

**Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Biociências
Departamento de Biofísica
Laboratório de Sinalização e Plasticidade Celular**

**Hospital de Clínicas de Porto Alegre
Centro de Pesquisas
Serviço de Patologia Clínica**

Clonagem, expressão e purificação de eIF2 beta humano e produção de soro policlonal anti-eIF2 beta

Trabalho apresentado como um dos
requisitos para obtenção do grau de
Bacharel no Curso de Ciências
Biológicas – Ênfase Molecular, Celular e
Funcional.

Rodrigo Maron Carlessi

**Orientador: Dr. Guido Lenz
Co-orientador: Dr. Jomar Pereira Laurino**

**Porto Alegre
Novembro, 2006**

“Os verdadeiros analfabetos são aqueles que aprenderam a ler e não lêem.”

Mário Quintana

Agradecimentos

Ao Jomar, por ter participado intensamente da minha formação e deste trabalho. Por vibrar a cada conquista e sempre me incentivar.

Ao Guido, pela confiança, orientação e amizade.

À Claudia, pela infinita paciência e pelos almoços deliciosos.

À Gabi, pela amizade e envolvimento técnico e emocional com este trabalho.

À Fê, pela amizade e companheirismo na bancada.

Aos meus avós queridos, pela base forte que dão à minha família e por sempre torcerem por mim.

À minha mãe, que sempre trabalhou duro pela minha educação e nunca deixou que eu me desviasse do caminho do bem, obrigado pelo amor e dedicação.

À Grazia, minha "piquena", que me acompanhou durante toda a faculdade e está sempre ao meu lado. Obrigado por ser essa mulher maravilhosa e a melhor esposa do mundo.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), pela verba destinada ao projeto.

Ao Dr. Xavier, por todo o apoio dado ao nosso grupo de pesquisas.

SUMÁRIO

1 Introdução	1
1.1 O processo de início da síntese protéica em eucariotos	4
1.2 A regulação global da síntese protéica em eucariotos	7
1.3 Aspectos bioquímicos dos fatores de iniciação de síntese protéica	9
1.4 Caracterização bioquímica e molecular do fator eIF2 humano	11
1.4.1 A subunidade beta de eIF2	12
1.5 A utilização de eIF2 beta truncado em terapia gênica antiproliferação celular.....	16
2 Objetivos	18
2.1 Objetivos específicos	18
3 Material e métodos	19
3.1 Linhagens de <i>E.coli</i> , plasmídeos e oligonucleotídeos	19
3.1.1 Linhagens de <i>E.coli</i>	19
3.1.2 Plasmídeos	20
3.1.3 Plasmídeos construídos neste trabalho	21
3.1.4 Oligonucleotídeos utilizados	21
3.2 Meios de cultura para bactérias	21
3.3 Manipulação de bactérias	22
3.3.1 Preparação de células de <i>E. coli</i> eletrocompetentes para transformação com DNA plasmidial	22
3.3.2 Transformação de <i>E. coli</i> por eletroporação	22
3.4 Manipulação de DNA	23
3.4.1 Extração de DNA plasmidial	23
3.4.1.1 Extração de DNA plasmidial de <i>E. coli</i> por lise alcalina	23
3.4.1.2 Extração de DNA plasmidial de bactérias utilizando "kit" comercial ..	24
3.4.2 Modificações do DNA	25
3.4.2.1 Digestão por endonucleases de restrição	25
3.4.2.2 Defosforilação de extremidades de DNA	25
3.4.2.3 Fosforilação de extremidades de DNA	26
3.4.2.4 Ligação de extremidades de DNA	26

3.4.3	Reação em cadeia da polimerase (PCR)	26
3.4.4	Análise do DNA	27
3.4.4.1	Eletroforese horizontal de DNA em gel de agarose e documentação	27
3.4.4.2	Quantificação de DNA	27
3.4.4.3	Seqüenciamento de DNA	27
3.4.5	Isolamento de fragmentos de DNA de gel de agarose	28
3.5	Obtenção da região codificadora (CDS) de eIF2 beta humano	29
3.6	Clonagem intermediária no plasmídeo pCR®2.1-TOPO®	29
3.7	Construções genéticas	30
3.7.1	Construção do plasmídeo pJPL13	30
3.7.2	Construção do plasmídeo pJPL14	31
3.7.3	Construção do plasmídeo pJPL64	32
3.7.4	Construção do plasmídeo pJPL65	32
3.8	Expressão de eIF2 beta humano recombinante em <i>E. coli</i>	33
3.8.1	Expressão em pequena escala	33
3.8.2	Expressão em escala de 100 mL	34
3.9	Purificação de eIF2 beta recombinante a partir de corpúsculos de inclusão	34
3.10	Análise de proteínas	35
3.10.1	Eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida com SDS (SDS-PAGE)	35
3.10.2	Coloração de proteínas em gel de poliacrilamida	36
3.10.3	Western-Blot revelado com soro anti-eIF2 beta humano	36
3.10.4	Western-Blot revelado com streptavidina peroxidase	37
3.10.5	Quantificação de proteína por Coomassie Azul Brilhante (modificação do método de Bradford, 1976)	37
3.11	Produção de soro policlonal anti-eIF2 beta recombinante	38
3.12	Adsorção do soro policlonal anti-eIF2 beta recombinante com ATPase recombinante de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	38
4	Resultados	39
4.1	Obtenção da região codificadora (CDS) de eIF2 beta humano	39
4.2	Construção dos plasmídeos pJPL13 e pJPL14	39
4.3	Construção dos plasmídeos pJPL64 e pJPL65	41

4.4 Expressão de eIF2 beta utilizando pJPL14 -----	43
4.5 Expressão de eIF2 beta utilizando pJPL65 -----	44
4.6 eIF2 beta recombinante é produzida em uma forma insolúvel (corpúsculo de inclusão) -----	45
4.7 Purificação de eIF2 beta recombinante a partir de corpúsculos de inclusão -----	46
4.8 Produção de soro policlonal anti-eIF2 beta recombinante-----	47
5 Discussão -----	50
6 Referências bibliográficas -----	57

Abreviaturas

°C - graus Celsius
μF - microFaraday
μg - micrograma
μL - microlitro
A - absorvância
ADP - adenosina difosfato
ATP - adenosina trifosfato
cDNA - ácido desoxi-ribonucléico complementar
CDS - seqüência de DNA correspondente à região codificadora do gene.
cm - centímetro
DNA - ácido desoxi-ribonucléico
ddNTPs - dideoxynucleotídeos
dNTPs - deoxynucleotídeos
DTT - ditioneitol
EDTA - ácido etilendiaminotetracético
eIF - fator eucariótico de início de tradução
g - força gravitacional
GDP - guanosina difosfato
GTP - guanosina trifosfato
IF - fator de iniciação
kDa - quiloDalton
kV - quiloVolt
LB - meio de Luria-Bertaini
mA - miliamper
m⁷GTP - 7-metil-guanosina
ml - mililitro
mg - miligrama
mM - milimolar
M - molar
mRNA - RNA mensageiro
mΩ - miliohms
ng - nanograma
pb - pares de base
PCR - reação em cadeia da polimerase
pH - potencial hidrogeniônico
RNA - ácido ribonucléico
RNase - ribonuclease
rpm - rotações por minuto
rRNA - ácido ribonucléico ribossomal
S - coeficiente de sedimentação
SDS - dodecil sulfato de sódio
TBE - tampão Tris-borato-EDTA
TC - complexo ternário
TE - Tris-EDTA
Tris - Tris-hidroximetil amino metano
tRNA - ácido ribonucléico transportador
U - unidade de enzima

Resumo

A síntese protéica é um processo essencial à célula e envolve centenas de macromoléculas. A ausência ou a perturbação da função de qualquer um dos componentes no sistema de tradução podem causar danos à integridade e funcionamento celular. O fator eucariótico 2 de iniciação da tradução (eIF2) apresenta um papel-chave no processo de tradução do mRNA e na sua regulação, promovendo a ligação do Met-tRNA_i à subunidade ribossomal 40S, em um processo dependente de GTP, e fazendo a seleção do códon AUG no mRNA para início de tradução. O eIF2 é um heterotrímero formado pelas subunidades alfa, beta e gama. Na porção amino-terminal da subunidade beta, existe um domínio bastante marcante composto por três blocos de seis a oito resíduos de lisina altamente conservados evolutivamente, que são responsáveis pela ligação de eIF2 ao mRNA e a outros dois fatores de iniciação, eIF5 e eIF2B.

Dados não publicados de Laurino JP mostram, em ensaio de curva de crescimento de *S. cerevisiae*, que o gene desprovido dos blocos de lisina competindo com o gene selvagem, sob controle do mesmo promotor, é capaz de induzir parada do crescimento celular. A partir disso, vem-se sugerindo a forma truncada do gene de eIF2 beta humano como um candidato à terapia gênica direcionada principalmente ao tratamento de tumores. Atualmente, o potencial de inibição da síntese protéica através da expressão de eIF2 beta truncado está sendo avaliado em nosso laboratório, com experimentos realizados em células de mamíferos em cultivo. Através de uma análise de expressão gênica nessas células será possível correlacionar a presença celular de eIF2 beta truncado com o fenômeno de parada do crescimento celular.

O objetivo deste trabalho foi desenvolver uma ferramenta imunológica para detecção por "Western-Blot" da expressão das formas selvagem e truncada de eIF2 beta. Para isso, a região codificadora (CDS) de eIF2 beta humano foi clonada em vetores de expressão em procariotos, a proteína recombinante foi produzida em *E. coli*, purificada e utilizada na imunização de um coelho Nova Zelândia, que produziu um soro policlonal anti-eIF2 beta recombinante. Tal soro foi avaliado quanto ao seu potencial para a detecção da expressão de eIF2 beta em extratos de células de mamíferos.

Abstract

Protein synthesis is an essential process to the cell, involving hundreds of macromolecules. The absence or alteration of any components in translation system may affect the integrity of cell biology. Eukaryotic initiation factor 2 (eIF2) plays a key role in the process of mRNA translation and in its regulation, promoting the binding of Met-tRNA_i to the 40S ribosomal subunit, in a GTP-dependent mechanism and selecting AUG codon in mRNA to translation initiation. The eIF2 is a heterotrimer formed by three subunits termed alpha, beta and gamma. In the amino-terminal region of eIF2 beta, there are three lysine-rich segments containing six to eight evolutionarily-conserved lysine residues, which are responsible for the binding of eIF2 on mRNA, and to another two initiation factors: eIF5 and eIF2B.

In a *S. cerevisiae* growth curve assay, previous studies have shown that eIF2 beta deleted in the lysine-rich segments competing against wild type eIF2 beta gene, under the control of the same promoter, was able to stop cell growth (Laurino JP, unpublished data). Considering this finding, we suggest that truncated eIF2 beta, lacking lysine-rich segments, could be exploited as a candidate in directed gene therapy, mainly oriented for tumor treatment. Nowadays, in our lab, the protein synthesis blockage through truncated eIF2 beta expression is being evaluated in mammalian cell culture assays. A gene expression analysis of these cells will be useful to correlate the cellular presence of truncated eIF2 beta with cellular growth arrest phenomenon.

The objective of this work was to develop an immunological tool to detect, by Western-Blot, the gene expression of the truncated and wild type eIF2 beta. To do this, the coding region (CDS) of human eIF2 beta was cloned into prokaryotic cell expression vectors, the recombinant protein was produced in *E. coli*, purified and used to immunize a *New Zealand* rabbit, which produced polyclonal sera against recombinant eIF2 beta. The eIF2 beta detection potential of such sera was evaluated in mammalian cell culture extracts.

1 Introdução

A síntese protéica é o mais complexo dos mecanismos biossintéticos celulares e o seu entendimento tem sido um dos maiores desafios na história da bioquímica. Na célula eucariótica, a síntese protéica requer a participação de mais de setenta diferentes proteínas ribossomais, vinte ou mais enzimas para ativar os precursores dos aminoácidos, uma dúzia ou mais de enzimas auxiliares e outros fatores protéicos específicos para a iniciação, alongação e término da síntese de polipeptídios, talvez cerca de cem enzimas adicionais para o processamento final dos diferentes tipos de proteínas existentes e quarenta ou mais tipos de RNAs transportadores e ribossomais. Dessa forma quase trezentas diferentes macromoléculas devem cooperar para a síntese polipeptídica. Muitas dessas macromoléculas estão organizadas em estruturas complexas tridimensionais, interagindo com outras moléculas de classe bioquimicamente distinta das suas.

É relevante ressaltar que a tradução é o processo que, em geral, consome a maior parte da energia produzida na célula, armazenada bioquimicamente em nucleotídeos fosfatados como ATP e GTP, além de os fatores protéicos envolvidos nesse processo representarem mais de 50% da quantidade total de proteínas celulares (Kozak, 1983; Merrick, 1992).

Os processos de ligação de tRNA, formação da cadeia peptídica e translocação ribossomal são, do ponto de vista mecânico, praticamente idênticos em todos os organismos e os ribossomos apresentam a mesma divisão de trabalho entre as subunidades menor e maior. No entanto, as características que envolvem as etapas iniciais e precedentes à formação da primeira ligação peptídica têm-se mostrado bastante divergentes entre procariotos e eucariotos (Kozak, 1983). Isto é evidente pelo maior número de fatores que participam dessa etapa nas células eucarióticas.

A conservação do processo de tradução entre eucariotos e procariotos é evidente na constituição da maquinaria de tradução, na qual ambos utilizam ribossomos organizados em uma subunidade menor (30S nos procariotos e 40S nos eucariotos) e em uma maior (50S e 60S respectivamente). Nos eucariotos, o número de proteínas ribossomais está em torno de 82 (49 proteínas associadas à subunidade 60S e 33 proteínas associadas à 40S),

número bem maior que em procariotos, com 52 proteínas (31 associadas à subunidade 50S e 21 associadas à 30S), evidenciando uma maior complexidade do processo de tradução em eucariotos (Lewin, 2001). Em eucariotos, a subunidade 60S contém três tipos distintos de rRNAs (28S, 5,8S e 5S), e a subunidade 40S, apenas um tipo de rRNA (18S). Nos procariotos, a subunidade 50S é composta por dois tipos diferentes de rRNAs (23S e 5S), enquanto a subunidade 30S possui apenas o rRNA 16S em sua estrutura (Kozak, 1983).

A estrutura secundária entre os tRNAs de procariotos e eucariotos também é bastante conservada em seu aspecto geral, sendo suas divergências limitadas a detalhes no pareamento de alguns nucleotídeos, a algumas modificações pós-transcricionais e constituição de algumas de suas alças. Nos eucariotos, a metionina inicial é transportada por um tRNA diferente do utilizado no transporte das demais metioninas da cadeia polipeptídica, denominado Metionil-tRNA^{Met}, que é aminoacilado por uma aminoacil sintetase específica. Normalmente, a metionina inicial é removida ao término da síntese da cadeia polipeptídica. Os procariotos utilizam para iniciar suas proteínas o formil-Metionil-tRNA^{Met}, que transporta uma metionina formilada, também normalmente removida da cadeia polipeptídica após o término da tradução. A utilização dessas formas de tRNAs especiais para a iniciação se faz necessária para o reconhecimento do códon de iniciação da síntese protéica e pelos fatores que atuam nesse processo (Kozak, 1983).

Distintamente ao que foi exposto até agora, é o mRNA o protagonista das inúmeras e importantes diferenças estruturais entre eucariotos e procariotos. A citar:

- Algumas modificações pós-transcricionais ocorrem no mRNA eucariótico, como adição de 7-metil-guanosina (m^7GTP) à extremidade 5' – denominada de estrutura “cap” –, conectada por uma ligação trifosfato 5'-5' feita pela enzima guanilil-transferase. CAP é fundamental para estabilidade e eficiente tradução da mensagem, pois sua presença parece ser muito importante na indução da ligação da subunidade ribossomal 40S ao mRNA. A adição de um segmento de poli-adenosina de 50 a 150 nucleotídeos, denominado cauda poli (A), às extremidades 3' da maioria dos mRNAs é

realizada pós-transcricionalmente pela enzima poli (A) polimerase. A cauda de poli (A) está relacionada com estabilidade da mensagem e sua eficiente tradução. Nenhuma dessas duas modificações ocorre nos procariotos.

- O códon de iniciação mais comum entre os procariotes é o AUG; contudo, mensagens contendo como códon iniciador os tripletes GUG, UUG ou ACG podem ocorrer naturalmente. A mais marcante diferença no reconhecimento do códon iniciador pelo complexo ternário-subunidade ribossomal 30S/40S entre procariotos e eucariotos está na presença no mRNA procarioto de uma seqüência consenso (5'-ACCUCC-3'), denominada seqüência Shine-Dalgarno, situada a dez nucleotídeos acima do códon de iniciação. Esta permite o pareamento com uma seqüência complementar presente na extremidade 3' do rRNA 16S (Shine e Dalgarno, 1974). A importância dessa seqüência na localização do códon de iniciação da tradução em procariotos é evidenciada pelo fato de que sua remoção, alteração de apenas um nucleotídeo ou modificação no espaçamento correto em relação ao códon de iniciação, provoca total perda ou uma acentuada redução na eficiência de tradução da mensagem. Em contraste, mensageiros eucarióticos não possuem a seqüência Shine-Dalgarno e utilizam em sua grande maioria o primeiro códon AUG da mensagem para início de síntese protéica. Através de um levantamento de mais de 200 seqüências líder de mRNAs eucarióticos, Kozak (1984) identificou nucleotídeos adjacentes ao códon AUG (A/GXXAUGG). Estes formariam um ambiente favorável para o início da síntese protéica em eucariotos, sem, no entanto, caracterizar uma interação rRNA-mRNA análoga à de procariotos. Nesse contexto, as posições -3 e +4 são as mais conservadas, contendo purinas. A alteração de uma dessas posições para pirimidinas reduz significativamente a eficiência de utilização desse codon AUG como sítio de início de tradução. Em levedura, no entanto, essas posições não são críticas. O tamanho da região 5' não traduzida do mRNA parece não influenciar na tradução da mensagem, já que deleções ou inserções de nucleotídeos parecem não afetar a eficiência ou acuidade na tradução da mensagem. Entretanto, na completa ausência de espaçamento entre a extremidade 5' do mRNA e o códon AUG, este passa a ser ignorado pelo complexo de iniciação, que então reconhece o segundo AUG da mensagem como sítio de iniciação da síntese protéica. É necessária, então, a

presença de uma extensão mínima entre a extremidade 5' da mensagem e o AUG para que este seja reconhecido corretamente como ponto inicial da tradução em eucariotos (Kozak, 1991).

- Nos eucariotos, com raras exceções, as mensagens são sempre monocistrônicas, codificando, portanto, uma única proteína. Em procariotos, muitos dos genes, quando metabolicamente relacionados, estão organizados em Operons. Sendo assim, são transcritos como uma única unidade transcricional que codifica um mRNA policistrônico. A tradução de cada cistron pode ocorrer de forma independente por eventos de iniciação interna. Os vários cistrons podem ser separados por regiões intercistrônicas de até 400 nucleotídeos, mas é comum encontrar sobreposição do códon terminador de um cistron com o códon iniciador do próximo (UGAUG) (Kozak, 1983).

Também é geral a associação transiente de fatores protéicos, que medeiam o processo de iniciação da síntese protéica com a subunidade ribossomal menor, o mRNA e o Met-tRNA^{Met}/f-Met-tRNA_i, tanto em eucariotos quanto em procariotos. Tais fatores normalmente são desligados da subunidade ribossomal menor com a chegada da subunidade maior e concomitante início da tradução. Entretanto, enquanto em *Escherichia coli* participam desse processo apenas três fatores (IF-1, IF-2 e IF-3), em eucariotos a complexidade do processo é bem maior, sendo que, até o momento, já foram isolados cerca de doze diferentes fatores (eIF1, eIF1A, eIF2, eIF2B, eIF3, eIF4A, eIF4B, eIF4E, eIF4G, eIF5B e eIF3A), em sua maioria compostos por várias subunidades.

1.1 O processo de início da síntese protéica em eucariotos

O início da síntese protéica em eucariotos, esquematizado na Figura 1, é um processo complexo que envolve a ligação de Met-tRNA_i à subunidade 40S do ribossomo e a subsequente associação ao mRNA. Esse processo é auxiliado por uma série de fatores protéicos. O início de síntese pode ser dividido didaticamente em quatro etapas: formação do complexo ternário; formação do complexo de pré-iniciação; associação ao mRNA; e formação do complexo de iniciação.

Maiores detalhes poderão ser encontrados nas seguintes revisões (Merrick, 1990; Hershey, 1991; Merrick, 1992; Altmann e Trachsel, 1993; Merrick, 1994; Gray, 1998; Gebauer e Hentze, 2004).

A maioria dos fatores de iniciação (IF – “initiation factor”) está envolvida na formação de complexos com os vários componentes da maquinaria traducional, associando-se a estes de maneira transitória.

O primeiro passo do início de síntese protéica, a formação do complexo ternário, ocorre com a ligação de eIF2 ao Met-tRNA_i na presença de GTP. A segunda etapa, ligação do complexo ternário à subunidade 40S do ribossomo, é dependente da prévia dissociação das subunidades do ribossomo. A dissociação ocorre pela interação dos fatores eIF3 e eIF1A com a subunidade 40S, e do fator eIF3A com a subunidade 60S. Assim, o complexo ternário liga-se à partícula 40S associada aos fatores eIF3, eIF1, eIF1A e eIF5, formando o complexo de pré-iniciação 43S (Gebauer e Hentze, 2004).

A próxima etapa, ligação do complexo de pré-iniciação 43S ao mRNA, é dependente da atuação do complexo eIF4F, que inclui vários fatores (eIF4E, eIF4G, eIF4A, eIF4B, entre outros), e de PABP – “Poly A binding protein”. O complexo eIF4F reconhece por eIF4E a estrutura m⁷GTP (“cap”) na extremidade 5' do mRNA e promove o desdobramento das estruturas secundárias pelo fator eIF4A que tem atividade de helicase, com hidrólise de ATP. O fator eIF4G funciona como uma plataforma protéica que permite uma interação entre eIF4E, eIF4A, eIF3 e PABP, ocasionando a circularização do mRNA (Wells *et al.*, 1998). Com isto, a extremidade 5' do mRNA adquire a conformação ideal e fica acessível ao acoplamento do complexo de pré-iniciação 43S, que migra no sentido 5' → 3' em um processo ativo, até encontrar o códon de iniciação AUG em contexto favorável definido por Kozak (1989).

Ao atingir o códon AUG, uma pequena pausa é necessária para a ligação da subunidade 60S do ribossomo. Nesse intervalo, o fator eIF5 promove a hidrólise de GTP ligado ao eIF2 e a liberação de eIF2-GDP, bem como a da maioria dos outros fatores (eIF1A, eIF3 e eIF3A), deixando o Met-tRNA_i no sítio P da subunidade ribossomal 40S. Após um segundo passo de hidrólise de GTP, dessa vez mediado por eIF5B, ocorre o perfeito acoplamento

da subunidade 60S, formando assim o complexo de iniciação 80S (Pestova, 2000).

Inicia-se a partir desse momento o ciclo de alongação. O eIF2-GDP pode ser reciclado pelo fator eIF2B, o qual catalisa a troca de GDP por GTP, sob a forma de um complexo quaternário (eIF2/eIF2B/GDP/GTP), permitindo que eIF2 participe de um novo ciclo de iniciação.

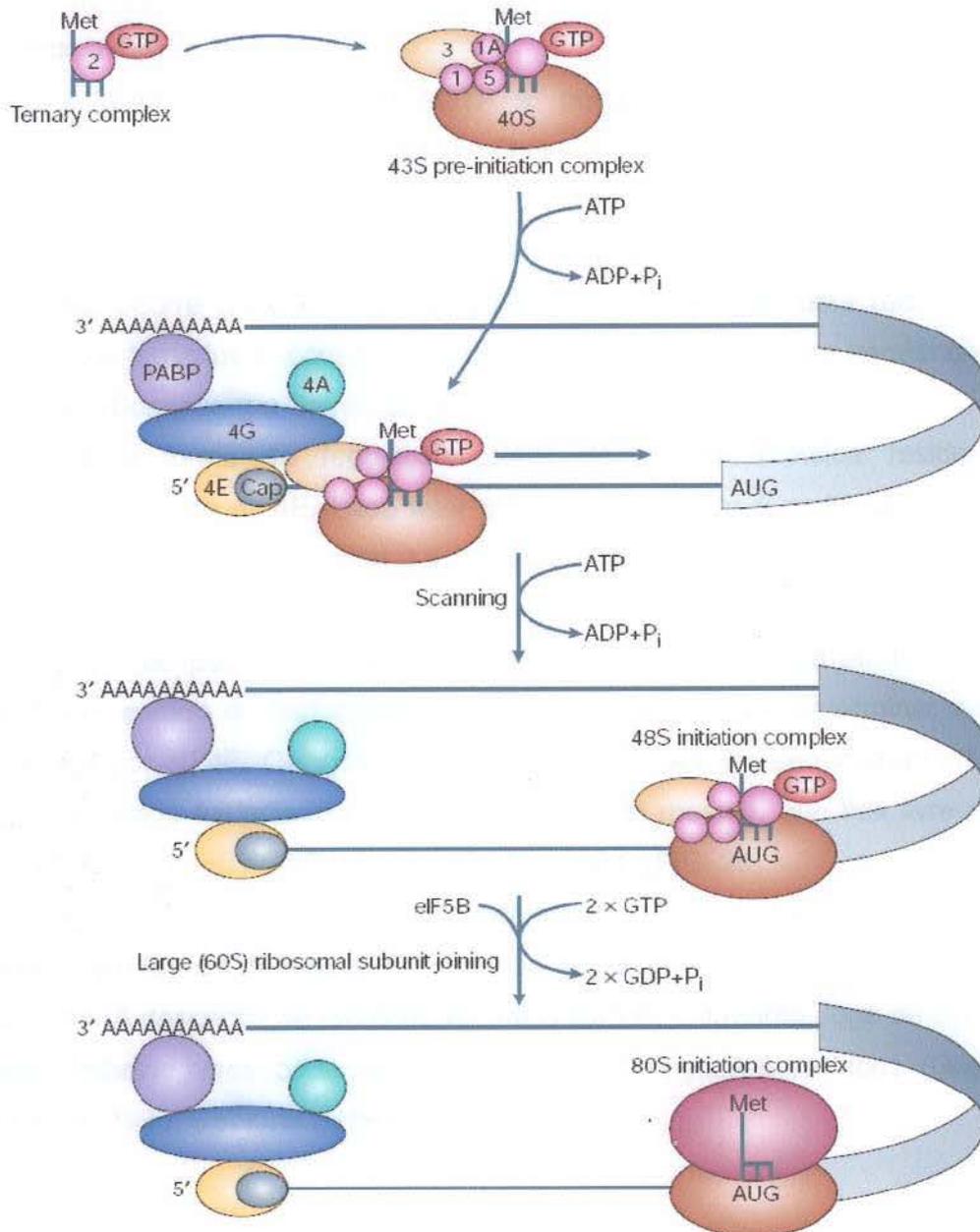


Figura 1 - Representação esquemática da iniciação da síntese protéica. (Figura retirada de Gebauer e Hentze, 2004.) Os círculos e elipses numerados representam os fatores de iniciação (eIFs).

1.2 A regulação global da síntese protéica em eucariotos

A forma mais eficaz de controle global da síntese de proteínas em eucariotos encontra-se na regulação da atividade ou na quantidade dos complexos envolvidos no processo de início de tradução. A atividade desses complexos é modulada, principalmente, pela fosforilação e desfosforilação de vários sítios-alvo presentes em muitos dos fatores de iniciação (Merrick, 1992; Merrick, 1994).

A disponibilidade de eIF2-GTP e, portanto, de complexo ternário é determinada pela atividade de eIF2B. Quando eIF2 está fosforilado na Serina 51 da subunidade alfa, há um aumento da afinidade entre eIF2-GDP e eIF2B, impedindo a sua dissociação. Isso causa o seqüestro de eIF2B e a troca GDP-GTP não ocorre (Rowlands, *et al.*, 1988), o que acarreta uma redução de complexos ternários e, conseqüentemente, uma queda global na freqüência de iniciação (Sonenberg e Dever, 2003; Gebauer e Hentze, 2004) (FIG. 2a).

Outra forma de regulação global da síntese protéica reside na disponibilidade de eIF4E. Esse fator precisa se associar à proteína "scaffold" eIF4G, para, assim, possibilitar a ligação do complexo de pré-iniciação 43S ao mRNA. Contudo, há uma família de proteínas, as 4E-BPs (4E "binding proteins"), que podem competir com eIF4G pela ligação com eIF4E. Nesse caso, é o estado de fosforilação dessas proteínas que vai determinar a sua afinidade por eIF4E. Quando hipofosforiladas, as mesmas seqüestram eIF4E, mas no estado fosforilado perdem afinidade pelo mesmo, que fica livre para associar-se com eIF4G (Gebauer e Hentze, 2004) (FIG. 2b).

Existem variadas formas já descritas de controle específico da síntese protéica em função de regular a expressão de determinados genes em nível de tradução. A descrição de todos esses mecanismos, entretanto, foge do escopo deste trabalho, mas pode ser encontrada nas seguintes revisões (Gray e Wickens, 1998; Gebauer e Hentze, 2004).

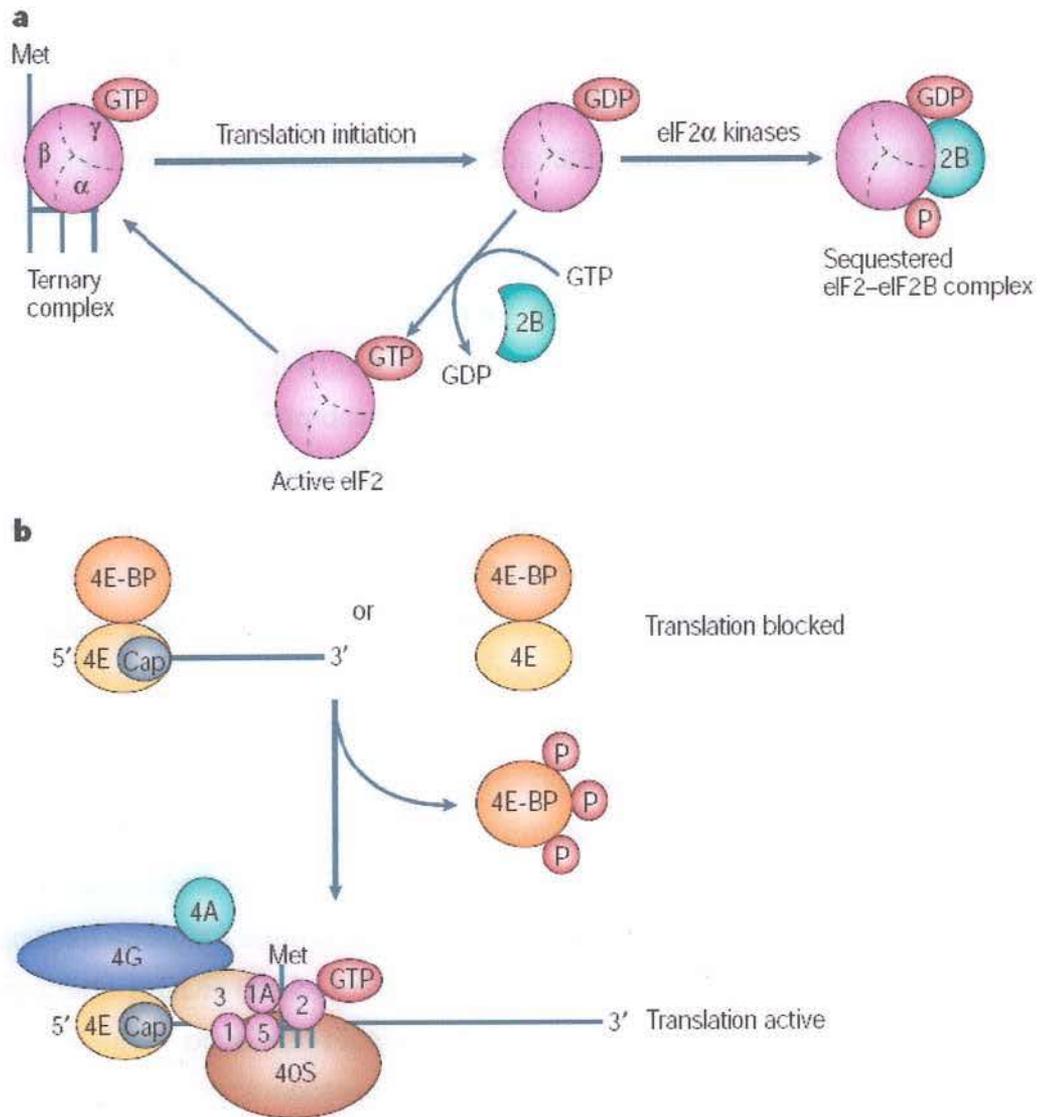


Figura 2 - Representação dos dois principais mecanismos de regulação global da síntese protéica em eucariotos. a - controle pelo estado de fosforilação da subunidade alfa de eIF2. b - controle pelo estado de fosforilação das 4E-BPs (4E "binding proteins"). (Figura retirada de Gebauer e Hentze, 2004.) Os círculos e elipses numerados representam os fatores de iniciação (eIFs). Os círculos com a letra P representam o fosfato.

1.3 Aspectos bioquímicos dos fatores de iniciação de síntese protéica

Fatores de iniciação de eucariotos foram inicialmente isolados de lisado de reticulócitos de coelho, e há alguns anos dados moleculares mais precisos foram obtidos com a clonagem dos genes que os codificam.

Os fatores **eIF1** e **eIF1A** são formados por proteínas de aproximadamente 13,5 kDa e 19 kDa respectivamente e foram caracterizados em mamíferos. A função dessas proteínas está relacionada com a dissociação das subunidades ribossomais, ligando-se à partícula 40S e estabilizando o complexo de pré-iniciação (Pestova, *et al.*, 2001).

O fator **eIF2** é formado por três subunidades, denominadas eIF2 alfa, eIF2 beta e eIF2 gama, que permanecem associadas durante todo o ciclo, e tem função de promover a ligação de Met-tRNA_i à partícula 40S do ribossomo, na presença de GTP. Para haver a ligação da subunidade ribossomal 40S ao mRNA, é necessário que esta se encontre associada ao complexo ternário (eIF2.GTP.Met-tRNA_i) (Kozak, 1989). Em eucariotos, para ocorrer a união da subunidade ribossomal 40S com a 60S, eIF5 interage com o complexo de pré-iniciação 43S para efetuar a hidrólise de GTP a qual causa a liberação de eIF2 associado a GDP (eIF2.GDP) e eIF3 do complexo 40S. Quando eIF2.GDP é liberado, este pode ser reutilizado para formar um novo complexo ternário. Para isso ocorrer, é necessário que a troca de GDP por GTP seja efetuada pelo fator eIF2B.

O fator **eIF2B** é responsável pela troca de GDP por GTP ligado a eIF2 após cada ciclo de iniciação, pois a afinidade de eIF2 por GDP é 100 vezes maior que por GTP (Merrick, 1992), o que torna necessário uma molécula auxiliar para a reciclagem, que não se daria espontaneamente. Já em procariotos, a afinidade de IF2 por GDP é menor do que por GTP, portanto esta troca ocorre de forma espontânea, sem a necessidade de um co-fator (Kozak, 1983). Composto por cinco proteínas, o fator **eIF2B** é formado por subunidades regulatórias alfa, beta e sigma e subunidades catalíticas lambda e epsilon (Yang e Hinnebusch, 1996; Pavitt, *et al.*, 1998).

Em mamíferos, **eIF3** é o mais complexo dos fatores, pois contém diferentes subunidades e participa de múltiplas etapas do início da tradução.

Liga-se à subunidade 40S do ribossomo e estimula a associação do complexo ternário (eIF2.GTP.Met.tRNA_i) ao mesmo. A ligação do mRNA ao complexo de pré-iniciação 43S, produzindo o complexo de iniciação 48S, também é estimulada por eIF3 (Hershey e Merrick, 2000; Hinnebusch, 2000). O fator **eIF3** de humano contém 10 subunidades. Cinco destas, denominadas p170, p116, p110, p36 e p44, são ortólogas às cinco subunidades de levedura TIF32, N1P1, PRT1, TIF34 e TIF35 respectivamente (Asano *et al.*, 1997; 1998; Phan *et al.*, 1998; 2001).

Purificado e caracterizado em mamíferos e trigo, **eIF3A** é uma proteína de 25 kDa com atividade de dissociação ribossomal, ligando-se à partícula 60S (Merrick, 1992).

Proteína de 46 kDa em mamíferos, **eIF4A** tem como função desfazer a estrutura secundária presente no mRNA, funcionando como uma RNA helicase. A caracterização bioquímica desse fator demonstrou atividade de desenrolar RNA dupla fita na presença de ATP (Gingras *et al.*, 1999). O fator possui sítio de ligação a ATP, um motivo rico em arginina para ligação a RNA (ARM) e contém o motivo D-E-A-D característico de DNA helicases (Pause *et al.*, 1994).

O fator **eIF4B** é um estimulador de eIF4A, o qual tem a atividade de helicase dependente de eIF4B. A proteína humana contém um motivo de reconhecimento de RNA (RRM) na extremidade amino, uma região central rica em asparagina, arginina, tirosina e glicina (domínio DRYG) e uma seqüência adjacente rica em arginina, importante para a ligação ao RNA e para a atividade de estimular eIF4A helicase. O RRM pode estar relacionado com interação a ribossomos (Méthot e cols, 1994).

O fator **eIF4E** tem como principal função ligar-se à estrutura m⁷GTP ("cap") no mRNA. A interação está relacionada com resíduos de triptofano conservados (Altmann e Trachsel, 1989).

Em mamíferos, **eIF4G** apresenta duas isoformas, eIF4GI e eIF4GII, que possuem 46% de similaridade e possuem massa molecular de 171 e 176 kDa respectivamente (Gradi *et al.*, 1998). Esse fator possui sítios de ligação a eIF4E, eIF4A, eIF3 (Gingras *et al.*, 1999) e a PABP (Wells, *et al.*, 1998). Funcionando, assim, como uma plataforma protéica que tem como principais

objetivos o posicionamento dos demais fatores e a circularização do mRNA (Gebauer e Hentze, 2004).

Complexo de alto peso molecular encontrado em mamíferos, levedura, plantas e *Drosophila* (Merrick, 1992), **eIF4F** é formado por eIF4A, eIF4E e eIF4G e interage com o “cap” e com o eIF3 associado ao ribossomo através de eIF4G. Desse modo, esse complexo executa a função pivô, intermediando a ligação entre ribossomo e mRNA (Gingras *et al.*, 1999).

Proteínas com atividade GTPásica ribossomo-dependente, **eIF5** e **eIF5B** têm como função permitir a junção das subunidades ribossomais no códon AUG após a hidrólise de GTP ligado a eIF2 no caso de eIF5 (Chakravarti e cols., 1993, Chevesich e cols., 1993) e GTP livre no caso de eIF5B (Pestova, *et al.*, 2000).

1.4 Caracterização bioquímica e molecular do fator eIF2 humano

Na década de 1970, grupos liderados por pesquisadores como Kaufman, Kaempfer, Merrick, entre outros, isolaram de células de mamíferos por métodos bioquímicos um complexo protéico com peso molecular entre 150 kDa e 160 kDa capaz de se ligar a Met.tRNA_i de forma GTP dependente (Berrieux *et al.* 1977; Trachsel *et al.*, 1977; Kaempfer *et al.*, 1978). Nessa mesma época, constatou-se que esse complexo, então denominado eIF-2, era composto por três subunidades (Berrieux *et al.* 1977).

Esse fator está envolvido no primeiro passo regulatório da biossíntese protéica (Moldave, 1985; Pain, 1986; Safer, 1983), promovendo a ligação do met-tRNA_i à subunidade ribossomal 40S, em um processo dependente de GTP, e fazendo a seleção do códon AUG para início de tradução em eucariotos (Donahue *et al.*, 1988; Hershey *et al.*, 2000; Hinnebush, 2000). O fator eIF2 humano é formado por três subunidades não-idênticas denominadas eIF2 alfa (36 KDa), eIF2 gama (52 KDa) e eIF2 beta (38 KDa), que permanecem associadas durante todo o ciclo. Essas três subunidades são requeridas para a utilização catalítica de eIF2 durante o início da síntese protéica. (Duncan *et al.*, 1983; Hershey, 1991). Nenhuma delas parece existir como um monômero funcional fora do heterotrímero eIF2.

A subunidade alfa de eIF2 é um polipeptídeo cujo estado de fosforilação regula a atividade do heterotrímero (Hershey, 1989). Essa subunidade fosforilada apresenta maior afinidade por eIF2B do que em seu estado não-fosforilado. Quando fosforilada em sua serina 51 (Patack *et al.*, 1988), essa proteína leva a uma inibição da troca de GDP por GTP realizada por eIF2B. Isso acarreta uma redução de complexos ternários ativos (Sonenberg e Dever, 2003) e, conseqüentemente, uma drástica queda na freqüência de iniciação, pois eIF2-GDP não é capaz de formar novos complexos ternários (Cigan *et al.*, 1993; Hinnebush, 1994; Dever *et al.*, 1992; 1995). A estrutura tridimensional, realizada por difração de raios X, de dois terços da região aminoterminal de eIF2 alfa humano, revelou dois motivos: um domínio de dobra-OB (dobra de ligação a oligonucleotídeo/oligossacarídeo) e um compacto domínio de alfa-hélice (Nonato *et al.*, 2002). O estado de fosforilação de eIF2 alfa é o principal ponto de controle global da síntese protéica nas células eucarióticas e é utilizado em diversas condições (Kozak, 1999), como infecção viral (Clemens e Elia, 1997), apoptose (Srivastava *et al.*, 1998), carência de aminoácidos (Hinnebush, 1997) e estresse do reticulo endoplasmático (Harding *et al.*, 1999).

A subunidade gama de eIF-2 é a menos conhecida, pois foi a última subunidade a ser clonada. Apresenta em sua seqüência de aminoácidos motivos-consenso para ligação a GTP (Merrick, 1992), além de ter uma evidente similaridade com o fator de alongação procariótica (EF-Tu), principalmente em relação à região de ligação ao tRNA (Hannig *et al.*, 1993; Schimitt *et al.*, 2002).

1.4.1 A subunidade beta de eIF2

A subunidade beta do eIF2 é uma proteína moderadamente abundante em células de mamíferos. Em humanos, é formada por 333 aminoácidos. Análises de sua seqüência nucleotídica revelaram um cDNA de 1416 nucleotídeos (Patack, 1988). A análise da seqüência de eIF2 beta humana indicou a presença de dois motivos-consenso de ligação a GTP (Pathak *et al.*, 1988; Bommer *et al.*, 1991). No entanto, esses motivos estão ausentes em levedura. Dados de experimentos de ligação cruzada com análogos de GTP indicaram uma possível participação de beta e gama na ligação a GTP

(Merrick,1992), o que sugere uma forte interação funcional entre gama e beta durante a formação do complexo ternário (Bommer *et al.*, 1991; Gaspar *et al.*, 1994). O eIF2 beta possui duas regiões altamente conservadas que podem representar interação com ácidos nucleicos.

Na porção amino-terminal da molécula, existe um domínio bastante marcante composto por três blocos de seis a oito resíduos de lisina (Pathak *et al.*, 1988) que são as únicas regiões conservadas evolutivamente nessa porção da molécula. Esses blocos conferem uma acentuada carga positiva à região N-terminal de eIF2 beta, mediando interações com o mRNA (Laurino *et al.*,1999).

Na porção carboxi-terminal, há uma seqüência contendo quatro cisteínas com potencial para formação de estrutura de "dedo-de-zinco": C-X2-4C-X2-16C-X2-4 (Evans e Hollenberg,1988; Pathak *et al.*, 1988). Contudo não se detectou zinco associado a eIF2, e zinco não é necessário para a função desse fator *in vitro*. Uma análise de mutações realizadas *in vitro*, em *Saccharomyces cerevisiae*, as quais alteravam uma ou mais cisteínas e o espaçamento entre essas cisteínas ou removiam a região C2-C2, indicou que estes resíduos de cisteínas são indispensáveis para a função de eIF2 beta (Donahue *et al.*, 1988; Castilho-Valavicius *et al.*, 1992). Ensaio de ligação *in vitro* ao mRNA, usando a técnica "Northwestern-Blot", revelaram que eIF2 beta liga-se ao mRNA de *HIS4*, enquanto alfa e gama não são capazes dessa associação (Laurino *et al.*, 1999). O emprego de uma série de formas truncadas de eIF2 beta nesses ensaios revelou que a capacidade de ligação a mRNA está relacionada com as regiões amino-terminal e carboxi-terminal, sugerindo que os blocos de lisina sejam responsáveis pela aproximação inicial do RNA, não-específica e de alta afinidade e a região C2-C2 responsável por uma ligação com menor afinidade, mas talvez de maior especificidade, como indicada pela análise genética (Laurino *et al.*, 1999). Essa ligação da porção carboxi-terminal deve estar relacionada com a seleção do códon de início AUG, visto que a análise de mutantes para a região carboxi-terminal, em *S. cerevisiae*, demonstrou que na presença de tais mutações o início da síntese protéica poderia ter como códon iniciador o "triplet" UUG (Donahue *et al.*, 1988).

A subunidade beta de eIF2 está envolvida em diversas interações com outros fatores (Hashimoto *et al.*, 2002). Os três conservados blocos de lisinas, presentes na região amino-terminal dessa molécula, mostraram ser

responsáveis pela ligação dessa subunidade a outro fator de iniciação, eIF5, tanto em *S. cerevisiae* (Asano *et al.*, 1999; Singh *et al.*, 2004) quanto em humanos (Das *et al.*, 1997; Das e Maitra, 2000). Essa região também parece ser responsável pela interação entre eIF2 e o fator de troca eIF2B (Asano *et al.*, 1999).

Laurino *et al.* (1999) demonstraram, em *S. cerevisiae*, que eIF2 beta desprovido dos blocos de lisina não é capaz de realizar a ligação ao mRNA, embora a associação às demais subunidades do heterotrímero eIF2 continuasse ocorrendo de forma normal. A partir daí, surgiu a hipótese de que essa forma truncada de eIF2 beta poderia funcionar *in vivo* como um inibidor competitivo da forma selvagem da mesma proteína. Essa hipótese foi confirmada em ensaio de curva de crescimento de *S. cerevisiae*, no qual sob controle do mesmo promotor competiam os genes selvagens e o gene desprovido dos blocos de lisinas. Observou-se que este último foi capaz de induzir parada do crescimento celular nesse microrganismo (dados não publicados, Laurino, JP) (FIG. 3).

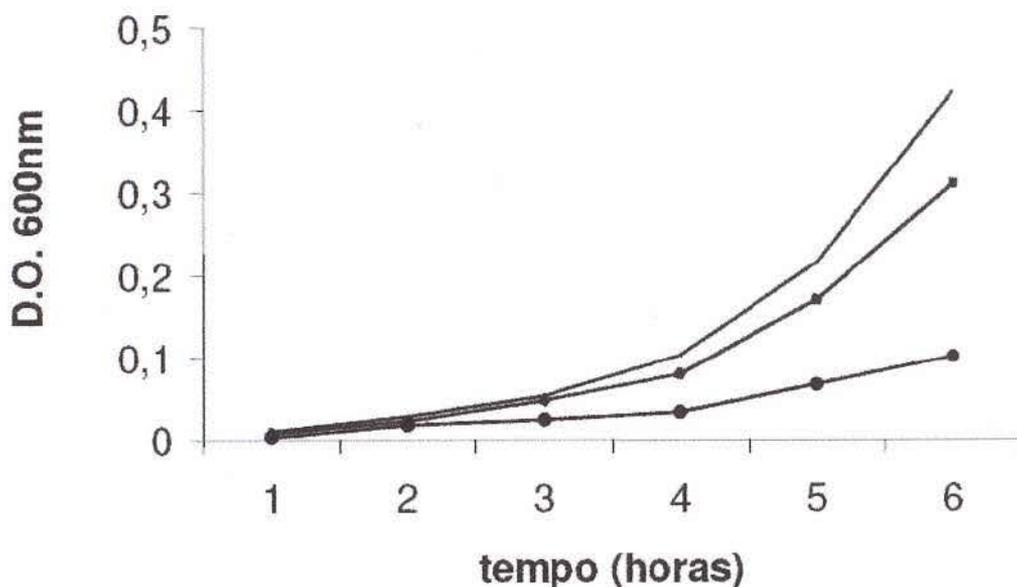


Figura 3 - Curva de crescimento de *S. cerevisiae* em meio líquido. Células transformadas com o plasmídeo pLeu2 Cen4 (plasmídeo de baixo número de cópias), expressando eIF2 beta selvagem ou desprovido dos blocos de lisina sob controle de seu próprio promotor (Laurino, JP). A linha simples representa a curva de crescimento de células transformadas com o plasmídeo pLeu2 Cen4. A linha com losangos representa a curva de crescimento de células transformadas com o plasmídeo pLeu2 Cen4, contendo o gene selvagem de eIF2 beta de *S. cerevisiae*. A linha com círculos representa a curva de crescimento de células transformadas com o plasmídeo pLeu2 Cen4, contendo o gene de eIF2 beta de *S. cerevisiae* desprovido dos blocos de lisinas.

1.5 A utilização de eIF2 beta truncado em terapia gênica antiproliferação celular

O efeito de parada do crescimento, observado em *S. cerevisiae*, pode ser explorado visando ao bloqueio da proliferação em outros tipos celulares. De modo que, após a verificação do mesmo efeito biológico de eIF2 beta truncado em células humanas em cultivo, estudos pré-clínicos poderão averiguar a viabilidade de utilização dessa molécula em protocolos clínicos de terapia gênica, direcionada principalmente ao tratamento do câncer.

Conceitualmente, a terapia gênica envolve identificação apropriada do gene alvo e direcionamento celular adequado. Em vista disso, vários problemas são encontrados com relação a essa estratégia terapêutica, como falta de um sistema de transferência eficiente e de expressão gênica adequada, além de reações imunes do hospedeiro aos vetores virais utilizados, sendo todos esses desafios a serem superados (Verma e Somia, 1997).

Considerando que a terapia gênica tem sido explorada como um tratamento para a diminuição da progressão de tumores, combate de infecções virais e de doenças neurodegenerativas (Verma e Somia, 1997; Hunt e Vorburger, 2002), células transformadas com vetores contendo o gene de eIF2 beta humano truncado poderiam apresentar parada de proliferação devido à diminuição acentuada da síntese protéica e, conseqüentemente, apresentariam morte celular. Devido a isso, é possível que formas truncadas dessa proteína, competindo com a forma selvagem da célula, tornem-se uma estratégia para terapia gênica direcionada, por exemplo, por anticorpos carreadores de plasmídeos, contendo formas mutantes do gene de eIF2 beta.

Em vista disso, já estão em andamento, em nosso laboratório, experimentos com diversas linhagens de células de mamíferos em cultivo, visando ao bloqueio da síntese protéica e, conseqüentemente, da proliferação celular, pela expressão de eIF2 beta truncado. A partir daí, surgiu a necessidade do desenvolvimento de uma ferramenta para dosagem da expressão das formas truncada e selvagem de eIF2 beta nessas células. Por meio de uma análise de expressão gênica será possível correlacionar a presença celular de eIF2 beta truncado com o fenômeno de parada do crescimento celular.

Atualmente, existem diversas metodologias capazes de caracterizar de forma qualitativa e quantitativa a expressão dos genes nas células. A maioria dessas técnicas quantifica a expressão dos genes, acessando o grau de presença do mRNA específico do gene na célula em questão. Alguns exemplos são: os arranjos de DNA, o "Northern Blot", a RT-PCR qualitativa e quantitativa, o Real Time RT-PCR, o SAGE, entre outras. Entretanto, em eucariotos superiores, um a cada 10 genes é fortemente regulado em nível de tradução do mRNA em proteína (Cazzola e Skoda, 2000). Ou seja, para esses genes, nenhuma das técnicas citadas acima é capaz de detectar oscilações na expressão dos mesmos.

Por outro lado, o "Western-Blot", uma técnica bastante simples, barata e de fácil reprodutibilidade, acessa diretamente a presença da proteína no extrato celular e é capaz de medir com precisão a expressão de qualquer gene, desde que para ele se tenha um anticorpo específico.

2 Objetivos

O objetivo deste trabalho é o desenvolvimento de uma ferramenta imunológica que possa ser utilizada para a detecção da expressão por "Western-Blot" das formas selvagem e truncada de eIF2 beta em células de mamíferos em cultivo.

2.1 Objetivos específicos

- Clonagem da região codificadora (CDS) de eIF2 beta humano em vetor de expressão em procaríoto.
- Expressão da proteína em *Escherichia coli*, com o intuito de se obter uma superexpressão de eIF2 beta humano recombinante.
- Purificação da proteína recombinante.
- Imunização de coelho da raça Nova Zelândia com quantidades suficientes de proteína purificada com o objetivo de estimular a produção de anticorpos policlonais anti-eIF2 beta humano.
- Realização de experimentos de detecção de eIF2 beta humano por "Western Blot".

3 Material e métodos

3.1 Linhagens de *E. coli*, plasmídeos e oligonucleotídeos

3.1.1 Linhagens de *E. coli*

Linhagem	Genótipo	Referência ou origem
JM109	<i>recA 1, endA 1, gyrA 96, thi, hsdR 17 (rk-, mk+), supE44, relA 1, l-, D(lac-proAB), [F', traD 36, proAB, lacIq ZDM15]</i>	Promega
BL21 DE3	<i>F⁻ ompT gal dcm lon hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻) λ (DE3)</i>	Novagen
BL21 DE3 STAR	<i>F⁻, ompT, hsdSB(r_B⁻ m_B⁻), dcm, gal,nre131,) λ (DE3)</i>	Invitrogen
BL21 (DE3) pLysS	<i>F⁻ ompT gal dcm lon hsdS_B (r_B⁻ m_B⁻) λ(DE3) pLysS (cm^R)</i>	Novagen
BL21 (DE3) CodonPlus-RIL	<i>F⁻ ompT gal dcm lon hsdS_B (r_B⁻ m_B⁻) λ (DE3) argU, ileY, leuW</i>	Stratagene
BL21 SI	<i>F⁻ ompT gal dcm lon hsdS_B (r_B⁻ m_B⁻) λ (DE3), polimerase de T7 indutível por NaCl</i>	Invitrogen

3.1.2 Plasmídeos

Linhagem	Características	Referência ou origem
pCR®2.1-TOPO®	Amp ^r , Kan ^r , plasmídeo de clonagem de produtos amplificados pela reação em cadeia da Polimerase (PCR)	Invitrogen
Pin Point™ Xa-1 T-Vector	Amp ^r , plasmídeo linear com desoxitimidinas nas extremidades para clonagem de produto de PCR, expressão de proteínas de fusão com biotina em <i>E. coli</i>	Promega
pET-23a(+)	Amp ^r , plasmídeo para expressão de proteínas de fusão com cauda de histidina em <i>E. coli</i>	Novagen

3.1.3 Plasmídeos construídos neste trabalho

pJPL13 - PCR da região codificadora do cDNA de eIF2 beta humano selvagem em Pin Point™ Xa-1 T-Vector.

pJPL14 - região codificadora do eIF2 beta humano selvagem em Pin Point™ Xa-1 T-Vector.

pJPL64 - PCR da seqüência do "tag" de biotina fundido com a região codificadora de eIF2 beta humano proveniente do pJPL14 em pCR®2.1-TOPO®

pJPL65 - seqüência do "tag" de biotina fundido com a região codificadora de eIF2 beta proveniente do pJPL64 em pET-23 a (+).

3.1.4 Oligonucleotídeos utilizados

NRUIF: 5' TTTTTTCGCGACGAGATGATTTTT 3'

NDEIF: 5' CGGGAGTAACTCATATGAAAC 3'

BAMHIR: 5' TGAAAGGATCCCTGTTATAATAACTTTAAT 3'

3.2 Meios de cultura para bactérias

Meio LB - triptona 10 g/L, extrato de levedura 10 g/L, NaCl 5 g/L, pH 7,0 (ágar 20 g/L quando meio sólido).

Meio 2X YT - triptona 16g/L, extrato de levedura 10g/L, NaCl 5g/L, pH 7,0.

Meio SOC - triptona 20 g/L, extrato de levedura 5 g/L, NaCl 0,5 g/L, Kcl 2,5 mM, MgCl₂ 7 mM e glicose 20 mM, pH 7,0.

3.3 Manipulação de bactérias

3.3.1 Preparação de células de *E. coli* eletrocompetentes para transformação com DNA plasmidial

Em 500 mL de meio LB, foram inoculados 5 mL de uma pré-cultura de *E. coli* pertencente a uma das linhagens descritas acima, crescidas por 16 a 18h em meio LB. As células foram crescidas com agitação vigorosa de 300 rpm até que a cultura atingisse uma densidade óptica de 0,5 a 0,7 A_{600nm} e incubadas no gelo por 15 a 30 minutos. A cultura gelada foi, então, centrifugada por 20 minutos a 3.200 g, em centrífuga Hettich (modelo Rotina 46R, com rotor oscilante modelo 4624) a 4°C. O sobrenadante foi totalmente retirado, e as células, ressuspensas em 500 mL de glicerol 10% estéril a 4°C. A suspensão foi centrifugada como anteriormente, e o precipitado foi ressuspenso em 250 mL de glicerol 10% a 4°C. Procedeu-se a nova centrifugação, o sobrenadante foi novamente descartado e as células, ressuspensas em 20 mL de glicerol 10%. O mesmo passo de centrifugação foi realizado novamente para coletar as células, as quais foram então ressuspensas em um volume final de 1 a 2 mL de glicerol 10% a 4°C. As células foram fracionadas em alíquotas de 40 μ L e congeladas a -80°C para posterior utilização.

3.3.2 Transformação de *E. coli* por eletroporação

As alíquotas de 40 μ L de células eletrocompetentes foram descongeladas a temperatura ambiente e colocadas imediatamente no gelo. A cada tubo foi adicionado DNA plasmidial suspenso em água ou TE (Tris-Hcl 10 mM pH 8,0; EDTA 1 mM) (máximo de 3 μ L), incubando-se no gelo por 1 minuto. As constantes elétricas utilizadas para a eletroporação foram: capacitância, 25 μ F; resistor, 200 m Ω ; e voltagem, 2,5 kV (uma vez que foram utilizadas cubetas de 0,2 cm). A suspensão de células foi transferida para o fundo de uma cubeta gelada e

colocada na câmara do eletroporador (Bio-Rad Laboratories, Inc.) e o pulso elétrico gerado. Após o pulso, a cubeta foi imediatamente retirada da câmara e as células foram coletadas com 1 mL de meio SOC. A suspensão foi transferida para um tubo de ensaio e incubada a 37°C por uma hora e então plaqueada em LB sólido contendo 100 µg/mL de ampicilina.

3.4 Manipulação de DNA

3.4.1 Extração de DNA plasmidial

3.4.1.1 Extração de DNA plasmidial de *E. coli* por lise alcalina

Inocularam-se bactérias de uma colônia isolada em 2 mL de meio LB, contendo o antibiótico ampicilina para seleção. Essas bactérias foram cultivadas a 37°C, sob agitação durante 16 horas. Um volume de 1,5 mL das culturas foi transferido para tubos de microcentrifuga e centrifugado a 12.000 rpm, por 30 segundos, em microcentrifuga. O sobrenadante foi descartado, as células foram lavadas com 1 mL de solução salina (NaCl 0,9%) e centrifugadas nas mesmas condições anteriores. A solução salina foi descartada, as células foram ressuspensas em 100 µL de solução de formação de protoplastos (SFP) (glicose 50 mM, EDTA 10 mM, Tris 25 mM pH8,0) através de agitação em vórtex. Após incubação no gelo por 10 minutos, 200 µL de solução de lise (SL) (NaOH 200 mM, SDS 1%) foram misturados à suspensão através de agitação em vórtex. O tubo foi incubado no gelo por 5 minutos e após foram adicionados 150 µL de acetato de sódio 3 M pH4,8, misturando-se, novamente, por agitação. O tubo foi incubado no gelo por 15 minutos e centrifugado por 5 minutos a 12.000 rpm, obtendo-se o sobrenadante contendo o DNA que foi transferido para novo tubo de microcentrifuga ao qual foi adicionado 1 mL de etanol absoluto gelado. Seguiu-se nova etapa de centrifugação por 10 minutos a 14.000 rpm. O sobrenadante foi descartado, e ao precipitado de DNA foram adicionados 500 µL de etanol 70%

para retirar o excesso de sal. Nas mesmas condições, foi realizada nova centrifugação, e o sobrenadante foi descartado. O DNA foi seco em temperatura ambiente e ressuspensão num volume de 20 a 50 μL de H_2O MiliQ. A essa solução foram adicionados 10 μg de RNase-A (Invitrogen), incubando-se por 20 minutos em temperatura ambiente.

3.4.1.2 Extração de DNA plasmidial de bactérias utilizando “kit” comercial

Para extração de DNA plasmidial de bactérias através de kit, foi utilizado o *WizardR Plus SV Minipreps DNA Purification System* (Promega), conforme a indicação do fabricante. Uma colônia isolada de *E. coli* foi inoculada em 10 mL de meio LB com o antibiótico apropriado e foi incubada a 37°C , sob agitação, por 12 a 16 horas. A cultura foi centrifugada a 3.200 g, por 10 minutos, e o sobrenadante foi descartado. O precipitado foi ressuspensão em 250 μL de Solução de Ressuspensão (Tris-Hcl 50 mM pH7,5; EDTA 10 mM; RNase 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) por agitação em vórtex. As células foram transferidas para tubos de microcentrífuga e foram adicionados 250 μL de Solução de Lise Celular (200 mM NaOH; SDS 1%). A solução foi misturada quatro vezes por inversão e foi incubada a temperatura ambiente por 5 minutos. Após esse tempo, foram adicionados 10 μL de Solução de Protease Alcalina e também se misturou quatro vezes por inversão. Foram adicionados 350 μL de Solução de Neutralização (hidrocloridrato de guanidina 4,09 M; acetato de potássio 0,759 M; ácido acético glacial 2,12 M) e imediatamente misturou-se quatro vezes por inversão. A mistura foi centrifugada a 14.000 rpm, durante 10 minutos. Para o isolamento e purificação do DNA plasmidial, o lisado foi transferido para uma microcoluna de purificação que foi inserida em um tubo coletor de microcentrífuga de 2 mL. A microcoluna foi centrifugada a 14.000 rpm por um minuto. O filtrado foi descartado. Após, foram adicionados 750 μL de Solução de Lavagem de Coluna (acetato de potássio 60 mM; Tris-Hcl 8,3 mM pH7,5; 0,04 EDTA pH8,0, etanol 60%) à microcoluna e foi realizada nova centrifugação sob as mesmas condições. O filtrado foi novamente descartado, e o

processo de lavagem foi repetido com 250 μL de Solução de Lavagem de Coluna. A microcoluna foi centrifugada a 14.000 rpm, por dois minutos e transferida para um novo tubo de microcentrífuga. O DNA foi eluído pela adição de 100 μL de água livre de nuclease na microcoluna, a qual foi centrifugada a 14.000 rpm durante um minuto. A microcoluna foi descartada, e o DNA plasmidial armazenado a -20°C .

3.4.2 Modificações do DNA

3.4.2.1 Digestão por endonucleases de restrição

A uma quantidade de 0,1 μg a 0,5 μg de DNA plasmidial (para análise de clones recombinantes ou para reação de ligação) e 0,5 μg a 1 μg (para extração de fragmentos de DNA em gel de agarose) foi adicionado 1/10 do volume total da reação de tampão de restrição 10X com composição dependente da enzima utilizada ou tampão para digestão dupla segundo o fabricante (New England Biolabs ou Fermentas) e H₂O MiliQ para completar o volume total da reação, geralmente realizada entre 10 μL a 20 μL . Quantidades apropriadas de enzimas foram adicionadas, levando-se em conta que uma unidade de enzima digere 1 μg de DNA em uma hora. A reação foi incubada na temperatura adequada para a enzima utilizada.

3.4.2.2 Defosforilação de extremidades de DNA

Em determinado volume de DNA plasmidial linearizado e ressuspenso em H₂O MiliQ, foi adicionado 1 μL de fosfatase alcalina (*Shrimp Alkaline 50 Phosphatase* – SAP) (USB-GE *healthcare*). A reação foi realizada durante 30 minutos, a 37°C seguidos de 15 minutos, a 80°C , para inativar a enzima.

3.4.2.3 Fosforilação de extremidades de DNA

Em determinado volume de DNA digerido por endonucleases de restrição, foram adicionados dois décimos do volume do tampão apropriado 5X (Tris-HCl 350 mM pH 7,6; MgCl₂ 50 mM; KCl 500 mM; 5mM 2-mercaptoetanol), 0,5 µL de T4 Polinucleotídeo quinase 10 U/µL (Invitrogen) e um décimo do volume de ATP 10 mM. A reação foi incubada a 37°C, por 30 minutos, e, para inativar a quinase, foi realizada uma etapa de 70°C por 10 minutos.

3.4.2.4 Ligação de extremidades de DNA

As reações de ligação foram feitas em um volume de 20 µL. Foram utilizados 2 µL de tampão de ligase 10X (Tris-HCl 400 mM, MgCl₂ 100 mM, DTT 100 mM, 5 mM ATP; pH 7,8), 1 µL de T4 DNA ligase 5 u/µL (Fermentas), 5 a 50 ng de vetor plasmidial e o fragmento a ser ligado ao vetor em uma concentração molar dez vezes maior que a do vetor utilizado. A reação foi incubada a 22°C durante 12 horas.

3.4.3 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

As reações de polimerização em cadeia (PCR) foram realizadas em aparelho termociclador DNA "Thermal Cycler" - MJ Research, modelo PTC 100. As reações continham 50 ng de DNA plasmidial, 0,2 µM de cada oligonucleotídeo iniciador, 0,2 mM de dNTPs, 1,5 mM de MgCl₂, 0,5 U de Taq DNA Polimerase (Invitrogen) e tampão 10X (Tris-HCl 200 mM pH 8,4; KCl 500 mM), em um volume de um décimo do volume final da reação. A reação foi incubada por 1 minuto, a 94°C, seguida de 40 ciclos de incubações a 94°C, por 1 minuto, temperatura de anelamento ideal dependendo do conjunto de iniciadores utilizados, por 1 minuto, e a 72°C, por 2 minutos. Por último, seguiu-se uma incubação a 72°C, por 10 minutos, para extensão final.

3.4.4 Análise do DNA

3.4.4.1 Eletroforese horizontal de DNA em gel de agarose e documentação

Eletroforese de DNA foi realizada em gel de agarose 1% em 0,5X TBE (Tris-HCl 44,5 mM, ácido bórico 44,5 mM, EDTA 1 mM). A amostra de DNA foi adicionada de tampão de amostra (azul de bromofenol 0,25%, glicerol 30%, EDTA 1 mM), e aplicada no gel contendo 0,5 µg/mL de brometo de etídeo. O gel foi submetido à voltagem de 100-150 V em tampão 0,5X TBE. O DNA foi visualizado através de iluminação ultravioleta, a 302 nm, e fotografado em máquina digital Kodak (DC 290).

3.4.4.2 Quantificação de DNA

Quando necessário, os fragmentos de DNA foram quantificados através de eletroforese horizontal em gel de agarose, juntamente com o marcador de peso molecular *DNA Low Mass Ladder* (Invitrogen), que possui fragmentos com quantidades conhecidas de DNA.

3.4.4.3 Seqüenciamento de DNA

O seqüenciamento de DNA foi realizado pelo método enzimático de terminação por dideoxynucleotídeo (Sanger et al., 1977), utilizando-se o “kit” de terminadores marcados (*DYEnamic ET Dye Terminator* – Amershan Biosciences™).

As reações de seqüenciamento continham 150 ng de DNA plasmidial que se desejava seqüenciar, 0,25 µM de iniciador e 4 µL do “sequencing reagent premix”, que contém ddNTPs, dNTPs e *Thermo Sequenase II Polymerase*, em um volume final de 10 µL. Foram realizadas em termociclador, em uma amplificação

linear com a incorporação dos terminadores marcados por distintas fluorescências com duração de 1 hora e 40 minutos. O programa utilizado realizava: uma etapa de desnaturação inicial a 95°C, por 20 segundos; 34 ciclos de incubação a 95°C, por 20 segundos; 50°C, por 15 segundos; 60°C, por um minuto; e, por fim, 4°C, por uma hora.

Após as reações de seqüenciamento, os produtos foram purificados com acetato de amônio 7,5 M e etanol absoluto para remoção dos ddNTPS marcados não incorporados. Para a eletroforese e a leitura das reações, foi utilizado o seqüenciador automático de DNA "MegaBACE" 1000 (Amershan). As seqüências obtidas foram analisadas no programa Chromas (www.technelysium.com.au).

3.4.5 Isolamento de fragmentos de DNA de gel de agarose

Para o isolamento de fragmentos de DNA de gel de agarose, foi utilizado o *StrataPrep™ DNA Gel Extraction Kit* (Stratagene).

O fragmento de DNA, separado em gel de agarose 1%, foi visualizado por coloração com brometo de etídeo e iluminação com luz ultravioleta em transluminador. O pedaço de agarose contendo o fragmento foi cortado e retirado do gel, colocado em tubo de microcentrifuga e a ele foram adicionados 300 µL de Tampão de Extração de DNA. O tubo foi incubado a 55°C, por 10 minutos, para dissolver o gel. A solução foi, então, transferida para uma microcoluna contendo matriz de fibra que foi colocada em novo tubo de microcentrifuga. Foi realizada uma centrifugação a 14.000 rpm, por 30 segundos. O líquido foi descartado, e a microcoluna foi novamente assentada sobre o tubo. Adicionaram-se 750 µL de Tampão de Lavagem (Tris-Hcl 5 mM pH7,5; NaCl 50 mM; EDTA 1,25 mM; etanol 50%), e centrifugou-se novamente nas mesmas condições. Descartou-se o líquido, e nova centrifugação foi realizada. A microcoluna contendo o DNA foi, então, transferida para outro tubo de microcentrifuga e a ela foram adicionados 50 µL de TE (Tris-Hcl 10 mM pH8,0; EDTA 1 mM) para eluir o DNA. Após 5 minutos de incubação a temperatura ambiente, seguiu-se outra etapa de

centrifugação nas mesmas condições anteriores. A microcoluna foi então descartada, e o DNA eluído em TE ficou retido no tubo.

3.5 Obtenção da região codificadora (CDS) de eIF2 beta humano

Para a obtenção do fragmento referente à CDS de eIF2 beta humano (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, M29536), foi realizada uma reação de PCR como descrito na seção 3.4.3, com temperatura de anelamento de 52°C. A reação teve como molde o DNA do plasmídeo pJPL07 (plasmídeo pALTER EX1® carregando a seqüência correspondente ao cDNA de eIF2 beta humano) (Salton, G. D., 2005) e utilizou os iniciadores NRUIF e BAMHIR que contêm em sua seqüência nucleotídica sítios de restrição para as enzimas *NruI* e *BamHI* respectivamente. O fragmento amplificado, de 1.300 pb, foi submetido a eletroforese em gel de agarose 1% e quantificado conforme seção 3.4.4.2.

3.6 Clonagem intermediária no plasmídeo pCR®2.1-TOPO®

Para clonagem de produtos da PCR, foi utilizado o *TOPO TA cloning kit* que utiliza o plasmídeo pCR®2.1-TOPO® (Invitrogen), o qual é especialmente formulado para essa finalidade. O protocolo foi seguido conforme as instruções do fabricante, de modo que os produtos de amplificação por PCR foram clonados em pCR®2.1- TOPO®, em uma reação com volume final de 6 µL, contendo 4 µL de produto de PCR, 1 µL de solução de sais diluída e 1µL do plasmídeo. A reação foi incubada por 5 minutos, a temperatura ambiente, e logo após, colocada no gelo. Posteriormente, foi utilizada para eletroporação de *E. coli* JM109, como descrito na seção 3.3.2. Os clones foram selecionados com ampicilina a 100 µg/mL. Para a análise da presença do plasmídeo recombinante, foram isoladas 20 colônias obtidas da transformação que foram repicadas em 2 mL de meio LB, contendo ampicilina 100 µg/mL e cultivadas a 37°C, por 16 a 18 horas. Os DNAs plasmidiais

foram extraídos por lise alcalina como descrito na seção 3.4.1.1. Para confirmar a presença do inserto nos diferentes clones, foi primeiramente feita uma triagem através de digestão com a enzima de restrição *EcoRI* (seção 3.4.2.1.) cujos sítios estão localizados nas regiões flanqueadoras da região de inserção do fragmento no plasmídeo pCR®2.1-TOPO®. Um clone que mostrou a presença do fragmento de DNA adequado foi selecionado.

3.7 Construções genéticas

3.7.1 Construção do plasmídeo pJPL13

Para obter a região codificadora do cDNA, foi elaborado o oligonucleotídeo iniciador NRUIF, que contém um sítio de restrição para a enzima *NruI*. O desenho desse iniciador faz com que o fragmento seja clonado em fase de leitura correta no vetor de expressão em células procarióticas Pin Point™ Xa-1 T-Vector quando esse vetor é clivado com a enzima de restrição *NruI*. Juntamente com o iniciador reverso BAMHIR, o iniciador NRUIF foi utilizado para a realização de uma reação de PCR que teve como molde o plasmídeo pJPL07. A reação foi feita conforme descrito na seção 3.4.3, apresentando temperatura de anelamento de 52°C. O fragmento de DNA amplificado de 1.300 pb foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1% e quantificado conforme seção 3.4.4.2.

Para a construção de um plasmídeo que expressasse a proteína eIF2 beta humana, foi escolhido o vetor Pin Point™ Xa-1 T-Vector, o qual permite a clonagem direta de produtos de PCR. Esse plasmídeo compõe o sistema *Pin Point™ Xa-1 T-Vector Systems* (Promega), o qual expressa a proteína de interesse sob a forma de um produto de fusão com um peptídeo que sinaliza a biotinação *in vivo* da proteína recombinante. Possibilitando, dessa forma, a sua detecção por “Western-Blot” revelado com streptavidina peroxidase e purificação por cromatografia de afinidade com resina de avidina (SoftLink™ Soft Release Avidin - Promega). O produto amplificado como descrito acima foi clonado no

plasmídeo Pin Point™ Xa-1 T-Vector. A reação de ligação foi realizada em um volume final de 10 µL, contendo 1 µL de Tampão de Ligação 10X (Tris-HCl 300 mM pH7,5; MgCl₂ 100 mM; DTT 100 mM; ATP 10 mM), 50 ng de Pin Point™ Xa-1 T-Vector, 0,5 µg de produto de PCR, 1 µL (1u) de T4 DNA Ligase (Promega) e H₂O MiliQ para completar o volume. Uma alíquota dessa reação foi utilizada para transformação em *E. coli* JM109, como descrito na seção 3.3.2. Os clones obtidos foram selecionados com 100 µg/mL de ampicilina. Para determinar a presença do plasmídeo recombinante, colônias isoladas da transformação foram repicadas em 2 mL de meio LB, contendo ampicilina 100 µg/mL e crescidas a 37°C, por 16 a 18 horas. Os DNAs plasmidiais foram extraídos por lise alcalina, como descrito na seção 3.4.1.1. Para confirmar a presença do inserto nos diferentes clones, foi realizada digestão dupla com endonucleases de restrição, como mostrado na seção 3.4.2.1, utilizando-se as enzimas *Nru*I e *Bam*HI. Um clone apresentando o fragmento de interesse de 1.292 pb foi selecionado e denominado pJPL13.

3.7.2 Construção do plasmídeo pJPL14

Para que a região codificadora de eIF2 beta fosse colocada em fase de leitura correta, o plasmídeo pJPL13 foi tratado com a endonuclease *Nru*I, como descrito na seção 3.4.2.1, e foi religado com 1 µL (1u) de T4 DNA Ligase (Promega) e com o volume adequado de tampão de ligação 10X. A reação foi transformada em *E. coli* JM109, como descrito na seção 3.3.2. Colônias isoladas da transformação foram repicadas em 2 mL de meio LB, contendo ampicilina 100 µg/mL e crescidas a 37°C, por 16 a 18 horas. Os DNAs plasmidiais foram extraídos por lise alcalina, como descrito na seção 3.4.1.1. Para confirmar a presença do inserto nos diferentes clones, foi realizado tratamento duplo com endonucleases de restrição, com as enzimas *Nru*I e *Bam*HI, como descrito na seção 3.4.2.1. Para análise da seqüência nucleotídica dos clones que mostraram apresentar o inserto, foi realizado seqüenciamento de DNA (seção 3.4.4.3). Um clone apresentando o fragmento de interesse de 1.292 pb foi selecionado e denominado pJPL14.

3.7.3 Construção do plasmídeo pJPL64

Para a obtenção de um fragmento composto pelo “tag” de biotilação, encontrado no plasmídeo Pin Point™ Xa-1 T-Vector, mais a região codificadora de eIF2 beta humano, foi realizada uma reação de PCR que teve como DNA molde o plasmídeo pJPL14. Para a realização dessa reação, foi criado o oligonucleotídeo iniciador NDEIF, que contém um sítio de restrição para a enzima *NdeI*. A PCR utilizou, então, os iniciadores NDEIF e BAMHIR para a amplificação de um fragmento de 1.695 pb, que foi realizada conforme descrito na seção 3.4.3. Esse produto de PCR foi ligado ao plasmídeo pCR®2.1-TOPO®, como descrito no item 3.6. Para confirmar a presença do inserto nos diferentes clones, foi primeiramente feita uma triagem através de digestão com a enzima de restrição *EcoRI*, como referido no item 3.4.2.1. Clones que mostraram a presença de um fragmento de aproximadamente 1.695 pb foram tratados com as endonucleases de restrição *NdeI* e *BamHI* por digestão dupla (seção 3.4.2.1). Um clone apresentando o fragmento de interesse foi selecionado e denominado pJPL64. O DNA desse plasmídeo foi extraído para armazenamento pelo “kit” *WizardR Plus SV Minipreps DNA Purification System* (Promega), como descrito na seção 3.4.1.2.

3.7.4 Construção do plasmídeo pJPL65

O plasmídeo pJPL64 foi tratado concomitantemente com as endonucleases *NdeI* e *BamHI* para o isolamento do fragmento de 1.695 pb. Esse fragmento foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1% e extraído do gel (seção 3.4.5). As extremidades do fragmento foram fosforiladas como descrito na seção 3.4.2.3. O plasmídeo pET-23a(+) também foi, do mesmo modo, digerido com essas duas enzimas e, posteriormente, teve suas extremidades defosforiladas (3.4.2.2). A reação de ligação foi realizada num volume final de 20 µL, como descrito na seção 3.4.2.4, e transformada em *E. coli* JM109, como na seção 3.3.2. Os clones resultantes foram selecionados com 100 µg/mL de ampicilina. Colônias isoladas obtidas com a transformação foram cultivadas em 2 mL de LB, com ampicilina

100 µg/mL. Os DNAs plasmidiais foram extraídos por lise alcalina como descrito no item 3.4.1.1. A presença de plasmídeos recombinantes foi analisada por digestão dupla com as enzimas *NdeI* e *BamHI*, como referido na seção 3.4.2.1. A análise da seqüência dos clones que apresentaram o fragmento de interesse foi realizada por seqüenciamento de DNA, como descrito na seção 3.4.4.3. Foi selecionado um plasmídeo recombinante com a seqüência correta, o qual foi denominado pJPL65. O DNA desse plasmídeo foi extraído para armazenamento pelo "kit" *WizardR Plus SV Minipreps DNA Purification System* (Promega), como descrito na seção 3.4.1.2.

3.8 Expressão de eIF2 beta humano recombinante em *E. coli*

3.8.1 Expressão em pequena escala

Foram preparadas células eletrocompetentes de *E. coli* das linhagens BL21 SI, BL21 DE3, BL21 DE3 STAR, BL21 (DE3) pLysS, BL21 (DE3) codon plus RIL e JM109, como descrito na seção 3.3.1. Todas essas linhagens foram eletroporadas (seção 3.3.2) com os plasmídeos pJPL14 e pJPL65.

Colônias transformantes foram repicadas em 2 mL de LB com 100 µg/mL de ampicilina e cultivadas por 16 a 18 horas, sob agitação a 37°C. Cada clone foi, então, repicado com 1% (50 µL) de pré-inóculo em 5 mL de 2X YT com 100 µg/mL de ampicilina e 2 µM de biotina, sob agitação (250 rpm) a 37°C. Os cultivos foram crescidos até atingirem uma OD_{600nm} de aproximadamente 0,6. Adicionou-se IPTG para concentrações finais de 0,1 mM até 1,0 mM e manteve-se o cultivo por 3 a 4 horas adicionais.

Os cultivos foram transferidos para tubos de microcentrífuga e centrifugados por 30 segundos a 12.000 rpm. As células foram ressuspensas no mesmo volume de PBS 1X (NaCl 145 mM; NaH₂PO₄ 7,46 mM; Na₂HPO₄ 14,5 mM, KCl 27 mM; pH 7,4) gelado e novamente centrifugadas nas mesmas condições. O precipitado foi armazenado a -20°C.

3.8.2 Expressão em escala de 100 mL

Pré-inóculos foram cultivados em 2 mL de LB com 100 µg/mL de ampicilina por 16 a 18 horas, sob agitação a 37°C. Foi utilizado 1 mL de pré-inóculo para semear 100 mL de meio 2X YT com 100 µg/mL de ampicilina e 2 µM de biotina em frasco "Erlenmayer" de 500 mL, sob forte agitação (250 rpm) a 37°C. O cultivo foi crescido até atingir uma OD_{600nm} de aproximadamente 0,6. Adicionou-se IPTG para concentração final de 0,3 mM e manteve-se o cultivo por 3 a 4 horas adicionais.

O cultivo foi transferido para tubos "Falcon" de 50 mL, que foram centrifugados a 4°C, por 15 minutos a 5.000 rpm. As células foram ressuspensas no mesmo volume de PBS 1X (NaCl 145 mM; NaH₂PO₄ 7,46 mM; Na₂HPO₄ 14,5 mM, KCl 27 mM; pH 7,4) gelado e novamente centrifugadas nas mesmas condições. O precipitado foi armazenado a -20°C

3.9 Purificação de eIF2 beta recombinante a partir de corpúsculos de inclusão

Após os cultivos em escala de 100 mL (seção 3.8.2), os precipitados celulares de 50 mL de cultivo foram incubados no nitrogênio líquido por 5 minutos e, em seguida, a 37°C por 5 minutos. Esse processo foi repetido em um total de cinco ciclos. O material foi ressuspendido em 10 mL de PBS 1X gelado com 0,8 mg/mL de lisozima e mantido no gelo por 15 minutos. Em seguida, a suspensão foi sonicada no gelo com 10 pulsos de 30 segundos em intensidade média. As amostras foram, então, centrifugadas a 4°C, por 30 minutos, a 5.000 rpm e a fração solúvel descartada. A seguir, o material precipitado foi ressuspendido em 15 mL de PBS 1X contendo uréia 1 M, Triton-X-100 1% e Tween 20 1% e incubado em temperatura ambiente por 10 minutos. Após, realizou-se nova centrifugação, como descrito acima, e a fração solúvel foi descartada. O material precipitado foi ressuspendido em 15 mL de PBS 1X

contendo uréia 2 M, Triton-X-100 2% e Tween 20 2% e incubado em temperatura ambiente por 10 minutos. As amostras foram novamente centrifugadas nas mesmas condições. O precipitado foi lavado uma vez com 15 mL de PBS 1X, ressuspendido em 10 mL de PBS 1X com 0,8 mg/mL de lisozima e mantido no gelo por 15 minutos. Seguiu-se nova centrifugação e descarte do material solúvel. Finalmente, o precipitado foi solubilizado em 15 mL de PBS 1X contendo uréia 8 M e centrifugado. A fração solúvel foi coletada e dialisada contra 2 L de Tris 25 mM, NaCl 125 mM, pH 7,5.

3.10 Análise de proteínas

3.10.1 Eletroforese de proteínas em gel de poli-acrilamida com SDS (SDS-PAGE)

Géis verticais de poli-acrilamida para eletroforese de proteínas foram preparados entre duas placas de vidro do sistema (Bio-Rad Mini-PROTEAN®). O gel de corrida 10% era composto de uma solução de acrilamida/bis-acrilamida 30% (29% de acrilamida e 1% de bis-acrilamida), Tris 0,37 M pH8,8, SDS 0,1%, 20 µL de persulfato de amônio 10% e 6 µL de TEMED, em um volume total de 5 mL. Essa solução era aplicada entre as placas do sistema até 2 cm da borda e coberta com uma fina camada de etanol 96° para formar uma interface lisa. Quando o gel encontrava-se polimerizado, o etanol 96° era removido com papel filtro, colocava-se o gel de empilhamento (acrilamida 4%, bis acrilamida 0,1%, Tris 0,125 M pH6,8, SDS 0,1%, 20 µL de persulfato de amônio 10% e 3 µL de TEMED, em um volume total de 2,5 mL) e inseriam-se os pentes para formação dos poços de aplicação das amostras. As amostras eram diluídas em tampão de aplicação 5X (Tris 1,562M pH6,8, glicerol 25%, SDS 7%, 2-mercaptoetanol 12%, azul de bromofenol 0,25%) e incubadas a 100°C por 5 minutos. Aplicavam-se as amostras no gel já submerso no tampão de corrida (1,44% de glicina, 0,3% de Tris e SDS

0,01%). A eletroforese era realizada a 120 volts até o corante começar a sair do gel, aproximadamente 1 hora e meia.

3.10.2 Coloração de proteínas em gel de poliacrilamida

Foi utilizada a coloração por Coomassie, onde as proteínas eram coradas numa solução de metanol 50%, ácido acético 10%, Coomassie-blue (Sigma) 0,1%, sob leve agitação, por 1 hora. Essa solução era removida, o gel lavado com água e descorado numa solução de ácido acético 10%, metanol 10% até as bandas ficarem visíveis.

3.10.3 Western-Blot revelado com soro anti-eIF2 beta humano

Após separação das proteínas em SDS-PAGE, as mesmas foram transferidas "overnight" para uma membrana de nitrocelulose (Hybond-C Extra Amersham) por eletroforese, utilizando-se o sistema (Bio-Rad Mini-Trans-Blot) a 90 mA em tampão de transferência 1X (Tris-HCl 25mM pH8,3, glicina 192mM, metanol 20%). A membrana foi corada com ponceau (ponceau 0,1%, em ácido acético glacial) por 5 minutos. As bandas do marcador de massa molecular foram identificadas com caneta esferográfica azul e em seguida a nitrocelulose foi descorada com água destilada. A seguir, foi bloqueada com leite em pó desnatado Molico 10% por uma hora e lavada com água destilada diversas vezes. Após, foi incubada com soro anti-eIF2 beta na diluição apropriada em PBS-Tween (PBS com Tween-20 0,05%) por uma hora a temperatura ambiente, com leve agitação. A membrana foi lavada com três ciclos de incubação em PBS-Tween por 5 minutos, seguida de enxágüe com água destilada. Seguindo-se, foi incubada com Proteína A-Peroxidase (Amersham), diluída a 1:2000 em PBS-Tween, por 1 hora com agitação, e lavada como descrito anteriormente. Para a detecção por quimioluminescência, a membrana foi, então, incubada 2 vezes por 5 minutos em tampão carbonato/bicarbonato (carbonato de sódio 15 mM, bicarbonato de sódio 35 mM). Seguiu-se incubação com uma mistura de iguais

quantidades da solução de detecção 1 e solução de detecção 2 (ECL™, Western blotting detection reagents - Amersham Life Science). O excesso de solução de detecção foi retirado e a membrana colocada dentro de um filme de transparência dobrado. A membrana foi exposta a um filme de raio-X por 5 minutos ou menos e este último revelado.

3.10.4 Western-Blot revelado com streptavidina peroxidase

O mesmo procedimento descrito no item 3.9.3 foi seguido até o bloqueio da membrana com Molico 10% e posterior lavagem com água destilada. A seguir, a mesma foi incubada com streptavidina peroxidase (Promega) diluída a 1:2000 em PBS-Tween, por 45 minutos a 37°C e com leve agitação. A membrana foi lavada com três ciclos de incubação em PBS-Tween por 5 minutos, seguida de enxágüe com água destilada. Para a detecção por quimioluminescência, a membrana foi, então, incubada 2 vezes por 5 minutos em tampão carbonato/bicarbonato (carbonato de sódio 15 mM, bicarbonato de sódio 35 mM). Após, seguiu-se incubação com uma mistura de iguais quantidades da solução de detecção 1 e solução de detecção 2 (ECL™, Western blotting detection reagents - Amersham Life Science). O excesso de solução de detecção foi retirado e a membrana colocada dentro de um filme de transparência dobrado. A membrana foi exposta a um filme de raio-X por 5 minutos ou menos e este último revelado.

3.10.5 Quantificação de proteína por Coomassie Azul Brilhante (modificação do método de Bradford, 1976)

A amostra de proteína foi diluída em água para um volume final de 100 µL. À diluição foi adicionado 1 mL de solução de Coomassie Azul Brilhante (abaixo) e a absorbância a 595 nm determinada por espectrofotometria. A concentração de proteína foi determinada contra uma curva padrão de 1 a 10 µg de albumina sérica bovina (BSA).

Solução corante: 10 mg Coomassie Brilliant Blue G-250 (Sigma) foram dissolvidos em 5 mL etanol 95%. Adicionou-se 10 mL H₃PO₄ e o volume foi completado para 100 mL com água destilada. A solução foi filtrada em papel de filtro e guardada a 4°C em frasco escuro.

3.11 Produção de soro policlonal anti-eIF2 beta recombinante

Foi inoculado por via subcutânea, em um coelho jovem da raça Nova Zelândia, 0,2 mg de eIF2 beta recombinante purificada, com adjuvante completo de Freund. Após 30 e 60 dias, inoculou-se 0,2 mg de proteína, com adjuvante incompleto de Freund.

O coelho foi sangrado diretamente do coração após uma semana do terceiro inóculo. O sangue foi incubado a 37°C por 30 minutos e a 4°C por 18 horas. O tubo foi centrifugado a 700g por 15 minutos, o sobrenadante transferido para novo tubo e centrifugado por 20 minutos a 2.800g. O sobrenadante foi aliquoteado e armazenado a -70°C.

3.12 Adsorção do soro policlonal anti-eIF2 beta recombinante com ATPase recombinante de Pseudomonas aeruginosas

A 0,5 mL de soro, foi adicionado 0,5 mL de ATPase recombinante purificada a uma concentração de 500 µg/mL. A mistura foi incubada a 37°C por uma hora e congelada a -20°C.

4 Resultados

4.1 Obtenção da região codificadora (CDS) de eIF2 beta humano

Foi realizada uma reação de PCR, utilizando os oligonucleotídeos iniciadores NRUIF e BAMHIR que inserem sítios de restrição para as endonucleases *NruI* e *BamHI* respectivamente. A reação teve como molde o DNA do plasmídeo pJPL07 (plasmídeo pALTER EX1® carregando a seqüência correspondente ao cDNA de eIF2 beta humano) (Salton, G. D., 2005). O fragmento amplificado resultante foi de 1300 pb (FIG. 4).



Figura 4 - Amplificação por PCR da região correspondente ao cDNA de eIF2 beta humano. 1 - marcador de massa molecular DNA Low Mass Ladder. 2 - produto de amplificação por PCR de 1300 pb referente ao cDNA de eIF2 beta humano, utilizando os oligonucleotídeos iniciadores NRUIF e BAMHIR.

4.2 Construção dos plasmídeos pJPL13 e pJPL14

O produto amplificado de 1300 pb referente ao cDNA de eIF2 beta humano foi clonado no plasmídeo Pin Point Xa-1 T-Vector, que é elaborado para a clonagem direta de produtos de PCR e integra o *Pin Point™ Xa-1 T-Vector Systems*. Os clones obtidos foram digeridos com as endonucleases de restrição

*Nru*I e *Bam*HI para a análise da presença do fragmento de interesse. Clones positivos liberaram um inserto de 1282 pb. Um clone contendo o fragmento de interesse foi selecionado e originou o plasmídeo pJPL13, o qual continha o fragmento de DNA de interesse em orientação correta em relação à região promotora.

Para que o gene de eIF2 beta fosse colocado em fase de leitura correta no pJPL13, esse foi tratado, somente, com a endonuclease de restrição *Nru*I para que fosse retirado um pequeno fragmento de 38 pb. Posteriormente, esse plasmídeo foi religado. Essa construção foi novamente transformada em *E. coli* e os clones resultantes da transformação foram digeridos com as enzimas de restrição *Nru*I e *Bam*HI para confirmação da presença do fragmento de interesse (FIG. 5). Aqueles que mostraram resultado positivo tiveram sua seqüência nucleotídica analisada por seqüenciamento. Um clone com a seqüência correta foi selecionado e originou o plasmídeo pJPL14 (FIG. 6).

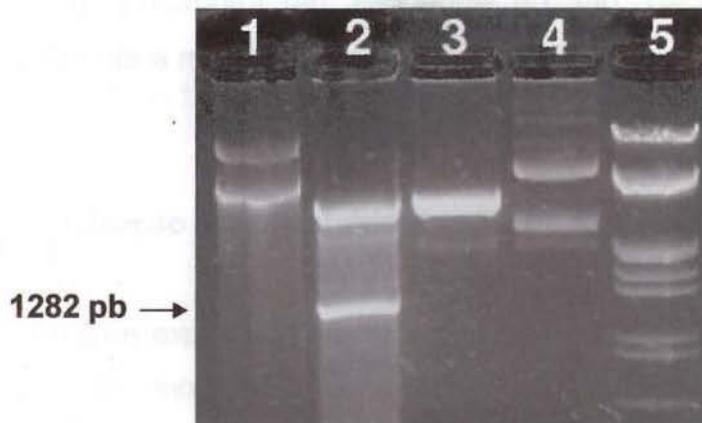


Figura 5 - Padrão de digestão com *Nru*I e *Bam*HI do plasmídeo pJPL14. 1 - plasmídeo pJPL14 não-clivado. 2 - plasmídeo pJPL14 clivado com *Nru*I e *Bam*HI, mostrando um fragmento de aproximadamente 3331 pb referente a Pin Point™ Xa-1 T-Vector e um fragmento de 1282 pb referente à região codificadora do cDNA de eIF2 beta humano. 3 - plasmídeo Pin Point™ Xa-1 T-Vector clivado *Nru*I e *Bam*HI, mostrando um fragmento de aproximadamente 3331 pb. 4 - plasmídeo Pin Point™ Xa-1 T-Vector não-clivado. 5 - marcador de massa molecular lambda *Eco*RI/*Hind*III.

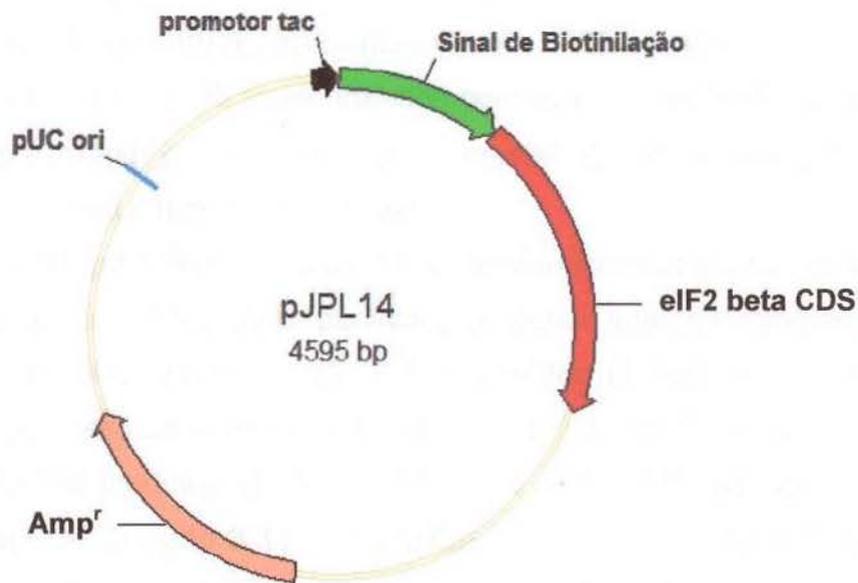


Figura 6 - Representação esquemática do plasmídeo pJPL14. Em destaque, na figura, estão os principais elementos do plasmídeo: gene de resistência a ampicilina (Amp^r); promotor tac; seqüência do “tag” para biotinilação *in vivo* e fragmento referente à região codificadora de eIF2 beta.

4.3 Construção dos plasmídeos pJPL64 e pJPL65

Os testes de expressão de eIF2 beta utilizando o plasmídeo PinPoint Xa-1 T-Vector (pJPL14) mostraram que a proteína recombinante foi produzida em níveis muito baixos, insuficientes para a purificação. Para a obtenção de um fragmento de DNA composto pela seqüência referente ao “tag” de biotinilação encontrado no plasmídeo PinPoint Xa-1 T-Vector, juntamente com a região codificadora de eIF2 beta (eIF2beta-Biot), sob controle de um promotor mais forte (promotor de T7), foi construído um novo plasmídeo usando a estrutura do plasmídeo pET-23 a (+).

Uma reação de PCR com os oligonucleotídeos iniciadores NDEIF e BAMHIR foi realizada utilizando como molde o DNA do plasmídeo pJPL14. O fragmento de 1695 pb amplificado foi clonado no plasmídeo pCR®2.1- TOPO®

como descrito na seção 3.6. Para confirmar a presença do inserto, clones que apresentaram um fragmento de aproximadamente 1695 pb na triagem feita pela digestão com a enzima *EcoRI* foram tratados com as enzimas *NdeI* e *BamHI*. Um clone que apresentou o fragmento de interesse de 1672 pb (FIG. 7) foi selecionado e originou o plasmídeo pJPL64.

O plasmídeo pJPL64 foi tratado com as endonucleases de restrição *NdeI* e *BamHI*. O fragmento de 1672 pb foi purificado do gel de agarose como descrito na seção 3.4.5e fosforilado (seção 3.4.3.3). O plasmídeo pET-23 a (+) também foi digerido com as mesmas enzimas e teve as suas extremidades defosforiladas (seção 3.4.3.2). Os produtos foram ligados como descrito na seção 3.4.2.4 e o material eletroporado (seção 3.3.2) em JM109. Para a confirmação da presença do fragmento referente a eIF2beta-Biot, os clones foram tratados com *NdeI* e *BamHI*. Um clone que apresentou o fragmento de interesse foi selecionado e deu origem ao plasmídeo pJPL65 (FIG. 8).

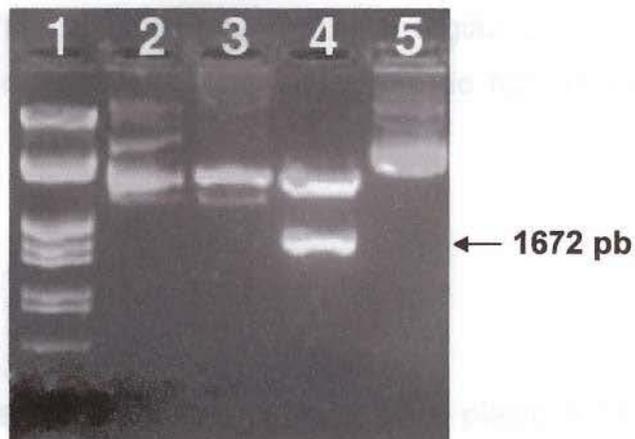


Figura 7 - Padrão de digestão com *NdeI* e *BamHI* do plasmídeo pJPL64. 1 - marcador de massa molecular lambda *EcoRI/HindIII*. 2 - plasmídeo pCR®2.1-TOPO® não-clivado. 3 - plasmídeo pCR®2.1-TOPO® clivado com *NdeI* e *BamHI*. 4 - plasmídeo pJPL64 clivado com *NdeI* e *BamHI*, mostrando um fragmento de aproximadamente 3931 pb referente a pCR®2.1-TOPO® e um fragmento de 1672 pb referente ao fragmento composto pelo “tag” de biotilação mais a região codificadora do eIF2 beta humano. 5 - plasmídeo pJPL64 não-clivado.

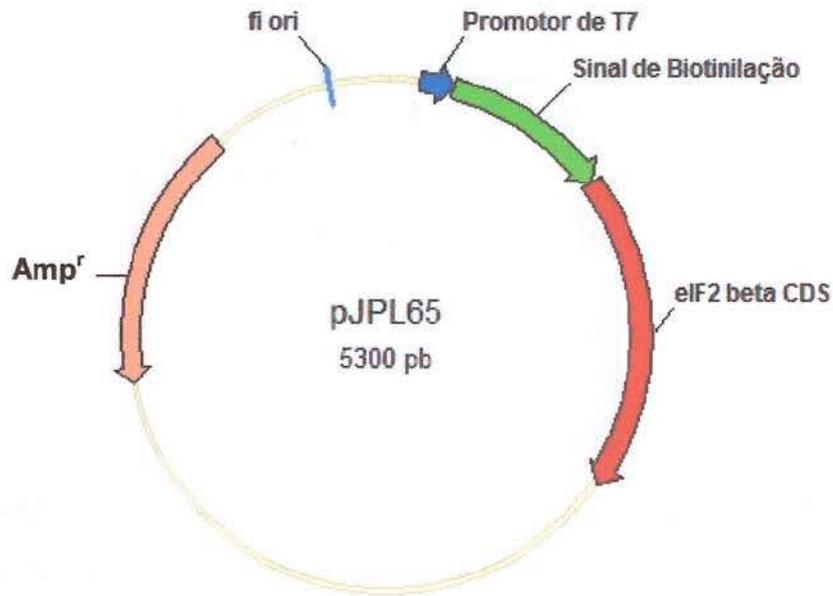


Figura 8 - Representação esquemática do plasmídeo pJPL65. Em destaque, na figura, estão os principais componentes do plasmídeo: promotor de T7; fragmento referente ao “tag” de biotinilação mais a região codificadora de eIF2 beta humano; gene de resistência a (Amp^r) e origem de replicação derivada do vírus f1 (f1 ori).

4.4 Expressão de eIF2 beta utilizando pJPL14

Os testes de expressão de eIF2 beta utilizando o plasmídeo PinPoint Xa-1 T-Vector evidenciaram baixos níveis de produção da proteína pelo sistema. A expressão não pôde ser detectada por coloração com Coomassie Blue (seção 3.10.2). O Western-Blot revelado com streptavidina peroxidase (seção 3.10.4), por ser altamente sensível, foi capaz de detectar baixos níveis de expressão da proteína recombinante. A expressão, no entanto, não foi induzida pelas diferentes concentrações de IPTG testadas, ao contrário, o cultivo sem IPTG expressou a proteína recombinante em maior quantidade (FIG. 9).

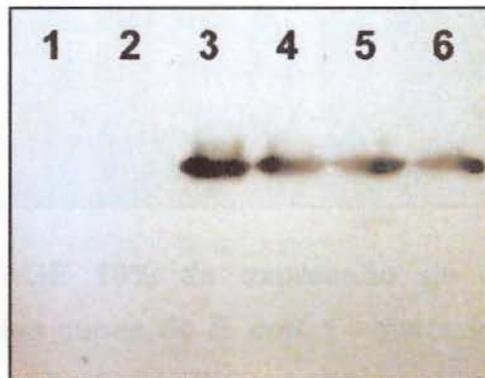


Figura 9 - Western-Blot revelado com streptavidina peroxidase da expressão de eIF2 beta recombinante (pJPL14) em JM109. 1 - PinPoint Xa-1 não induzido. 2 - PinPoint Xa-1 induzido com 1,0 mM de IPTG. 3 - pJPL14 não induzido. 4 a 6 - pJPL14 induzido com 0,1 mM de IPTG; pJPL14 induzido com 0,5 mM de IPTG; pJPL14 induzido com 1,0 mM de IPTG.

4.5 Expressão de eIF2 beta utilizando pJPL65

Ao contrário do descrito acima, a proteína recombinante eIF2 beta foi produzida em grandes quantidades quando induzida a partir do plasmídeo pJPL65. As diferentes linhagens de *E. coli* mostraram pouca variação nos níveis de expressão, à exceção de BL21 DE3 pLys, que não expressou eficientemente a proteína recombinante. Entretanto, a cepa BL21 Codon Plus RIL foi escolhida para os experimentos de expressão em maior escala (seção 3.8.2). Essa linhagem, aparentemente, expressou a proteína em um nível ligeiramente superior ao das outras cepas (FIG. 10 – linha 8). Tal diferença, provavelmente, deva-se ao fato de na seqüência codificadora de eIF2 beta existirem alguns códons, principalmente para arginina, que são raros em *E.coli*. A linhagem referida possui um plasmídeo adicional que codifica, justamente, para tais tRNAs escassos naquela espécie.

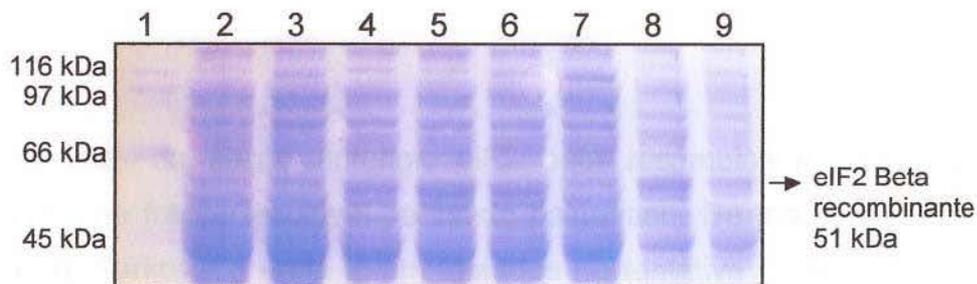


Figura 10 - SDS-PAGE 10% da expressão de eIF2 beta recombinante (pJPL65) em diferentes cepas de *E. coli*. 1 - marcador de massa molecular. 2 - BL21 DE3 não induzida. 3 - BL21 DE3 induzida com 0,3 mM de IPTG. 3, 4, 5, 6, 7 e 8 - BL21 SI, BL21 DE3, JM109, BL21 DE3 pLys, BL21 DE3 Codon Plus e BL21 DE3 STAR carregando pJPL65 induzidas com 0,3 mM de IPTG.

4.6 eIF2 beta recombinante é produzida em uma forma insolúvel (corpúsculo de inclusão)

Após a lise celular, eIF2 beta recombinante se concentra na fração insolúvel do extrato protéico (FIG.11).

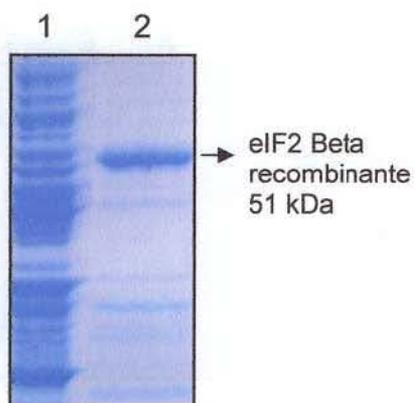


Figura 11 - SDS-PAGE 10% de extratos de *E. coli* BL21 DE3 Codon Plus RIL expressando eIF2 beta (pJPL65). 1 - fração solúvel. 2 - fração insolúvel. O gel mostra que a proteína recombinante se concentra exclusivamente na fração insolúvel.

4.7 Purificação de eIF2 beta recombinante a partir de corpúsculos de inclusão

Como visto na seção anterior, eIF2 beta recombinante se concentra exclusivamente na fração insolúvel do lisado bacteriano. De modo que Triton-X-100, tween 20, Sarkosyl e uréia foram testados na tentativa de solubilização da proteína. Os dois primeiros não foram eficientes, e mesmo em concentrações altas de até 2% desses detergentes a proteína continuou insolúvel. Sarkosyl na concentração de 0,5% e uréia na concentração 8 M foram capazes de provocar a solubilização do corpúsculo de inclusão. Após a solubilização, procedeu-se o protocolo de purificação por cromatografia de afinidade com resina de avidina (SoftLink™ Soft Release Avidin - Promega) conforme especificações do fabricante. Por esse método, no entanto, não se obteve sucesso na purificação. Os agentes utilizados para a solubilização impediram a ligação de eIF2 beta à resina.

Optou-se por desenvolver um método de purificação que visava à solubilização gradual dos contaminantes, entretanto, sem solubilizar eIF2 beta (seção 3.9). Tal processo de lavagem rendeu eIF2 beta recombinante com um bom grau de pureza (FIG. 12).

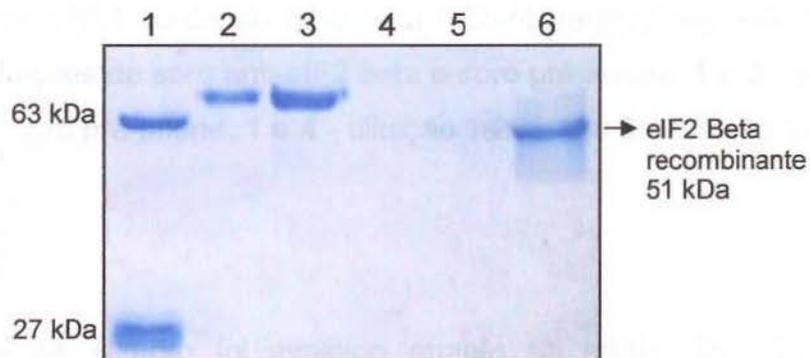


Figura 12 - SDS-PAGE 10% da purificação de eIF2 beta. 1 - marcador de massa molecular. 2 - 0,5 µg de BSA. 3 - 1,0 µg de BSA. 4 - N/D. 5 - N/D. 6 - eIF2 beta recombinante purificada.

4.8 Produção de soro policlonal anti-eIF2 beta recombinante

A proteína purificada foi utilizada para a imunização de um coelho jovem da raça Nova Zelândia como foi descrito na seção 3.11. A partir da utilização do soro bruto do animal, foram realizados experimentos de detecção da expressão de eIF2 beta por Western-Blot.

Inicialmente, realizaram-se testes de titulação por Western-Blot. Para isso, tiras de nitrocelulose contendo a proteína recombinante purificada como antígeno foram desafiadas contra diferentes concentrações de soro imune e de soro pré-imune (seção 3.10.3) (FIG.13).

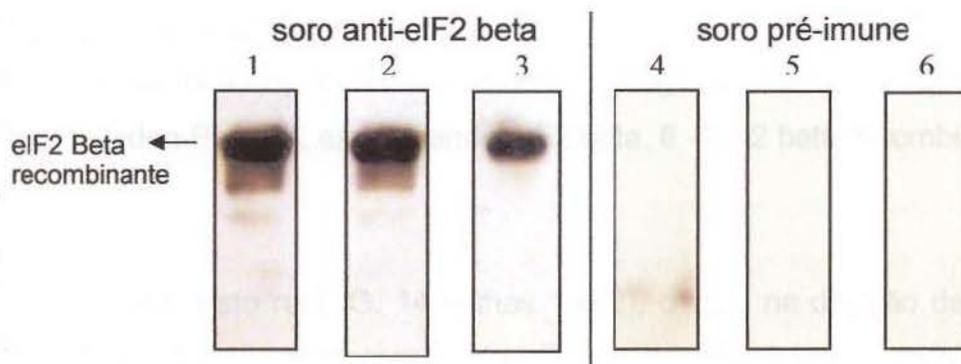


Figura 13 - Western-Blot contendo eIF2 beta recombinante purificada, revelado com diferentes diluições de soro anti-eIF2 beta e soro pré-imune. **1 a 3** - soro anti-eIF2 beta. **4 a 6** - soro pré-imune. **1 e 4** - diluição 1:200. **2 e 5** - diluição 1:400. **3 e 6** - diluição 1:800.

Posteriormente, o soro foi avaliado quanto ao poder de detecção da expressão de eIF2 beta em extratos de células humanas em cultivo. Para isso, o soro na diluição de 1:800 foi utilizado para revelar um Western-Blot que continha extratos de Hek, Hela, *E.coli*, expressando eIF2 beta e frações de proteínas purificadas (FIG. 14).

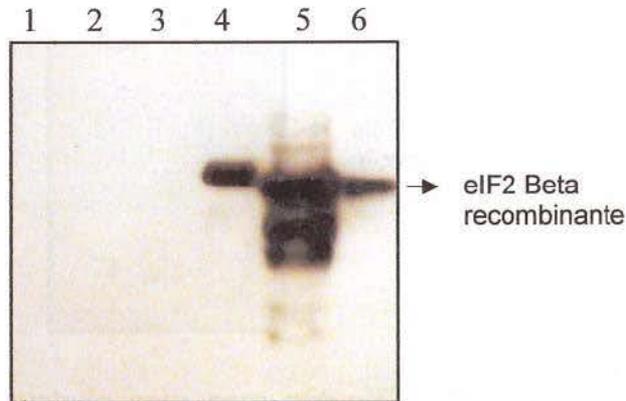


Figura 14 - Western-Blot revelado com soro anti-eIF2 beta na diluição de 1:800. **1** - extrato de Hek. **2** - extrato de Hela. **3** - proteína L-lactato desidrogenase de *Mycoplasma hyopneumoniae* fusionada com GST. **4** - proteína ATPase de *Pseudomonas aeruginosa* fusionada com “tag” de biotinilação. **5** - extrato *E. coli* BL21 Codon Plus RIL expressando eIF2 beta. **6** - eIF2 beta recombinante.

Como visto na FIG. 14 (linhas 1 e 2), o soro na diluição de 1:800 não foi capaz de detectar a expressão de eIF2 beta endógeno nos extratos de células humanas. Entretanto, apresentou alta reatividade contra a ATPase recombinante de *Pseudomonas aeruginosa*, também fusionada com “tag” de biotinilação.

A partir daí, surgiu a hipótese de que o soro produzido poderia apresentar reatividade apenas contra a porção referente ao “tag” de biotinilação presente em eIF2 beta recombinante. Para avaliar essa possibilidade, o soro foi adsorvido com ATPase recombinante purificada (seção 3.12). O soro adsorvido foi utilizado para a revelação de um Western-Blot que continha ATPase e eIF2 beta purificadas (FIG. 15).

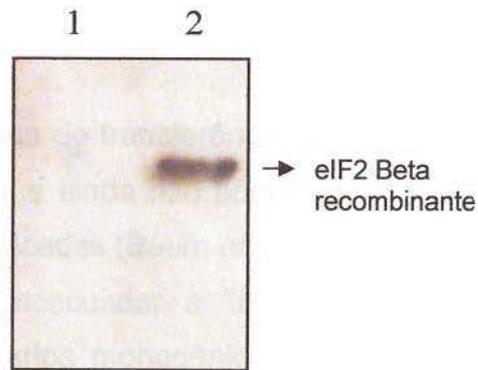


Figura 15 - Western-Blot revelado com soro anti-eIF2 adsorvido com ATPase recombinante, na diluição de 1:50. **1** - ATPase recombinante purificada. **2** - eIF2 beta recombinante purificada.

Após a adsorção do soro, a reatividade contra ATPase desapareceu (FIG. 15). eIF2 beta recombinante, no entanto, ainda continuou sendo detectada, mas com menor sensibilidade. Sendo assim, fica claro que grande parte da reatividade total do soro contra eIF2 beta recombinante se dá contra o “tag”, mas uma fração do mesmo é capaz de reconhecer especificamente eIF2 beta. Dessa forma, foram realizados novamente experimentos de detecção em células humanas, contudo com o soro em diluições mais baixas (FIG. 16).

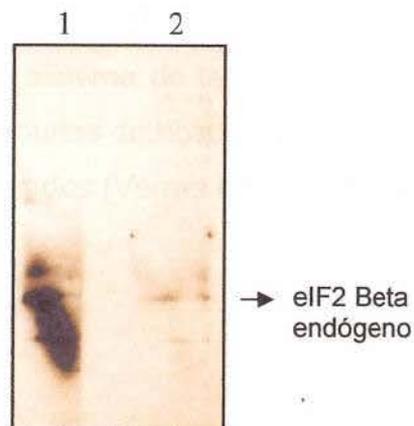


Figura 16 - Western-Blot revelado com soro anti-eIF2 beta na diluição de 1:50 (linha 1) e 1:100 (linha 2). As linhas 1 e 2 contêm extrato de Hek.

5 Discussão

A utilização de tecnologias de transferência gênica no desenvolvimento de novas terapias para doenças que ainda não possuem um tratamento efetivo tem aumentado muito nas últimas décadas (Baum *et al.*, 2003).

Como originalmente conceituada, a terapia gênica foi direcionada à correção de distúrbios hereditários monogênicos (Kay *et al.*, 1997) e tumores refratários aos tratamentos convencionais (Friedmann, 2001). Atualmente, esses limites do uso potencial da terapia gênica têm se expandido, ao menos em estudos pré-clínicos, incluindo um espectro de doenças para as quais ainda não existe uma terapia convencional completamente adequada, como é o caso das doenças auto-imunes (Baum *et al.*, 2003), da diminuição da progressão de tumores, do combate a infecções virais e doenças neurodegenerativas (Verma e Somia, 1997; Hunt e Vorburger, 2002).

O câncer é a doença mais freqüentemente visada pela terapia gênica. De acordo com o banco de dados do National Institute of Health - Recombinant DNA Advisory Committee, em setembro de 2006, dos 785 protocolos de terapia gênica, 67,4% visavam ao tratamento de câncer. Destes, apenas 8,13% utilizavam uma abordagem de lise celular direcionada por vetor (TAB. 1). Esse tipo de estratégia envolve a identificação apropriada do gene-alvo e o direcionamento celular adequado. Em vista disso, vários problemas relacionados a essa técnica são encontrados, como falta de um sistema de transferência eficiente, de expressão gênica suficiente e de reações imunes do hospedeiro aos vetores utilizados, sendo esses os desafios a serem superados (Verma e Somia, 1997).

Tabela 1 - Protocolos de transferência gênica em humanos registrados no National Institute of Health (NIH). (Tabela retirada da *homepage* oficial do NIH.)

Page 125 - Human Gene Transfer Protocols, Last updated: 9-12-06

HUMAN GENE TRANSFER PROTOCOLS (please see the explanation of review levels below)								
	Review Level 1	Review Level 2	Review Level 3	Review Level 4	Review Level 5	Review Level 6	Review Level 7	TOTAL
MARKING	23	2	5	0	0	10	1	41
THERAPY	53	5	92	5	7	440	103	735
NON-THERAPEUTIC	1	0	0	0	0	4	4	9
INFECTIOUS DISEASES	8	1	11	1	0	21	3	45
1. Human Immunodeficiency Virus	8	1	11	1	0	18	3	42
2. Other viral diseases	0	0	0	0	0	3	0	3
MONOGENIC DISEASES	20	1	9	0	1	16	17	64
1. Alpha-1-Antitrypsin Deficiency	1	0	0	0	0	1	1	3
2. Chronic Granulomatous Disease	1	0	1	0	0	1	0	3
3. Cystic Fibrosis	10	1	5	0	0	6	2	24
4. Familial Hypercholesterolemia	1	0	0	0	0	0	0	1
5. Fanconi Anemia	1	0	0	0	0	3	0	4
6. Gaucher Disease	3	0	0	0	0	0	0	3
7. Hunter Syndrome	1	0	0	0	0	0	0	1
8. Ornithine Transcarbamylase Deficiency	0	0	1	0	0	0	0	1
9. Purine Nucleoside Phosphorylase Deficiency	1	0	0	0	0	0	0	1
10. SCID	1	0	1	0	0	3	1	6
11. Leukocyte Adherence Deficiency	0	0	1	0	0	0	0	1
12. Canavan Disease	0	0	0	0	0	1	2	3
13. Hemophilia	0	0	0	0	0	0	5	5
14. Muscular Dystrophy	0	0	0	0	0	0	2	2
15. Amyotrophic Lateral Sclerosis	0	0	0	0	1	0	0	1
16. Junctional Epidermolysis Bullosa	0	0	0	0	0	0	1	1
17. Retinal Disorders (e.g., LCA)	0	0	0	0	0	0	2	2
18. Neuronal Ceroid Lipofuscinosis	0	0	0	0	0	1	0	1
19. Mucopolysaccharidosis	0	0	0	0	0	0	1	1
OTHER DISEASES / DISORDERS	2	0	2	2	2	54	35	97
1. Peripheral Artery Disease	1	0	0	1	0	30	5	37
2. Arthritis	1	0	0	0	0	1	3	5
3. Arterial Restenosis	0	0	1	0	0	1	1	3
4. Heart Failure	0	0	0	0	0	1	2	3
5. Cubital Tunnel Syndrome	0	0	1	0	0	0	0	1
6. Coronary Artery Disease	0	0	0	1	0	15	5	21
7. Alzheimer's Disease	0	0	0	0	0	0	2	2
8. Ulcer	0	0	0	0	0	1	2	3
9. Bone Fracture	0	0	0	0	1	0	0	1
10. Peripheral Neuropathy	0	0	0	0	0	1	1	2
11. Parkinson's Disease	0	0	0	0	1	0	3	4
12. Epilepsy	0	0	0	0	0	0	1	1
13. Eye Disorders	0	0	0	0	0	3	4	7
14. Erectile Dysfunction	0	0	0	0	0	0	1	1
15. Intractable Pain	0	0	0	0	0	0	1	1
16. Autoimmune Disease	0	0	0	0	0	1	2	3
17. Salivary gland hypofunction	0	0	0	0	0	0	1	1
18. Overactive Bladder Syndrome	0	0	0	0	0	0	1	1
CANCER (BY THERAPEUTIC APPROACH)	53	3	70	2	4	349	48	529
1. Antisense	4	0	0	0	0	6	0	9
2. Chemoprotection	4	0	4	0	0	5	1	14
3. Immunotherapy/In Vitro Transduction	22	2	19	0	1	108	8	160
4. Immunotherapy/In Vivo Transduction	7	0	28	1	2	145	9	192
5. Pro-drug/HSV-TK and Ganciclovir	12	1	10	0	1	17	8	49
6. Tumor Suppressor Gene	3	0	6	0	0	28	3	40
7. Single Chain Antibody	0	0	2	0	0	0	0	2
8. Oncogene Down-Regulation	1	0	1	1	0	7	0	10
9. Vector-Directed Cell Lysis/Death	0	0	0	0	0	28	15	43
10. Dominant Negative Mutation	0	0	0	0	0	3	2	5
11. Gene Up-Regulation	0	0	0	0	0	0	1	1
12. Radiotherapy	0	0	0	0	0	1	1	2
13. Apoptosis Induction	0	0	0	0	0	2	0	2
TOTAL GENE TRANSFER PROTOCOLS (THERAPY, MARKING and NON-THERAPEUTIC)	107	7	97	5	7	454	108	785

A síntese protéica é um processo vital à célula e envolve centenas de macromoléculas. É relevante ressaltar que a tradução é o processo que consome a maior parte da energia produzida na célula, armazenada bioquimicamente na forma de ATP e GTP, além de os fatores protéicos envolvidos nesse processo representarem mais de 50% da quantidade total de proteínas celulares (Kozak, 1983; Merrick, 1992). Nota-se, assim, a complexidade desse mecanismo biossintético e a sua importância para uma célula. Desse modo, é provável que a ausência ou perturbação da função de qualquer um dos componentes nesse sistema de tradução cause danos à integridade do funcionamento celular. Esse processo torna-se, então, um forte alvo para a terapia gênica direcionada, principalmente no que se refere ao tratamento de tumores. O mecanismo de tradução apresenta uma gama enorme de fatores protéicos envolvidos, muitos dos quais exibem características estruturais relativamente simples e essenciais à manutenção desse processo na célula. Sendo assim, tais fatores se tornam alvos atrativos para a terapia gênica direcionada à parada da proliferação e morte de linhagens celulares tumorais.

O controle global do processo de síntese protéica é geralmente realizado pela modulação da atividade dos fatores de iniciação (eIFs). Essa regulação se dá por mudanças no estado de fosforilação de vários sítios-alvo, que estão presentes em muitos dos fatores de iniciação ou nos reguladores que interagem com eles (Gebauer e Hentze, 2004). O eIF2 apresenta um papel-chave no processo global e na sua regulação (Sonenberg e Dever, 2003; Gebauer e Hentze, 2004; Proud, 2005). Está envolvido no primeiro passo regulatório da biossíntese protéica (Safer, 1983; Moldave, 1985; Pain, 1986), promovendo a ligação do Met-tRNA_i à subunidade ribossomal 40S, em um processo dependente de GTP, e fazendo a seleção do códon AUG para início de tradução. (Donahue *et al.*, 1988; Hershey *et al.*, 2000; Hinnebusch, 2000). Ele é formado por três subunidades não-idênticas, denominadas eIF2 alfa (36Kda), eIF2 gama (52 Kda) e eIF2 beta (38 Kda), que permanecem associadas durante todo o ciclo. A fosforilação da subunidade alfa em sua serina 51 faz com que eIF2-GDP tenha maior afinidade pelo fator de troca eIF2B, bloqueando a reação de reciclagem de GDP para GTP. Isso causa o

seqüestro de eIF2B e, conseqüentemente, a falta de troca de eIF2-GDP por eIF2-GTP, o que acarreta uma redução de complexos ternários ativos e a inibição global do processo de tradução (Sonenberg e Dever, 2003; Gebauer e Hentze, 2004).

Em vista disso, esse fator se constitui, também, no primeiro alvo para o controle da síntese protéica por fosforilação, e permanece o fator de tradução mais extensivamente estudado a esse respeito. O mecanismo fundamental de controle é conservado entre eucariotos, desde leveduras até mamíferos superiores. A modulação ocorre em resposta a uma vasta gama de condições de estresse (Kosak, 1999), como infecção viral (Clemens e Elia, 1997), apoptose (Srivastava *et al.*, 1998), carência de aminoácidos (Hinnebush, 1997) e estresse do retículo endoplasmático (Harding *et al.*, 1999). Em mamíferos, essas diversas condições de estresse causam a ativação de quatro diferentes quinases (Gebauer e Hentze, 2004; Proud, 2005).

Percebe-se que esse processo bioquímico de fosforilação é bastante complexo, envolvendo variáveis em demasia para ser um alvo adequado de terapia gênica, a qual também é de difícil padronização. Desse modo, nessa linha de pesquisa, sugerimos como alvo esse importante fator de iniciação, o eIF2. Entretanto, evitamos utilizar a subunidade modulada pelo complexo processo de fosforilação.

Optamos por trabalhar com a subunidade beta, a qual apresenta suas principais funções relacionadas a características estruturais. A mesma é responsável por funções essenciais à integridade do processo de síntese protéica: ligação do complexo ternário eIF2-GTP-Met-tRNA_i ao mRNA, realizada pela porção amino-terminal da proteína (Laurino *et al.*, 1999); ligação ao fator de troca de GDP por GTP eIF2B, também realizada pela porção amino-terminal dessa proteína (Asano *et al.*, 1999); ligação ao fator que hidrolisa GTP eIF5, que mais uma vez é realizada pela porção amino-terminal (Das *et al.*, 1997; Asano *et al.*, 1999; Das e Maitra, 2000) e a função de reconhecimento do códon de início AUG realizada pela porção carboxi-terminal de eIF2 beta (Donahue *et al.*, 1988). As três funções realizadas pela porção amino-terminal da proteína estão relacionadas

com a presença de um domínio composto por três blocos de seis a oito resíduos de lisinas, os quais são altamente conservados entre eucariotos e os verdadeiros responsáveis pela interação entre eIF2 e mRNA (Laurino *et al.*, 1999), eIF2B (Asano *et al.*, 1999) e eIF5 (Das *et al.*, 1997; Asano *et al.*, 1999; Das e Maitra, 2000). Além disso, essa proteína desprovida desses resíduos não perde a capacidade de montar o heterotrîmero (Laurino *et al.*, 1999). Daí surgiu a hipótese que eIF2 beta desprovido dos blocos de lisina poderia funcionar *in vivo* como um inibidor competitivo da forma selvagem do gene. De fato, dados não publicados de Laurino JP (1999) mostraram que, em ensaio de curva de crescimento de *S. cerevisiae*, eIF2 beta desprovido dos blocos de lisinas competindo com o gene selvagem, sob controle do mesmo promotor, foi capaz de induzir a parada do crescimento celular (FIG. 3).

A partir daí, nosso grupo vem trabalhando com a possibilidade de utilização de eIF2 beta desprovido dos blocos de lisinas como um candidato à terapia gênica direcionada, principalmente ao tratamento de tumores. Atualmente, o potencial de inibição da síntese protéica através da expressão de eIF2 beta truncado está sendo avaliado em experimentos realizados com células de mamíferos em cultivo.

No entanto, como já citado anteriormente, o objetivo específico deste trabalho foi a produção de um soro policlonal capaz de detectar a expressão das formas truncada e selvagem de eIF2 beta. Para isso, a região codificadora (CDS) de eIF2 beta humano foi clonada em vetores de expressão em procariotos, a proteína recombinante foi produzida em *E. coli*, purificada e utilizada na imunização de um coelho Nova Zelândia, o qual produziu um soro policlonal anti-eIF2 beta recombinante.

Como visto na seção 4.6, eIF2 beta recombinante é produzida na forma de um corpúsculo de inclusão, pois após a lise celular a proteína se concentra na fração insolúvel do extrato protéico (FIG. 11). A formação desses corpúsculos é muito comum em sistemas de expressão em *E. coli*. A maioria das proteínas heterólogas expressas nesse organismo forma tais agregados insolúveis (Marston, F. A., 1986). A presença da proteína de interesse em um corpúsculo de inclusão é, em geral, um problema, pois a sua solubilização depende da adição de agentes

desnaturantes como detergentes e/ou caotrópicos. A partir daí, torna-se extremamente difícil e, às vezes, impossível a recuperação da forma nativa da mesma. Por outro lado, a simples centrifugação do extrato protéico total da bactéria já é o suficiente para produzir uma purificação parcial da proteína recombinante. De modo que todos os polipeptídios solúveis são eliminados nesse passo.

Inicialmente, a purificação da proteína recombinante foi tentada por cromatografia de afinidade, utilizando a resina de avidina (SoftLink™ Soft Release Avidin - Promega). Não foi possível, no entanto, a purificação por esse método. Os agentes, Sarkosyl ou uréia 8 M, utilizados para a solubilização, impediram a ligação de eIF2 beta à resina. Tal ligação se dá por interações intermoleculares de natureza não-covalente, que foram impossibilitadas na presença daqueles agentes.

Levando-se em conta a natureza química dos corpúsculos de inclusão, que são compostos principalmente de proteínas bacterianas insolúveis da membrana externa, fosfolipídios, proteína recombinante e de restos de parede celular e outros *debris* celulares (Valax, P. e Georgiou, G., 1993). Optou-se por desenvolver um método de purificação que visava à solubilização gradual dos contaminantes, mas sem solubilizar eIF2 beta (seção 3.9). Tal processo de lavagem rendeu eIF2 beta recombinante com um bom grau de pureza (FIG. 12). Amostras da proteína purificada foram, então, utilizadas para o protocolo de imunização (seção 3.11).

Os ensaios iniciais de titulação mostraram que o soro produzido foi capaz de detectar eIF2 beta recombinante com uma boa sensibilidade (FIG. 13). Quando testado contra extratos de células humanas, entretanto, o mesmo, na diluição de 1:800, não apresentou reatividade (FIG. 14). O soro mostrou alta reatividade contra a ATPase recombinante de *Pseudomonas aeruginosa*, também fusionada com o mesmo "tag" de biotilação. Tais evidências sugerem que o "tag" foi imunodominante em relação à porção da proteína de fusão referente ao eIF2 beta. Dessa forma, a reatividade total do soro pode ter se dado, principalmente, contra aquele peptídeo de 13 kDa.

Para avaliar essa possibilidade, o soro foi adsorvido com ATPase recombinante purificada e utilizado para revelar um Western-Blot que continha ATPase e eIF2 beta purificadas (FIG. 15). Esse experimento mostrou que a adsorção do soro eliminou a reatividade contra a ATPase. A reatividade contra eIF2 beta recombinante, por outro lado, manteve-se após a adsorção. Contudo, a sensibilidade de detecção caiu consideravelmente. E o soro adsorvido só foi capaz de reconhecer eIF2 beta em diluições bastante baixas (FIG. 15). É evidente, portanto, que a maior parte das imunoglobulinas reativas ao eIF2 beta recombinante, na verdade, reconhecem o "tag" de biotilação. Porém uma fração do soro é capaz de reconhecer especificamente eIF2 beta.

Sendo assim, novos experimentos de detecção em células humanas foram realizados. Desta vez, entretanto, o soro foi utilizado em concentrações mais altas. Em diluição de 1:50, o ruído de fundo se torna muito alto e prejudica a análise da imagem, mas em 1:100 se destaca claramente a banda referente ao eIF2 beta endógeno (FIG. 16).

Conclui-se que o soro policlonal produzido neste trabalho, em concentrações altas, foi capaz de detectar a expressão de eIF2 beta selvagem em extratos de células humanas. Possivelmente, poderá detectar, também, a presença da forma truncada de eIF2 beta em células transfectadas com este gene. Sendo assim, o mesmo será uma importante ferramenta para experimentos futuros que tentarão relacionar a presença celular de eIF2 beta, desprovido dos blocos de lisina, com o fenômeno de bloqueio da proliferação observado nessas células.

6. Referências bibliográficas

Altmann M, Trachsel H (1989). Altered mRNA cap recognition activity of initiation factor 4E in the yeast cell cycle division mutant. *Nucleic Acids Res* 17: 5923-5931.

Altmann M, e Trachsel H. (1993) Regulation of translation initiation and modulation of cellular physiology. *TIBS* 18: 429-432.

Asano K, Vornlocher HP, Richter-Cook NJ, Merrick WC, Hinnebusch AG, Hershey JW (1997). Structure of cDNAs encoding human eukaryotic initiation factor 3 subunits. Possible roles in RNA binding and macromolecular assembly. *J Biol Chem* 272(43): 27042-27052.

Asano K, Phan L, Anderson J, Hinnebusch AG (1998). Complex formation by all five homologues of mammalian translation initiation factor 3 subunits from yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 273(29): 18573-18585.

Asano K, Krishnamoorthy T, Phan L, Pavitt GD, Hinnebusch AG (1999). Conserved bipartite motifs in yeast eIF5 and eIF2Bepsilon, GTPase-activating and GDP-GTP exchange factors in translation initiation, mediate binding to their common substrate eIF2. *EMBO J* 18(6): 1673-1688.

Barrieux, A, Rosenfeld MG (1977). Characterization of GTP-dependent Met-tRNA^f binding protein. *J Biol Chem* 252: 3843-3847.

Baum BJ, Goldsmith CM, Kok MR, Lodde BM, van Mello NM, Voutetakis A, Wang J, Yamano S, Zheng C (2003). Advances in vector-mediated gene transfer. *Immunol Lett* 90 (2-3):145-149.

Bommer JA, Kraft R, Kurzchalia TV, Price NT, Proud CG (1991). Amino acid sequence analysis of the b and g subunits of eucaryotic initiation factor eIF-2. Identification of regions interacting with GTP. *Biochim Biophys Acta* 1079: 308-315.

Castilho-Valavicius B, Thompson GM, Donahue TF (1992). Mutation analysis of the Cys-X2-Cys-X19-Cys-X2-Cys motif in the b subunit of eukaryotic translation initiation factor 2. *Gene Exp* 3: 297-309.

Cazzola M, Skoda RC (2000). Translational pathophysiology: a novel molecular mechanism of human disease. *Blood* 95 (11): 3280-3288.

Chakravarti D, Maiti T, Maitra U (1993). Isolation and immunochemical characterization of eukaryotic translation initiation factor 5 from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 268: 5754-5762.

Chevesich J, Chaudhuri J, Maitra U (1993). Characterization of mammalian translation initiation factor 5 (eIF-5): Demonstration that eIF-5 is a phosphoprotein and is present in cells as a single molecular form of apparent M_r 58,000. *J. Biol. Chem* 268: 20659-20667.

Chromas Homepage: <http://www.technelysium.com.au/chromas.html>

Cigan AM, Bushman JL, Boal TR, Hinnebusch AG (1993). A protein complex of translational regulators of GCN4 mRNA is the guanine nucleotide-exchange factor for translation initiation factor 2 in yeast. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 5350-5354.

Clemens MJ, Elia A (1997). The double-stranded RNA-dependent protein kinase PKR: structure and function. *J Interferon Cytokine Res.* 9: 503-524.

Das S, Maiti T, Das K, Maitra U (1997). Specific interaction of eukaryotic translation initiation factor 5 (eIF5) with the beta-subunit of eIF2. *J Biol Chem* 272(50): 31712- 31718.

Das S, Maitra U (2000). Mutational analysis of mammalian translation initiation factor 5 (eIF5): role of interaction between the beta subunit of eIF2 and eIF5 in eIF5 function in vitro and in vivo. *Mol Cell Biol* 20 (11): 3942-50.

Dever TE, Feng L, Wek RC, Cigan AM, Donahue TF, Hinnebusch AG (1992). Phosphorylation of initiation factor 2a by protein kinase GCN2 mediates genespecific translational control of GCN4 in yeast. *Cell* 68: 585-596.

Dever TE, Yang W, Astrom S, Bystrom AS, Hinnebusch AG (1995). Modulation of tRNAⁱ met, eIF-2 and eIF-2B expression shows that GCN4 translation is inversely coupled to the level of eIF-2.GTP.Met- tRNAⁱ met ternary complex. *Mol Cell Biol* 15: 6351-6363.

Donahue TF, Cigan AM, Pabich EK and Castilho-Valavicius B (1988). Mutations at a Zn(II) finger motif in the yeast eIF-2b gene alter ribosomal start-site selection during the scanning process. *Cell* 54: 621-632.

Duncan R, Hershey JWB (1983). Identification and quantitation of levels of protein synthesis initiation factors in crude HeLa cell lysates by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *J Biol Chem* 258: 7228-7235.

Evans RM, Hollenberg SM (1988). Zinc fingers: guilt by association. *Cell* 52 (1):1-3.

Gebauer F, Hentze MW (2004). Molecular mechanisms of translational control. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10: 827-835.

Gaspar NJ, Kinzy TG, Scherer BJ, Humbelin M, Hershey JW, Merrick WC (1994). Translation initiation factor eIF-2. Cloning and expression of the human cDNA encoding the gamma-subunit. *J Biol Chem* 269 (5): 3415-3422.

Gingras AC, Raught B, Sonenberg N (1999). eIF4 initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation. *Annu Rev Biochem* 68: 913-963.

Gradi A, Imataka H, Svitkin YV, Rom E, Raught B, Morino S, Sonenberg N (1998). A novel functional human eukaryotic translation initiation factor 4G. *Mol Cell Biol* 18 (1):334-342.

Gray NK, Wickens M (1998). Control of translation initiation in animals. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 14:399-458.

Friedmann T (2001). Stanfield Rogers: insights into virus vectors and failure of an early gene therapy model. *Mol Ther* 4 (4): 285-288.

Hannig EM, Cigan AM, Freeman BA, Kinzy TG (1993). GCD11, a negative regulator of GCN4 expression, encodes the γ subunit of eIF-2 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 13: 506-520.

Harding HP, Zhang Y, Ron D (1999) Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum resident kinase. *Nature* 397: 271-274.

Hashimoto NN, Carnevalli LS, Castilho BA (2002). Translation initiation at non-AUG codons mediated by weakened association of eukaryotic initiation factor (eIF) 2 subunits. *Biochem J* 367: 359-368.

Hershey JWB (1989). Protein phosphorylation controls translation rates. *J Biol Chem* 264: 20823-29826.

Hershey JWB. (1991). Translational control in mammalian cells. *Annu Rev Biochem* 60: 717-755.

Hershey JWB and Merrick WC (2000). Pathway and mechanism of initiation of protein synthesis. In: Sonenberg N, Hershey JWB and Mathews MB (eds) *Translation Control of Gene Expression*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, pp 33-88. *apud* Hashimoto NN, Carnevalli LS, Castilho BA (2002).

Hinnebush AG (1994). Translational control of GCN4: an *in vivo* barometer of initiation factor activity. *TIBS* 19: 409-414.

Hinnebusch A.G (1997). Translational regulation of yeast GCN4. *J. Biol. Chem.* 272, 21661-21664.

Hinnebusch AG (2000). Mechanism and regulation of initiator methionyl-tRNA binding to ribosomes. In: Sonenberg N, Hershey JWB and Mathews MB (eds) *Translation Control of Gene Expression*. Cold Spring Harbor Laboratory Press,

- Cold Spring Harbor, New York, pp 185-243. *apud* Hashimoto NN, Carnevalli LS, Castilho BA (2002).
- Hunt KK, Vorburger SA (2002). Hurdles and Hopes for Cancer Treatment. *Science* 297: 415-416.
- Invitrogen Homepage. <http://www.invitrogen.com/>.
- Kaempfer R, Hollender R, Abrams WR, Israeli R (1978). Specific binding of messenger RNA and methionyl-tRNA^{fMet} by the same initiation factor for eucaryotic protein synthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 75: 209-213.
- Kay MA, Liu D, Hoogerbrugge PM (1997). Gene therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94 (24): 12744-12746.
- Kozak M (1983). Comparison of initiation of protein synthesis in procaryotes, eucaryotes, and organelles. *Microbiol Rev* 47: 1-45.
- Kozak M (1984). Compilation and analysis of sequences upstream from the translational start site in eukaryotic mRNAs. *Nucleic Acids Res* 12: 857-872.
- Kozak M (1989). The scanning model for translation: an update. *J Cell Biol* 108: 229-241.
- Kozak M (1991). A short leader sequence impairs the fidelity of initiation by eukaryotic ribosomes. *Gene Expr* 1: 11-115.
- Kozak M (1999). Initiation of translation in prokaryotes and eukaryotes. *Gene* 234: 187-208.
- Laurino JP, Thompson GM, Pacheco E and Castilho BA (1999). The β subunit of eukaryotic translation initiation factor 2 binds mRNA through the lysine repeats and a region comprising the C2-C2 motif. *Mol Cell Biol* 19: 173-181.
- Lewin B (2001). *Genes VII*. 7^a edição. ArtMed, Porto Alegre, Brasil.
- Marston FA (1986). The purification of eukaryotic polypeptides synthesized in *Escherichia coli*. *Biochem. J.* 240: 1-12.
- Merrick WC (1990). Overview: mechanism of translation initiation in eukaryotes. *Enzyme* 44: 7-16.
- Merrick EC (1992). Mechanism and regulation of eukaryotic protein synthesis. *Microbiol Rev* 56: 291-315.
- Merrick WC (1994). Eucaryotic protein synthesis: an in vitro analysis. *Biochimie* 76: 822-830.

Méthot N, Pause A, Hershey JWB, Sonenberg N (1994). The translation initiation factor eIF-4B contains an RNA-binding region that is distinct and independent from its ribonucleoprotein consensus sequence. *Mol Cell Biol* 14: 2307-2316.

Moldave K (1985). Eukaryotic protein synthesis. *Annu Rev Biochem* 54: 1109-1149.

National Center for Biotechnology and Information (NCBI). Homepage <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.

National Institutes of Health (NIH) Homepage. <http://www.nih.gov>.

Nonato MC, Widom J, Clardy J (2002). Crystal structure of the N-terminal segment of human eukaryotic translation initiation factor 2 α . *J Biol Chem* 277(19): 17057-17061.

Novagen Homepage. <http://www.emdbiosciences.com/html/NVG/home.html>.

Pain VM (1986). Initiation of protein synthesis in mammalian cells. *Biochem J* 235: 635-637.

Pathak VK, Nielsen PJ, Trachsel H and Hershey JWB (1988). Structure of the beta subunit of translational initiation factor eIF-2. *Cell* 54: 633-639.

Pause A, Méthot N, Svitkin Y, Merrick Wc, Sonenberg N (1994). Dominant negative mutants of mammalian translation initiation factor eIF-4A define a critical role for eIF-4F in cap-dependent and cap-independent initiation of translation. *EMBO J* 13: 1205-1215.

Pavitt GD, Ramaiah KV, Kimball SR, Hinnebusch AG (1998). eIF2 independently binds two distinct eIF2B subcomplexes that catalyze and regulate guanine nucleotide exchange. *Genes Dev* 12 (4): 514-526.

Pestova TV, Lomakin IB, Lee JH, Choi SK, Dever TE, Hellen CUT (2000). The joining of ribosomal subunits in eukaryotes requires eIF5B. *Nature* 403: 332-335.

Pestova TV, Kolupaeva VG, Lomakin IB, Pilipenko EV, Shatsky IN, Agol VI, Hellen CU (2001). Molecular mechanisms of translation initiation in eukaryotes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 98 (13): 7029-7036.

Phan L, Zhang X, Asano K, Anderson J, Vornlocher HP, Greenberg JR, Qin J, Hinnebusch AG (1998). Identification of a translation initiation factor 3 (eIF3) core complex, conserved in yeast and mammals, that interacts with eIF5. *Mol Cell Biol*. 8: 4935-4946.

Phan L, Schoenfeld LW, Valasek L, Nielsen KH, Hinnebusch AG (2001). A subcomplex of three eIF3 subunits binds eIF1 and eIF5 and stimulates ribosome binding of mRNA and tRNA(i)Met. *EMBO J* 20 (11): 2954-2965.

Promega Corporation Homepage. <http://www.promega.com/>.

Proud CG (2005). eIF2 and the control of cell physiology. *Semin Cell Dev Biol* 1: 3- 12.

Rowlands AG, Panniers R, Henshaw E (1988). The catalytic mechanism of guanine nucleotide exchange factor action and competitive inhibition by phosphorylated eukaryotic initiation factor 2. *J. Biol. Chem* 263 (12): 5526-5533.

Saelens X, Kalai M, Vandenabeele P (2001). Translation inhibition in apoptosis: caspase-dependent PKR activation and eIF2-alpha phosphorylation. *J Biol Chem* 276(45): 41620-41628.

Safer B (1983). 2B or no 2B: regulation of the catalytic utilization of eIF-2. *Cell* 33: 7-8.

Salton GD (2005). Construção de um vetor para terapia gênica baseado no bloqueio da síntese protéica devido à expressão de eIF2 beta truncado. Dissertação de mestrado - Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular (UFRGS).

Schmitt E, Blanquet S, Mechulam Y (2002). The large subunit of initiation factor eIF2 is a close structural homologue of elongation factors. *EMBO J* 21(7): 1821-1832.

Shine, J. e Dalgarno, L. The 3'-terminal sequence of *E. coli* 16S ribosomal RNA: complementarity to nonsense triplets and ribosome binding sites (1974). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 71: 1342-1346.

Singh CR, Yamamoto Y, Asano K (2004). Physical association of eukaryotic initiation factor (eIF) 5 carboxyl-terminal domain with the lysine-rich eIF2beta segment strongly enhances its binding to eIF3. *J Biol Chem* 279 (48): 49644-49655.

Sonenberg N, Dever TE (2003). Eukaryotic translation initiation factors and regulators. *Curr Opin Struct Biol* 13 (1): 56-63.

Srivastava SP, Kumar KU, Kaufman RJ, (1998). Phosphorylation of Eukaryotic Translation Initiation Factor 2 Mediates Apoptosis in Response to Activation of the Double-stranded RNA-dependent Protein Kinase. *J Biol Chem* 273 (4): 2416-2423.

Trachsel H, Erni B, Schreier M, Staehelin T (1977). Initiation of mammalian protein synthesis II. The assembly of the initiation complex with purified factors. *J Mol Biol* 116: 755-767.

Valax P, Georgiou G (1993). Molecular characterization of β -lactamase inclusion bodies produced in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Prog.* 1893, 9, 539-547.

Verma IM, Somia N (1997). Gene therapy: promises, problems and prospects. *Nature* 389 (6648): 239-242.

Yang W, Hinnebusch AG (1996). Identification of a regulatory subcomplex in the guanine nucleotide exchange factor eIF2B that mediates inhibition by phosphorylated eIF2. *Mol Cell Biol* 16: 6603-6616.

Wells SE, Hillner PE, Vale RD, Sachs AB (1998). Circularization of mRNA by eukaryotic translation initiation factors. *Molecular Cell* 2, 135-140.