TTC TCT G 3' | <i>EcoRI</i> |
| SVO537 | 5' CCG GAA TTC TAT CCT AGA AGG AGG G 3' | <i>EcoRI</i> |

6.3. METODOLOGIA

6.3.1. Subclonagem de DNA

6.3.1.1. Digestão de plasmídeos

Os plasmídeos de interesse foram digeridos em um volume de 20 μ L, utilizando as condições recomendadas para as diferentes enzimas de restrição (New England Biolabs).

6.3.1.2. Desfosforilação do vetor (quando necessário)

Após digestão do vetor, foram adicionadas 2 unidades de fosfatase alcalina (CIAP- Calf Intestinal Alkaline Phosphatase) e a reação incubada a 37°C por 30 minutos.

6.3.1.3. Purificação de inserto e vetor

Após digestão dos plasmídeos e realização das modificações necessárias, os produtos obtidos foram separados por eletroforese em gel de agarose 0,8% em TAE (Tris 40 mM, ácido acético glacial 0,11% e EDTA 1 mM), contendo 0,5 µg/mL de brometo de etídio. Ao DNA foi adicionado tampão de amostra (azul de bromofenol 0,125%, xileno cianol 0,125% e glicerol 50%) e a solução foi aplicada no gel. O gel foi submetido a voltagem de 80 V. O DNA foi visualizado utilizando luz ultravioleta e a imagem documentada utilizando o aparelho AlphaImager 2200 (Alpha Innotech Corporation). Os fragmentos desejados foram purificados utilizando o kit “QIAquick Gel Extraction” da Qiagen, seguindo as orientações do fabricante.

6.3.1.4. Reação de ligação

Os fragmentos (vetor e inserto), após a purificação, foram analisados por eletroforese em gel de agarose 0,8% para avaliar a pureza e estimar a concentração dos mesmos. A reação de ligação foi realizada utilizando um volume final de 20 µL, tampão apropriado, um excesso de inserto em relação ao vetor (usualmente 10 vezes) e 200-400 unidades de T4 DNA ligase.

A reação foi incubada a 16°C por 4-24 horas.

6.3.1.5. Transformação de bactéria

- Competência

Uma colônia de *E.coli* foi inoculada em 10 mL de meio LB (extrato de levedura 5 g/L; NaCl 10 g/L; triptona 10 g/L) e incubada a 37°C sob agitação por uma noite. A cultura foi então diluída em 250 mL de meio SOB (triptona 20 g/L, extrato de levedura 5 g/L, NaCl 10 mM, KCl 2,5 mM, MgCl₂.4H₂O 10 mM e MgSO₄.7H₂O 10 mM) até atingir D.O._{600nm}=0,6. A

cultura foi incubada em banho de gelo por 10 minutos e centrifugada a 2.500xg a 4°C por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células foram suspensas em 80 mL de solução TB (Pipes pH7,0 10 mM, MnCl₂.4H₂O 55 mM, CaCl₂.2H₂O 15 mM e KCl 250 mM) gelada e incubadas no gelo por 10 minutos. As células foram centrifugadas e suspensas em 20 mL de TB gelado adicionado de 1,5 mL de DMSO. As células foram novamente incubadas em gelo por 10 minutos. Para armazenamento, 200 µL de células foram alíquotados e congelados a -80°C.

- Transformação

As células de *E. coli* competentes estocadas foram descongeladas em banho de gelo. Em um tubo de microcentrífuga foram adicionados 100 µL das células competentes e 50–250 ng de DNA plasmidial ou a reação de ligação. Os tubos foram mantidos em banho de gelo por 30 minutos e submetidos ao choque térmico em banho-maria a 42°C por 2 minutos. A seguir, 1 mL de meio LB líquido foi adicionado ao tubo, o qual foi incubado por 1 hora a 37°C, sob agitação. Finalmente, as células foram plaqueadas em meio seletivo (meio LB contendo ampicilina 50 µg/mL) e incubadas a 37°C até a obtenção de colônias.

6.3.2. Clonagem empregando Reação de Polimerase em Cadeia (PCR)

6.3.2.1. Reação de PCR

As reações de PCR foram realizadas em tubos de microcentrífuga de 0,5 mL contendo 1 µM de cada oligonucleotídeo (dATP, dTTP, dCTP e dGTP), 2 µg da biblioteca de cDNA de cérebro humano fetal, 2U da enzima Taq Hifi DNA Polimerase (Invitrogen), em um volume final de reação de 100 µL. As condições das reações foram estabelecidas de acordo com a temperatura de desnaturação dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados. Para a clonagem do gene de *CRABP2* foi utilizado, o seguinte par de oligonucleotídeo: SVO536 / SVO537 (Tabela 3). Após o último ciclo, a reação foi mantida a 72°C por 5 minutos e, a seguir, a 4°C

até o momento da próxima etapa. Os produtos das reações foram analisados por eletroforese em gel de agarose 0,8% em tampão TAE (Tris 40mM, ácido acético glacial 0,11% e EDTA 1mM) e então purificados utilizando o Kit “QIAquick PCR Purification” da QIAGEN.

6.3.2.2. Clonagem do produto de PCR

Os produtos amplificados e purificados foram submetidos a digestão com as enzimas de restrição requeridas, seguindo as condições recomendadas pelo fabricante (New England Biolabs). Os produtos de digestão foram purificados após eletroforese em gel de agarose 0,8%, utilizando o kit “QIAquick Gel Extraction” da QIAGEN. Os fragmentos (vetor e inserto) foram analisados por eletroforese em gel de agarose 0,8-1% para avaliar a pureza e estimar a concentração dos mesmos. A reação de ligação e a introdução dos produtos da reação de ligação em *E. coli* competente foram realizadas como descrito nos itens 6.3.1.4 e 6.3.1.5, respectivamente.

6.3.3. Isolamento de DNA plasmidial a partir de bactéria

6.3.3.1. Em pequena escala – Miniprep

Bactérias contendo os plasmídeos de interesse foram inoculadas em 3 mL de meio LB contendo 50 µg/mL de ampicilina e incubadas a 37°C por aproximadamente 16 horas, sob agitação constante. A cultura foi centrifugada por 1 minuto a 12.000xg. As células foram suspensas em 200 µL de TE (Tris 10 mM pH 8,0, EDTA 1 mM pH 8,0). Foram adicionados 200 µL de solução NaOH/SDS (NaOH 0,2M, SDS 1%), incubando-se por 5 minutos a 37°C. Em seguida, foram adicionados 150 µL de acetato de sódio 3 M pH 4,8 e o tubo foi invertido várias vezes. Após centrifugação por 6 minutos a 12.000xg, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo. A seguir, foi adicionado isopropanol (3 vezes o volume da amostra). Após incubação de 5 minutos a 37°C, o tubo foi centrifugado por 10 minutos a 12.000xg. O

sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado duas vezes com etanol 75%. Depois de seco, o DNA foi suspenso em 50 μ L de TE pH 8,0.

6.3.3.2. Em média escala – Midiprep

Uma colônia de bactéria transformada com o plasmídeo desejado foi inoculada em 50 mL de meio seletivo (LB adicionado de ampicilina 50 μ g/mL) e incubada a 37°C durante a noite, sob agitação. Os plasmídeos foram extraídos e purificados por lise alcalina, utilizando o kit “QIAfilter Plasmid Midi” da QIAGEN, seguindo as orientações do fabricante.

6.3.4. Isolamento de DNA plasmidial a partir de levedura

De uma cultura estacionária da levedura desejada, um volume de 1,5 mL foi centrifugado a 12.000xg por 1 minuto. A seguir, o sobrenadante foi desprezado, as células lavadas com 1 mL de água e suspensas em 200 μ L de tampão de lise (Triton X-100 2%; SDS 1%; NaCl 100 mM; Tris-HCl pH8,0 10 mM; EDTA 1 mM). Foram adicionados 200 μ L de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) e 300 mg de pérolas de vidro. O tubo foi então agitado vigorosamente (vortex) por 5 minutos e centrifugado a 16.000xg por 1 minuto. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo e adicionada de igual volume de isopropanol. Após centrifugação de 10 minutos a 16.000xg o sobrenadante foi removido e o precipitado lavado com 500 μ L de etanol 75% gelado. O precipitado, depois de seco, foi suspenso em 50 μ L de água.

6.3.5. Transformação de leveduras

Uma colônia da levedura desejada foi inoculada em 5 mL de meio adequado e incubada a 30°C sob agitação por toda a noite. 1,5 mL da cultura foram centrifugados na velocidade máxima por 5 segundos. Após descarte do sobrenadante, as células foram

suspensas em 1 mL de solução de acetato de lítio 100 mM e então incubadas por 15 minutos a 30°C. As células foram coletadas por centrifugação e o sobrenadante foi removido. Foram adicionados, na seguinte ordem, 240 µL de PEG 50%, 36 µL de acetato de lítio 1 M, 50 µL de DNA de esperma de salmão, 5 µL de DNA plasmidial, completando-se o volume de reação com 45 µL de água. O tubo foi então agitado vigorosamente (vortex) por 1 minuto e incubado à 25 °C por 30 minutos e em seguida à 42°C por 20 minutos. As células foram centrifugadas na velocidade máxima por 10 segundos. Após o sobrenadante ter sido removido, as células foram suspensas em 200 µL de água estéril e então plaqueadas em meio seletivo apropriado. As placas foram incubadas a 30°C até o aparecimento de colônias.

6.3.6. Transformação de leveduras de alta eficiência

Inicialmente, uma colônia de levedura foi inoculada em 10 mL de meio adequado e incubada a 30°C sob agitação por toda a noite. A partir desta cultura, foi feito o inóculo de $5,0 \times 10^6$ células/mL em 10 mL de meio pré-aquecido a 30°C. As células foram incubadas a 30°C até que a concentração atingisse $2,0 \times 10^7$ células/mL, centrifugadas a 3.000xg por 5 minutos e lavadas com água. Após centrifugação, as células foram suspensas em 600 µL de solução de acetato de lítio 100 mM e incubadas por 15 minutos a 30°C. Coletaram-se novamente as células por centrifugação e removeu-se o sobrenadante. Foram adicionados, na seguinte ordem, 480 µL de PEG 50%, 72 µL de acetato de lítio 1M, 50 µL de DNA de esperma de salmão, 10 µL da biblioteca de cDNA completando-se o volume de reação com 108 µL de água. O tubo foi então agitado vigorosamente (vortex) por 1 minuto e incubado a 30°C por 30 minutos. O choque térmico foi dado incubando-se o tubo a 42°C por 20 minutos, tomando-se cuidado de inverter o tubo a cada 5 minutos para equilíbrio da temperatura. As células foram centrifugadas como descrito acima, suspensas em 2 mL de água, plaqueadas em meio seletivo e incubadas a 30°C até o aparecimento das colônias.

6.3.7. Western blot

As leveduras de interesse foram inoculadas em 5 mL de meio YPD e incubadas a 30°C por 12-16 horas. As culturas foram então normalizadas para $D.O._{600nm}=0,2$ em 20 mL e incubadas a 30°C por 4 horas. Em seguida, as células foram coletadas por centrifugação, o sobrenadante foi desprezado e as células foram lisadas sob agitação em 250 μ L de tampão (Tris HCl pH7,5 20 mM; DTT 2 mM; PMSF 2 mM; coquetel de inibidor de protease; EDTA 2 mM e água q.s.p.) e aproximadamente 5 mg de “glass beads”. A concentração de proteína total foi determinada pelo método de Bradford.

As amostras protéicas foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS (SDS-PAGE) e transferidas para membrana de nitrocelulose. A membrana foi bloqueada à temperatura ambiente por 60 minutos em tampão PBST (PBS 1X, 0.25% Tween-20) contendo 5% de leite desnatado, sob agitação. A membrana foi então incubada por 2 horas à temperatura ambiente com uma diluição adequada de anticorpo em PBST contendo 5% de leite desnatado. Na análise de expressão da proteína de fusão LexA-CRABP2, foi utilizado o anticorpo anti-LexA (Millipore). Posteriormente, a membrana foi lavada 3 vezes por cinco minutos com PBST. A seguir, a membrana foi incubada por 1 hora com anti-IgG de coelho conjugado com peroxidase, em PBST contendo 5% de leite desnatado. Após três novas lavagens de cinco minutos com PBST, a membrana foi tratada com reagentes quimioluminescentes (ECL-Amersham Biosciences) e exposta a filme autorradiográfico.

6.3.8. Rastreamento por duplo-híbrido

O sistema de duplo-híbrido desenvolvido por Fields e Song em 1989 (Fields e Song, 1989) é um método pelo qual interações entre proteínas são identificadas *in vivo* através da

reconstituição da atividade de um fator de transcrição.

Sistema da linhagem L40

Esse sistema é baseado nas propriedades das proteínas Gal4 de levedura e LexA de procarioto e utiliza a linhagem L40 para rastrear uma biblioteca de cDNA clonada em fusão com o domínio de ativação de Gal4 no vetor pACT2 (*LEU2*). Esta linhagem contém os dois marcadores do sistema de duplo-híbrido *HIS3* e *lacZ*. Os clones da biblioteca de cDNA que codificarem proteínas capazes de interagir com a proteína de interesse serão identificados pela capacidade de gerar ativação destes genes repórteres (*HIS3* e *lacZ*).

Inicialmente, o gene da proteína CRABP2 foi clonado no vetor pBTM116 (*TRP1*) para produzir a proteína alvo em fusão com a proteína de ligação ao DNA LexA (pBTM-*CRABP2*). Após a avaliação da correta expressão da proteína de fusão por western blot, o próximo passo foi introduzir nas linhagens L40, já possuindo a proteína de fusão com LexA, o plasmídeo pACT vazio. Os transformantes obtidos foram então testados para verificar a capacidade de causar a ativação dos genes repórteres (*HIS3* e *lacZ*).

Após os testes de expressão e auto-ativação, o rastreamento por duplo-híbrido foi iniciado. Resumidamente, a levedura L40 possuindo o plasmídeo contendo pBTM-*CRABP2* foi transformada com uma biblioteca de cDNA de cérebro fetal humano clonada em fusão com o domínio de ativação da transcrição de Gal4. As colônias que cresceram no meio seletivo para os dois plasmídeos (pBTM116/*TRP1* e pACT/*LEU2*) e para o gene repórter auxotrófico *HIS3* foram então repicados para meio SC -leu,-trp, ausente de qualquer seleção para o gene *HIS3*. Após o crescimento a 30°C, os clones inicialmente isolados foram novamente cultivados em meio SC-leu,-trp,-his. Os transformantes que confirmaram o fenótipo His⁺ foram testados para atividade de β-galactosidase (expressão de *lacZ*). Em seguida, os clones candidatos positivos para a expressão dos genes *HIS3* e *lacZ* foram submetidos a etapa de “plasmid linkage” (ensaio de ligação do plasmídeo) e os genes contidos

nos clones que confirmaram especificidade da interação física foram identificados por seqüenciamento. A confirmação das interações proteína-proteína também foi realizada por outros métodos.

6.3.9. Teste de diluição seriada

As leveduras a serem analisadas foram crescidas a 30°C em 10 mL de meio seletivo até aproximadamente $1-2 \times 10^7$ células/mL. Após centrifugação a 3.000xg por 10 minutos e remoção do meio de cultura, as células foram suspensas na concentração de $2,5 \times 10^8$ células/mL. 200 μ L da suspensão foram transferidos para um poço de microplaca e a suspensão foi diluída seriadamente (1:10) em meio líquido apropriado. Utilizando um pipetador multicanal, 4 μ L da suspensão original e das diluições foram aplicados nos meios de cultura de interesse. A seguir, as placas foram incubadas a 30°C até a observação de crescimento.

6.3.10. Ensaio de β -galactosidase

As linhagens de interesse foram cultivadas a 30°C em 5 mL de meio seletivo até aproximadamente $1-2 \times 10^7$ células/mL. Após centrifugação a 3.000xg por 10 minutos e remoção do meio de cultura, as células foram ressuspensas na concentração de $2,5 \times 10^8$ células/mL. 3 μ L da suspensão foram aplicados sobre uma membrana de nitrocelulose (Amersham Biosciences) sobre meio sólido YPD, e deixados crescer durante uma noite a 30°C. A membrana foi então retirada da placa e colocada sobre um papel alumínio flutuando em nitrogênio líquido com as células voltadas para cima. Após 30 segundos, a membrana foi submergida no nitrogênio líquido por 5 segundos e retirada para descongelar em temperatura ambiente. Um papel de filtro (Whatman) foi colocado em uma placa de petri de 100 mm e umedecido com 1,5mL de Tampão Z (Na_2HPO_4 60 mM, NaH_2PO_4 40 mM, KCl 10 mM,

MgSO₄ 1 mM pH7,0) adicionado de X-gal (0,5 mg/mL). A membrana, com as células voltadas para cima, foi colocada sobre este papel de filtro e incubada a 30°C em câmara úmida até o desenvolvimento de coloração azul.

6.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.4.1. Clonagem de *CRABP2* em vetor pBTM116 e análise da produção da proteína de fusão gerada

Nesse contexto, o gene *CRABP2* foi inicialmente clonado no vetor pBTM116 (Tabela 2), para produzir *CRABP2* em fusão com a proteína LexA (pBTM-*CRABP2*). Para a obtenção da proteína *CRABP2* em fusão com a proteína de ligação ao DNA LexA, o gene que codifica *CRABP2* foi amplificado por PCR utilizando oligonucleotídeos contendo sítios para a enzima de restrição *EcoRI* nas extremidades, gerando um produto de PCR com o tamanho esperado de 514 pb. Após a digestão com *EcoRI*, o fragmento *EcoRI-EcoRI* foi introduzido no sítio *EcoRI* do vetor pBTM116, gerando a construção pBTM-*CRABP2* (Figura 2, Painel A). O Painel B da Figura 2 mostra os tamanhos esperados dos fragmentos gerados após as digestões com as enzimas *PstI* e *EcoRI* combinadas e *SacII* e *HindIII* combinadas. Os fragmentos gerados após a digestão com *PstI* e *EcoRI* são de 4.780, 648, 422 e 343 pb (Figura 2, Painel C, canaleta 2), enquanto que após a digestão com *SacII* e *HindIII*, são de 4.622, 1.065, 516 pb (Figura 2, Painel C, canaleta 3). Assim, a presença do fragmento contendo *CRABP2* e sua orientação correta com relação ao vetor pBTM116 foram confirmados por diagnóstico de restrição.

Uma vez confirmada, a construção plasmidial pBTM-*CRABP2* foi introduzida na linhagem L40. Com o intuito de checar a produção de *CRABP2* com a proteína de fusão LexA, um transformante foi analisado por western blot utilizando anticorpo policlonal anti-

LexA (Millipore). Como pode ser visto na Figura 3, a fusão LexA-*CRABP2* (37 kDa) está presente na canaleta 2, correspondente à linhagem L40 transformada com o plasmídeo pBTM-*CRABP2*. A canaleta 1 corresponde à linhagem L40 sem plasmídeo utilizada como controle negativo. Este resultado confirma a produção da proteína de fusão Lex-*CRABP2* pelo transformante selecionado.

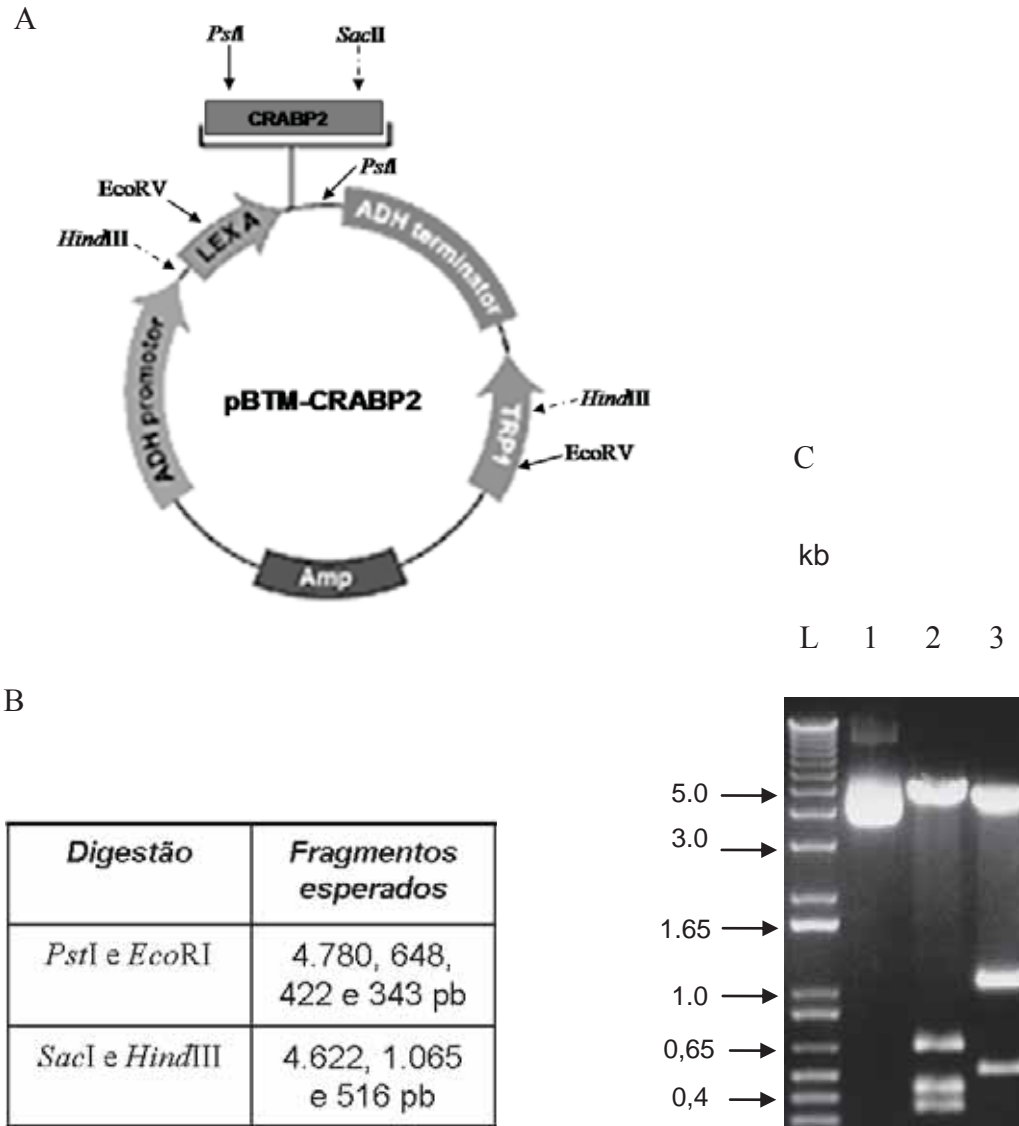


FIGURA 2. Caracterização da construção plasmidial pBTM116 + *CRABP2*. **A:** Mapa simplificado da construção plasmidial pBTM-*CRABP2*. **B:** Tabela com os tamanhos esperados dos fragmentos gerados após a digestão. **C:** Confirmação por diagnóstico de restrição após eletroforese em gel de agarose 0,8%. L: padrão de tamanho molecular “1kb Ladder Plus” (Invitrogen); canaletas 1: pBTM-*CRABP2* sem digerir; canaletas 2: pBTM-*CRABP2* digerido com as enzimas *Pst*I e *Eco*RV (setas cheias no Painel A); canaletas 3: pBTM-*CRABP2* digerido com as enzimas *Sac*I e *Hind*III (setas pontilhadas no Painel A).

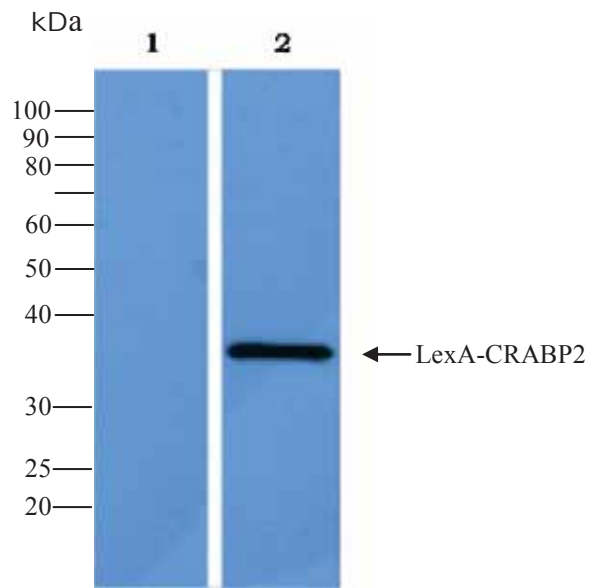


FIGURA 3. Análise da produção da proteína *CRABP2* fusionada com *LexA* na linhagem L40. Lisados da linhagem L40 sem plasmídeo (canaleta 1) e transformada com o plasmídeo pBTM-*CRABP2* (*LexA-CRABP2*) (canaleta 2) foram submetidos a SDS-PAGE 12% e western blot utilizando anticorpo policlonal anti-*LexA* - Millipore (1:2.000). A proteína de fusão *LexA-CRABP2* está indicada por uma seta.

6.4.2. Ensaio de autoativação da isca LexA-CRABP2

Também para esse sistema, a etapa subsequente à checagem da produção da proteína de fusão LexA-CRABP2 consistiu na análise da auto-ativação dos genes repórteres deste sistema de duplo-híbrido. Para tanto, a linhagem L40 já contendo o plasmídeo pBTM-CRABP2 foi transformada com o vetor pACT para testar a capacidade de crescer em meio SC-leu,-trp,-his (repórter *HIS3*) e a atividade da enzima β -galactosidase (repórter *lacZ*). Interações entre proteínas já caracterizadas em nosso laboratório (Thompson *et al.*, 2003), foram utilizadas como controles deste sistema. Assim, a interação entre as proteínas eIF5A e Dys1 foi utilizada como controle de interação positiva forte (++), a interação entre as proteínas eIF5A e Lia1 foi utilizada como controle de interação positiva fraca (+), enquanto que a levedura contendo pBTM-eIF5A + pACT foi usada como controle negativo de interação. Na Figura 4, é possível observar que não houve crescimento dos transformantes contendo pBTM-CRABP2 + pACT em meio SC-leu,-trp,-his e nem houve desenvolvimento de coloração azul no ensaio de β -galactosidase.

Dessa forma, o transformante analisado que expressa a proteína de fusão LexA-CRABP2 e não gera auto-ativação dos genes repórteres do sistema da linhagem L40 foi usado para o rastreamento por duplo-híbrido utilizando uma biblioteca de cDNA de cérebro fetal humano em pACT2.

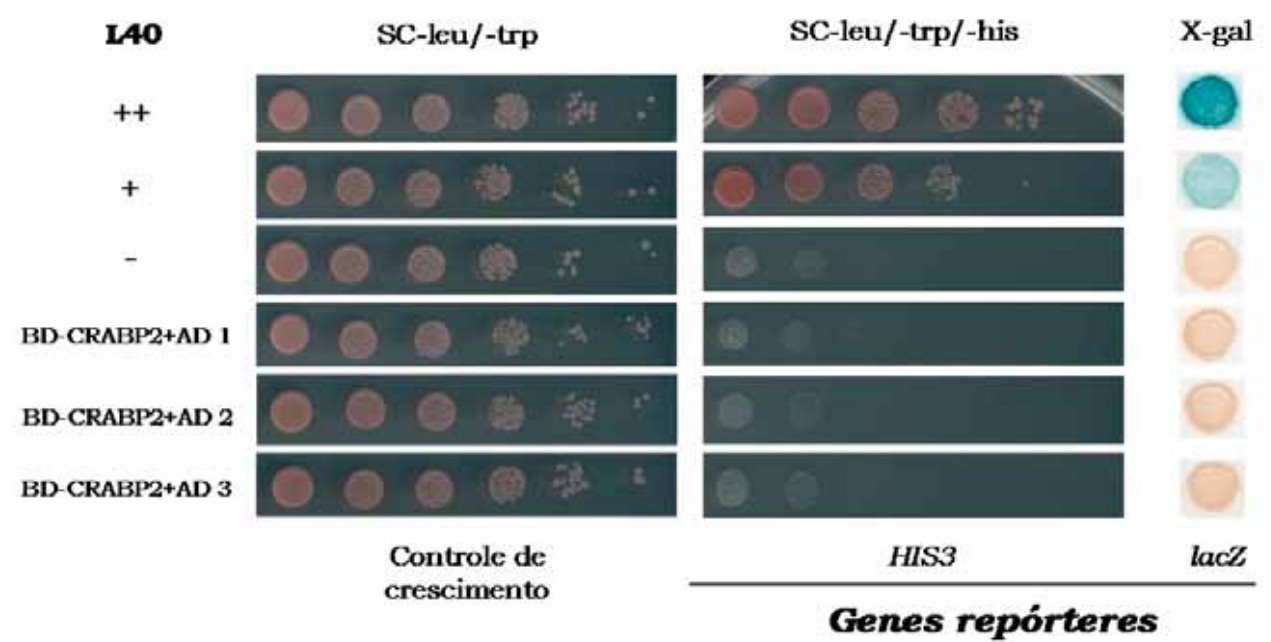


FIGURA 4. Avaliação da expressão dos genes repórteres (*HIS3* e *lacZ*) do sistema de duplo-híbrido da linhagem L40. Células da L40 contendo concomitantemente a construção plasmidial pBTM-*CRABP2* e vetor pACT (transformantes 1 a 3) foram plaqueadas em meio SC-leu,-trp, SC-leu,-trp,-his e ensaiadas para β -galactosidase em membrana de nitrocelulose. A linhagem L40 contendo pBTM-eIF5A+pACT-Dys1 (++) , pBTM-eIF5A+ pACT-Lia1 (+) e pBTM-eIF5A+pACT (-) foram utilizadas como controles positivo forte, positivo fraco e negativo, respectivamente.

6.4.3. Rastreamento de duplo-híbrido pelo sistema da linhagem L40

Confirmação dos clones obtidos (plasmid linkage) e identificação por sequenciamento

A linhagem L40 (VZL86) foi inicialmente transformada com o plasmídeo pBTM-*CRABP2* e, posteriormente, com a biblioteca de cDNA de cérebro fetal humano fusionada ao domínio de ativação de Gal4. As colônias capazes de crescer no meio SC-leu,-trp,-his, seletivo para as marcas presentes nos dois plasmídeos e para o gene repórter *HIS3*, foram selecionadas. Interações entre proteínas já caracterizadas em nosso laboratório (Thompson *et al.*, 2003), foram utilizadas como controles deste sistema. Assim, a interação entre as proteínas eIF5A e Dys1 foi utilizada como controle de interação positiva forte (++) (VZL899), a interação entre as proteínas eIF5A e Lia1 foi utilizada como controle de interação positiva fraca (+) (VZL900), enquanto que a levedura contendo pBTM-eIF5A + pACT (-) (VZL 901) foi usada como controle negativo de interação.

Até o momento, foram rastreados $2,1 \times 10^5$ transformantes neste sistema, dos quais 550 foram inicialmente positivos para His⁺. Os transformantes foram então cultivados em meio SC-leu,-trp. A seleção dos clones positivos para marca His⁺ foi realizada após nova passagem em meio SC-leu,-trp,-his. Desses, 182 transformantes confirmaram a marca His⁺ e foram testados para β-galactosidase. Em seguida, 19 foram selecionados para passar pela etapa do “plasmid linkage” por serem capazes de induzir a expressão do gene repórter *lacZ*. Essa etapa consiste em confirmar a ligação dos plasmídeos com a expressão dos genes repórteres do sistema duplo-híbrido. Para isto, os plasmídeos da biblioteca (*LEU2*) dos clones confirmados foram recuperados e reintroduzidos na linhagem L40 contendo o plasmídeo pBTM-*CRABP2*. Após esse teste, 9 clones confirmaram a ligação dos marcadores His⁺ e β-gal⁺ com a presença do plasmídeo *LEU2* (Figura 5). Assim, após o sequenciamento dos insertos contidos nos

clones identificados, ciclina D3 (CCND3), alfa-macroglobulina 2 (A2M) (2 clones), canal aniônico dependente de voltagem 2 (VDAC2), tubulina alfa 1 (TUBA1), tubulina alfa 2 (TUBA2), tubulina beta (TUBB), fator de ligação ao “enhancer” do gene interleucina 2 (ILF2) e desoxi-hipusina sintase (DHPS) emergiram como ligantes de CRABP2.

Ciclina D3 já foi descrita como uma proteína ligante de CRABP2, o que valida este rastreamento (Despouy *et al.*, 2003). No estudo em questão, também foi observada a interação de ciclina D3 com o receptor RAR α , e ensaios subsequentes sugeriram formação de um complexo ternário CCND3-RAR α -CRABP2, capaz de induzir um aumento da atividade transcricional dependente de RAR (Despouy *et al.*, 2003).

Alfa-macroglobulina 2 é uma proteína plasmática inibidora de proteases, incluindo tripsina, trombina e colagenase (Kan *et al.*, 1985) e transportadora de citocinas (Borth e Luger, 1989; James, 1990). Uma vez que não se conhecem funções citoplasmáticas de A2M e como CRABP2 é uma proteína intracelular (Chytil e Ong, 1987), é mais provável que esta interação física não tenha relevância biológica, sendo portanto, algum tipo de artefato gerado pela produção de uma forma citoplasmática de A2M.

VDAC2 emergiu como um ligante fraco de CRABP2 neste rastreamento. Os canais aniônicos dependentes de voltagem VDACs estão localizados na membrana externa da mitocôndria e têm sido apontados como mediadores da transição da permeabilidade da membrana mitocondrial induzida por cálcio (Shimizu *et al.*, 2001) e indução do estresse oxidativo (Madresh e Hajnoczky, 2001). Cheng *et al.*, 2003 mostraram que VDAC2, especificamente, age como um agente citoprotetor através de sua interação com a proteína pró-morte BAK e subsequente inibição de sua ativação, regulando assim o processo de apoptose dependente da mitocôndria (Cheng *et al.*, 2003). Além disso, foi demonstrado que erastin, um agente anti-câncer seletivo capaz de causar letalidade em células cancerígenas

humanas com mutações em oncogenes HRAS, KRAS ou BRAF, induz morte celular oxidativa dependente da sinalização RAS-RAF-MEK via ligação direta com VDAC2 (Yagoda *et al.*, 2007).

Tanto tubulinas alfa 1 e 2, como a tubulina beta, também emergiram como ligantes de CRABP2 neste rastreamento. As tubulinas são componentes dos microtúbulos, os quais fazem parte do citoesqueleto celular. Interessantemente, além de compor os microtúbulos, estruturas citoplasmáticas, já foi verificada a interação no núcleo de TUBB com uma proteína co-ativadora do receptor RAR, NCOA6 (co-ativador 6 de receptor nuclear) (Goo *et al.*, 2003). Ambas fazem parte de dois complexos de proteínas, ASCOM e ALR/MLL2, envolvidos com ativação da transcrição via metilação de histona H3 em resposta a RAR (Goo *et al.*, 2003 e Issaeva *et al.*, 2007). Assim, a interação de CRABP2 com TUBA1, TUBA2 e TUBB e a participação de TUBB nos complexos de ativação da transcrição de genes, incluindo de receptores nucleares de ácido retinóico, indicam uma participação de tubulina na regulação da transcrição de genes alvos de ácido retinóico.

Outro parceiro físico de CRABP2 revelado neste trabalho foi o fator de ligação ao “enhancer” do gene interleucina 2 (ILF2). O gene *ILF2* codifica uma proteína chamada fator nuclear 45 (NF45), a qual participa na regulação da expressão de interleucina 2 (IL2) (Zhao *et al.*, 2005), uma citocina essencial para a regulação da proliferação de células T (Smith, 1988). Já foi visto que ácido retinóico em níveis fisiológicos estimula a proliferação de células T humanas normais do sangue periférico pelo aumento da produção de IL2 através de mecanismos ainda não conhecidos, envolvendo os receptores RARs (Ertesvag *et al.*, 2002 e Engedal *et al.*, 2006). Além disso, foi observado que ácido retinóico também leva a um aumento da produção de IL2 em linhagem celular derivada de células T humanas HUT-78 (Goto *et al.*, 2008). Entretanto, esses dados contrariam o resultado obtido por Felli e colaboradores em 1991, que mostraram pela primeira vez a influência do ácido retinóico na

expressão de IL2. Neste estudo, foi observado que o ácido retinóico diminuiu a expressão de IL2 em linhagem de linfócitos T derivada de leucemia de células T de adulto (células Jurkat), também via mecanismos envolvendo RARs (Felli *et al.*, 1991). Além disso, estudos *in vivo* têm demonstrado um efeito negativo do ácido retinóico em relação à produção de IL2, uma vez que foi observada uma redução da expressão do gene de IL2 em camundongos na presença de ácido retinóico (Ertesvag *et al.*, 2008) e, ainda, camundongos deficientes de vitamina A demonstraram um aumento da secreção de IL2 (Wiedermann *et al.*, 1993 e Ertesvag *et al.*, 2008). Enfim, todos os resultados citados acima indicam a participação de ácido retinóico na regulação da expressão do gene de interleucina 2 de maneira dependente do tipo celular e modelo utilizado. Assim, o estudo da interação de CRABP2 e NF45 poderá ajudar a entender os mecanismos envolvidos na regulação da expressão de interleucina 2 por ácido retinóico.

A proteína desoxi-hipusina sintase (DHPS) também surgiu como um ligante de CRABP2 neste rastreamento por duplo-híbrido. DHPS é uma enzima essencial para o primeiro passo da modificação pós-traducional do fator de início de tradução (eIF5A), a qual é uma das proteínas estudadas em nosso laboratório. Esta enzima catalisa a transferência do grupo aminobutil da poliamina espermidina para o amino grupo livre de um resíduo específico de lisina no precursor de eIF5A para formar um intermediário contendo o resíduo desoxi-hipusina. O intermediário formado é então hidroxilado pela enzima desoxi-hipusina hidroxilase, completando a síntese de hipusina e conseqüentemente a maturação de eIF5A (Schnier *et al.*, 1991; kang *et al.*, 1993; klier *et al.*, 1993; Park *et al.*, 1993a; Abid *et al.*, 1997; Chen e Liu, 1997). Este achado causou grande surpresa, pois nosso laboratório também estuda o papel do homólogo de eIF5A em *Saccharomyces cerevisisiae*, o que contribuirá para o estudo da relação entre CRABP2 e DHPS em mamífero.

A Figura 5 traz um modelo dos ligantes de CRABP2 identificados por duplo-híbrido este trabalho.

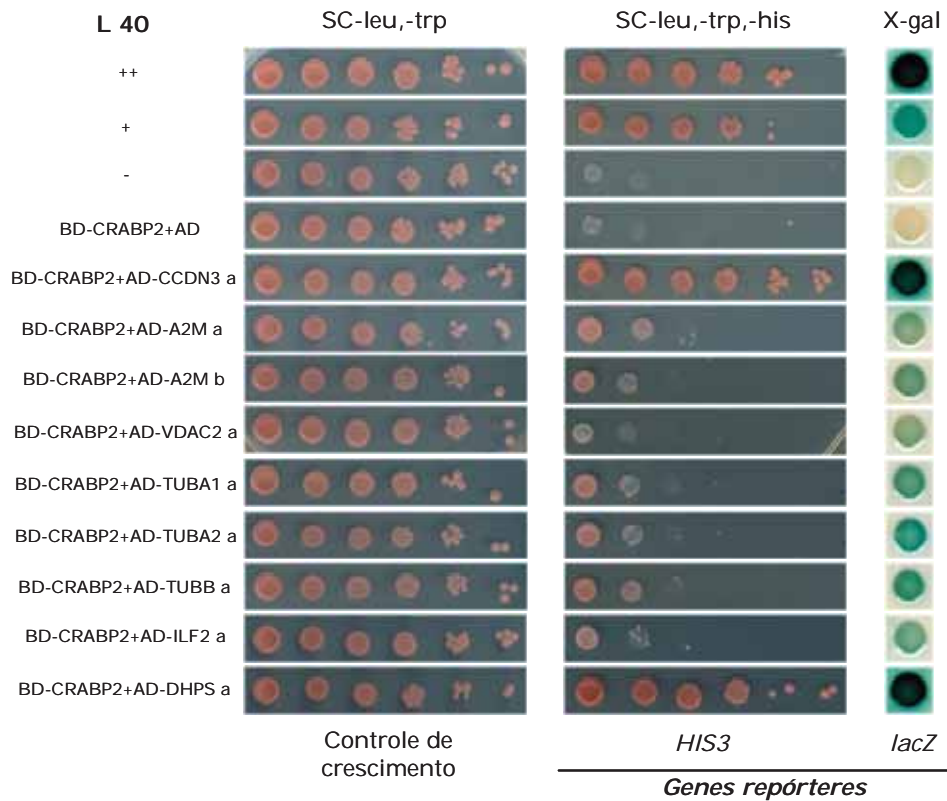


FIGURA 5. Ligantes da proteína CRABP2 revelados no rastreamento de duplo-híbrido utilizando o sistema da linhagem L40. Diluição seriada (1:10) de culturas da linhagem L40 contendo o plasmídeo pBTM-*CRABP2* e o plasmídeo pACT-cloneX (obtido no rastreamento) foram crescidos em meio SC-leu,-trp, SC-leu,-trp,-his e ensaiadas para β -galactosidase em membrana de nitrocelulose. A linhagem L40 contendo pBTM-eIF5A + pACT-Dys1 (++) , pBTM-eIF5A + pACT-Lia1 (+) e pBTM-eIF5A + pACT (-) foram utilizadas como controles positivo forte, positivo fraco e negativo, respectivamente.

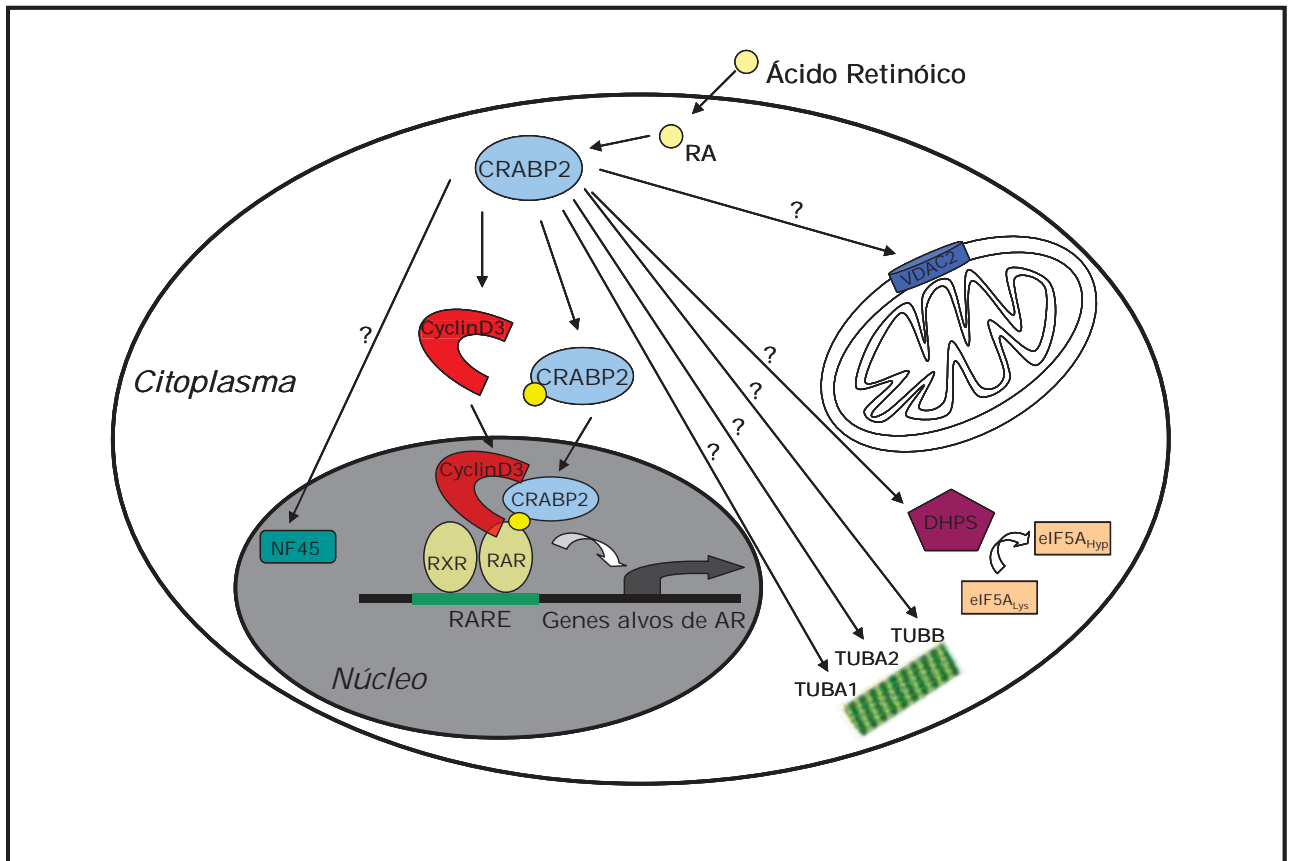


FIGURA 6. Modelo da ação de CRABP2 na célula, incluindo seus novos ligantes identificados neste trabalho. A ciclina D3 já foi descrita como um ligante de CRABP2 previamente, validando nosso rastreamento. O gene *ILF2* codifica NF45, a qual atua como um fator de regulação da produção de interleucina 2, requerida para a proliferação de linfócitos T. Os genes *TUBB*, *TUBA1* e *TUBA2* são genes que codificam para tubulina beta, tubulina alfa 1 e tubulina alfa 2, respectivamente, os quais são componentes dos microtúbulos. VDAC2 é encontrado na membrana externa da mitocôndria e está envolvido na regulação de apoptose. DHPS participa na biossíntese de um aminoácido incomum chamado hipusina, o qual está presente somente em eIF5A e é essencial para sua função.

7. CONCLUSÃO

Ao final do rastreamento, emergiram como possíveis ligantes da proteína CRABP2: ciclina D3; gene *ILF2* que codifica NF45; genes *TUBB*, *TUBA1* e *TUBA2*, que codificam para tubulina beta, tubulina alfa 1 e tubulina alfa 2, respectivamente; VDAC2; DHPS; e alfa-macroglobulina 2 (A2M).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abid, M. R.; Ueda, K.; Miyazaki, M. Novel features of the functional site and expression of the yeast deoxyhypusine synthase. *Biol Signals*, 6:157-65, 1997.
- Astrom, A.; Tavakkol, A.; Pettersson, U.; Cromie, M.; Elder, J. T. and Voorhees, J. J. Molecular cloning of two human cellular retinoic acid-binding proteins (CRABP). *J. Biol. Chem.*, 263:17662-17666, 1991.
- Bartel, P. L. & Fields, S.; Analyzing protein-protein interactions using two-hybrid system. *Methods Enzymol.*, 19:254:241-63, 1995.
- Bast, R.C.; Kufe, D.W.; Pollock, R.E.; Weichselbaum, R.R.; Holland, J.F.; Frei, E. (Eds.) BC Decker Inc; *Cancer Medicine*, 5th ed, 2000.
- Borth, W. and Luger, T. A. Identification of as-macroglobulin as a cytokine binding plasma protein. Binding of interleukin-1 β to "F" α 2-macroglobulin. *J. Blot. Chens.* 264:5818-5825, 1989.
- Boylan, J. F. & Gudas, L. J. Overexpression of the cellular retinoic acid binding protein-I (Crabp-I) results in a reduction in differentiation-specific geneexpression in F9 teratocarcinoma cells. *J. Cell. Biol.*, 112:965-979, 1991.
- Brent, R.; Ptashne, M. A eukaryotic transcriptional activator bearing the DNA specificity of a prokaryotic repressor. *Cell*, 43(3 Pt 2):729-36, 1985.
- Brown, R.; Strathdee, G. Epigenomics and epigenetic therapy of cancer. *Trends Mol. Med.*, 8:S43-S48, 2002.
- Budhu, A. S. & Noy, N. Direct channeling of retinoic acid between cellular retinoic acid-binding protein II and retinoic acid receptor sensitizes mammary carcinoma cells to retinoic acid-induced growth arrest. *Mol. Cell. Biol.*, 22:2632-2641, 2002
- Causier, B. Studying the interactome with the yeast two-hybrid system and mass spectrometry. *Mass Spectrom. Rev.*, 23(5):350-67, 2004.

- Chambon, P. A decade of molecular biology of retinoic acid receptors. *FASEB J.*, 10:940–954, 1996.
- Chen, K. Y. and Liu, A. Y. Biochemistry and function of hypusine formation on eukaryotic initiation factor 5A. *Biol. Signals*, 6:105-9, 1997.
- Cheng, E. H.; Sheiko, T. V.; Fisher, J. K.; Craigen, W. J. and Korsmeyer, S. J. VDAC2 inhibits BAK activation and mitochondrial apoptosis. *Science*, 301:513–517, 2003.
- Cheng, X.; Roberts, R.J. AdoMet-dependent methylation, DNA methyltransferases and base flipping. *Nucleic Acids Res.*, 29(18):3784-95, 2001.
- Chomienne, C.; Fenaux, P. and Degos, L. Retinoid differentiation therapy in promyelocytic leukemia. *FASEB J.*, 10:1025–1030, 1996.
- Christman, J.K. 5-Azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine as inhibitors of DNA methylation: mechanistic studies and their implications for cancer therapy. *Oncogene*, 21:5483-5495, 2002.
- Chytil, F. and Ong, D. E. Intracellular vitamin A-binding proteins. *Annu. Rev. Nutr.*, 7:321-335, 1987.
- Dawson, M.I.; Okamura, W.H. (Eds.) *Chemistry and Biology of Synthetic Retinoids*. Boca Raton, FL: CRC, 1990.
- DeLuca, L. M. Retinoids and their receptors in differentiation, embryogenesis, and neoplasia. *FASEB J.*, 5:2924–2933, 1991.
- Delva, L.; Bastie, J. N.; Rochette-Egly, C.; Kraiba, R.; Balitrand, N.; Despouy, G.; Chambon, P. and Chomienne, C. Physical and functional interactions between cellular retinoic acid binding protein II and the retinoic acid-dependent nuclear complex. *Mol. Cell. Biol.*, 19:7158–7167, 1999.

- Despouy, G.; Bastie, J. N.; Deshaies, S.; Balitrand, N.; Mazharian, A.; Rochette-Egly, C., Chomienne, C. and Delva, L. Cyclin D3 is a cofactor of retinoic acid receptors, modulating their activity in the presence of cellular retinoic acid-binding protein II. *J. Biol. Chem.*, 278:6355-6362, 2003.
- Dong, D.; Ruuska, S. E.; Levinthal, D. J. and Noy, N. Distinct roles for cellular retinoic acid-binding proteins I and II in regulating signaling by retinoic acid. *J. Biol. Chem.*, 274:23695–23698, 1999.
- Donovan, M.; Olofsson, B.; Gustafson, A. N.; Dencker, L. and Eriksson. The cellular retinoic acid binding proteins. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.*, 53:459-465, 1995.
- Ertesvag, A.; Endegal, N.; Naderi, S. and Blomhoff, H. K. Retinoic acid stimulates the cell cycle machinery in normal T cells: involvement of retinoic acid receptor-mediated IL-2 secretion. *The Journal of Immunology*, 169:5555-5563, 2002.
- Ertesvag, A.; Austenaa, L. M. I.; Carlsen, H.; Blomhoff, R. and Blomhoff, H. K. Retinoic acid inhibits in vivo interleukin-2 gene expression and T-cell activation in mice. *Immunology*, 126:514–522, 2008.
- Esteller, M. Epigenetic lesions causing genetic lesions in human cancer: promoter hypermethylation of DNA repair genes. *Eur. J. Cancer*, 36:2294-300, 2000.
- Esteller, M.; Tortola, S.; Toyota, M.; Capella, G.; Peinado, M.A.; Baylin, S.B.; Herman, J.G. Hypermethylation-associated inactivation of p14(ARF) is independent of p16(INK4a) methylation and p53 mutational status. *Cancer Res.*, 60(1):129-33, 2000.
- Esteller, M.; Corn, P.G.; Baylin, S.B.; Herman, J.G. A gene hypermethylation profile of human cancer. *Cancer Res.*, 61(8):3225-9, 2001.
- Feinberg, A. P. Cancer epigenetics takes center stage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98:392-4, 2001.

- Felli, M. P.; Vacca, A.; Meco, D.; Screpanti, I.; Farina, A. R.; Maroder, M.; Martinotti, S.; Petrangeli, E.; Frati, L. and Gulinoi, A. Retinoic acid-induced down-regulation of the interleukin-2 promoter via cis-regulatory sequences containing an octamer motif. *Mol. Cell. Biol.*, 11(9):4771-4778, 1991.
- Fields, S.; Song, O. A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature*, 340(6230):245-6, 1989.
- Fields, S.; Sternglanz, R. The two-hybrid system: an assay for protein-protein interactions. *Trends Genet.*, 10(8):286-92, 1994.
- Gietz, I.D. Yeast two-hybrid system screening. *Methods Mol. Biol.*, 313: 345-72, 2005.
- Goo, Y. H.; Sohn, Y. C.; Kim, D. H.; Kim, S. W.; Kang, M. J.; Jung, D. J.; Kwak, E.; Barlev, N. A.; Berger, S. L.; Chow, V. T.; Roeder, R. G.; Azorsa, D. O.; Meltzer, P. S.; Suh, P. G.; Song, E. J.; Lee, K. J.; Lee, Y. C. and Lee, J. W. Activating signal cointegrator 2 belongs to a novel steady-state complex that contains a subset of trithorax group proteins. *Mol. Cell. Biol.*, 23(1):140-149, 2003.
- Goto, S.; Okada, N.; Kaneko, A. and Isemura, M. Different Effects of *all-trans*-retinoic acid on phorbol ester-stimulated and phytohemagglutinin-stimulated interleukin-2 expression in human T-cell lymphoma HUT-78 cells. *Cell Structure and Function*, 33:13-19, 2008.
- Greenman, J.; Homer, J.J.; Stafford, N.D. Markers in cancer of the larynx and pharynx. *Clin. Otolaryngol.*, 25(1):9-18, 2000.
- Hasegawa, M.; Nelson, H.H.; Peters, E.; Ringstrom, E.; Posner, M.; Kelsey, K.T. Patterns of gene promoter methylation in squamous cell cancer of the head and neck. *Oncogene*, 21:4231-4236, 2002.
- Hendrich, B.; Bird, A. Identification and characterization of a family of mammalian methyl-CpG binding proteins. *Mol. Cell Biol.*, 18(11):6538-47, 1998.
- Hong, W. K.; Lippman, S. M.; Itri, L M.; Karp, D. D.; Lee, J. S.; Byers, R. M.; Schantz, S. S.;

- Kramer, A. M.; Lotan, R.; Peters, L. L.; Dimery, I.; Brown, B. W. and Goepfert, H. Prevention of second primary tumors with isotretinoin in squamous cell carcinoma of the head and neck. *N. Engl. J. Med.*, 323:795-801, 1990.
- Hope, I.A.; Struhl, K. Functional dissection of a eukaryotic transcriptional activator protein, GCN4 of yeast. *Cell*, 46(6):885-94, 1986.
- Issaeva, I.; Zonis, Y.; Rozovskaia, T.; Orlovsky, K.; Croce, C. M.; Nakamura, T.; Mazo, A.; Eisenbach, L. and Canaani, E. Knockdown of ALR (MLL2) reveals ALR target genes and leads to alterations in cell adhesion and growth. *Mol Cell Biol.*, 27:1889–1903, 2007.
- James, K. Interactions between cytokines and α_2 -macroglobulin. *Immanol. Today*, 11:163-166, 1990.
- Jetten, A. M.; Kim, J. S.; Sacks, P. G.; Rearick, J. I.; Lotan, D.; Hong, W. K. and Lotan, R. Suppression of growth and squamous cell differentiation markers in cultured human head and neck squamous carcinoma cells by α -all trans retinoic acid. *Int. J. Cancer*, 45:195-202, 1990.
- Jing, Y. K.; Waxman, S. and Miray-Lopez, R. The cellular retinoic acid binding protein II is a positive regulator of retinoic acid signalling in breast cancer cells. *Cancer Res.*, 57:1668–1672, 1997.
- Jones: A.; Laird: W. Cancer epigenetics comes of age. *Nat. Genet.*, 21:163-167, 1999.
- Kan, C. C.; Solomon, E.; Belt, K. T.; Chain, A. C.; Hiorns, L. R. and G. Fey. Nucleotide sequence of cDNA Encoding Human Alpha 2-Macroglobulin and Assignment of the Chromosomal Loci. *Proceedings of the National Academy of Science*, 82(8):2282-2286, 1985.
- Kang, H. A.; Schwelberger, H. G. and Hershey, J. W. Translation initiation factor eIF-5A, the hypusine-containing protein, is phosphorylated on serine in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, 268(20):14750-14756, 1993.

- Keegan, L.; Gill, G.; Ptashne, M. Separation of DNA binding from the transcription-activating function of a eukaryotic regulatory protein. *Science*, 231(4739):699-704, 1986.
- Klier, H.; Wohl, T.; Eckerskorn, C.; Magdolen, V. and Lottspeich F. Determination and mutational analysis of the phosphorylation site in the hypusine-containing protein Hyp2p. *FEBS Lett.*, 334(3): 360-364, 1993.
- Kraemer, K. H.; DiGiovanna, J. J.; Moshell, A. N.; Tarone, R. E. and Peck, G. L. Prevention of skin cancer in xeroderma pigmentosum with the use of oral isotretinoin. *N. Engl. J. Med.*, 318:1633-1637, 1988.
- Kresty, L.A.; Mallery, S.R.; Knobloch, T.J.; Song, H.; Lloyd, M.; Casto, B.C.; Weghorst, C.M. Alterations of p16(INK4a) and p14(ARF) in patients with severe oral epithelial dysplasia. *Cancer Res.*, 62(18):5295-300, 2002.
- Kulkarni, V.; Saranath, D. Concurrent hypermethylation of multiple regulatory genes in chewing tobacco associated oral squamous cell carcinomas and adjacent normal tissues. *Oral Oncology*, 40:145-153, 2004.
- Kwong, J.; Lo, K.W.; To, K.F.; Teo, M.; Johnson, J.; Huang, D.P. Promoter hypermethylation of multiple genes in nasopharyngeal carcinoma. *Clin. Cancer Res.*, 8:131-137, 2002.
- MacDonald, P. N. Two-hybrid systems: methods and protocols. *Methods in molecular biology*, Humana Press, 177
- Maden, M. Vitamin A in embryonic development. *Nutrition Rev.*, 52:3-12, 1994.
- Madesh, M. and Hajnoczky, G. VDAC-dependent permeabilization of the outer mitochondrial membrane by superoxide induces rapid and massive cytochrome c release. *J. Cell. Biol.* 155:1003–1015, 2001.
- Manor, D.; Shmidt, E. N.; Budhu, A.; Flesken-Nikitin, A.; Zgola, M.; Page, R.; Nikitin, A. Y. and Noy, N. Mammary carcinoma suppression by cellular retinoic acid binding protein-II. *Cancer Res.*, 63:4426-4433, 2003

- Napoli, J. L. Interactions of retinoid binding proteins and enzymes in retinoid metabolism. *Biochim. Biophys.*
- Ogi, K.; Toyota, M.; Ohe-Toyota, M.; Tanaka, N.; Noguchi, M.; Sonoda, T.; Kohama, G.; Tokino, T. Aberrant methylation of multiple genes and clinicopathological features in oral squamous cell carcinoma. *Clin. Cancer Res.*, 8:3164-3171, 2002.
- Park, M. H.; Wolffi, E. C. and Folk, J. E. Hypusine: Its post-translational formation in eukaryotic initiation factor 5A and its potential role in cellular regulation. *Biofactors*, 4:95-104, 1993a.
- Pastorino, U.; Infante, M.; Maioli, M.; Chiesa, G.; Buyse, M.; Pirket, P.; Rosementz, N.; Clerici, M.; Soresi, E.; Valente, M.; Belloni, P. A. and Ravasi, G. Adjuvant treatment of stage I lung cancer with high-dose vitamin A. *J. Clin. Oncol.*, 11:1216-1222, 1993.
- Ransohoff, D.F. Cancer. Developing molecular biomarkers for cancer. *Science*, 299(5613):1679-80, 2003.
- Rosas, S.L.; Koch, W.; Da Costa Carvalho, M.G.; Wu, L.; Califano, J.; Westra, W.; Jen, J.; Sidransky, D. Promoter hypermethylation patterns of p16; O6-methylguanine-DNA-methyltransferase; and death-associated protein kinase in tumors and saliva of head and neck cancer patients. *Cancer Res.*, 61:939-942, 2001.
- Rual, J. F.; Venkatesan, K.; Hao, T.; Hirozane-Kishikawa, T.; Dricot, A.; Li, N.; Berriz, G. F.; Gibbons, F. D.; Dreze, M.; Ayivi-Guedehoussou, N.; Klitgord, N.; Simon, C.; Boxem, M.; Milstein, S.; Rosenberg, J.; Goldberg, D. S.; Zhang, L. V.; Wong, S. L.; Franklin, G.; Li, S.; Albala, J. S.; Lim, J.; Fraughton, C.; Llamasas, E.; Cevik, S.; Bex, C.; Lamesch, P.; Sikorski, R. S.; Vandenhaute, J.; Zoghbi, H. Y.; Smolyar, A.; Bosak, S.; Sequerra, R.; Doucette-Stamm, L.; Cusick, M. E.; Hill, D. E.; Roth, F. P. and Vidal, M. Towards a proteome-scale map of the human protein-protein interaction network. *Nature*, 437(7062):1173-1178, 2005.

- Schnier, J.; Schwelberger, H. G.; Smit-McBride, Z.; Kang, H. A. and Hershey, J. W. Translation initiation factor 5A and its hypusine modification are essential for cell viability in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.*, *11*:3105-3114, 1991.
- Sessler, R. J. and Noy, N. A ligand-activated nuclear localization signal in cellular retinoic acid binding protein-II. *Mol. Cell.*, *18*:343-353, 2005.
- Shimizu, S.; Matsuoka, Y.; Shinohara, Y.; Yoneda, Y. and Tsujimoto, Y. Essential role of voltage-dependent anion channel in various forms of apoptosis in mammalian cells. *J. Cell. Biol.* *152*:237–250, 2001.
- Smiraglia, D.J.; Plass, C. The study of aberrant methylation in cancer via restriction landmark genomic scanning. *Oncogene*, *21*:5414-5426, 2002.
- Smith, K. A. Interleukin-2: inception, impact, and implications. *Science*, *240*:1169-1176, 1988.
- Stryer, L. Biochemistry, 3rd edit., W. H. Freeman and Company, New York, 1988.
- Thompson, G. M.; Cano, V. S. and Valentini, S. R. Mapping eIF5A binding sites for Dys1 and Lia1: in vivo evidence for regulation of eIF5A hypusination. *FEBS Lett.*, *555*(3):464-468, 2003.
- Vettermann, O.; Siegenthaler, G.; Winter, H. and Schweizer, J. Retinoic acid signaling cascade in differentiating murine epidermal keratinocytes: alterations in papilloma- and carcinoma-derived cell lines. *Mol. Carcinog.*, *20*:58–67, 1997.
- Wiedermann, U.; Hanson, L. A.; Kahu, H. and Dahlgren, U. I. Aberrant T-cell function *in vitro* and impaired T-cell dependent antibody response in vivo in vitamin A-deficient rats. *Immunology*, *80*:581-586, 1993.
- Worm, J.; Guldberg: DNA methylation: an epigenetic pathway to cancer and a promising target for anticancer therapy. *J. Oral Pathol. Med.*, *31*:443-449, 2002.
- Yagoda, N.; von Rechenberg, M.; Zaganjor, E.; Bauer, A. J.; Yang, W. S.; Fridman, D. J.;

Wolpaw, A. J.; Smukste, I.; Peltier, J. M.; Boniface, J. J.; Smith, R.; Lessnick, S. L.; Sahasrabudhe, S. and Stockwell, B. R. RAS-RAF-MEK-dependent oxidative cell death involving voltage-dependent anion channels. *Nature* 447:864–868, 2007.

Zhao, G.; Shi, L.; Qiu, D.; Hu, H. and Kao, P. N. NF45/ILF2 tissue expression, promoter analysis, and interleukin-2 transactivating function. *Exp. Cell. Res.*, 305:312-323, 2005.