

CARLOS EDUARDO BRANTIS DE CARVALHO

Busca de parceiros físicos por duplo-híbrido
das proteínas ADAM23 e MX1, codificadas
por genes metilados em câncer de cabeça e
pescoço

Dissertação apresentada ao Instituto de
Química, Universidade Estadual
Paulista - UNESP, como parte dos
requisitos para a obtenção do título de
Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Sandro Roberto Valentini
Co-orientador: Prof. Dr. Cleslei Fernando Zanelli

Araraquara
2009

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos integrantes da Família Brantis, que se esforçaram para me proporcionar uma boa educação e sempre respeitaram e incentivaram as minhas decisões.

AGRADECIMENTOS

Aos meus avós, por serem a razão do meu viver e minha fonte de motivação, força e coragem.

Aos meus pais, pelo dom da vida e pelo crescimento proporcionado.

Aos meus familiares, pelo amor, carinho e apoio incondicionais.

Ao professor Sandro, pela oportunidade de desenvolver este trabalho, pela orientação, pelo estímulo de sempre ir além e pela grande amizade.

Ao professor Cleslei, pela excepcional co-orientação.

Aos professores Maria Célia Bertolini, do IQ-UNESP, Flávio Henrique da Silva, da UFSCAR, Paula Rahal, do IBILCE-UNESP, pela participação e contribuição na banca de qualificação deste trabalho.

Aos companheiros de laboratório, Ana Beatriz, Ana Paula, Camila, Diana, Daniella, Danuza, Éric, Fábio, Hermano, Juliana, Laura, Luciano, Mariana, Paulo, Rodolfo, Tatiana, Veridiana e Wagner pelo convívio e aprendizado diário.

Às técnicas Danieli, Tamires, Maiara, Bruna e Érika pelo suporte nas atividades laboratoriais.

Aos funcionários da FCF-UNESP e do IQ-UNESP.

À FCF-UNESP, FAPESP e CNPq, pelo apoio financeiro e institucional para a realização desse trabalho.

Aos amigos Adelino, Adolfo, Paulo, Sandro e Valcimar, pelo companheirismo incondicional, pelas conversas, pelas festas e pelo aprendizado que me proporcionaram.

Aos amigos, pela companhia e dedicação nos mais diversos momentos vividos.

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 identificar possíveis marcadores moleculares para o diagnóstico, prognóstico e tratamento de tumores, além de possibilitar a descoberta de fatores importantes no processo biológico do câncer. Neste sentido, ao estudar o perfil diferencial de metilação de genes em carcinomas de células escamosas de cabeça e pescoço, o gene *MX1* foi identificado como diferencialmente expresso. Correlação também foi encontrada entre o silenciamento de *ADAM23* e estágios tardios da progressão tumoral neste tipo de câncer. Dessa forma, o presente estudo envolveu a identificação de ligantes celulares das proteínas *ADAM23* e *MX1* por meio de rastreamentos de duplo-híbrido, usando bibliotecas de cDNA de cérebro fetal humano. Inicialmente, foi realizado rastreamento com os domínios desintegrina e rico em cisteína (DIS-ACR) de *ADAM23*, com um total de $5,1 \times 10^5$ transformantes obtidos, dos quais somente 1 foi confirmado pelo ensaio de “plasmid linkage”. O candidato confirmado pelo “plasmid linkage”, identificado como *SPRY1*, foi considerado como falso positivo por ser uma proteína estritamente citoplasmática, não podendo, portanto, interagir fisicamente com os domínios DIS-ACR de *ADAM23*, que são extracelulares. Ainda, foi realizado rastreamento com a proteína *MX1*, que resultou em aproximadamente $1,0 \times 10^6$ transformantes, dos quais 74 foram confirmados pelo ensaio de duplo-híbrido e codificam para 9 ligantes já conhecidos e 21 ligantes prováveis de *MX1*. Entre esses ligantes prováveis estão proteínas que já haviam sido descritas como ligantes de *MX1*, incluindo a própria proteína *MX1*, o que valida os resultados obtidos com este rastreamento. Além disso, grande parte dos ligantes identificados são fatores envolvidos no processo de SUMOilação de proteínas, na formação de corpúsculos nucleares denominados PML-NB e uma série de proteínas relacionadas ao controle da transcrição e apoptose. Estes resultados ampliam o conhecimento sobre os ligantes físicos de *MX1* na célula e sugerem vias de sinalização nas quais *MX1* pode atuar, além de dar suporte à idéia de que *MX1* possui um papel importante no controle da proliferação celular, como sugerido pelos resultados de metilação de *MX1*.

ABSTRACT

The methylation of CpG islands at regulatory regions of various genes has been described as an important process for the silencing of tumor suppressor genes and is directly involved in the carcinogenesis of a series of tumors. The study of these methylation-affected genes in tumors aims at identifying possible molecular markers for diagnostic, prognostic and treatment of such tumors, besides making possible the discovery of factors important for cancer biology. On this purpose, the study of differential pattern of gene methylation in head and neck squamous cell carcinoma identified the gene *MX1* as differentially methylated. Together with this result, it was found a correlation between *ADAM23* silencing and late stages of tumor progression in this type of cancer. In order to identify cellular ligands of *ADAM23* and *MX1*, we performed two-hybrid screenings using fetal brain cDNA libraries. Initially, a screening with the disintegrin and cystein rich (DIS-ACR) domains of *ADAM23* was accomplished, with an amount of $5,1 \times 10^5$ transformants obtained, out of which just one was confirmed by plasmid linkage assay and identified as *SPRY1*. However, it was considered a false positive since this protein is restricted to the cytoplasmatic compartment and, therefore, it may not physically bind the DIS-ACR domains of *ADAM23*, known to be extracellular. Additionally, a screening with the *MX1* protein was performed, resulting in approximately 1.0×10^6 transformants, out of which 74 were confirmed by two-hybrid assay and revealed 9 already known and 21 putative ligands of *MX1*. Among the putative ligands there are proteins previously described as *MX1* ligands, including *MX1* itself, corroborating the results obtained in our screening. Moreover, most of the identified ligands are factors involved in protein SUMOylation, PML-NB assembly and proteins that are related to transcriptional control and apoptosis. The results presented here extend the knowledge about *MX1* binding partners and suggest the signaling pathways in which *MX1* may act. They also give support to the idea that *MX1* exerts an important role in cell proliferation control, as suggested by the methylation results.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Esquema da organização estrutural dos domínios da proteína ADAM23 de humanos.	22
Figura 2.	Esquema da organização estrutural da proteína MX1 de humanos e de outras GTPases Dinaminas.	23
Figura 3.	Esquema do sistema de duplo-híbrido utilizado para análise de interação proteína-proteína.	24
Figura 4.	Caracterização da construção plasmidial pBTM116-AMP-ADAM23 _{DIS-ACR} e teste de autoativação.	56
Figura 5.	Caracterização da construção plasmidial pDEST32-ADAM23 _{DIS-ACR} e teste de autoativação.	57
Figura 6.	Avaliação da expressão dos genes repórteres (<i>HIS3</i> , <i>URA3</i> e <i>lacZ</i>) dos clones selecionados com a isca BD-ADAM23 _{DIS-ACR} .	58
Figura 7.	Caracterização da construção plasmidial pDEST32-MX1 e teste de autoativação.	59
Figura 8.	Caracterização da construção plasmidial pBTM116-KAN-MX1, confirmação da expressão e teste de autoativação.	60
Figura 9.	Avaliação da expressão dos genes repórteres (<i>HIS3</i> e <i>lacZ</i>) dos clones selecionados após transformação com a construção plasmidial pBTM116-AMP-PUB1 (A) ou com o vetor plasmidial pRS314 (B).	62
Figura 10.	Avaliação da expressão dos genes repórteres (<i>HIS3</i> e <i>lacZ</i>) de um clone representativo de cada ligante selecionado com a isca LexA-MX1.	63
Figura 11.	Diagrama de grupos dos ligantes prováveis de MX1 de acordo com dados de ontologia genética.	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Vetores e construções plasmidiais utilizados neste estudo.	27
Tabela 2.	Leveduras utilizadas neste estudo.	30
Tabela 3.	Oligonucleotídeos utilizados neste estudo.	32
Tabela 4.	Ligantes prováveis de MX1 identificados neste estudo.	61
Tabela 5.	Análise de ontologia genética dos ligantes prováveis de MX1.	64

ABREVIATURAS

°C	graus Celcius
µg	micrograma
µF	microFaraday
µL	microlitro
Ω	Ohm
BSA	soroalbumina bovina
cDNA	DNA complementar
C-terminal	carboxi-terminal
DMSO	dimetilssulfóxido
DNA	ácido desoxirribonucléico
dNTPs	mistura de desoxirribonucleotídeos trifosfatados (dATP, dCTP, dGTP e dTTP)
D.O.	densidade ótica
DTT	ditiotreitól
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
5-FOA	ácido 5-fluoroótico
IPTG	isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo
kb	quilobase
kDa	quilodalton
kV	quilovolt
LB	meio Luria-Bertani
M	molar

ABREVIATURAS

mL	mililitro
mM	milimolar
ng	nanograma
nm	nanômetro
N-terminal	amino-terminal
PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida
pb	pares de bases
PBS	solução salina tamponada com fosfato
PBST	PBS com Tween 20
PCI	fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (24:25:1)
PCR	“Polymerase Chain Reaction” (reação em cadeia de polimerase)
PEG	polietilenoglicol
pH	potencial hidrogeniônico
PMSF	fluoreto de fenilmetilsulfonila
PLAC	solução de inibidores de proteases (pepstatina, leupeptina, aprotinina e quimostatina)
q.s.p.	quantidade suficiente para
RNA	ácido ribonucléico
RNase	ribonuclease
SC	meio sintético completo para levedura
SDS	dodecil sulfato de sódio
TAE	Tris-acetato EDTA
Tris	tris-hidroximetilaminometano

ABREVIATURAS

Triton X-100	polietilenoglicol-terc-octilfenil éter
Tween 20	monolaurato de polioxietilenosorbitana
U	unidade enzimática
UAS	“upstream activation sequence”
V	volt
YNB	“yeast nitrogen base” (base nitrogenada para levedura)
YPD	“yeast extract, peptone, dextrose” (extrato de levedura, peptona, glicose - meio rico para levedura)
xg	aceleração gravitacional
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactosídeo

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
1.1. CÂNCER DE CABEÇA E PESCOÇO E METILAÇÃO DE DNA	13
1.2. A PROTEÍNA ADAM23.....	15
1.3. A PROTEÍNA MX1	17
1.4. SISTEMA DE DUPLO-HÍBRIDO EM LEVEDURA.....	19
2. OBJETIVOS	25
2.1. OBJETIVO GERAL	25
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	25
2.2.1. IDENTIFICAR PROTEÍNAS LIGANTES DE ADAM23 POR DUPLO-HÍBRIDO	25
2.2.2. IDENTIFICAR PROTEÍNAS LIGANTES DE MX1 POR DUPLO-HÍBRIDO	25
3. MATERIAL E MÉTODOS	27
3.1. MATERIAL.....	27
3.2. MEIOS DE CULTURA	33
3.3. MANIPULAÇÃO DE BACTÉRIAS.....	33
3.3.1. TRANSFORMAÇÃO QUÍMICA DE <i>E. coli</i>	33
3.3.2. ELETROPORAÇÃO DE <i>E. coli</i>	34
3.4. MANIPULAÇÃO DE LEVEDURAS	34
3.4.1. TRANSFORMAÇÃO DE ALTA EFICIÊNCIA DE <i>S. cerevisiae</i>	34
3.5. MANIPULAÇÃO DE DNA.....	35
3.5.1. ISOLAMENTO DE DNA PLASMIDIAL DE BACTÉRIA (MINI PREPARAÇÃO)	35
3.5.2. ISOLAMENTO DE DNA PLASMIDIAL DE LEVEDURA	35
3.5.3. ELETROFORESE DE DNA EM GEL DE AGAROSE	36
3.5.4. ISOLAMENTO DE FRAGMENTOS DE DNA DE GEL DE AGAROSE	36
3.5.5. AMPLIFICAÇÃO DE DNA POR PCR.....	36
3.5.6. MANIPULAÇÃO ENZIMÁTICA DE DNA	36
3.5.7. SEQUENCIAMENTO DE DNA.....	37
3.6. CLONAGEM UTILIZANDO O SISTEMA GATEWAY (INVITROGEN)	37
3.6.1. GERAÇÃO DO CLONE DE ENTRADA	37
3.6.2. GERAÇÃO DO CLONE DESTINO	37
3.7. ANÁLISE DE PROTEÍNAS	38
3.7.1. QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS.....	38
3.7.2. SEPARAÇÃO DE PROTEÍNAS POR SDS-PAGE	38
3.7.3. COLORAÇÃO DE PROTEÍNAS POR “COOMASSIE BLUE”	38

3.7.4. WESTERN BLOT	38
3.8. RASTREAMENTO POR DUPLO-HÍBRIDO	39
3.8.1 SISTEMA DA LINHAGEM MaV203 (ProQuest, INVITROGEN)	39
3.8.2. SISTEMA DA LINHAGEM L40.....	40
3.8.3. ANÁLISE DE FENÓTIPO DE CRESCIMENTO	40
3.8.4. ENSAIO DE β -GALACTOSIDASE	41
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	42
4.1. RASTREAMENTO DE DUPLO-HÍBRIDO UTILIZANDO A PROTEÍNA ISCA	
ADAM23 _{DIS-ACR}	42
4.1.1. RASTREAMENTO DE DUPLO-HÍBRIDO PELO SISTEMA DA LINHAGEM L40	42
4.1.1.1. CLONAGEM DE ADAM23 _{DIS-ACR} NO VETOR PLASMIDIAL DE DUPLO-HÍBRIDO	
pBTM116-AMP	42
4.1.1.2. ENSAIO DE AUTO-ATIVAÇÃO DA ISCA	43
4.1.2. RASTREAMENTO DE DUPLO-HÍBRIDO PELO SISTEMA ProQuest.....	43
4.1.2.1. CLONAGEM DE ADAM23 _{DIS-ACR} NO VETOR PLASMIDIAL DE DUPLO-HÍBRIDO	
pDEST32.....	44
4.1.2.2. ENSAIO DE AUTOATIVAÇÃO DA ISCA.....	45
4.1.2.3. RASTREAMENTO DE DUPLO-HÍBRIDO COM A ISCA BD-ADAM23 _{DIS-ACR}	46
4.2. RASTREAMENTO DE DUPLO-HÍBRIDO UTILIZANDO A PROTEÍNA ISCA MX1	47
4.2.1. RASTREAMENTO DE DUPLO-HÍBRIDO PELO SISTEMA ProQuest.....	47
4.2.1.1. CLONAGEM DE MX1 NO VETOR PLASMIDIAL DE DUPLO-HÍBRIDO pDEST32	47
4.2.1.2. ENSAIO DE AUTOATIVAÇÃO DA ISCA.....	48
4.2.1.3. RASTREAMENTO DE DUPLO-HÍBRIDO COM A ISCA BD-MX1	48
4.2.2. RASTREAMENTO DE DUPLO-HÍBRIDO PELO SISTEMA DA LINHAGEM L40	49
4.2.2.1. CLONAGEM DE MX1 NO VETOR PLASMIDIAL DE DUPLO-HÍBRIDO	
pBTM116-KAN	49
4.2.2.2. ENSAIOS DE EXPRESSÃO E AUTOATIVAÇÃO DA ISCA	50
4.2.2.3. RASTREAMENTO DE DUPLO-HÍBRIDO COM A ISCA LexA-MX1.....	50
5. CONCLUSÕES	66
REFERÊNCIAS	67

1. INTRODUÇÃO

1.1. Câncer de cabeça e pescoço e metilação de DNA

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).

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 colaboração entre as vantagens seletivas obtidas através do acúmulo de alterações genéticas como: aneuploidia, perda de heterozigose, deleções, inserções, translocações, mutações pontuais e amplificação gênica; e por meio de alterações epigenéticas, isto é, sem a ocorrência de alterações na sequência do DNA, caracterizadas pela alteração do padrão de metilação de dinucleotídeos CpG e hipoacetilação de histonas, podendo levar a instabilidades cromossomais, perda de *imprinting*, ativação de oncogenes e silenciamento de genes supressores de tumor. Tais alterações genéticas e epigenéticas são herdadas pelas células filhas no momento da divisão celular (Esteller et al., 2000; Esteller, 2000; Feinberg, 2001; Smiraglia e Plass, 2002; Feinberg et al., 2006).

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 do desenvolvimento, *imprinting* genômico e inativação do cromossomo X (Hendrich e Bird, 1998). Tal processo ocorre em regiões denominadas Ilhas CpG, as quais são caracterizadas por apresentarem

tamanho variável entre 0,6 kb e 1,0 kb e pela presença de dinucleotídeos CpG em alta proporção ($\geq 50\%$). As ilhas CpG estão geralmente localizadas na região promotora do gene, mas também estão presentes em regiões internas do gene (Jones e Laird, 1999).

A metilação dessas sequências é introduzida enzimaticamente por DNA metiltransferases que exibem uma interação sequência específica com o DNA e utilizam a S-adenosil-L-metionina (AdoMet) como doador de grupos metila (Cheng e Roberts, 2001). Este processo é comumente acompanhado pela alteração no padrão de metilação e acetilação das histonas responsáveis pela formação do nucleossomo. A acetilação e metilação de histonas apresentam papel fundamental na transcrição gênica, fornecendo potencial eletrostático e pontos de ancoragem a outras proteínas envolvidas na formação da cromatina, aos fatores de transcrição e demais subunidades da maquinaria de transcrição. Sendo assim, a remoção do radical acetil (hipoacetilação), mediada por histona desacetilases, e a metilação de diferentes resíduos de lisina, mediada por histona metiltransferases, impedem a formação do complexo iniciador da transcrição via modificação na estrutura do nucleossomo e por meio do sequestro do DNA aos pontos de ligação a histona, favorecendo o silenciamento gênico (Feinberg, 2006).

A metilação anormal do DNA é fortemente implicada no desenvolvimento do câncer, afetando a expressão de genes supressores de tumor ou relacionados com a regulação da proliferação e apoptose e com o reparo do DNA (Esteller et al., 2001). Por exemplo, em tumores de cabeça e pescoço, alguns genes estão comumente hipermetilados, como o *p16*, o *DAPK*, o *E-cad*, o *RASSF1A* e o *RAR β 2* (Rosas et al., 2001; Hasegawa et al., 2002; Kwong et al., 2002). A recorrência desses tumores parece ser mais frequente 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. Recentes avanços na compreensão dos mecanismos envolvidos no silenciamento epigenético de genes durante o desenvolvimento neoplásico apontam para a utilização conjunta de

inibidores da metilação de DNA e da desacetilação de histonas. Tais inibidores atuam na inibição da herdabilidade dos padrões anormais de metilação de DNA e desacetilação de histonas nas células em processo mitótico, levando à diminuição da taxa de crescimento de células tumorais. Portanto, é possível a reversão parcial do fenótipo tumoral pelo uso de inibidores da metilação de DNA e desacetilação de histonas (Brown e Strathdee, 2002; Christman, 2002; Worm e Guldberg, 2002; Minucci e Pelicci, 2006; Jones e Baylin, 2007).

Pelo exposto, é de fundamental importância o estudo da metilação do DNA, a caracterização cuidadosa dos padrões de metilação no câncer humano e a identificação de genes que, quando silenciados, conferem vantagens seletivas a células, contribuindo para o fenótipo neoplásico e facilitando a progressão do tumor por permitir o acúmulo de alterações genéticas e epigenéticas. A precisa quantificação do estado de metilação de ilhas CpG pode, sem dúvida, resultar no desenvolvimento de um marcador molecular para diagnóstico e prognóstico de neoplasias e, ainda, levar à identificação de novos alvos terapêuticos.

Entre os genes diferencialmente metilados em tumores de cabeça e pescoço estão *MX1* e *ADAM23*. Esses genes são bastante interessantes, pois *ADAM23* se encontra hipermetilado em uma série de tumores (Costa et al., 2004; Costa et al., 2005; Takada et al., 2005), incluindo os tumores de cabeça e pescoço, onde se encontra, possivelmente, associado à estágios tardios do desenvolvimento tumoral (Calmon et al., 2007). Ainda, o gene de *MX1* é pouco expresso em carcinoma de próstata (Schulz et al., 2007) e se encontra metilado em carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço e de células de leucemia mieloide aguda (Calmon et al., 2009; Desmond et al., 2007), o que proporciona uma correlação potencial entre o silenciamento de *MX1* e a tumorigênese.

1.2. A proteína ADAM23

As proteínas da família ADAM (a disintegrin and metalloproteinase) são glicoproteínas transmembrânica que contêm os domínios propeptídeo, metaloprotease, desintegrina, rico em cisteína, semelhante ao fator de crescimento epidermal (EGF-like), transmembrânica e cauda citoplasmática, despertando o interesse devido à sua habilidade em realizar as funções de adesão e proteólise e assim controlar a adesão célula-célula e célula-matrix extracelular (Cal et al., 2000;

Seals e Courtneidge, 2003).

Atualmente existem evidências de que cada um destes domínios apresentam um papel funcional em diferentes proteínas da família ADAM, a saber: 1) o bloqueio da atividade de metaloprotease exercido pelo domínio propeptídeo; 2) a clivagem de proteínas alvo da membrana de outras células e da matriz celular pelo domínio de metaloprotease; 3) a adesão às proteínas permitindo assim a clivagem pelo domínio metaloprotease dos domínios desintegrina e rico em cisteína; 4) o estímulo à fusão de membranas pelo domínio EGF-like e 5) sinalização citoplasmática após fosforilação, em ADAMs que possuem cauda citoplasmática organizada em domínio (aproximadamente 131 a 196 aminoácidos) (Primakoff e Myles, 2000).

Vários membros da família ADAM foram descritos como fatores diretamente relacionados com aumento da proliferação celular e/ou metástase em diferentes tipos de tumores. É importante ressaltar que as proteínas ADAM relacionadas positivamente com processo neoplásico possuem domínios de metaloprotease completos, isto é, com todos os resíduos de aminoácidos necessários para coordenar a ligação do átomo de Zinco (**HEXXHXXGXXH**). De fato, para a maior parte dessas ADAMs, foi descrita atividade de metaloprotease. Assim, é proposto que essas ADAMs atuem na ativação de fatores de crescimento celular e de receptores para fatores de crescimento celular, assim como na reestruturação de matriz extracelular e modulação de interações integrinas-matriz extracelular (Cal et al., 2000; Mochizuki e Okada, 2007; Rocks et al., 2008).

Por outro lado, ADAMs relacionadas com o controle negativo da proliferação celular e indução de diferenciação não possuem um sítio ativo nos seus domínios de metaloprotease. Portanto, essas ADAMs devem agir promovendo adesão célula-célula e célula-matriz, modulando a interação de outras proteínas transmembrânica e da matriz extracelular e, além disso, também poderiam competir pelos ligantes das ADAMs proteolíticas, evitando a sua ativação (Wu et al., 1997; D'abaco et al., 2006; Calmon, 2007).

Entre as ADAMs que não apresentam domínio de metaloprotease ativo estão ADAM11, ADAM22 e ADAM23. A proteína ADAM23 possui uma organização de domínios típica da família ADAM, porém apresenta uma cauda citoplasmática de tamanho reduzido (aproximadamente 18 aminoácidos) (Figura 1) (Arribas et al.,

2006).

Assim como descrito para outros membros da família ADAM, ADAM23 também interage com integrinas da superfície de outras células e da matriz extracelular via domínio desintegrina e rico em cisteína, especificamente, com a integrina $\alpha V\beta 3$, atuando, provavelmente, na inibição de sua ativação, a qual está associada à progressão tumoral e à aquisição de características metastáticas (Cal et al., 2000; Yong, 2005; Arribas et al., 2006; Mochizuki e Okada, 2007). Ainda estão descritas como ligantes de ADAM23, as proteínas LGI1, LGI4 e PrP^c, proteínas estas relacionadas com doenças genéticas neurodegenerativas fatais, evidenciando o papel de ADAM23 na formação e manutenção do sistema nervoso central (Sagane et al., 2008; Costa et al., 2009). Dessa maneira, visando entender melhor o papel de ADAM23 no processo de controle da proliferação celular, é necessário que se amplie o conhecimento sobre quais proteínas se ligam fisicamente a ADAM23.

1.3. A proteína MX1

Existe uma série de genes conhecidos por sua expressão e atuação dependente da indução por interferons do tipo I e III, que estão relacionados às atividades antiviral, antiproliferativa e antitumoral *in vivo* (Bromberg, 2002; Calò et al., 2003; Brand et al., 2005). Neste cenário, o gene *MX1* (*myxovirus resistance 1*), também chamado de *IFI78* (Interferon-inducible protein p78), atua como mediador da imunidade inata e na resistência a vírus de RNA (Haller et al., 2007a).

A proteína MX1 é um membro da superfamília de GTPases dinaminas e está estruturalmente organizada em domínio de ligação ao GTP (GTPase) e domínio central de interação (CID), em sua porção N-terminal, e domínio efetor de GTPase (GED), o qual forma um Zipper de Leucina (LZ), em sua porção C-terminal (Figura 2). Essa família ainda inclui a proteína MX1 nuclear de camundongos (mMX1) e a proteína dinamina-1 (DYN1), entre outras proteínas (Haller et al., 2007ab).

Ainda quanto à estrutura de MX1, foi demonstrado que os domínios CID e GED coordenam sua homo-oligomerização, levando à formação de grânulos de MX1. Estes grânulos são formados em associação com as membranas celulares, como a membrana do retículo endoplasmático de humanos, e são necessários para a atividade GTPase de MX1 e a manutenção da estabilidade desta proteína, uma vez

que foi demonstrado que a proteína mutante MX1(L612K), que carrega uma substituição de lisina para leucina no resíduo 612 resultando na alteração do caráter anfipático da primeira alfa hélice do domínio LZ sem perturbar a estrutura do domínio, não é capaz de formar oligômeros e, por isso, perde a atividade de GTPase e é degradada em aproximadamente duas horas, em contraste com a forma selvagem que tem aproximadamente 24 horas de tempo de meia vida (Janzen et al., 2000; Holzinger et al., 2007; Haller et al., 2007a).

Como mediadora da resposta imune inata desencadeada por interferons, foi demonstrada a capacidade de MX1 de inibir a replicação viral através do bloqueio do transporte dos núcleocapsídeos virais para o núcleo. Ainda, diferentemente do que ocorre para as proteínas MX1 citoplasmáticas de outros organismos, que somente inibem multiplicação de vírus cuja replicação ocorre no citoplasma, MX1 de humanos apresenta um amplo espectro de atividade antiviral, sendo capaz de reconhecer e inibir vírus de replicação citoplasmática e nuclear, entre eles os vírus pertencentes às famílias bunivírus, ortomixovírus, paramixovírus, rabdovírus, togavírus, entre outros (Haller et al., 2007b).

Neste sentido, foi demonstrado que MX1 não é capaz de impedir a síntese de RNA virais, o que ocorre no núcleo celular, porém os experimentos conduzidos mostraram que não só a síntese de proteínas virais, mas também a de proteínas celulares, é inibida pela presença de MX1. Além disso, células expressando MX1 adquirem uma maior sensibilidade à morte celular induzida por Fas/FasL, irradiação UV e infecção viral, o que evidencia a influência de MX1 na promoção das vias apoptóticas (Mibayashi et al., 2002).

De acordo com estas observações está o fato de que rastreamentos de duplo-híbrido realizados com a proteína MX1 de camundongos revelaram a interação entre essa e proteínas componentes de corpúsculos nucleares, como SP100, DAXX, BLM, TOPORS e PKM/HIPK-2, além da interação com componentes do sistema de modificação de proteínas SUMO1. Tais proteínas são conhecidas pela sua participação no processo apoptótico, na progressão do ciclo celular, nos mecanismos de resistência viral desencadeado por interferons e no controle do ciclo celular (Troost et al., 2000; Engelhardt et al., 2001; Engelhardt et al., 2004; Haller et al., 2007a).

Além disso, *MX1* foi correlacionada com o processo apoptótico em estudos não envolvendo infecção viral. Nestes foi demonstrado que *MX1* é super expresso em células de alguns dos grupos de complementação da Anemia Fanconi, o que pode estar relacionado ao fenótipo característico de indução de morte celular na medula óssea desta doença (Altschul, Madden et al., 1997; Li e Youssoufian, 1997). *MX1* também se encontra metilado em carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço e de células de leucemia mielóide aguda (Desmond et al., 2007; Calmon et al., 2009) e teve seu silenciamento associado à progressão do câncer e ao fenótipo de imortalização em células tumorais (Kulaeva et al., 2003; Noser, 2007). Por outro lado, o gene *MX1* é pouco expresso em carcinoma de próstata, onde sua expressão foi recentemente ligada à inibição do fenótipo de motilidade e invasão celular (Schulz et al., 2007; Mushinski et al., 2009). Consequentemente, é possível que baixos níveis da proteína *MX1* contribuam para a resistência à apoptose durante o desenvolvimento neoplásico. Assim, a identificação dos parceiros físicos de *MX1* de humanos poderia contribuir significativamente para a elucidação do papel de seu silenciamento no processo neoplásico.

1.4. Sistema de duplo-híbrido em levedura

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 sequências específicas do DNA genômico, enquanto o domínio AD recruta a maquinaria de síntese de mRNA 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 3).

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 β -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 sequências 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.

Atualmente, existem variações do sistema original de duplo-híbrido, desenvolvidos com os objetivos de aumentar a sensibilidade do método e diminuir a detecção de interações falso-positivas (Brachmann e Boeke, 1997). Foi demonstrado que o domínio de ativação da proteína Gal4 de *S. cerevisiae* pode ser fusionado à proteína ligante de DNA de *Escherichia coli* LexA, criando um ativador transcricional funcional em levedura (Brent e Ptashne, 1985). A substituição do domínio de ligação de DNA de Gal4 pela proteína LexA leva a uma maior sensibilidade do sistema, principalmente devido ao fato de LexA, por ser uma proteína de bactéria, não possuir nenhum sítio de ligação ao DNA de levedura, diminuindo a obtenção de interações falso-positivas (Gyuris et al., 1993). Nesse sistema, também é possível variar a sensibilidade do gene repórter através do número de operadores de LexA (LexAop) utilizadas como promotor (Gyuris et al., 1993).

A utilização de outros domínios de ativação de transcrição diferentes de Gal4, como o domínio acídico da proteína B42 de *E. coli* (Gyuris et al., 1993), também oferece vantagens na diminuição da detecção de clones falso-positivos. Também com o objetivo de prevenir a obtenção de clones falso-positivos, podem ser

utilizados múltiplos genes repórteres, inclusive URA3, que permite seleção negativa em meio 5-FOA (Brachmann e Boeke, 1997). Assim, a combinação entre as diferentes origens dos domínios BD e AD e a utilização de sistemas 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).

Como o entendimento de um sistema biológico requer a determinação da interação entre suas partes constituintes, e a caracterização das interações entre as proteínas desse sistema pode contribuir no entendimento da função específica de cada fator. Os diferentes sistemas de duplo-híbrido têm sido extensamente aplicados na detecção de interações proteína-proteína (Brachmann e Boeke, 1997), inclusive na determinação de redes de interações (interactomas) de diversos organismos (Parrish et al., 2006).

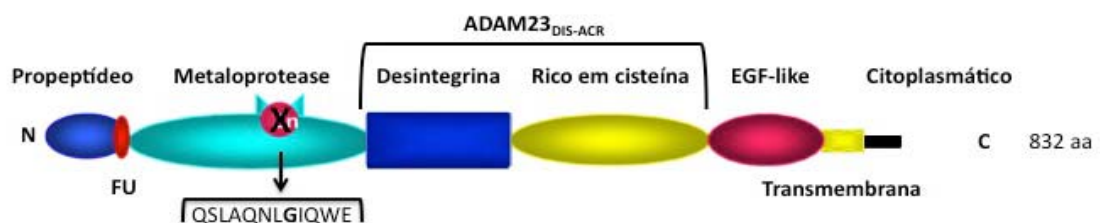


Figura 1. Esquema da organização estrutural dos domínios da proteína ADAM23 de humanos. Esquema de domínios de ADAM23, indicando os domínios DIS-ACR de ADAM23 utilizados no rastreamento de duplo híbrido. Também estão indicadas neste esquema a região de ação de proteases semelhantes a furina (FU), necessária para a remoção do propeptídeo e ativação das ADAMs e a ausência da sequência completa para a coordenação do átomo de zinco (**HEXXHXXGXXH**), que inativa a capacidade de metaloprotease. Modificada de Rocks et al., 2008.

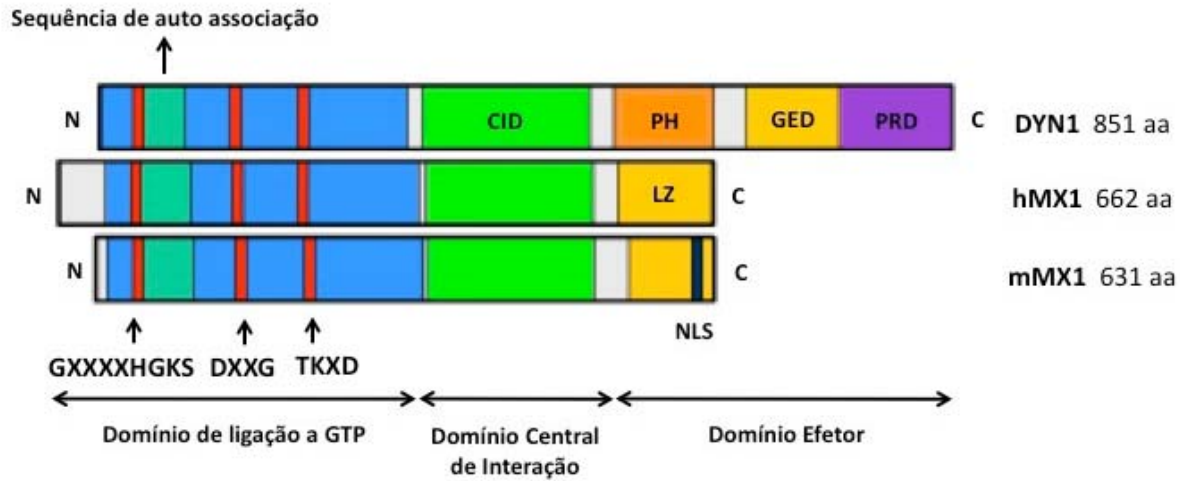


Figura 2. Esquema da organização estrutural da proteína MX1 de humanos e de outras GTPases Dinaminas. A proteína MX1 de humanos (hMX1) é comparada com as proteínas MX1 de camundongos (mMX1) e dinamina-1 de humanos (DYN1). Os domínios em comum são: (i) domínio de ligação ao GTP (azul), que contém os elementos de ligação ao GTP (vermelho), assim como a sequência de auto associação (SAS, verde escuro), (ii) domínio central de interação (CID, verde claro) e (iii) domínio efetor de GTPase (GED, amarelo) o qual forma um Zipper de Leucina (LZ) em GTPases MX. O sinal de localização nuclear (NLS, preto) está presente apenas em algumas proteínas MX1 de roedores. Os domínios específicos de dinaminas são: domínio pleckstrina (PH, laranja) e domínio rico em prolina (PRD, roxo). Modificado de Haller et al., 2007a.

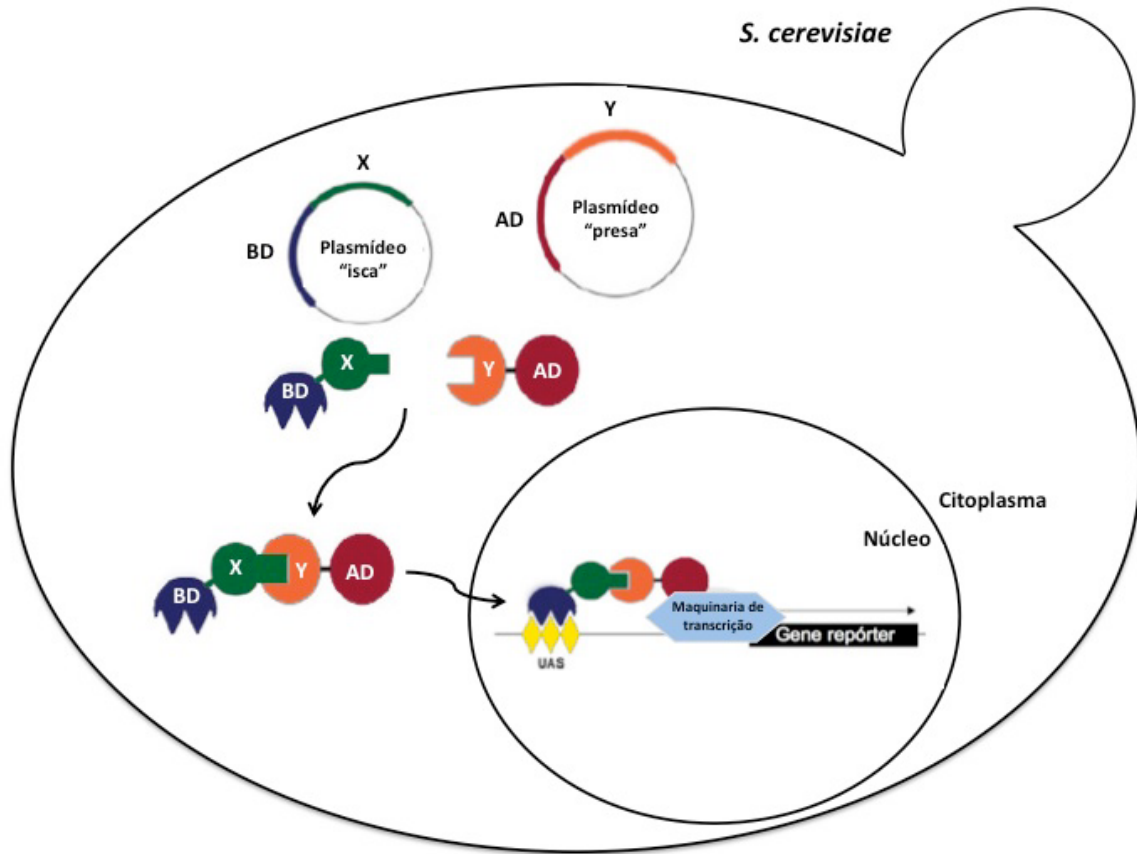


Figura 3. Esquema do sistema de duplo-híbrido utilizado para análise de interação proteína-proteína. Os genes das proteínas X e Y clonados em vetores de expressão em *S. cerevisiae*, levam à produção de proteínas em fusão com os domínios de ativação de transcrição (AD, "activation domain") e de interação a DNA (BD, "binding domain"), respectivamente. No caso de interação entre X e Y, é restaurada artificialmente a proximidade física entre os domínios AD e BD, levando à expressão de genes repórteres que tenham a sequência de ligação em suas regiões ativadoras de transcrição (UAS). Dessa forma, é possível determinar a existência de interação entre duas proteínas conhecidas ou rastrear ligantes de uma proteína utilizando uma biblioteca de cDNA através da observação da ativação da transcrição dos genes repórteres.

2. OBJETIVOS

2.1. *Objetivo Geral*

Análise funcional das proteínas ADAM23 e MX1, codificadas por genes metilados em câncer de cabeça e pescoço.

2.2. *Objetivos específicos*

2.2.1. *Identificar proteínas ligantes de ADAM23 por duplo-híbrido*

Como descrito anteriormente, a proteína ADAM23 possui uma organização de domínios típica da família ADAM, porém, diferentemente de outras proteínas ADAM que já possuem seus ligantes para o domínio citoplasmático descritos na literatura, ADAM23 apresenta uma pequena porção citoplasmática de somente 18 aminoácidos, que exclui a possibilidade de mediar a interação com um possível parceiro físico (Nelson et al., 1999; Galliano et al., 2000; Huang et al., 2002; Zhu et al., 2003). Em contrapartida, diversos rastreamentos de duplo-híbrido já foram realizados com domínios extracelulares de proteínas relacionadas à ADAM23 e revelaram interações destas com proteínas da matriz extracelular (Shi et al., 2000; Bartholin et al., 2005; Lee et al., 2005; Yoshida et al., 2005; Liu et al., 2006; Torres-Collado et al., 2006). Além disso, a interação descrita entre os domínios desintegrina e rico em cisteína de ADAM23 com a integrina $\alpha V\beta 3$, associada à ausência de atividade de protease, nos leva a crer que estes domínios desempenham uma função crucial no papel de ADAM23 como um possível supressor do desenvolvimento tumoral.

2.2.2. *Identificar proteínas ligantes de MX1 por duplo-híbrido*

Como já descrito, rastreamentos de duplo-híbrido com a proteína MX1 de camundongo já foram realizados, revelando parceiros físicos que se encontram presentes na composição dos corpúsculos nucleares. Tendo em vista que MX1 de humanos, que apresenta localização citoplasmática, está envolvida com diversos processos celulares como a indução de morte celular por apoptose (Altschul e Madden et al., 1997; Mibayashi et al., 2002; Haller et al., 2007b), além de ser expresso em carcinoma de próstata, onde sua expressão foi recentemente ligada à inibição do fenótipo de motilidade e invasão celular (Schulz et al., 2007; Mushinski et

al., 2009) e que *MX1* encontra-se silenciado em uma série de processos neoplásicos (Schulz, et al., 2007, Calmon et al., 2009), acredita-se que esta apresente outros parceiros físicos que determinam seu modo de atuação na célula e que o silenciamento de *MX1* esteja envolvido com a aquisição de características necessárias para o desenvolvimento do tumor e progressão da doença.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material

Os plasmídeos, as linhagens de leveduras e o oligonucleotídeos iniciadores utilizados nos experimentos estão apresentados nas Tabelas 1, 2 e 3, respectivamente.

TABELA 1 – Vetores e construções plasmidiais utilizados neste estudo.

Plasmídeo	Descrição	Origem
pCR8-TOPO	Vetor plasmidial para geração de clone de entrada do sistema “Gateway” (<i>Spectinomycin^R</i>)	Invitrogen
pDEST32 (pVZ860)	Vetor plasmidial para produção em <i>S. cerevisiae</i> da proteína isca (Gal4-BD) (<i>LEU2</i> , <i>CEN</i> , <i>Gentamicin^R</i>)	Invitrogen
pDEST22 (pVZ861)	Vetor plasmidial para produção em <i>S. cerevisiae</i> da proteína presa (Gal4-AD) (<i>TRP1</i> , <i>CEN</i> , <i>Ampicilin^R</i>)	Invitrogen
pEXP/AD-502	Vetor plasmidial no qual foi gerada a biblioteca de cDNAs de cérebro fetal humano para produção em <i>S. cerevisiae</i> de proteína presa (Gal4-AD) (<i>TRP1</i> , <i>CEN</i> , <i>Ampicilin^R</i>)	Invitrogen
pEXP32-Krev1 (pVZ963)	Construção plasmidial controle para duplo-híbrido do sistema da linhagem MaV203, codifica Gal4-BD-Krev1	Invitrogen
pEXP22-RalGDSwt (pVZ893)	Construção plasmidial controle para duplo-híbrido do sistema da linhagem MaV203, que codifica Gal4-AD-RalGDSwt (selvagem)	Invitrogen
pEXP22-RalGDSm1 (pVZ894)	Construção plasmidial controle para duplo-híbrido do sistema da linhagem MaV203, que codifica Gal4-AD-RalGDSm1 (mutante 1)	Invitrogen
pEXP22-RalGDSm2 (pVZ895)	Construção plasmidial controle para duplo-híbrido do sistema da linhagem MaV203, que codifica Gal4-AD-RalGDSm2 (mutante 2)	Invitrogen

pBTM116-AMP (pSV148)	Vetor plasmidial para produção em <i>S. cerevisiae</i> de proteína isca (LexA-) (<i>TRP1</i> , 2 μ , <i>Ampicilina</i> ^R)	(Bartel e Fields, 1995)
pBTM116-KAN (pVZ993)	Vetor plasmidial para produção em <i>S. cerevisiae</i> de proteína isca (LexA-) (<i>TRP1</i> , 2 μ , <i>Kanamicina</i> ^R)	
pACT (pSV149)	Vetor plasmidial para produção em <i>S. cerevisiae</i> de proteína presa (Gal4-AD) (<i>LEU2</i> , 2 μ , <i>Ampicilina</i> ^R)	(Bartel e Fields, 1995)
pACT2	Vetor plasmidial no qual foi gerada a biblioteca de cDNAs de cérebro fetal humano para produção em <i>S. cerevisiae</i> de proteína presa (Gal4-AD) (<i>LEU2</i> , 2 μ , <i>Ampicilina</i> ^R)	Clontech
pCDNA3.1-ADAM23 (pVZ890)	cDNA completo de <i>ADAM23</i> clonado no vetor plasmidial pCDNA3.1 (<i>Ampicilina</i> ^R)	Anamaria Camargo
pCMV6-XL5-MX1 (pVZ997)	cDNA de <i>MX1</i> clonado no vetor plasmidial pCMV6-XL5 (<i>Ampicilina</i> ^R)	Origene
pBTM116-AMP-TIF51A (pSV278)	Construção plasmidial controle para duplo-híbrido do sistema da linhagem L40, que codifica LexA-eIF5a	(Thompson et al., 2003)
pACT-Dys1 (pSV558)	Construção plasmidial controle para duplo-híbrido do sistema da linhagem L40, que codifica Gal4-AD-Dys1	(Thompson et al., 2003)
pACT-Lia1 (pVZ940)	Construção plasmidial controle para duplo-híbrido do sistema da linhagem L40, que codifica Gal4-AD-Lia1	(Thompson et al., 2003)
pDEST32- ADAM23 _{DIS-ACR} (pVZ916)	<i>ADAM23</i> _{DIS-ACR} clonado no vetor plasmidial pDEST32	este trabalho
pVZ963 (pCR8-ADAM23 _{DIS-ACR})	<i>ADAM23</i> _{DIS-ACR} clonado no vetor plasmidial pCR8	este trabalho
pBTM116-AMP- ADAM23 _{DIS-ACR} (pVZ984)	<i>ADAM23</i> _{DIS-ACR} clonado no vetor plasmidial pBTM116-AMP	este trabalho

pCR8-MX1 (pVZ998)	<i>MX1</i> clonado no vetor plasmidial pCR8	este trabalho
pDEST32-MX1 (pVZ999)	<i>MX1</i> clonado no vetor plasmidial pDEST32 contendo "tag" de HA	este trabalho
pBTM116-KAN-MX1 (pVZ1004)	<i>MX1</i> clonado no vetor plasmidial pBTM116-KAN contendo "tag" de HA	este trabalho
pBTM116-AMP-PUB1 (pSV424)	<i>PUB1</i> clonado no vetor plasmidial pBTM116-AMP	(Apponi et al., 2007)
pRS314 (pSV58)	Vetor plasmidial para clonagem e produção para <i>S. Cerevisiae</i> (<i>ARSH4</i> , <i>CEN6</i> , <i>TRP1</i> , <i>Ampicilina^R</i>)	(Sikorski e Hieter, 1989)

TABELA 2 - Leveduras utilizadas neste estudo.

S. cerevisiae	Genótipo	Origem
L40 (SVL86)	<i>MATa trp1 his3 leu2 ade2 LYS2::lexAop(4x)-HIS3 URA3::lexAop(8x)-lacZ</i>	Clontech
MaV203 (VZL772)	<i>MATα leu2-3,112 trp1-901 his3Δ200 ade2-101 gal4Δ gal80Δ SPAL10::URA3 GAL1::lacZ HIS3_{UASGAL1}::HIS3@LYS2 can1^R cyh2^R</i>	Invitrogen
VZL813	MaV203 transformada com as construções plasmidiais pEXP32/Krev1 (pVZ963) e pEXP22/RalGDSwt (pVZ893).	este trabalho
VZL814	MaV203 transformada com as construções plasmidiais pEXP32/Krev1 (pVZ963) e pEXP22/RalGDSm1 (pVZ894).	este trabalho
VZL815	MaV203 transformada com as construções plasmidiais pEXP32/Krev1 (pVZ963) e pEXP22/RalGDSm2 (pVZ895).	este trabalho
VZL816	MaV203 transformada com a construção plasmidial (pDEST32-ADAM23 _{DIS-ACR})	este trabalho
VZL817	MaV203 transformada com a construção plasmidial (pDEST32-ADAM23 _{DIS-ACR}) e com o vetor plasmidial pDEST22.	este trabalho
VZL833	L40 transformada com a construção plasmidial (pBTM116-AMP-ADAM23 _{DIS-ACR})	este trabalho
VZL834	L40 transformada com a construção plasmidial pBTM116-AMP-ADAM23 _{DIS-ACR} e com o vetor plasmidial pACT.	este trabalho
VZL887	MaV203 transformada com a construção plasmidial (pDEST32-MX1)	este trabalho
VZL888	MaV203 transformada com a construção plasmidial (pDEST32-MX1) e com o vetor plasmidial pDEST22.	este trabalho
VZL889	L40 transformada com a construção plasmidial (pBTM116-KAN-MX1)	este trabalho
VZL890	L40 transformada com as construção plasmidial pBTM116-KAN-MX1 e com o vetor plasmidial pACT.	este trabalho

VZL899	L40 transformada com as construções plasmidiais pBTM116-AMP-TIF51A (pSV278) e pACT-Dys1 (pSV558).	este trabalho
VZL900	L40 transformada com as construções plasmidiais pBTM116-AMP-TIF51A (pSV278) e pACT-Lia1(pVZ940).	este trabalho
VZL901	L40 transformada com as construções plasmidiais pBTM116-AMP-TIF51A (pSV278) e com o vetor plasmidial pACT (pSV149).	este trabalho
VZL929	L40 transformada com o vetor plasmidial pBTM116-KAN	este trabalho

TABELA 3 – Oligonucleotídeos utilizados neste estudo.

Oligonucleotídeo	Sequência*	Sítio
SVO135	5'-TACCACTACAATGGATG-3'	
SVO199	5'-CACGATGCACAGTTG-3'	
VZO482	5'-GGAAATGGATACGTGGAAGC-3'	-
VZO508	5'-CAGCTGCTCATATTTAGGGC-3'	-
VZO547	5'-CG GAATTC AATGGATACGTGGAAG-3'	<i>EcoRI</i>
VZO548	5'- CG GAATTC ATCGAGTGACAGCTGC-3'	<i>EcoRI</i>
VZO551	5'-TATAAGCGTTTGAATCACTAC - 3'	-
VZO552	5'- AGCCGACAAAACCTTGGATTGGAGAC -3'	-
VZO555	5'- GCGGATAACAAGCTCAAC -3'	-
VZO623	5'-TACGACGTACCAGATTACGCTATGGTTGTT TCCGAAGTG-3'	-
VZO624	5'- CTGGACAGAGTGTGGTTAACCGGGGAAC TG -3'	-

* Os sítios de restrição introduzidos estão em negrito.

3.2. Meios de cultura

- *Meio LB* - triptona 1%; NaCl 0,5%; extrato de levedura 1% (ágar 2% para meio sólido).

- *Meio SOB* - triptona 2%; extrato de levedura 0,5%; NaCl 10 mM; KCl 2,5 mM; MgCl₂ 10 mM; MgSO₄ 10 mM.

- *M9* - Na₂HPO₄ 46 mM; KH₂PO₄ 22 mM; NaCl 8,5 mM; NH₄Cl 18 mM; glicose 0,4%; prolina 20 µg/mL (ágar 1,8% para meio sólido).

- *Meio completo (YPD)* - extrato de levedura 1%; peptona 2%; glicose 2% (ágar 2% para meio sólido).

- *Meio sintético (SC)* - YNB 0,67% (sem aminoácidos); glicose 2%; suplementado com aminoácidos, uracila ou adenina quando necessário (ágar 2% para meio sólido).

3.3. Manipulação de bactérias

3.3.1. Transformação química de *E. coli*

Uma cultura estacionária de *E. Coli* (SVB3/DH5a - F'/endA1 hsdR17(r_K-m_K+) supE44 thi-1 recA1 gyrA (Na¹) relA1 D(lacZYA-argF)_{U169}($\square$ 80/lacZDM15)) foi diluída em 250mL de meio SOB líquido e incubada a 37°C até atingir D.O._{600nm} 0,6. A cultura bacteriana foi resfriada em banho de gelo por 10 minutos e centrifugada a 3.200xg por 10 minutos a 4°C. Posteriormente, o precipitado celular foi suspenso em 100mL de solução TB gelada (Pipes 10 mM pH7,0; MnCl₂ 55 mM; CaCl₂ 15 mM; KCl 250 mM). As células foram incubadas por 10 minutos em banho de gelo e centrifugadas a 3.200xg por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi desprezado e as células foram suspensas em 20 mL de solução TB gelada contendo 1,5mL de DMSO. Para armazenamento, alíquotas da suspensão congeladas em nitrogênio líquido e estocadas a -80°C.

Células de *E. coli* competentes foram descongeladas em banho de gelo. Foram adicionados 50-250 ng de DNA plasmidial ou 10 µL de reação de ligação em um tubo de microcentrífuga contendo 100 µL de células competentes. Os tubos foram mantidos em banho de gelo por 30 minutos e, então, 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. Decorrido o período de incubação, a cultura foi centrifugada, o sobrenadante descartado e as células suspensas em 200 µL de meio

LB. A suspensão foi distribuída em meio LB sólido contendo o antibiótico requerido para seleção de transformantes e as placas foram incubadas por uma noite a 37°C.

3.3.2. Eletroporação de *E. coli*

Uma cultura estacionária de *E. coli* foi diluída 1:100 em 1 L de meio LB líquido e incubada a 37°C, sob agitação até atingir D.O._{600nm} 1,0-1,2. As células foram coletadas por centrifugação a 3.200 xg por 20 minutos e lavadas uma vez com 500 mL de água milli-Q estéril gelada e duas vezes com 250 mL de água gelada. Foi realizada uma nova lavagem com 30 mL de glicerol 20% gelado. As células foram suspensas em 3 mL de glicerol 20% gelado e armazenadas em alíquotas a -80°C.

O volume de 2 µL da preparação de DNA plasmidial de levedura (item 3.5.2) foi adicionado a 40 µL de células eletrocompetentes. Estas foram transferidas para uma cubeta de eletroporação (0,1cm) e submetidas a um pulso elétrico com as seguintes constantes elétricas: voltagem 1,7 kV, resistência 200 Ω e capacitância 25 µF. Em seguida, as células foram removidas da cubeta com 1 mL de meio LB e incubadas a 37°C por 1 hora sob agitação. Finalmente, as células foram plaqueadas em meio seletivo M9 contendo o antibiótico requerido para seleção dos transformantes. A seguir, as placas foram incubadas a 37°C até a obtenção de colônias.

3.4. Manipulação de leveduras

3.4.1. Transformação de alta eficiência de *S. cerevisiae*

A cultura de interesse em fase estacionária foi diluída a $5,0 \times 10^6$ células/mL em 10 mL de meio SC líquido pré-aquecido e incubada a 30°C até a concentração de $2,0 \times 10^7$ células/mL. As células foram coletadas por centrifugação a 3.000 xg por 5 minutos e lavadas com água milli-Q estéril. O precipitado foi suspenso em 600 µL de solução de acetato de lítio 100 mM e incubado por 15 minutos a 30°C. As células foram novamente coletadas por centrifugação e ao precipitado foram adicionados, na seguinte ordem, 480 µL de 50% PEG5000, 72 µL de 1 M acetato de lítio, 50 µL de 2 mg/mL DNA de esperma de salmão, 10 µL da biblioteca de cDNA e o volume de reação completado com 108 µL de água milli-Q estéril. O tubo foi então agitado vigorosamente por 1 minuto e incubado a 30°C por 30 minutos. A suspensão foi incubada a 42°C por 20 minutos, tomando-se cuidado de inverter o tubo a cada 5 minutos para equilíbrio da temperatura. Após nova centrifugação, as células foram

suspensas em 2 mL de água milli-Q estéril, plaqueadas em meio seletivo e incubadas a 30°C até o aparecimento das colônias.

3.5. Manipulação de DNA

3.5.1. Isolamento de DNA plasmidial de bactéria (mini preparação)

Uma colônia da bactéria de interesse foi inoculada em 3 mL de meio LB líquido contendo antibiótico para seleção. O inóculo foi incubado a 37°C sob agitação por uma noite. Após crescimento, 1 mL da cultura bacteriana foi centrifugada a 16.000 xg por 2 minutos, o sobrenadante descartado e as bactérias suspensas em 200 µL de TE pH8,0 (Tris-HCl 10 mM pH8,0; EDTA 1 mM pH8,0). À suspensão foram adicionados 200 µL de solução SDS/NaOH (SDS 1%; NaOH 0,2 M), o conteúdo homogeneizado por inversão e incubado a 37°C por 5 minutos. Em seguida, foram adicionados 150 µL de acetato de sódio 3 M pH4,8 e a solução foi misturada várias vezes por inversão. Os tubos foram então centrifugados a 16.000 xg por 6 minutos, o sobrenadante foi transferido para novos tubos e 1 mL de isopropanol foi adicionado. Após serem misturados por inversão, os tubos foram incubados a 37°C por 5 minutos e centrifugados a 16.000 xg por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado, o precipitado lavado duas vezes com 1 mL de etanol 75% gelado e, após secagem, suspenso em 50 µL de TE.

3.5.2. Isolamento de DNA plasmidial de levedura

O volume de 1,5 mL da cultura de interesse em fase estacionária foi centrifugado a 16.000 xg por 1 minuto. A seguir, o sobrenadante foi desprezado, as células lavadas com 1 mL de água milli-Q estéril e suspensas em 200 µL de tampão de lise (Tris-HCl 10 mM pH8,0; Triton X-100 2%; SDS 1%; NaCl 100 mM; 1 mM EDTA). Foram adicionados 200 µL de PCI e aproximadamente 300 mg de pérolas de vidro. O tubo foi então agitado vigorosamente por 5 minutos e centrifugado a 16.000 xg por 1 minuto. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo e adicionada de igual volume de isopropanol. Após centrifugação por 10 minutos a 16.000 xg o sobrenadante foi removido e o precipitado lavado com 500 µL de etanol 75% gelado. O precipitado, depois de seco, foi suspenso em 50 µL de água milli-Q.

3.5.3. Eletroforese de DNA em gel de agarose

A eletroforese de DNA foi realizada em gel de agarose 0,8% em TAE 1X (Tris-acetato 40 mM pH8,5; EDTA 2 mM). À amostra de DNA, foi adicionado tampão de amostra 5X (Tris-HCl 10 mM pH8,0; EDTA 1 mM pH8,0; azul de bromofenol 0,125%; xilenocianol 0,125%; glicerol 30%; EDTA 1 mM), e aplicada no gel contendo 0,5 mg/mL de brometo de etídeo. O gel foi submetido à voltagem de 100 V em tampão TAE 1X.

3.5.4. Isolamento de fragmentos de DNA de gel de agarose

O fragmento de DNA separado em gel de agarose 0,8% foi visualizado por coloração com brometo de etídeo e iluminação ultravioleta. O fragmento de interesse foi cortado do gel e purificado utilizando o kit “QIAquick Gel Extraction” (Qiagen), conforme recomendado pelo fabricante.

3.5.5. Amplificação de DNA por PCR

As reações foram realizadas em tubos de microcentrífuga de 0,5 mL contendo aproximadamente 50 ng de DNA molde, 1 μ M de cada oligonucleotídeo, 2 U de Taq HiFi DNA polimerase (Invitrogen) e 200 μ M de dNTPs em tampão adequado num volume final de reação de 100 μ L. A solução foi incubada por 3 minutos a 94°C, seguida de 20 ciclos de incubações a 94°C por 30 segundos (desnaturação), a 58°C por 40 segundos (hibridização) e a 72°C por 1 minuto (extensão). Por último, seguiu-se incubação a 72°C por 10 minutos. Quando necessário, as condições de hibridização e extensão foram variadas de acordo com os oligonucleotídeos utilizados e o fragmento de DNA a ser amplificado. Os produtos da reação foram analisados por eletroforese em gel de agarose 0,8% e purificados utilizando o kit “QIAquick PCR Purification” (QIAGEN).

3.5.6. Manipulação enzimática de DNA

As reações com enzimas de restrição, T4 DNA ligase, fosfatase (CIP) ou outras enzimas modificadoras de DNA seguiram as especificações do fabricante New England Biolabs.

3.5.7. Sequenciamento de DNA

A reação de sequenciamento foi realizada num volume final de 20 µL com oligonucleotídeos adequados utilizando a técnica de PCR e o Kit Big Dye Terminator (Applied Biosystem). As reações de amplificação foram realizadas utilizando o termociclador seguindo as condições: 1 ciclo – 96°C; 25 ciclos – 96°C por 10 segundos, temperatura de hibridização dos oligos por 5 segundos, 60°C por 4 minutos; 1 ciclo – 60°C por 5 minutos.

O DNA foi precipitado pela adição de 2 µL EDTA 125 mM, 2 µL NaAc 3 M e 50 µL de etanol absoluto em cada amostra, as quais ficaram cobertas com papel alumínio para isolar da luz. Incubar as amostras por 15 minutos à temperatura ambiente e centrifugar a 3.000 xg por 30 minutos a 4°C. Em seguida, descartar o sobrenadante e ressuspender o precipitado em 70 µL de etanol 70%. Centrifugar a 1.650 xg por 15 minutos, descartar o sobrenadante e, após secagem do DNA, ressuspender as amostras em 10 µL de formamida Hidi. As amostras foram desnaturadas a 96°C por 5 minutos e incubadas no gelo por 2 minutos. As amostras foram aplicadas em placas de 96 poços e colocadas no aparelho Sequenciador ABI Prism 3130 (Applied Biosystems).

3.6. Clonagem utilizando o sistema Gateway (Invitrogen)

3.6.1. Geração do clone de entrada

O kit “pCR8/GW/TOPO” foi utilizado para gerar clones contendo o fragmento de PCR ligado ao vetor plasmidial pCR8, o qual possui o sítio de recombinação *attL* (Tabela 2). Para a reação, o volume de 4 µL do produto de PCR foi misturado com 1 µL de “salt solution” fornecida no kit e com 1 µL de “TOPO vector” (pCR8-topoisomerase I) e, posteriormente, incubada por 30 minutos a 25°C. Em seguida, o produto da reação foi utilizado para transformar *E. coli* competente, utilizando o antibiótico espectinomicina como marcador de seleção. O clone de entrada gerado possui sítios de recombinação *attL* flanqueando o fragmento de PCR inserido.

3.6.2. Geração do clone destino

Para geração das construções plasmidiais de duplo-híbrido para expressão das proteínas isca contendo o domínio de ligação ao DNA de Gal4 (Gal4-BD), foi utilizado o vetor plasmidial pDEST32, o qual possui os sítios de recombinação *attR*.

A reação de recombinação LR foi realizada em tubo de microcentrifuga de 1,5 mL contendo 150 ng da construção plasmidial do clone de entrada (pCR8-ADAM23_{DIS-ACR} ou pCR8-MX1), 150 ng de pDEST32 e 2 µL de “LR Clonase II” (Invitrogen). O volume final de 10 µL foi ajustado com tampão TE (Tris 10 mM e EDTA 1 mM) pH 8,0. A reação foi incubada a 25°C por 2 horas. Em seguida, a reação foi tratada com 2 µg de Proteinase K por 10 minutos a 37°C. Por fim, metade do volume total de reação foi utilizada para transformar *E. coli* competente, utilizando o antibiótico gentamicina como marcador de seleção.

3.7. Análise de proteínas

3.7.1. Quantificação de proteínas

Para a determinação da concentração protéica de extratos celulares e de proteínas purificadas foi utilizado o kit “BioRad Protein Assay” (BioRad), baseado no método de Bradford.

3.7.2. Separação de proteínas por SDS-PAGE

Proteínas foram separadas em gel de poliacrilamida descontínuo. O gel de empacotamento continha acrilamida:bis-acrilamida (29:1) 5%; Tris-HCl 380 mM pH6,8; SDS 0,1%; persulfato de amônio 0,1%; 1 µL/mL de TEMED e o gel de separação acrilamida:bis-acrilamida (29:1) 10% ou 12%; Tris-HCl 380 mM pH8,8; SDS 0,1%; persulfato de amônio 0,1%; 0,4 µL/mL de TEMED. As amostras em tampão de amostra para proteína (Tris-HCl 40 mM pH6,8; glicerol 8%; SDS 2%; DTT 100 mM; azul de bromofenol 0,1%) foram incubadas a 96°C por 5 minutos e aplicadas no gel. O gel foi submetido a voltagem de 150 V em tampão de corrida (Tris-HCl 25 mM; glicina 250 mM; SDS 0,1%)

3.7.3. Coloração de proteínas por “Coomassie Blue”

O gel de acrilamida foi incubado em solução de Coomassie Blue R 0,25% em metanol 45% e ácido acético 10% por 30 minutos e descorado em solução de etanol 50% e ácido acético 10%.

3.7.4. Western blot

Após separação por SDS-PAGE, as proteínas foram transferidas para

membrana de nitrocelulose (Hybond-ECL GE Healthcare) por 1 hora a 100V em tampão de transferência (Tris-HCl 12 mM; glicina 125 mM) em sistema de transferência (BioRad). A transferência foi avaliada por coloração com Ponceau S (Ponceau S 1 mg/mL; ácido acético 5%) e a membrana foi incubada com tampão PBST (PBS pH7,4; 0,25% Tween-20) contendo 5% de leite desnatado a temperatura ambiente por ao menos 30 minutos. Após bloqueio, a membrana foi incubada em PBST contendo 5% de leite desnatado e o anticorpo primário de interesse por 2 horas a temperatura ambiente sob agitação branda. Posteriormente, a membrana foi lavada três vezes por 5 minutos com PBST e incubada por 1 hora com anti-IgG de coelho conjugado com peroxidase (Sigma) na diluição de 1:5.000 em PBST contendo 5% de leite desnatado. Após três lavagens de 5 minutos com PBST, a membrana foi tratada com reagentes quimioluminescentes (ECL-GE Healthcare) e utilizada na exposição de filme autorradiográfico.

3.8. Rastreamento por duplo-híbrido

Neste trabalho foram utilizados dois sistemas de duplo-híbrido:

3.8.1 Sistema da linhagem MaV203 (ProQuest, Invitrogen)

O sistema de duplo-híbrido ProQuest faz uso de Gal4-BD e Gal4-AD e dos genes repórteres *HIS3*, *URA3* e *lacZ*. Dessa forma, a região codificadora dos domínios DIS-ACR de ADAM23 e o gene codificador de MX1 foram clonados pelo sistema Gateway no vetor plasmidial de fusão com o domínio de ligação ao DNA de Gal4 pDEST32 (*LEU2*) para produzir a proteína isca. Em seguida, a levedura já possuindo a proteína isca foi transformada com o vetor plasmidial contendo o domínio de ativação de Gal4 pDEST22 (*TRP1*) vazio para verificar se as fusões BD-ADAM23_{DIS-ACR} e BD-MX1 ativam inespecificamente os genes repórteres *HIS3*, *URA3* e *lacZ*. Em seguida, o rastreamento foi iniciado.

A linhagem MaV203 contendo a proteína isca foi transformada, segundo protocolo descrito por Gietz (2005), com a construção plasmidial pEXP-AD502 contendo uma biblioteca de cDNA de cérebro fetal humano (Invitrogen) em fusão com o domínio de ativação de Gal4 (Gal4-AD). A seleção dos transformantes foi realizada em meio de cultura sintético sem histidina e contendo 3-aminotriazol. Após o surgimento de colônias, os transformantes foram cultivados em meio SC-leu,-trp

(seleção apenas para os plasmídeos) e então confirmados utilizando os fenótipos His⁺ (na presença de diferentes concentrações de 3-AT), Ura⁺, 5-FOA^S e β -galactosidade⁺ (atividade de β -galactosidade).

3.8.2. 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 plasmidial 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, a região codificadora dos domínios DIS-ACR de ADAM23 e o gene codificador de MX1 foram clonados no vetor plasmidial pBTM116-AMP (*TRP1*) e pBTM116-KAN, respectivamente, para produzir a proteína isca em fusão com a proteína de ligação ao DNA LexA (pBTM116-AMP-ADAM23_{DIS-ACR} e pBTM116-KAN-MX1). O próximo passo foi introduzir nas linhagens L40, já contendo as proteínas isca LexA-ADAM23_{DIS-ACR} e LexA-MX1, o vetor plasmidial pACT vazio e testá-la para dos genes repórteres (*HIS3* e *lacZ*).

A linhagem L40 contendo a proteína isca foi transformada, segundo protocolo descrito por Gietz (1995), com a construção plasmidial pACT2 contendo uma biblioteca de cDNA de cérebro fetal humano (Clontech) em fusão com o domínio de ativação de Gal4 (Gal4-AD). A seleção dos transformantes foi realizada em meio de cultura sintético sem histidina. Após o surgimento de colônias, os transformantes foram cultivados em meio SC-leu,-trp (seleção apenas para os plasmídeos) e então confirmados utilizando os fenótipos His⁺ e β -galactosidade⁺ (atividade de β -galactosidade).

3.8.3. Análise de fenótipo de crescimento

As linhagens a serem analisadas foram crescidas a 30°C em 10mL de meio seletivo até aproximadamente 1-2x10⁷ células/mL. Após centrifugação a 3.000 xg 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.

3.8.4. 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 3.000 xg 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 transferida para uma nova placa de petri e as células foram lisadas por congelamento durante uma hora em freezer -80°C com as células voltadas para cima. 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, MgSO_4 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.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Rastreamento de duplo-híbrido utilizando a proteína isca ADAM23_{DIS-ACR}

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

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*. Como descrito anteriormente, os domínios de ligação ao DNA (BD) e de ativação da transcrição (AD), além de não precisarem estar no mesmo polipeptídeo, podem pertencer a fatores de transcrição diferentes.

Para início do rastreamento de duplo-híbrido com os domínios desintegrina e rico em cisteína de ADAM23 (ADAM23_{DIS-ACR}) foi escolhido o sistema da linhagem L40 de *S. cerevisiae* (SVL86). Este sistema utiliza o fator de transcrição de *E. coli* LexA codificado pelo vetor plasmidial pBTM116-AMP (pSV148) e o domínio de ativação da transcrição de Gal4 (Gal4-AD) codificado pelo vetor plasmidial pACT (pSV149), para criar um ativador transcricional funcional em levedura (Brent e Ptashne, 1985). Ainda, este sistema apresenta plasmídeos com origem de replicação 2μ , o que leva a uma superexpressão das proteínas de fusão, e os genes repórteres utilizados são *HIS3* e *lacZ* sobre o controle do promotor responsável a LexA.

4.1.1.1. Clonagem de ADAM23_{DIS-ACR} no vetor plasmidial de duplo-híbrido pBTM116-AMP

O fragmento de PCR da região codificadora de ADAM23_{DIS-ACR}, com aproximadamente 0,7 kb, foi obtido a partir da construção plasmidial pCDNA3.1-ADAM23 (pVZ890), que contém o cDNA completo de ADAM23, utilizando os oligonucleotídeos iniciadores VZO547 e VZO548. Tal fragmento foi então clonado no sítio de *EcoRI* do vetor plasmidial pBTM116-AMP (pSV148). O produto da clonagem foi então transformado em DH5 α e os clones obtidos foram analisados.

Para confirmar a identidade da clonagem de ADAM23_{DIS-ACR} no vetor plasmidial pBTM116-AMP, as construções plasmidiais obtidas da transformação foram submetidas a diagnóstico de restrição. Para tanto, foram utilizadas as combinações

das enzimas *EcoRV* e *XhoI* (fragmentos esperados de aproximadamente 4,8 kb, 0,9 kb e 0,7 kb), e também das enzimas *HindIII* e *SacI* (fragmentos esperados de aproximadamente 4,6 kb, 1,1 kb e 0,6 kb). A Figura 4A apresenta o esquema simplificado da clonagem dos domínios de ADAM23 em pBTM116-AMP e a Figura 4B apresenta os diagnósticos de restrição utilizados na confirmação. Os fragmentos esperados foram observados, possibilitando assim a obtenção da construção plasmidial pBTM116-AMP-ADAM23_{DIS-ACR} (pVZ984), codificadora da proteína isca LexA-ADAM23_{DIS-ACR}.

4.1.1.2. Ensaio de auto-ativação da isca

A etapa subsequente à obtenção da isca LexA-ADAM23_{DIS-ACR} consiste na análise da autoativação dos genes repórteres do sistema de duplo-híbrido. Para tanto, a linhagem L40 foi inicialmente transformada com a construção plasmidial pBTM116-AMP-ADAM23_{DIS-ACR} (pVZ984, VZL833) e, a seguir, com o vetor plasmidial pACT (pSV149, VZL834) para testar a capacidade de crescimento 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 foram utilizadas como controles deste sistema (Thompson et al., 2003). Assim, a interação entre as proteínas eIF5A e Dys1 (VZL899), eIF5A e Lia1 (VZL900), foram utilizadas como controles positivo forte (++) e positivo fraco (+), respectivamente. Ainda, a linhagem L40 expressando apenas o gene da isca eIF5a na presença do vetor plasmidial pACT (VZL901) foi utilizada como controle negativo de interação (-). Após a realização deste ensaio, foi possível observar que houve crescimento dos transformantes contendo a proteína isca (LexA-ADAM23_{DIS-ACR}) e o vetor plasmidial pACT em meio SC-leu,-trp,-his e houve desenvolvimento de coloração azul no ensaio de β -galactosidase (Figura 4C). Tais resultados indicam que a proteína isca LexA-ADAM23_{DIS-ACR} leva à autoativação do sistema, o que inviabiliza a utilização deste para o rastreamento de duplo-híbrido usando LexA-ADAM23_{DIS-ACR} como proteína isca.

4.1.2. Rastreamento de duplo-híbrido pelo sistema ProQuest

Uma vez que o sistema de L40 apresentou autoativação da proteína isca para os domínios DIS-ACR de ADAM23, decidiu-se pela utilização de um sistema

comercial denominado ProQuest (Invitrogen), que contempla uma série de diferenças significativas em relação ao sistema de L40.

O sistema de duplo-híbrido ProQuest utiliza vetores plasmidiais centroméricos, que mantêm um nível relativamente baixo de expressão das proteínas de fusão quando comparado ao sistema da linhagem L40, tais vetores codificam o domínio de ligação ao DNA (Gal4-BD) e de ativação (Gal4-AD) da transcrição da proteína Gal4 de levedura fusionados separadamente às proteínas de interesse que, quando interagem entre si, reconstituem a proximidade natural destes domínios, promovendo a transcrição dos genes sobre o controle de Gal4. Neste sistema, a linhagem de *S. cerevisiae* utilizada é a MaV203, que apresenta os genes repórteres *HIS3*, *URA3* e *lacZ* sobre o controle de promotor responsívél a Gal4.

4.1.2.1. Clonagem de ADAM23_{DIS-ACR} no vetor plasmidial de duplo-híbrido pDEST32

A sequência codificadora para os domínios desintegrina e rico em cisteína de ADAM23 (ADAM23_{DIS-ACR}) foi amplificada por PCR a partir da construção plasmidial pCDNA3.1-ADAM23 (pVZ890), que contém o cDNA completo de ADAM23, utilizando os oligonucleotídeos VZO482 e VZO508. O fragmento obtido da PCR foi clonado no vetor plasmidial pCR8-TOPO e o produto da ligação pCR8-ADAM23_{DIS-ACR} (pVZ963), denominado clone de entrada, foi amplificado em bactéria DH5α e utilizado para a realização da reação de recombinação LR.

Resumidamente, para a geração da construção plasmidial codificadora da fusão entre o domínio de ligação ao DNA de Gal4 (Gal4-BD) e os domínios DIS-ACR de ADAM23, foi realizada a reação de recombinação LR, que transfere o inserto do clone de entrada, pCR8-ADAM23_{DIS-ACR}, para o vetor plasmidial de interesse, pDEST32 (pVZ860), gerando a construção plasmidial pDEST32-ADAM23_{DIS-ACR} (pVZ916). O produto da reação de recombinação foi então transformado em DH5α e, após a extração, foi submetido a diagnóstico de restrição. A Figura 5A apresenta um mapa simplificado da construção plasmidial obtida. A digestão com *Xho*I deve gerar um padrão de restrição contendo fragmentos de aproximadamente 8,8 kb, 1,7 kb e 0,8 kb. Fragmentos de aproximadamente 11,2 kb e 0,2 kb são esperados para a digestão com a enzima *Sac*I. Esses produtos da digestão foram confirmados por eletroforese em gel de agarose, como apresentado na Figura 5B. Assim, a presença

do fragmento contendo ADAM23_{DIS-ACR} e sua orientação correta com relação ao vetor plasmidial pDEST32 foram confirmadas por diagnóstico de restrição. Esta clonagem também foi confirmada por sequenciamento usando os oligonucleotídeos iniciadores VZO551 e VZO552, não mostrando alteração na fase de leitura na região de interface entre o vetor plasmidial e inserto ou na sequência de bases quando comparada com a sequência disponível no banco de dados do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

4.1.2.2. Ensaio de autoativação da isca

A construção plasmidial pDEST32-ADAM23_{DIS-ACR} (pVZ916), que codifica a proteína isca BD-ADAM23_{DIS-ACR}, foi introduzida na linhagem MaV203 (VZL772), gerando assim a linhagem VZL816. Esta foi transformada com o vetor plasmidial pDEST22 (pVZ861), gerando a linhagem VZO817, e submetida à verificação do perfil de ativação dos genes repórteres *HIS3*, *URA3* e *lacZ*. Para isso, diluições seriadas (1:10) das culturas de dois transformantes foram aplicadas nos meios SC-leu,-trp, SC-leu,-trp,-his+25 mM de 3-aminotriazol (3AT), SC-leu,-trp,-ura e SC-leu,-trp+0,2% de ácido 5 fluoroótico (5FOA) e testadas para atividade de β -galactosidase. O composto 3AT é utilizado como um inibidor competitivo para o produto do gene *HIS3* (imidazolglicerol-P-desidratase), assim, o seu emprego aumenta o rigor do rastreamento e da análise dos clones positivos de duplo-híbrido, possibilitando selecionar ligantes com diferentes perfis de interação (diferentes níveis de expressão do gene repórter *HIS3*). O composto 5FOA é um precursor de pirimidinas que se torna tóxico para linhagens quando degradado pelo produto gênico de *URA3* (orotidina-5'-P-descarboxilase), assim, somente as linhagens que não ativam a expressão do repórter *URA3* são capazes de crescer em meio contendo 5FOA. Portanto, este repórter pode ser utilizado tanto como uma marca de seleção positiva em meio sem uracila, como negativa, no meio com 5-FOA.

O sistema de duplo-híbrido ProQuest inclui várias construções plasmidiais controles baseados na interação conhecida entre a proteína Krev1 (um membro da família Ras) e a proteína RalGDS ("Ral guanine nucleotide dissociator stimulator protein") (Herrmann et al., 1996; Serebriiskii et al., 1999). As mutações m1 e m2 na proteína RalGDS afetam a interação com Krev1 em intensidades diferentes. Assim, a linhagem MaV203 contendo concomitantemente as construções plasmidiais pEXP-

Krev1 e pEXP22-RalGDSwt (VZL813) funciona como controle positivo de interação forte (++) e as linhagens de MaV203 contendo a construção plasmidial pEXP32-Krev1 juntamente com as construções plasmidiais das mutações pEXP22-RalGDSm1 (VZL814) ou pEXP22-RalGDSm2 (VZL815) foram utilizadas como controle positivo de interação fraca (+) e como controle negativo de interação (-), respectivamente.

Como pode ser observado na Figura 5C, os dois transformantes selecionados da linhagem MaV203 contendo a proteína isca BD-ADAM23_{DIS-ACR} e o vetor plasmidial pDEST22 não foram capazes de crescer em meio SC-leu,-trp,-his+25mM de 3AT e em SC-leu,-trp,-ura, além de apresentar um fenótipo de crescimento em SC-leu,-trp+0,2% de 5FOA. Ainda, os transformantes selecionados não desenvolveram coloração azul quando testados para atividade de β -galactosidase. Este resultado indica que a proteína isca BD-ADAM23_{DIS-ACR} (isca) não promove a autoativação deste sistema e, portanto, pode ser utilizada para o rastreamento de duplo-híbrido.

4.1.2.3. Rastreamento de duplo-híbrido com a isca BD-ADAM23_{DIS-ACR}

Para a realização do rastreamento, a linhagem MaV203 previamente transformada com a construção plasmidial pVZ916 (VZL816) foi transformada com a biblioteca de cDNA de cérebro fetal humano (Invitrogen). Após cada transformação, as células foram plaqueadas em meio SC-leu,-trp,-his+25mM de 3AT e o controle de eficiência foi feito em meio SC-leu,-trp, no qual foram plaqueados os volumes de 2, 5 e 10 μ L da transformação.

Após uma série de seis transformações, um total de $5,1 \times 10^5$ transformantes foram obtidos, dos quais, 726 foram capazes de crescer quando novamente testados para a ativação de *HIS3* em meio SC-leu,-trp,-his+25mM de 3AT. Desses, 48 candidatos foram capazes de ativar a transcrição do gene *lacZ*, os quais foram selecionados para teste de ativação em diluição seriada. Dos 48 clones encontrados, somente 7 (clones 11, 23, 27, 47, 48, 91 e 233) foram capazes de confirmar o fenótipo esperado quando testado para ativação de repórteres em diluição seriada.

Para eliminar interações inespecíficas, as construções plasmidiais, contidas

nos clones 11, 23, 27, 47, 48, 91 e 233 obtidos no rastreamento, foram submetidos ao “plasmid linkage”. O “plasmid linkage”, ou ensaio de ligação do plasmídeo, consiste na confirmação da ligação entre a presença da construção plasmidial da biblioteca (presa, pEXP/AD502-cloneX), quando em combinação com a proteína isca BD-ADAM23_{DIS-ACR}, com os fenótipos de ativação dos genes repórteres. Para tanto, a linhagem MaV203 contendo a construção plasmidial pDEST32-ADAM23_{DIS-ACR} foi re-transformada com as 7 construções plasmidiais provenientes da biblioteca e uma colônia isolada de cada transformação foi submetida aos testes de ativação dos genes repórteres em diluição seriada nos meios SC-leu,-trp, SC-leu,-trp,-his+25mM de 3AT, SC-leu,-trp,-ura e SC-leu,-trp+0,2% de 5FOA, e testados para atividade de β -galactosidase. Como observado na Figura 6, apenas o clone 47 foi capaz de revelar um possível ligante dos domínios desintegrina e rico em cisteína de ADAM23.

Em seguida, as extremidades do cDNA presente no clone 47 foram sequenciadas, utilizando os oligonucleotídeos iniciadores VZO551 e VZO552, sendo identificado como o cDNA de SPRY1 (Sprouty Homolog 1), uma proteína conhecida por seu envolvimento na inibição das vias de sinalização celular por tirosina-quinases, sendo, assim, uma proteína estritamente citoplasmática (Mason et al., 2006). Além disso, as proteínas SPRY também acumulam uma grande lista de proteínas ligantes e de proteínas associadas que regulam sua atividade, muitas das quais interagem através do domínio rico em cisteína, altamente conservado em suas isoformas (Kim e Bar-Sagi, 2004; Mason et al., 2006; Bundschu et al., 2007; Cabrita e Christofori, 2008). Tais dados apontam para uma interação entre o domínio rico em cisteína contido na isca de ADAM23 e o domínio rico em cisteína de SPRY1, caracterizando um falso positivo, uma vez que SPRY1 está localizada no citoplasma e os domínios DIS-ACR de ADAM23 são extracelulares.

4.2. Rastreamento de duplo-híbrido utilizando a proteína MX1

4.2.1. Rastreamento de duplo-híbrido pelo sistema ProQuest

4.2.1.1. Clonagem de MX1 no vetor plasmidial de duplo-híbrido pDEST32

No procedimento de clonagem de MX1, a região codificadora foi obtida por PCR a partir do plasmídeo pCMV6-XL5-MX1 (pVZ997), contendo o cDNA completo

de MX1, pela utilização dos oligonucleotídeos VZO623 e VZO624, e o fragmento resultante foi ligado ao vetor plasmidial pCR8, gerando assim a construção plasmidial pCR8-MX1 (pVZ998), clone de entrada. Após a reação de recombinação LR entre pCR8-MX1 e pDEST32, a construção plasmidial de interesse pDEST32-MX1 (pVZ999) foi submetido a diagnóstico de restrição com as enzimas *Xho*I e *Bgl*II, mostrando os fragmentos esperados de aproximadamente 5,0 kb, 2,9 kb, 1,7 kb, 1,2 kb, 0,84 kb e 0,8 kb e também com a enzima *Sac*I, gerando as bandas de aproximadamente 11,0 kb, 1,0 kb e 0,7 kb. As Figuras 7A e 7B mostram, respectivamente, o esquema simplificado da clonagem de MX1 e o seu diagnóstico de restrição, visualizado em gel de agarose. Além disso, as construções plasmidiais foram sequenciadas usando os oligonucleotídeos iniciadores VZO551 e VZO552, não mostrando alteração na fase de leitura na região de interface entre vetor plasmidial e inserto ou na sequência de bases quando comparada com a sequência disponível no banco de dados do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

4.2.1.2. Ensaio de autoativação da isca

A construção plasmidial pDEST32-MX1, que codifica a proteína a isca BD-MX1, foi utilizada para transformar a linhagem MaV203 (VZL772), gerando assim a linhagem VZL887. Esta foi transformada com o vetor plasmidial pDEST22 (pVZ861, VZL888) e submetida à verificação do perfil de ativação dos genes repórteres *HIS3*, *URA3* e *lacZ*. Para isso, diluições seriadas (1:10) das culturas de dois transformantes foram aplicadas nos meios SC-leu,-trp, SC-leu,-trp,-his+15mM de 3-aminotriazol (3AT), SC-leu,-trp,-ura e SC-leu,-trp+0,2% de ácido 5 fluoroótico (5FOA) e testadas para atividade de β -galactosidase. Como pode ser observado na Figura 7C, a isca não revelou autoativação e pode ser utilizada para o rastreamento de duplo-híbrido.

4.2.1.3. Rastreamento de duplo-híbrido com a isca BD-MX1

Um vez verificado que a expressão da isca não leva a autoativação do sistema, foram iniciadas as transformações com as biblioteca de cDNA de cérebro fetal humano (Invitrogen). Durante o procedimento de seleção primária em meio seletivo para o repórter *HIS3* utilizando a concentração de 15mM de 3AT, houve o surgimento de um número elevado de transformantes. Uma nova transformação foi

realizada utilizando a mesma biblioteca de cDNA ou o vetor plasmidial pDEST22 vazio, sendo plaqueada em meio seletivo para o repórter *HIS3* em concentrações crescentes de 3AT, nas quais foram encontrados o mesmo padrão de crescimento entre a transformação com as construções plasmidiais da biblioteca e a transformação controle com o vetor plasmidial pDEST22, caracterizando o surgimento de falsos positivos.

Após selecionar aproximadamente 80 clones provenientes das placas de transformação com a biblioteca de cDNA e testá-los em diluições seriadas (1:10) das culturas aplicadas nos meios SC-leu,-trp, SC-leu,-trp,-his+15mM e +30mM de 3AT, SC-leu,-trp,-ura e SC-leu,-trp+0,2% de 5FOA e testadas para atividade de β -galactosidase, nenhum foi capaz de ativar a transcrição dos genes repórteres (resultados não apresentados). Este resultado, aliado ao fato do surgimento de ligantes no sistema da linhagem L40 (descrito abaixo), levou à desistência da utilização do sistema da linhagem MaV203 para o rastreamento com a proteína MX1.

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

4.2.2.1. Clonagem de MX1 no vetor plasmidial de duplo-híbrido pBTM116-KAN

O procedimento de clonagem do gene MX1 no vetor plasmidial pBTM116-KAN (pVZ993) foi realizado pela subclonagem do gene MX1 presente na construção plasmidial pCR8-MX1 (pVZ998), a partir de sua remoção com a enzima de restrição *EcoRI*. A construção plasmidial obtida (pBTM116-KAN-MX1, pVZ1004) foi testada para presença do inserto, pela digestão com *EcoRI*, liberando os fragmentos de aproximadamente 5,7 kb e 2,2 kb, e também checado para direcionalidade pela digestão com as enzimas de restrição *EcoRV* e *PstI*, liberando os fragmentos de aproximadamente 4,8 kb, 1,1 kb, 1,0 kb, 0,6 kb e 0,2 kb, que confirmam a direção correta de MX1 em relação a LexA. A Figura 8A apresenta o esquema simplificado da clonagem de MX1 no vetor plasmidial pBTM116-KAN e a Figura 8B apresenta o diagnóstico de restrição da construção.

4.2.2.2. Ensaios de expressão e autoativação da isca

Para os transformantes selecionados da linhagem L40 contendo a construção plasmidial pBTM116-KAN-MX1 (VZL889), foi realizado ensaio de “western blot” visando confirmar a expressão da proteína isca LexA-MX1. Assim, os lisados das linhagens L40, L40 contendo o vetor plasmidial pBTM116-KAN e três transformantes contendo a construção plasmidial pBTM116-KAN-MX1 foram blotados contra anticorpo anti-LexA (Millipore). Anticorpo anti-eIF5A de *S. cerevisiae* foi utilizado como controle deste ensaio. Como pode ser visto na Figura 8C, todas as linhagens produzem eIF5A (~17 kDa). A linhagem L40 contendo pBTM116-KAN produz apenas a proteína LexA, de aproximadamente 22 kDa, e os três transformantes da linhagem L40 contendo pBTM116-KAN-MX1 produzem apenas LexA-MX1, de aproximadamente 110 kDa. Esse resultado confirma a produção da proteína isca LexA-MX1 pelos transformantes da linhagem L40.

Após a checagem da produção da proteína isca, a linhagem de L40 contendo a construção plasmidial pBTM116-KAN-MX1 foi transformada com o vetor plasmidial pACT vazio, gerando a linhagem VZL890, e dois transformantes foram testados para autoativação do sistema. Como pode ser visto na Figura 8D, a proteína isca LexA-MX1 (isca) não promove a autoativação e, portanto, pode ser utilizada para o rastreamento de duplo-híbrido.

4.2.2.3. Rastreamento de duplo-híbrido com a isca LexA-MX1

Para a realização do rastreamento, a linhagem L40 previamente transformada com a construção plasmidial pBTM116-KAN-MX1 (VZL889) foi transformada com a biblioteca de cDNA de cérebro fetal humano (Clontech). Após cada transformação, as linhagens foram plaqueadas em meio SC-leu,-trp,-his e o controle de eficiência foi feito em meio SC-leu,-trp, no qual foram plaqueados os volumes de 2, 5 e 10 µL da transformação.

Após uma série de seis transformações, um total de $1,0 \times 10^6$ transformantes foram obtidos, gerando 157 transformantes no meio seletivo SC-leu,-trp,-his, dos quais, 116 foram capazes de crescer quando novamente testados para a ativação de *HIS3* em meio SC-leu,-trp,-his e desenvolveram coloração azul quando testados para atividade de β -galactosidase. Tais clones foram considerados positivos para

interação e selecionados para a etapa posterior.

Para confirmar a ligação de ativação dos genes repórteres com a presença da construção plasmidial da biblioteca (presa), a linhagem L40 contendo a construção plasmidial pBTM116-KAN-MX1 foi re-transformada com cada construção plasmidial isolada da biblioteca e uma colônia isolada de cada uma das transformações foi submetida a teste de ativação dos genes repórteres em diluição seriada nos meios SC-leu,-trp e SC-leu,-trp,-his e testada para atividade de β -galactosidase. Dos 116 clones testados, um total de 76 apresentaram crescimento em meio SC-leu,-trp,-his e desenvolveram coloração azul quando testados para atividade de β -galactosidase, caracterizando ligantes prováveis de MX1. Curiosamente, um dos clones selecionados (clone 2) apresentou crescimento em meio SC-leu,-trp,-his e não desenvolveu coloração azul quando submetido a teste de β -galactosidase.

Em seguida, as extremidades dos cDNAs presentes nos 76 clones selecionados foram sequenciadas, utilizando os oligonucleotídeos iniciadores SVO135 e SVO199, para sua identificação, que foi realizada pelo alinhamento das sequências obtidas juntamente à base de dados de humanos do NCBI (Tabela 4). Os 76 clones obtidos no rastreamento revelaram 31 ligantes prováveis de MX1, sendo que 9 destes, incluindo a própria proteína MX1, já haviam sido descritas como ligantes de MX1.

Para testar a especificidade das ligações das 22 proteínas ainda não descritas como ligantes de MX1, as respectivas construções plasmidiais isoladas da biblioteca foram transformadas inicialmente na linhagem L40 contendo a construção plasmidial pBTM116-AMP-PUB1 (pSV424), que codifica uma proteína isca (LexA-Pub1) diferente daquela utilizada para o rastreamento. A seguir, as mesmas construções plasmidiais foram introduzidas na linhagem L40 contendo o vetor plasmidial pRS314 (*TRP1*, pSV58), para testar a capacidade da proteína presa de se ligar ao promotor de LexA no gene repórter e assim ativar a transcrição independentemente da proteína isca. A Figura 9 mostra os resultados obtidos com a construção plasmidial pBTM116-AMP-PUB1 (A) e com o vetor plasmidial pRS314 (B). Como pode ser visto, a construção plasmidial da proteína presa BRF2 foi capaz de ativar o sistema nas duas condições testadas. Dessa forma, os dois clones (68 e 89) que codificam a proteína BRF2 foram desconsiderados deste estudo. Assim, este rastreamento possibilitou o isolamento de 74 clones que codificam para 9 ligantes já conhecidos e

21 ligantes prováveis de MX1.

A Figura 10 apresenta o resultado da avaliação da expressão dos genes repórteres *HIS3* e *lacZ* de um clone representativo de cada um dos 30 ligantes de MX1 encontrados no rastreamento com a proteína isca LexA-MX1.

Como dito acima, entre as proteínas reveladas neste rastreamento, 9 já foram descritas como ligantes de MX1 (Tabela 4, destacados em vermelho). Entre estes ligantes estão 8 proteínas DAXX, SUMO1, UBE2I, CASP8AP2, PIAS1, BRD7, TDG e GMEB1 que foram descritas como ligantes de MX1 de camundongos (Trost et al., 2000; Engelhardt et al., 2001). Ainda, a proteína MX1 também foi revelada como ligante, resultado que está de acordo com a sua capacidade de oligomerização (Melén et al., 1992). O encontro de ligantes já descritos em outros estudos valida os resultados obtidos e garante a confiabilidade no rastreamento realizado.

Além dos clones previamente descritos como ligantes de MX1, foram isolados neste rastreamento de duplo-híbrido os genes de 21 proteínas diferentes, a saber: RELA, DNLZ, RUSC2, ZBTB16, KIF26B, LAMA2, ZNF251, ZNF623, PSD3, ZCCHC12, CBX4, KLHL35, C7orf25, CHD3, ADRM1, PLRG1, TUBA1A, HMGXB4, SLC25A3, LRRC4B e HIRIP3.

Buscando entender a correlação funcional entre todos os ligantes prováveis de MX1, e assim obter uma visão geral sobre o papel funcional de MX1, foi realizada a uma análise de ontologia genética. Para este fim, foram utilizados os 30 genes encontrados neste rastreamento, assim como genes de 6 ligantes já descritos para MX1 de camundongos e humanos, mas não identificados neste rastreamento (Tabela 5, genes em negrito e sublinhados). A análise de ontologia genética mostrou que os genes estão principalmente envolvidos na regulação da transcrição, na regulação da apoptose, na resposta celular a estresse envolvendo danos do DNA e no controle do ciclo celular, o que está de acordo com o fato de que muitos desses genes estão envolvidos na formação de PML-NBs (Tabela 5/Figura 11) (<http://omicslab.genetics.ac.cn/GOEAST/index.php>).

Somente 10 dos genes identificados neste estudo não foram correlacionados às funções reveladas pela análise de ontologia genética. Entre eles estão os clones codificantes para: ADRM1, uma proteína envolvida na desubiquitinação, durante a degradação de proteínas (Qiu et al., 2006). KIF26B, PSD3 e TUBA1A, envolvidas no

transporte dependente de microtúbulos de vesículas e complexos proteicos (Hirokawa, 1998; Miki et al., 2003; Anders e Jürgens, 2008), LRRC4B, uma proteína da fenda pós sináptica com domínio citoplasmático (Linhoff et al., 2009), KLHL35 e C7orf25, proteínas citoplasmáticas cujas funções são desconhecidas.

Continuando, não foram contemplados nas funções reveladas pela análise ontológica os genes que codificam para: DNLZ e SLC25A3, descritas como componentes da membrana interna da mitocôndria (Burri, 2004; Palmieri, 2004) e LAMA2 uma proteína extracelular envolvida no processo de adesão celular (Girgenrath et al., 2005). Essas proteínas provavelmente não sejam ligantes de MX1 por apresentarem localização celular diferente de MX1.

Um resultado bastante interessante revelado neste rastreamento é a interação física de MX1 com proteínas envolvidas no processo de SUMOilação, a saber: SUMO1 e as enzimas de conjugação E2 (UBE2I) e ligação E3 (PIAS1, CBX4). Apesar de não ter sido revelado neste rastreamento, vale ressaltar que MX1 também interage fisicamente com a proteína de ativação E1 (UBE1I) (Engelhardt et al., 2001). Além disso, também foram reveladas como ligantes de MX1 as seguintes proteínas constituintes de corpúsculos nucleares conhecidos como “Promyelocytic Leukaemia Nuclear Bodies” (PML-NBs): DAXX, ZBTB16, PIAS1, SUMO1, TDG, ZNF623 E UBE2I. Com exceção de CBX4, ZBTB16 e ZNF623, os demais já foram descritos como ligantes de MX1 de camundongos (Trost et al., 2000; Engelhardt et al., 2001; Geiss-Friedlander e Melchior, 2007). Ainda, grande parte dos ligantes identificados estão relacionados com o controle da transcrição e apoptose.

Apesar de muitos dos ligantes revelados no rastreamento correlacionarem MX1 à via de modificação pós-traducional de SUMO1, não há descrição na literatura de que MX1 seja sumoilada ou atue diretamente na função desta via. Uma possível explicação para a interação entre MX1 e as proteínas da via de SUMOilação reside na semelhança existente entre esta e a proteína DYN1. Como descrito anteriormente, MX1 e DYN1 fazem parte da superfamília de GTPases dinaminas (Figura 2). Curiosamente, dinamina-1 também foi descrita como ligante das proteínas SUMO1, UBE2I (E2) e PIAS1 (E3). Ainda, foi demonstrado que o domínio efetor de GTPase (GED) é o responsável pela interação entre DYN1 e estas proteínas. Também foi demonstrado que a interação entre DYN1 e os componentes da SUMOilação impede que DYN1 forme oligômeros, afetando assim seu papel no

tráfego vesicular. Estes fatos em associação com os dados de mapeamento que mostraram uma semelhança entre os resíduos de aminoácidos de SUMO1 e UBE2I responsáveis pela interação com o domínio GED de DYN1, levantaram a hipótese de que a interação entre DYN1, SUMO1 e UBE2I pode ser sequencial e não simultânea e de que DYN1 poderia atuar como uma proteína adaptadora (E3 ligase), promovendo a SUMOilação de determinadas proteínas através da sua ligação com estas proteínas (Haller et al., 2007b; Mishra et al., 2004).

Assim como MX1, muitas das proteínas envolvidas na formação dos PML-NBs são transcricionalmente induzidas pela ligação de interferons do tipo I e III a receptores da superfície celular. Entre estas proteínas estão PML e SP100, descritas como ligantes de MX1 em camundongos, o que aponta para a possibilidade da atuação conjunta destas proteínas no desenvolvimento das respostas celulares à sensibilização por interferons. Além disso, vários dos componentes dos PML-NBs sofrem modificação por SUMO1 ou interagem fisicamente com proteínas sumoiladas via “motif” de interação com SUMO1 (SIM), como a proteína DAXX, sendo que até mesmo a própria formação dos PML-NBs é coordenada pela tripla SUMOilação de PML e também pela presença de “motifs” SIM nesta proteína, permitindo a interação física com os outros constituintes deste corpúsculo. Por fim, ressalta-se a importância do processo de formação de PML-NBs, uma vez que estes estão envolvidos em uma série de processos celulares como apoptose, controle de expressão gênica, mecanismos de reparo do DNA e resistência a vírus (Lin et al., 2006; Bernardi e Pandolfi, 2007; Haller et al., 2007a; Krieghoff-Henning e Hofmann, 2008).

Os resultados obtidos no presente estudo ampliam o conhecimento sobre os ligantes físicos de MX1 na célula e sugerem vias de sinalização nas quais MX1 deve atuar. Vale ressaltar que as várias funções atribuídas a MX1, através de seus ligantes, são de extrema importância para o controle do desenvolvimento de neoplasias, além de dar suporte à idéia de que MX1 possui um papel importante no controle da proliferação celular, como sugerido pelos resultados de metilação de MX1 (Calmon et al., 2009). Ainda, as funções atribuídas a MX1 corroboraram com os dados que associam seu silenciamento à progressão do câncer e ao fenótipo de imortalização em células tumorais (Kulaeva et al., 2003; Noser, 2007).

Desta maneira, a confirmação por outros métodos das interações descritas

aqui e estudos adicionais sobre MX1, como aqueles que visam avaliar a sua influência sobre a SUMOilação e os PML-NBs, contribuirão para o entendimento de seu papel biológico, principalmente na regulação transcricional e na apoptose e elucidarão o papel de seu silenciamento no desenvolvimento neoplásico.

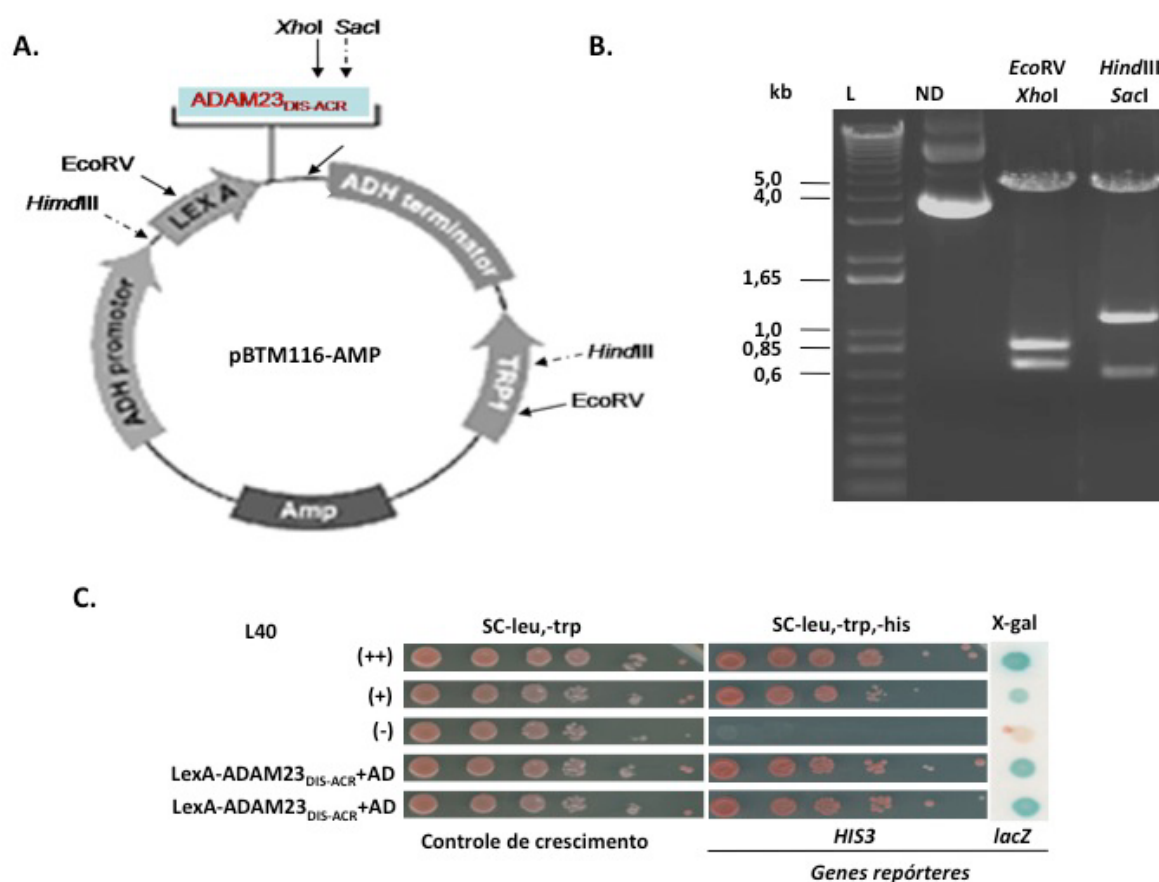


Figura 4. Caracterização da construção plasmidial pBTM116-AMP-ADAM23_{DIS-ACR} e teste de autoativação. **A.** Esquema representativo da clonagem de ADAM23_{DIS-ACR} no vetor de duplo-híbrido pBTM116-AMP e dos sítios de restrição utilizados na confirmação da construção plasmidial pBTM116-AMP-ADAM23_{DIS-ACR}. **B.** Diagnóstico de restrição para a construção plasmidial pBTM116-AMP-ADAM23_{DIS-ACR} com as combinações das enzimas *EcoRV* e *XhoI* (fragmentos esperados de 4,8 kb, 0,9 kb e 0,7 kb) ou *HindIII* e *SacI* (fragmentos esperados de 4,6 kb, 1,1 kb e 0,6 kb). ND = não digerido. L (ladder) = padrão de massa molecular "1kb Ladder Plus" (Invitrogen). **C.** Teste de autoativação dos genes repórteres *HIS3* e *lacZ* pela proteína isca LexA-ADAM23_{DIS-ACR}. Dois transformantes da linhagem L40 contendo a construção plasmidial pBTM116-AMP-ADAM23_{DIS-ACR} (LexA-ADAM23_{DIS-ACR}) e o vetor plasmidial pACT (AD) foram cultivados nos meios de cultura SC-leu,-trp, SC-leu,-trp,-his e testados para atividade de β-galactosidase. L40/pBTM116-AMP-TIF51A + pACT-Dys1 (++) , L40/pBTM116-AMP-TIF51A + pACT-Lia1(+) e L40/pBTM116-AMP-TIF51A + pACT (-) foram utilizadas como controle positivo forte, positivo fraco e negativo, respectivamente.

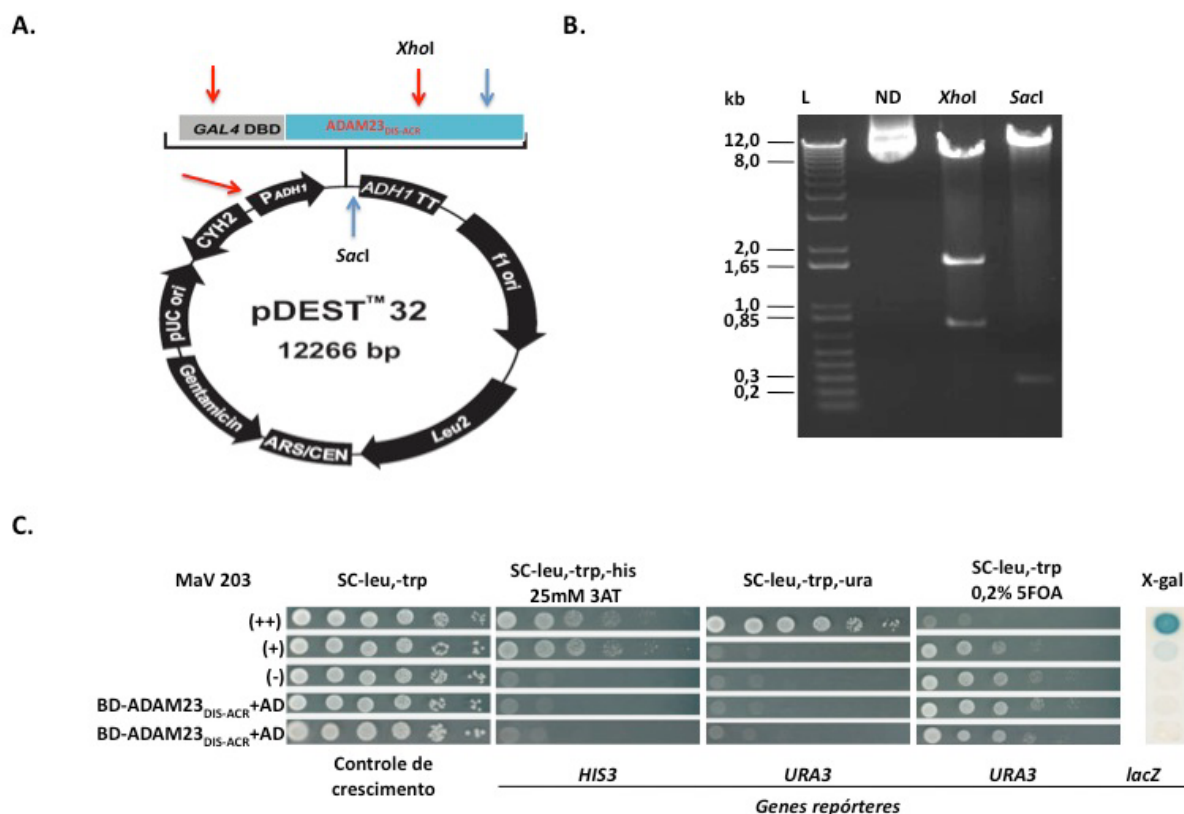


Figura 5. Caracterização da construção plasmidial pDEST32-ADAM23_{DIS-ACR} e teste de autoativação. **A.** Esquema representativo da clonagem de ADAM23_{DIS-ACR} no vetor de duplo-híbrido pDEST32 e dos sítios de restrição utilizados na confirmação da construção plasmidial pDEST32-ADAM23_{DIS-ACR}. **B.** Diagnóstico de restrição para a construção plasmidial pDEST32-ADAM23_{DIS-ACR} com as enzimas *XhoI* (fragmentos esperados de 8,8 kb, 1,7 kb e 0,8 kb) ou *SacI* (fragmentos esperados de 11,2 kb e 0,2 kb). ND = não digerido. L (ladder) = padrão de massa molecular “1kb Ladder Plus” (Invitrogen). **C.** Teste de autoativação dos genes repórteres *HIS3*, *URA3* e *lacZ* pela proteína isca BD-ADAM23_{DIS-ACR}. Dois transformantes da linhagem MaV203 contendo a construção plasmidial pDEST32-ADAM23_{DIS-ACR} (BD-ADAM23_{DIS-ACR}) e vetor plasmidial pDEST22 (AD) foram plaqueados em meio SC-leu,-trp, SC-leu,-trp,-his+25 mM de 3AT, SC-leu,-trp,-ura, SC-leu,-trp+0,2% de 5FOA e testados para atividade de β -galactosidase. A linhagem MaV203 contendo pEXP32-Krev1+pEXP22-RalGDSwt (++) , pEXP32-Krev1+pEXP22-RalGDSm1 (+) e pEXP32-Krev1+pEXP22-RalGDSm2 (-) foram utilizadas como controles positivo forte, positivo fraco e negativo, respectivamente.

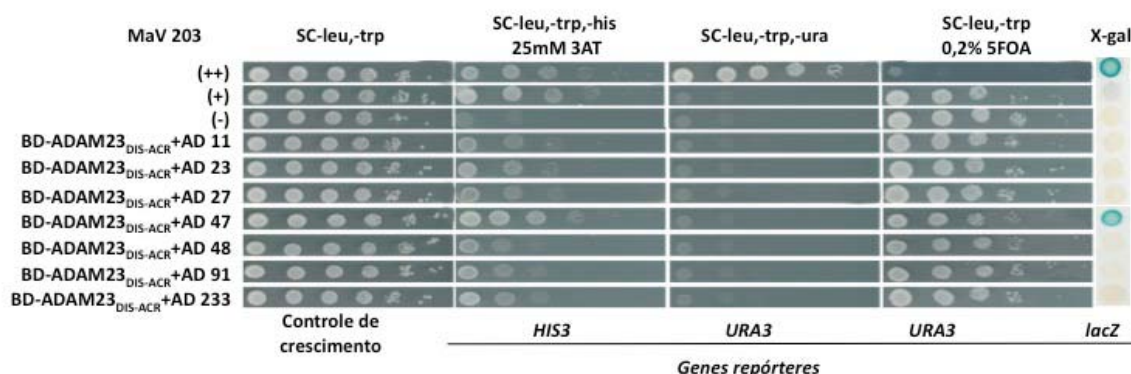


Figura 6. Avaliação da expressão dos genes repórteres (*HIS3*, *URA3* e *lacZ*) dos clones selecionados com a isca BD-ADAM23_{DIS-ACR}. Diluições seriadas (1:10) da linhagem MaV203 contendo a construção plasmidial pDEST32-ADAM23_{DIS-ACR} (BD-ADAM23_{DIS-ACR}) e a construção plasmidial contendo o cDNA selecionado pEXP/AD502-cloneX (AD #), após re-transformação, foram cultivadas em meio SC-leu,-trp, SC-leu,-trp,-his+25 mM de 3AT, SC-leu,-trp,-ura, SC-leu,-trp+0,2% de 5FOA e testadas para atividade de β -galactosidase. A linhagem MaV203 contendo pEXP32-Krev1+pEXP22-RalGDSwt (++), pEXP32-Krev1+pEXP22-RalGDSm1 (+), pEXP32-Krev1+pEXP22-RalGDSm2 (-) foram utilizadas como controles positivo forte, positivo fraco e negativo, respectivamente.

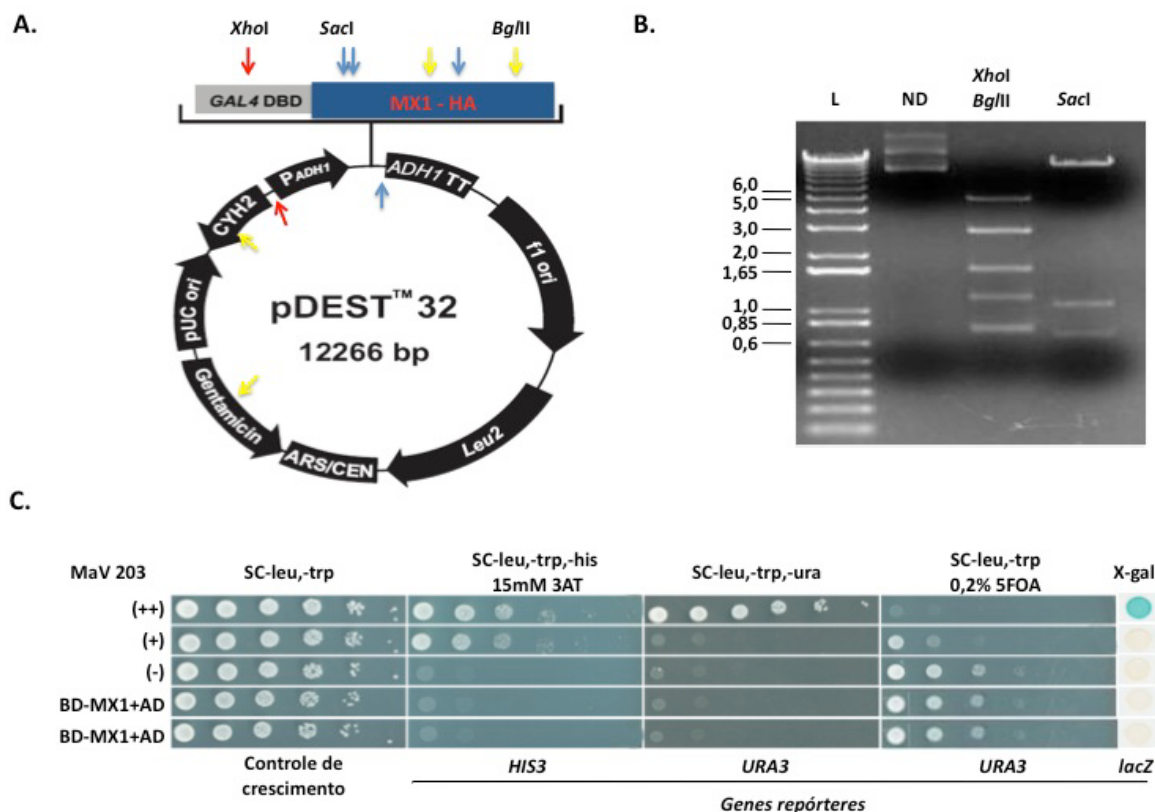


Figura 7. Caracterização da construção plasmidial pDEST32-MX1 e teste de autoativação. **A.** Esquema representativo da clonagem de MX1 no vetor de duplo-híbrido pDEST32 e dos sítios de restrição utilizados na confirmação da construção plasmidial pDEST32-MX1. **B.** Diagnóstico de restrição para a construção plasmidial pDEST32-MX1 com as enzimas *XhoI* e *BglII* (5,0 kb, 2,9 kb, 1,7 kb, 1,2 kb, 0,84 kb e 0,8 kb) ou *SacI* (11 kb, 1,0 kb e 0,7 kb). ND = não digerido. L (ladder) = padrão de massa molecular “1kb Ladder Plus” (Invitrogen). **C.** Teste de autoativação dos genes repórteres *HIS3*, *URA3* e *lacZ* pela proteína isca BD-MX1. Dois transformantes da linhagem MaV203 contendo a construção plasmidial pDEST32-MX1 (BD-MX1) e vetor plasmidial pDEST22 (AD) foram plaqueados em meio SC-leu,-trp, SC-leu,-trp,-his+15 mM de 3AT, SC-leu,-trp,-ura, SC-leu,-trp+0,2% de 5FOA e testados para atividade de β -galactosidase. A linhagem MaV203 contendo pEXP32-Krev1+pEXP22-RalGDSwt (++), pEXP32-Krev1+pEXP22-RalGDSm1 (+) e pEXP32-Krev1+pEXP22-RalGDSm2 (-) foram utilizadas como controles positivo forte, positivo fraco e negativo, respectivamente.

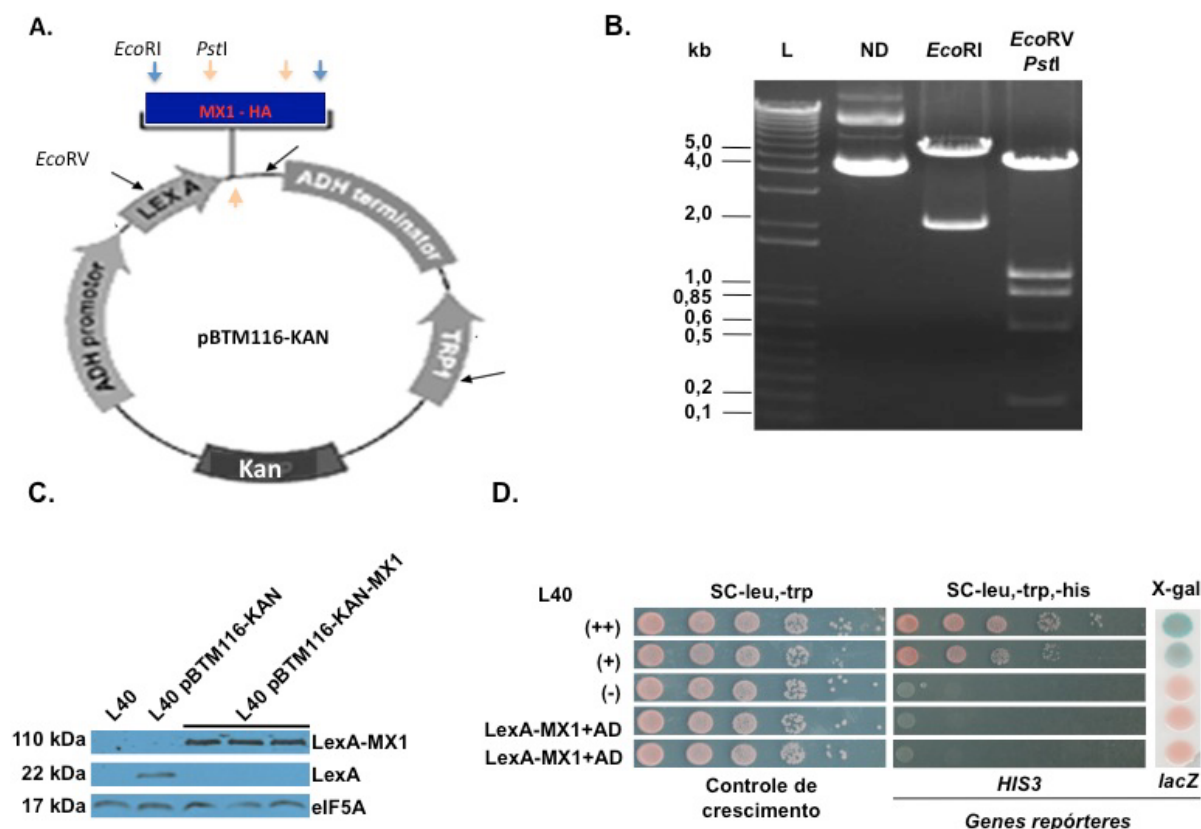


Figura 8. Caracterização da construção plasmidial pBTM116-KAN-MX1, confirmação da expressão e teste de autoativação. **A.** Esquema representativo da clonagem de MX1 no vetor de duplo-híbrido pBTM116-KAN e dos sítios de restrição utilizados na confirmação da construção plasmidial pBTM116-KAN-MX1. **B.** Diagnóstico de restrição para a construção plasmidial pBTM116-KAN-MX1 com a enzima *EcoRI* (fragmentos esperados de 5,7 kb e 2,2kb) ou com as enzimas *EcoRV* e *PstI* (fragmentos esperados de 4,8 kb, 1,1 kb, 1,0 kb, 0,6 kb e 0,2kb), e. ND = não digerido. L (ladder) = padrão de massa molecular “1kb Ladder Plus” (Invitrogen). **C.** Western blot com 18 µg do lisado da linhagem de L40, da linhagem L40 transformada como vetor plasmidial pBTM116-KAN (LexA) e de três transformantes da construção plasmidial pBTM116-KAN-MX1 (LexA-MX1) foram blotados com anticorpo anti-LexA e anti-eIF5A (controle). **D.** Teste de autoativação dos genes repórteres *HIS3* e *lacZ* pela proteína isca LexA-MX1. Dois transformantes da linhagem L40 contendo a construção plasmidial pBTM116-KAN-MX1 (LexA-MX1) e o vetor plasmidial pACT (AD) foram plaqueados nos meios de cultura SC-leu,-trp, SC-leu,-trp,-his e testados para atividade de β-galactosidase. L40/pBTM116-AMP-TIF51A + pACT-Dys1 (++), L40/pBTM116-AMP-TIF51A + pACT-Lia1(+) e L40/pBTM116-AMP-TIF51A + pACT (-) foram utilizadas como controle positivo forte, positivo fraco e negativo, respectivamente.

TABELA 4 – Ligantes prováveis de MX1 identificados neste estudo.

Clone	Gene ¹
1	DAXX
2	RELA
3, 8, 47, 115, 116, 123, 140	SUMO1
4, 15, 104	DNLZ
10, 71	RUSC2
11, 12, 107, 118	MX1
19, 32, 35, 36	ZBTB16
21, 28, 39, 43, 45, 49, 51, 57, 64, 65, 66, 70, 88, 92, 93, 99, 100, 121, 127, 130, 132, 139, 143, 144, 151	UBE2I
38	KIF26B
40	LAMA2
41	ZNF251
48, 141	CASP8AP2
52	ZNF623
54	PSD3
56	ZCCHC12
60	PIAS1
69	CBX4
76	KLHL35
77	C7orf25
86, 87, 146	CHD3
68, 89	BRF2
90, 91	ADRM1
98, 112	BRD7
101	TDG
105	PLRG1
109	TUBA1A
120	HMGXB4
133	SLC25A3
137	LRRC4B
138	GMEB1
153	HIRIP3

¹Os genes apresentados em vermelho já foram identificados em rastreamentos de duplo-híbrido de MX1 de camundongo. O gene MX1 também está em vermelho, pois já está demonstrada a oligomerização dessa proteína.

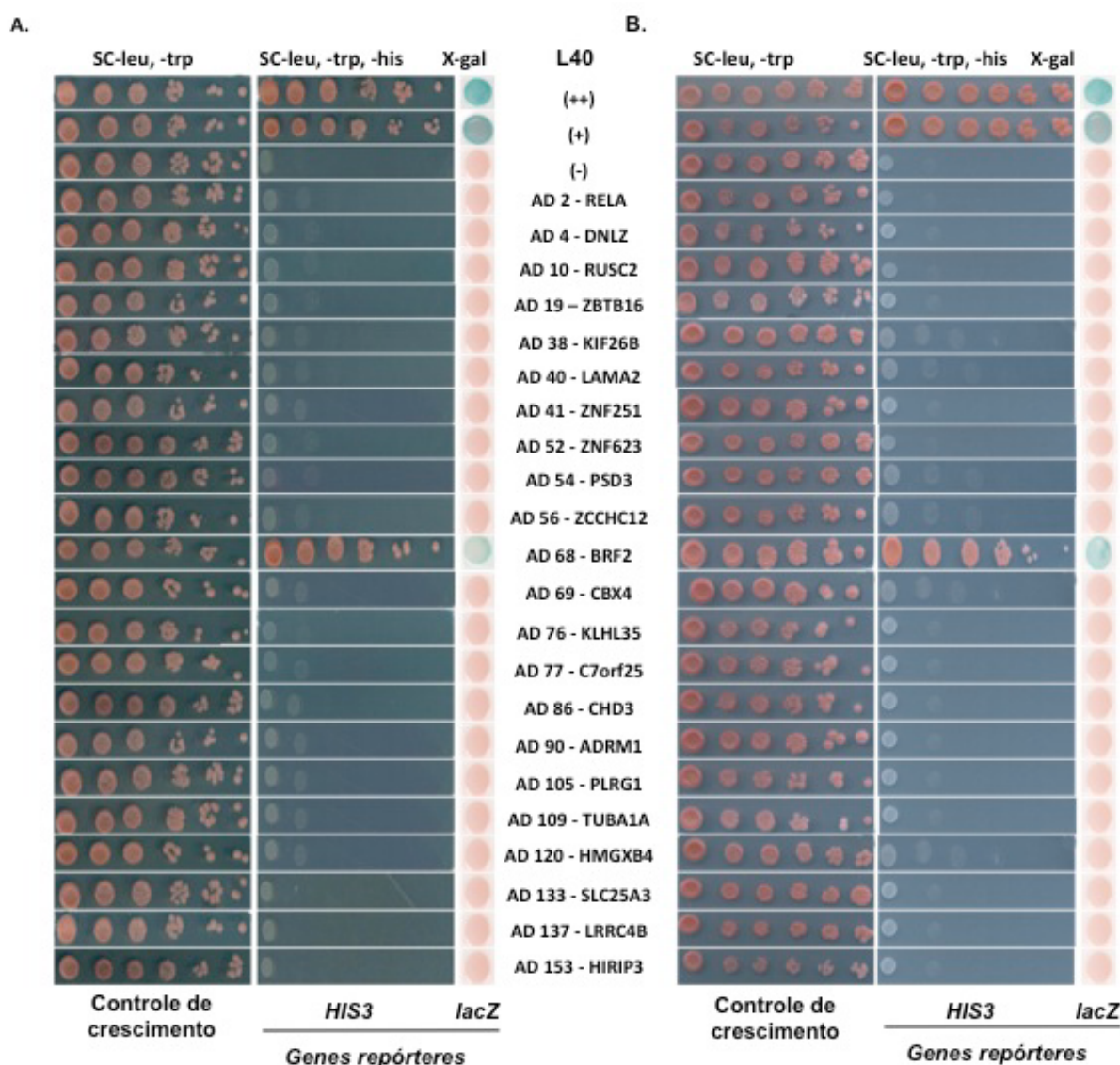


Figura 9. Avaliação da expressão dos genes repórteres (*HIS3* e *lacZ*) dos clones selecionados após transformação com a construção plasmidial pBTM116-AMP-PUB1 (A) ou com o vetor plasmidial pRS314 (B). (A) Diluições seriadas (1:10) da linhagem L40 contendo a construção plasmidial pBTM116-AMP-PUB1 e a construção plasmidial contendo o cDNA selecionado pACT2-cloneX (AD # - gene) ou (B) Diluições seriadas (1:10) da linhagem L40 contendo o vetor plasmidial pRS314 e a construção plasmidial contendo o cDNA selecionado pACT2-cloneX (AD # - gene), foram cultivadas em meio SC-leu,-trp, SC-leu,-trp,-his e testadas para atividade de β -galactosidase. L40/pBTM116-AMP-TIF51A + pACT-Dys1 (++) , L40/pBTM116-AMP-TIF51A + pACT-Lia1(+) e L40/pBTM116-AMP-TIF51A + pACT (-) foram utilizadas como controle positivo forte, positivo fraco e negativo, respectivamente.

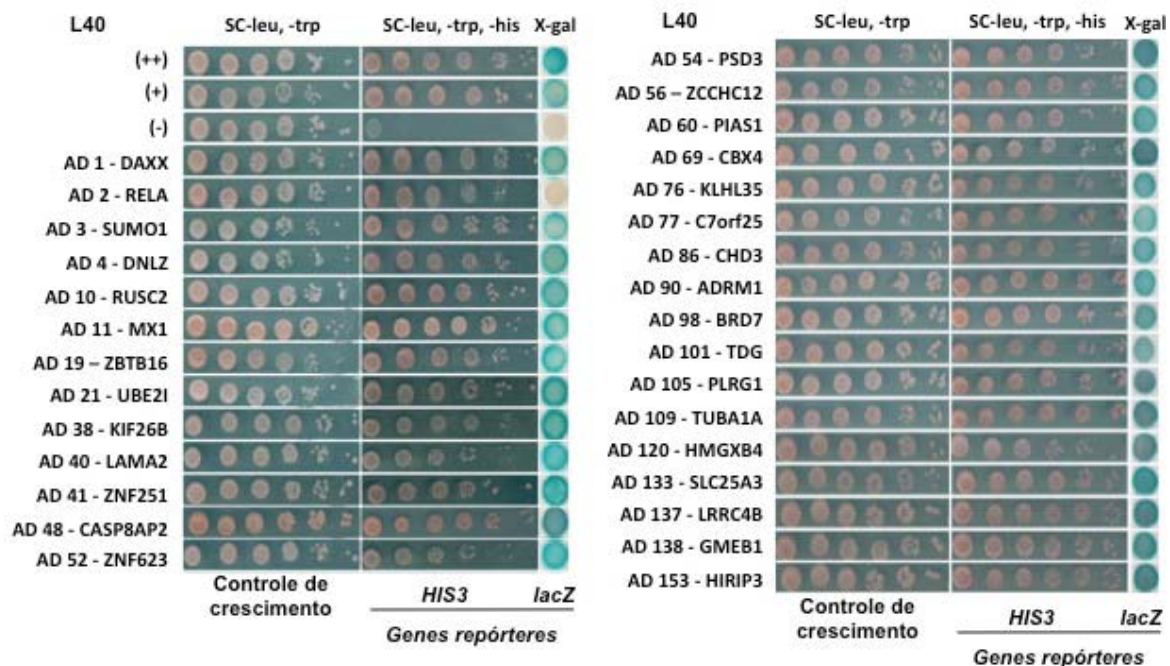


Figura 10. Avaliação da expressão dos genes repórteres (*HIS3* e *lacZ*) de um clone representativo de cada ligante selecionado com a isca LexA-MX1. Diluições seriadas (1:10) da linhagem L40 contendo a construção plasmidial pBTM116-KAN-MX1 e o construção plasmidial contendo o cDNA selecionado pACT2-cloneX (AD # - gene), após re-transformação, foram cultivadas em meio SC-leu,-trp, SC-leu,-trp,-his e testadas para atividade de β -galactosidase. L40/pBTM116-AMP-TIF51A + pACT-Dys1 (++) , L40/pBTM116-AMP-TIF51A + pACT-Lia1(+) e L40/pBTM116-AMP-TIF51A + pACT (-) foram utilizadas como controle positivo forte, positivo fraco e negativo, respectivamente.

TABELA 5 – Análise de ontologia genética dos ligantes prováveis de MX1.

Nome ¹	Regulação da transcrição	PML-NB	Resposta ao estímulo por danos ao DNA	Regulação da apoptose	Controle do ciclo celular
DAXX	x	x	x	x	X
CASP8AP2	x			x	X
HIPK2	x	x	x	x	
TOPORS	x	x	x	x	
SP100	x	x	x		
HIRIP3	x				
ZBTB16	x	x		x	
SUMO1	x	x	x		
UBE2I	x	x			X
BLM	x		x		X
BRD7	x				
ATF7IP	x				
GMEB1	x				
PIAIS1	x	x			
ZNF251	x				
ZNF623	x				
ZCCHC12	x				
CBX4	x			x	
CHD3	x				
PRLG1	x				
RELA	x			x	
TDG		x	x		
HMGXB4					X
RUSC2			x		
FANCA			x		

¹Os genes apresentados em vermelho já foram identificados em rastreamentos de duplo-híbrido de MX1 de camundongo. Os genes em negrito e sublinhados já foram identificados como ligantes de MX1 em camundongos e humanos, mas não foram encontrados neste trabalho.

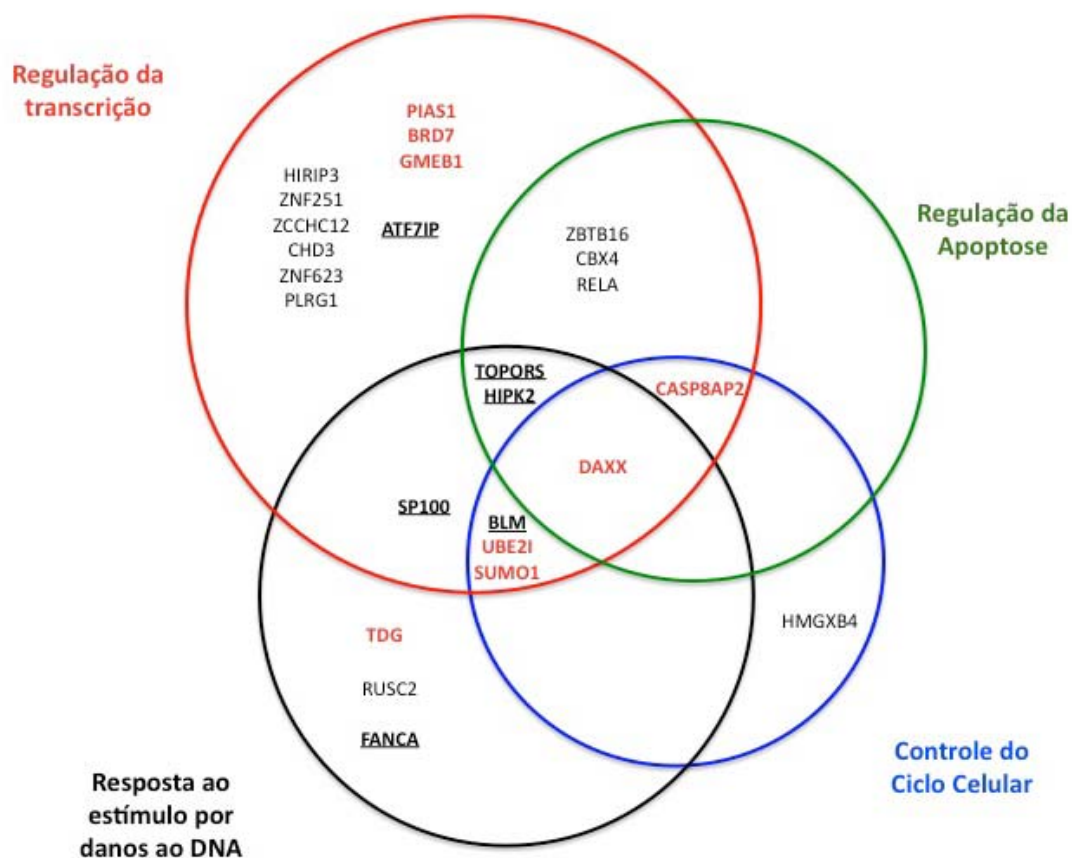


Figura 11. Diagrama de grupos dos ligantes prováveis de MX1 de acordo com dados de ontologia genética. Os clones de MX1 estão organizados segundo seu envolvimento com os processos de: Regulação da transcrição (círculo vermelho), Resposta ao estímulo por danos ao DNA (círculo preto), Regulação da apoptose (círculo verde) e Controle do ciclo celular (círculo azul). As regiões de interseção representam os clones envolvidos em mais de um processo. Os genes apresentados em vermelho já foram identificados em rastreamentos de duplo-híbrido de MX1 de camundongo. Os genes em negrito e sublinhados já foram identificados como ligantes de MX1 em camundongos e humanos, mas não foram encontrados neste trabalho.

5. CONCLUSÕES

- Nenhum ligante de ADAM23 foi revelado por duplo-híbrido, uma vez que o único ligante identificado (SPRY1) foi considerado falso positivo.
- MX1 se liga fisicamente, por duplo-híbrido, a proteínas componentes do processo de SUMOilação de proteínas e dos PML-NBs, sugerindo seu envolvimento no controle transcricional, na apoptose, na resposta a danos no DNA e no controle do ciclo celular.

REFERÊNCIAS

- ALTSCHUL, S. et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v. 25, n. 17, p. 3389-3402, 1997.
- ANDERS, N.; JÜRGENS, G. Large ARF guanine nucleotide exchange factors in membrane trafficking. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 65, p. 3233-3445, 2008.
- APPONI, L. H. et al. An interaction between two RNA binding proteins, Nab2 and Pub1, links mRNA processing/export and mRNA stability. **Molecular Cell Biology**, v. 27, n. 18, p. 6569-6579, 2007.
- ARRIBAS, J. et al. ADAMs, cell migration and cancer. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 25, p. 57-68, 2006.
- BARTEL, P.; FIELDS, S. Analyzing protein-protein interactions using two-hybrid system. **Methods in Enzymology**, v. 254, p. 241-263, 1995.
- BARTHOLIN, L. et al. FLRG, a new ADAM12-associated protein, modulates osteoclast differentiation. **Biology of the Cell**, v. 97, n. 7, p. 577-588, 2005.
- BAST, R. C. et al. **Cancer medicine**. 5th ed. Hamilton: BC Decker, 2000.
- BERNARDI, R. et al. Structure, dynamics and functions of promyelocytic leukaemia nuclear bodies. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 8, n. 12, p. 1006-1016, 2007.
- BRACHMANN, R. K.; BOEKE, J. D. Tag games in yeast: the two-hybrid system and beyond. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 8, p. 561-568, 1997.
- BRAND, S. SOCS-1 inhibits expression of the antiviral proteins 2', 5'-OAS and MxA induced by the novel interferons lambdas IL-28a and IL29. **Biochemical and Biophysical Research**, v. 331, n. 2, p. 543-548, 2005.
- BRENT, R.; PTASHNE, M. A eukaryotic transcriptional activator bearing the DNA specificity of a prokaryotic repressor. **Cell**, v. 43, n. 3, p. 729-36, 1985.
- BROMBERG, J. Stat proteins and oncogenesis. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 109, n. 9, p. 1139-42, 2002.
- BROWN, R.; STRATHDEE, G. Epigenomics and epigenetic therapy of cancer. **Trends in Molecular Medicine**, v. 8, n. 4, p. S43-S48, 2002.
- BUNDSCHU, K. et al. Getting a first clue about SPRED functions. **Bioessays**, v. 29, n. 9, p. 897-907, 2007.

BURRI, L. et al. Zim 17, a novel zinc finger protein essential for protein import into mitochondria. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 48, p. 50243, 2004.

CABRITA, M. A.; CHRISTOFORI, G. Sprouty proteins, masterminds of receptor tyrosine kinase signaling. **Angiogenesis**, v. 11, n. 1, p. 53-62, 2008.

CAL, S. et al. ADAM 23/MDC3, a human disintegrin that promotes cell adhesion via interaction with the α v β 3 integrin through an RGD-independent mechanism. **Molecular Biology of the Cell**, v. 11, n. 4, p. 1457-1469, 2000.

CALMON, M. et al. Methylation profile of genes CDKN2A (p14 and p16), DAPK1, CDH1, and ADAM23 in head. **Cancer Genet Cytogenet**, v. 173, n. 1, p. 157-168, 2007.

CALMON, M. et al. Epigenetic silencing of CRABP2 and MX1 in head and neck tumors. **Neoplasia**, v. 11, n. 12, 2009. In press.

CALÒ, V. et al. STAT proteins: from normal control of cellular events to tumorigenesis. **Journal of Cellular Physiology**, v. 197, n. 2, p. 157-168, 2003.

CAUSIER, B. Studying the interactome with the yeast two-hybrid system and mass spectrometry. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 23, n. 5, p. 350-67, 2004.

CHENG, X.; ROBERTS, R. J. AdoMet-dependent methylation, DNA methyltransferases and base flipping. **Nucleic Acids Research**, v. 29, n. 18, p. 3784-95, 2001.

CHRISTMAN, J. K. 5-Azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine as inhibitors of DNA methylation: mechanistic studies and their implications for cancer therapy. **Oncogene**, v. 21, p. 5483-5495, 2002.

COSTA, F. F. et al. Epigenetic silencing of the adhesion molecule ADAM23 is highly frequent in breast tumors. **Oncogene**, v. 23, n. 7, p. 1481-1488, 2004.

COSTA, F. F. et al. ADAM23 methylation and expression analysis in brain tumors. **Neuroscience Letters**, v. 380, n. 3, p. 260-264, 2005.

COSTA, M. D. et al. Characterization of a specific interaction between ADAM23 and cellular prion protein. **Neuroscience Letters**, v. 461, n. 1, p. 16-20, 2009.

D'ABACO, G. et al. ADAM22, expressed in normal brain but not in high-grade gliomas, inhibits cellular proliferation via the disintegrin domain. **Neurosurgery**, v. 58, p. 179-186, 2006.

DAWSON, M.; OKAMURA, W. H. **Chemistry and biology of synthetic retinoids**. Boca Raton: CRC Press, 1990.

DESMOND, J. et al. Discovery of epigenetically silenced genes in acute myeloid leukemias. **Leukemia**, v. 21, n. 5, p. 286-295, 2007.

- ENGELHARDT, O. G. et al. Interferon-induced antiviral MX1 GTPase is associated with components of the SUMO-1 system and promyelocytic leukemia protein nuclear bodies. **Experimental Cell Research**, v. 271, n. 2, p. 286-295, 2001.
- ENGELHARDT, O. G. et al. Mx1 GTPase accumulates in distinct nuclear domains and inhibits influenza A virus in cells that lack promyelocytic leukaemia protein nuclear bodies. **Journal of General Virology**, v. 85, p. 2315-2326, 2004.
- ESTELLER, M. Epigenetic lesions causing genetic lesions in human cancer: promoter hypermethylation of DNA repair genes. **European Journal of Cancer**, v. 36, n. 18, p. 2294-300, 2000.
- ESTELLER, M. et al. Hypermethylation-associated inactivation of p14(ARF) is independent of p16(INK4a) methylation and p53 mutational status. **Cancer Research**, v. 60, n. 1, p. 129-33, 2000.
- ESTELLER, M. et al. A gene hypermethylation profile of human cancer. **Cancer Research**, v. 61, n. 8, p. 3225-3229, 2001.
- FEINBERG, A. P. Cancer epigenetics takes center stage. **Proceedings of the National Academy of Science of USA**, v. 98, n. 4, p. 392-394, 2001.
- FEINBERG, A. P. et al. The epigenetic progenitor origin of human cancer. **Nature Reviews Genetics**, v. 7, n. 1, p. 21-33, 2006.
- FIELDS, S.; SONG, O. A novel genetic system to detect protein-protein interactions. **Nature**, v. 340, n. 6230, p. 245-246, 1989.
- FIELDS, S.; STERNGLANZ, R. The two-hybrid system: an assay for protein-protein interactions. **Trends Genetics**, v. 10, n. 8, p. 286-292, 1994.
- GALLIANO, M. F. et al. Binding of ADAM12, a marker of skeletal muscle regeneration, to the muscle-specific actin-binding protein, alpha -actinin-2, is required for myoblast fusion. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 18, p. 13933-13939, 2000.
- GEISS-FRIEDLANDER, R.; MELCHIOR, F. Concepts in sumoylation: a decade on. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 8, n. 12, p. 947-956, 2007.
- GIETZ, R. D. Yeast two-hybrid system screening. **Methods in Molecular Biology**, v. 313, p. 345-71, 2005.
- GIRGENRATH, M. et al. Diseased muscles that lack dystrophin or laminin- α 2 have altered compositions and proliferation of mononuclear cell populations. **BMC Neurology**, v. 5, n. 1, p. 7, 2005.
- GREENMAN, J. et al. Markers in cancer of the larynx and pharynx. **Clinical Otolaryngology**, v. 25, n. 1, p. 9-18, 2000.

GYURIS, J. et al. Cdi1, a human G1 and S phase protein phosphatase that associates with Cdk2. **Cell**, v. 75, p. 791-803, 1993.

HALLER, O. et al. Interferon-induced Mx proteins in antiviral host defense. **Biochimie**, v. 89, p. 812-818, 2007a.

HALLER, O. et al. Interferon, Mx, and viral countermeasures. **Cytokine Growth Factor Reviews**, v. 18, n. 5-6, p. 425-33, 2007b.

HASEGAWA, M. et al. Patterns of gene promoter methylation in squamous cell cancer of the head and neck. **Oncogene**, v. 21, n. 27, p. 4231-4236, 2002.

HENDRICH, B.; BIRD, A. P. Identification and characterization of a family of mammalian methyl-CpG binding proteins. **Molecular Cell Biology**, v. 18, n. 11, p. 6538-654, 1998.

HERRMANN, C. Differential interaction of the ras family GTP-binding proteins H-Ras, Rap1A, and R-Ras. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, p. 6794-6800, 1996.

HIROKAWA, N. Kinesin and dynein superfamily proteins and the mechanism of organelle transport. **Science**, v. 257, p. 519-526, 1998.

HOLZINGER, D. et al. Induction of MxA gene expression by influenza A virus requires type I or type III interferon signaling. **Journal of Virology**, v. 81, n. 14, p. 7776-85, 2007.

HOPE, I. A.; STRUHL, K. Functional dissection of a eukaryotic transcriptional activator protein, GCN4 of yeast. **Cell**, v. 46, n. 6, p. 885-894, 1986.

HUANG, Y. et al. Screen and identification of proteins interacting with ADAM19 cytoplasmatic tail. **Molecular Biology Reports**, v. 29, n. 3, p. 317-323, 2002.

JANZEN, C. et al. A monomeric GTPase-negative MxA mutant with antiviral activity. **Journal of Virology**, v. 74, n. 17, p. 8202-8206, 2000.

JONES, P. Cancer epigenetics comes of age. **Nature Genetics**, v. 21, p. 163-167, 1999.

JONES, P.; BAYLIN, S. The epigenomics of cancer. **Cell**, v. 128, n. 4, p. 683-692, 2007.

KEEGAN, L. et al. Separation of DNA binding from the transcription-activating function of a eukaryotic regulatory protein. **Science**, v. 231, n. 4739, p. 699-704, 1986.

KIM, H.; BAR-SAGI, D. Modulation of signalling by Sprouty: a developing story. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 5, n. 6, p. 441-450, 2004.

KRESTY, L. A. et al. Alterations of p16(INK4a) and p14(ARF) in patients with severe oral epithelial dysplasia. **Cancer Research**, v. 62, n. 18, p. 5295-5300, 2002.

KRIEGHOFF-HENNING, E.; HOFMANN, T. G. Role of nuclear bodies in apoptosis signalling. **BBA-Molecular Cell Research**, v. 1783, n. 11, p. 2185-94, 2008.

KULAEVA, O. I. et al. Epigenetic silencing of multiple interferon pathway genes after cellular immortalization. **Oncogene**, v. 22, n. 26, p. 4118-27, 2003.

KWONG, J. et al. Promoter hypermethylation of multiple genes in nasopharyngeal carcinoma. **Clinical Cancer Research**, v. 8, n. 1, p. 131-7, 2002.

LEE, N. V. et al. Fibulin-1 acts as a cofactor for the matrix metalloprotease ADAMTS-1. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 41, p. 34796-804, 2005.

LI, Y.; YOUSSEF, H. MxA overexpression reveals a common genetic link in four Fanconi anemia complementation groups. **The Journal Of Clinical Investigation**, v. 100, n. 11, p. 2873-80, 1997.

LIN, D. et al. Role of SUMO-interacting motif in DAXX, SUMO modification, subnuclear localization, and repression of sumoylated transcription factors. **Molecular Cell**, v. 24, n. 3, p. 341-354, 2006.

LINHOFF, M. et al. An unbiased expression screen for synaptogenic proteins identifies the LRRTM protein family as organizers. **Neuron**, v. 61, p. 734-749, 2009.

LIU, C. J. et al. ADAMTS-7: a metalloproteinase that directly binds to and degrades cartilage oligomeric matrix protein. **FASEB Journal**, v. 20, n. 7, p. 988-90, 2006.

MA, J.; PSTAHNE, M. Converting a eukaryotic transcriptional inhibitor into an activator. **Cell**, v. 55, n. 3, p. 443-446, 1988.

MASON, J. et al. Sprouty proteins: multifaceted negative-feedback regulators of receptor tyrosine kinase. **Trends in Cell Biology**, v. 16, n. 1, p. 45-54, 2006.

MELÉN, K. et al. Interferon-induced Mx proteins form oligomers and contain a putative leucine zipper. **Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 36, p. 25898-25907, 1992.

MIBAYASHI, M. et al. Promoted cell death of cells expressing human MxA by influenza virus infection. **Microbiology and Immunology**, v. 46, n. 1, p. 29-36, 2002.

MIKI, H. et al. Kinesin superfamily proteins (KIFs) in the mouse transcriptome. **Genome Research**, v. 13, p. 1455-1465, 2003.

MINUCCI, S.; PELICCI, P. G. Histone deacetylase inhibitors and the promise of epigenetic (and more) treatments for cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 6, n. 1, p. 38-51, 2006.

MISHRA, R. et al. Dynamin interacts with members of the sumoylation machinery. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 30, p. 31444-31454, 2004.

MOCHIZUKI, S.; OKADA, Y. ADAMs in cancer cell proliferation and progression. **Cancer Science**, v. 98, n. 5, p. 621-628, 2007.

MUSHINSKI, J. F. et al. Inhibition of tumor cell motility by the interferon-inducible GTPase MxA. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 22, p. 15206-15214, 2009.

NELSON, K. K. et al. Evidence for an interaction of the metalloprotease-disintegrin tumour necrosis factor alpha convertase (TACE) with mitotic arrest deficient 2 (MAD2), and of the metalloprotease-disintegrin MDC9 with a novel MAD2-related protein, MAD2beta. **Biochemistry Journal**, v. 343, n. 3, p. 673-680, 1999.

NOSER, J. et al. The RAS/Raf1/MEK/ERK signaling pathway facilitates VSV-mediated oncolysis: implication for the defective interferon response in cancer cells. **Molecular Therapy**, v. 15, n. 8, p. 1531-1536, 2007.

OGI, K. et al. Aberrant methylation of multiple genes and clinicopathological features in oral squamous cell carcinoma. **Clinical Cancer Research**, v. 8, n. 10, p. 3164-3171, 2002.

PALMIERI, F. The mitochondrial transporter family (SLC25): physiological and pathological implications. **Pflügers Archiv European Journal of Physiology**, v. 447, p. 689-709, 2004.

PARRISH, J. R. et al. Yeast two-hybrid contributions to interactome mapping. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 17, p. 387-393, 2006.

PRIMAKOFF, P.; MYLES, D. G. The ADAM gene family: surface proteins with adhesion and protease activity. **Trends in Genetics**, v. 16, n. 2, p. 83-87, 2000.

QIU, X. et al. hRpn13/ADRM1/GP110 is a novel proteasome subunit that binds the deubiquitinating enzyme, UCH37. **The EMBO Journal**, v. 25, n. 24, p. 5742-5753, 2006.

RANSOHOFF, D. Cancer: developing molecular biomarkers for cancer. **Science**, v. 299, n. 5613, p. 1679-1680, 2003.

ROCKS, N. et al. Emerging roles of ADAM and ADAMTS metalloproteinases in cancer. **Biochimie**, v. 90, n. 2, p. 369-379, 2008.

ROSAS, S. L. et al. 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 Research**, v. 61, n. 3, p. 939-942, 2001.

SAGANE, K. et al. LGI1 and LGI4 bind to ADAM22, ADAM23 and ADAM11. **International Journal of Biological Sciences**, v. 4, n. 6, p. 387-396, 2008.

SCHULZ, W. A. et al. Factor interaction analysis for chromosome 8 and DNA methylation alterations highlights innate immune response suppression and cytoskeletal changes in prostate cancer. **Molecular Cancer**, v. 6, n. 14, p. 16, 2007.

SEALS, D.; COURTNEIDGE, S. The ADAMs family of metalloproteases: multidomain proteins with multiple functions. **Genes & Development**, v. 17, p. 7-30, 2003.

SEREBRIISKII, I. et al. A two-hybrid dual bait system to discriminate specificity of protein interactions. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, p. 17080-17087, 1999.

SHI, Z. et al. ADAM 12, a disintegrin metalloprotease, interacts with insulin-like growth factor-binding protein-3. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 24, p. 18574-18580. 2000.

SIKORSKI, R.; HIETER, P. A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. **Genetics**, v. 122, p. 19-27, 1989.

SMIRAGLIA, D. J.; PLASS, C. The study of aberrant methylation in cancer via restriction landmark genomic scanning. **Oncogene**, v. 21, n. 35, p. 5414-5426, 2002.

TAKADA, H. et al. ADAM23, a possible tumor suppressor gene, is frequently silenced in gastric cancers by homozygous deletion or aberrant promoter hypermethylation. **Oncogene**, v. 24, p. 8051-8060, 2005.

THOMPSON, G. M. et al. Mapping eIF5A binding sites for Dys1 and Lia1: *in vivo* evidence for regulation of eIF5A hypusination. **FEBS Letters**, v. 555, n. 3, p. 464-8, 2003.

TORRES-COLLADO, A. X. et al. ADAMTS1 interacts with, cleaves, and modifies the extracellular location of the matrix inhibitor tissue factor pathway inhibitor-2. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 26, p. 17827-31787, 2006.

TROST, M. et al. Characterization of a novel serine/threonine kinase associated with nuclear bodies. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, p. 7373-7377, 2000.

WORM, J.; GULDBERG, P. DNA methylation: an epigenetic pathway to cancer and a promising target for anticancer therapy. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 31, n. 3, p. 443-449, 2002.

WU, E. et al. Expression of members of the novel membrane linked metalloproteinase family ADAM in cells derived from a range of haematological malignancies. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 235, n. 2, p. 437-442, 1997.

YONG, V. Metalloproteinases: mediators of pathology and regeneration in the CNS. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 6, n. 12, p. 931-944, 2005.

YOSHIDA, K. et al. Aggrecanase-1 (ADAMTS-4) interacts with alpha1-antitrypsin. **BBA-Molecular Cell Research**, v. 1725, n. 2, p. 152-9, 2005.

ZHU, P. et al. The interaction between ADAM 22 and 14-3-3 ζ : regulation of cell adhesion and spreading. **Biochemical and Biophysical Research**, v. 301, n. 2, p. 991-999, 2003.