

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Construção de um vetor para terapia gênica baseado no bloqueio da síntese protéica devido a expressão de eIF2 beta truncado

Autora: Gabrielle Dias Salton

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da UFRGS como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre

Orientador: José Artur Bogo Chies (1)
Co-orientador: Jomar Pereira Laurino (2)

(1)Laboratório de Imunogenética, Departamento de Genética, IB, UFRGS
(2) Centro de Biologia Molecular e Genômica, IB, PUCRS

Porto Alegre, março de 2005

A parte experimental deste trabalho foi desenvolvida no Centro de Biologia Molecular e Genômica do Instituto de Biociências da PUCRS. O trabalho foi financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS)

“Se as coisas são inatingíveis...
Ora!
Não é motivo para não querê-
las...
Que triste os caminhos,
Se não fora
A presença distante das
estrelas.”

Mário Quintana

AGRADECIMENTOS

Ao Jomar, idealizador do trabalho, pela oportunidade, pela confiança em mim depositada, pelo respeito, carinho, preocupação, valorização, pelos puxões de orelha e principalmente pela maravilhosa, dedicada e competente orientação. Grande Cientista e amigo esse Jomar, pessoa única que admiro muito, e com a qual aprendi demais, o meu muito obrigada.

Ao Zeca pela oportunidade e orientação, muito obrigada.

A todos os colegas do Centro de Biologia Molecular e Genômica, pelo ótimo ambiente de trabalho, pelo companheirismo e momentos de descontração, muito obrigada.

À Claudia, esposa do Jomar, pela colaboração e ensino de técnicas realizadas neste trabalho, muito obrigada.

Ao Luiz Zerbini pela fundamental colaboração com este trabalho, muito obrigada.

Ao Luis Fernando Marins pela essencial colaboração com este trabalho, muito obrigada.

Ao Nelson por ter oportunizado minha entrada no Genoma, por ter me ajudado na escolha tão gratificante que é trabalhar com o Jomar, pelo seu companheirismo, pela sua amizade, pelas dicas no trabalho, discussões científicas, discussões culturais, pelas bobagens também, pelos desabafos emocionais, muito obrigada.

Ao André pela grande e preocupada amizade, pelo companheirismo, pelas discussões culturais, pelas discussões de bobagens, pela diversão e pela ajuda nesse trabalho, muito obrigada.

À Cladinara, técnica do Genoma, pelo companheirismo, pela ajuda nas horas necessárias e pela competente organização e manutenção do laboratório, muito obrigada.

À Lisiane pela ajuda, pela empolgação e vibração nas horas de conquistas neste trabalho e pela amizade, muito obrigada.

Ao Rodrigo pela ajuda, pelo envolvimento filosófico com o trabalho, pelas discussões e reflexões sobre o futuro deste trabalho, muito obrigada.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio na concessão de bolsa de pós-graduação, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) pelo apoio financeiro que possibilitou a realização deste trabalho.

Ao Nicolás, pelo companheirismo e carinho nesse último ano do mestrado, pela ajuda nesta etapa final do trabalho, pela paciência, compreensão e estímulo, muito obrigada.

À minha mãe, que é uma pessoa que admiro muito, agradeço pelo carinho, pelo cuidado e dedicação, pelo estímulo dado às minhas escolhas e por dar a base para que eu possa continuar, muito obrigada.

SUMÁRIO

ABREVIATURAS.....	10
RESUMO.....	12
ABSTRACT.....	14
1- INTRODUÇÃO.....	17
1.1 O processo de início de síntese protéica em eucariotos.....	19
1.2 Características básicas da maquinaria de tradução.....	22
1.2.1 Os ribossomos.....	22
1.2.2 O RNA transportador.....	22
1.2.3 O RNA mensageiro.....	23
1.2.4 Fatores protéicos envolvidos na iniciação.....	25
1.2.4.1 Aspectos bioquímicos dos fatores de iniciação de síntese protéica em eucariotos.....	27
1.3 Mecanismos de regulação traducional em eucariotos.....	30
1.4 Caracterização bioquímica e molecular do fator eIF2 humano.....	30
1.4.1 A subunidade beta de eIF2.....	32
2- OBJETIVOS.....	37
3- MATERIAL E MÉTODOS.....	39
3.1 Linhagens de <i>Escherichia coli</i> , plasmídeos e oligonucleotídeos.....	39
3.1.1 Linhagens de <i>E. coli</i>	39
3.1.2 Plasmídeos adquiridos.....	39
3.1.3 Plasmídeos construídos neste trabalho.....	41
3.1.4 Oligonucleotídeos iniciadores.....	43
3.2 Meios de cultura para bactérias.....	44
3.3 Manipulação de bactérias.....	44
3.3.1 Preparação de células de <i>E. coli</i> eletrocompetentes para transformação com DNA plasmidial.....	44
3.3.2 Transformação de <i>E. coli</i> por eletroporação.....	45
3.3.3 Preparação de células de <i>E. coli</i> competentes com cloreto de cálcio	

para transformação com DNA plasmidial.....	45
3.3.4 Transformação de <i>E. coli</i> por cloreto de cálcio.....	46
3.4 Manipulação de DNA.....	47
3.4.1 cDNA total utilizado.....	47
3.4.2 Extração de DNA plasmidial.....	47
3.4.2.1 Extração de DNA plasmidial de bactéria por lise alcalina.....	47
3.4.2.2 Extração de DNA plasmidial de bactérias utilizando “ki” comercial...	48
3.4.3 Modificações do DNA.....	49
3.4.3.1 Digestão por endonucleases de restrição.....	49
3.4.3.2 Defosforilação de extremidades de DNA.....	49
3.4.3.3 Fosforilação de extremidades de DNA.....	50
3.4.3.4 Ligação de extremidades de DNA.....	50
3.4.3.5 Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	50
3.4.3.6 Preparação de DNA simples fita.....	51
3.4.3.7 Mutagênese sítio dirigida <i>in vitro</i>	52
3.4.4 Análise do DNA.....	55
3.4.4.1 Eletroforese horizontal de DNA em gel de agarose e documentação.....	55
3.4.4.2 Quantificação de DNA.....	55
3.4.4.3 Seqüenciamento de DNA.....	56
3.4.4.4 Isolamento de fragmentos de DNA de gel de agarose.....	56
3.5 Obtenção de eIF2 beta humano.....	57
3.6 Clonagem intermediária no plasmídeo pCR2.1-TOPO.....	59
3.7 Sistema de expressão do gene de interesse, em células eucarióticas, baseado na regulação por tetraciclina.....	61
3.7.1 Sistema utilizado: <i>T-Rex System</i> (Invitrogen).....	61
3.7.1.1 Descrição do sistema.....	61
3.7.1.2 Mecanismo de ação do sistema.....	62
3.8 Etapas da construção do pJPL46: plasmídeo para expressar a proteína eIF2 beta selvagem em células eucarióticas.....	64
3.8.1 Construção do plasmídeo pJPL03.....	64
3.8.2 Construção do plasmídeo pJPL07.....	66

3.8.3 Construção do plasmídeo pJPL25.....	68
3.8.4 Construção do plasmídeo pJPL46.....	68
3.9 Etapas da construção do pJPL50: plasmídeo para expressar a proteína de eIF2 beta humana desprovida dos três blocos de lisina em células eucarióticas.....	71
3.9.1 Construções dos plasmídeos pJPL10, pJPL11 e pJPL17.....	71
3.9.2 Construção do plasmídeo pJPL26.....	71
3.9.3 Construção do plasmídeo pJPL50.....	72
3.10 Etapas da construção do pJPL60: plasmídeo para expressar a porção amino-terminal da proteína eIF2 beta em células eucarióticas.....	72
3.10.1 Construção do plasmídeo pJPL27.....	72
3.10.2 Construção do plasmídeo pJPL60.....	73
3.11 Etapas da construção do pJPL62: plasmídeo para expressar a porção carboxi-terminal da proteína eIF2 beta humana em células eucarióticas..	74
3.11.1 Construção do plasmídeo pJPL30.....	74
3.11.2 Construção do plasmídeo pJPL62.....	74
3.12 Etapas da construção do pJPL63: plasmídeo para expressar o repressor Tet e a EGFP sob controle do promotor de CMV.....	75
3.12.1 Construção do plasmídeo pJPL33.....	75
3.12.2 Construção do plasmídeo pJPL40.....	76
3.12.3 Construção do plasmídeo pJPL43.....	80
3.12.4 Construção do plasmídeo pJPL63.....	80
3.13 Construções de vetores para a expressão da proteína eIF2 beta humana em células procarióticas.....	83
3.13.1 Obtenção da região codificadora de eIF2 beta humano.....	83
3.13.2 Construção do plasmídeo pJPL13.....	83
3.13.3 Construção do plasmídeo pJPL14.....	84
3.13.4 Construção do plasmídeo pJPL15.....	85
3.13.5 Construção do plasmídeo pJPL64.....	87
3.13.6 Construção do plasmídeo pJPL65.....	87
4 RESULTADOS.....	91
4.1 Obtenção de eIF2 beta humano.....	91

4.2 Etapas da construção do plasmídeo pJPL46.....	95
4.3 Etapas da construção do plasmídeo pJPL50.....	100
4.4 Etapas da construção do plasmídeo pJPL60.....	111
4.5 Etapas da construção do plasmídeo pJPL62.....	115
4.6 Etapas da construção do plasmídeo pJPL63.....	119
4.7 Construções de plasmídeos para expressar a proteína eIF2 beta humana em células procarióticas.....	127
4.7.1 Obtenção da região codificadora de eIF2 beta humano.....	127
4.7.2 Etapas da construção do plasmídeo pJPL14.....	128
4.7.2.1 Construção do plasmídeo pJPL13.....	128
4.7.2.2 construção do plasmídeo pJPL14.....	129
4.7.3 Construção do plasmídeo pJPL15.....	130
4.7.4 Etapas da construção do plasmídeo pJPL65.....	132
4.7.4.1 Construção do plasmídeo pJPL64.....	132
4.7.4.2 Construção do plasmídeo pJPL65.....	135
5 DISCUSSÃO.....	139
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	149

ABREVIATURAS

°C	- graus Celsius
μF	- microFaraday
μg	- micrograma
μl	- microlitro
aa	- aminoácido
A	- absorbância
ADP	- adenosina difosfato
ATP	- adenosina trifosfato
cDNA	- ácido desoxi-ribonucléico complementar
cm	- centímetro
CMV	- citomegalovírus
ddNTPs	- dideoxinucleotídeos
DNA	- ácido desoxi-ribonucléico
dNTPs	- deoxinucleotídeos
dsDNA	- DNA fita dupla
DTT	- ditioneitol
EDTA	- ácido etilenodiaminotetracético
EGFP	- variante da proteína verde fluorescente
EtBr	- brometo de etídeo
eIF	- fator eucariótico de início de tradução
$x g$	- força gravitacional
GDP	-guanosina difosfato
GTP	-guanosina trifosfato
kDa	- quiloDalton
kV	- quiloVolt
LB	- Luria-Bertaini
mA	- miliamper
m ⁷ GTP	- 7-metil-guanosina
mg	- miligrama
ml	- mililitro

mM	- milimolar
M	- molar
mRNA	- RNA mensageiro
mΩ	- miliohms
ng	- nanograma
nt	- nucleotídeo
pb	- pares de base
PCR	- reação em cadeia da polimerase
pH	- potencial de hidrogênio
pmol	- picomol
RNA	- ácido ribonucléico
RNase	- ribonuclease
rpm	- rotações por minuto
rRNA	- ácido ribonucléico ribossomal
SDS	- dodecil sulfato de sódio
ssDNA	- DNA simples fita
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 terapia gênica tem sido explorada como tratamento para uma grande variedade de distúrbios genéticos, diminuição da progressão de tumores e no combate a infecções virais e doenças neurodegenerativas. A síntese protéica é um processo essencial à célula que envolve centenas de macromoléculas. A ausência ou a perturbação da função de qualquer um dos componentes no sistema de tradução pode comprometer o 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 e fazendo a seleção do códon AUG no mRNA para início da tradução. O eIF2 é um heterotrímero formado pelas subunidades α , β e γ . A porção amino-terminal de eIF2 β possui um domínio bastante marcante composto por três blocos de seis a oito resíduos de lisina altamente conservados, que são responsáveis pela ligação do eIF2 ao mRNA e a outros dois fatores de iniciação, eIF5 e eIF2B.

Estudos anteriores mostraram inibição do crescimento em *Saccharomyces cerevisiae* pela expressão de eIF2 β desprovido dos blocos de lisinas, mesmo na presença da forma celular selvagem dessa proteína (Laurino JP, dados não publicados). Esse resultado sugere o gene de eIF2 β humano como um forte candidato à terapia gênica direcionada principalmente ao tratamento de tumores. O objetivo do trabalho foi construir plasmídeos contendo fragmentos truncados de eIF2 beta humano (em relação à presença ou ausência dos três blocos de lisina) sob controle de um forte promotor humano. Essas construções poderiam ser capazes de expressar essas proteínas truncadas de maneira eficiente, competindo com eIF2 β selvagem em células humanas. Esse trabalho resultou na construção de quatro plasmídeos de expressão induzida por tetraciclina em eucariotos contendo os seguintes diferentes fragmentos sob controle do forte promotor de citomegalovírus (CMV): 1) eIF2 β humano selvagem; 2) eIF2 β humano desprovido dos três blocos de lisinas; 3) porção 13 amino-terminal de eIF2 β humano abrangendo os blocos de lisinas); 4) porção carboxi-terminal de eIF2 β (não abrangendo os blocos de lisinas). Também se obteve como resultado mais duas construções: um plasmídeo expressando o gene de uma variante da

proteína verde fluorescente (EGFP) sob controle do promotor de CMV e o gene do repressor de tetraciclina, para ser usado na transfecção de células humanas, concomitantemente, com uma das quatro construções referidas acima. Um outro plasmídeo, contendo o cDNA de eIF2 β humano fusionado a um “tag” de biotina para sua expressão em *Escherichia coli* também foi construído. É possível que a expressão de formas truncadas de eIF2 β possa ser utilizada como uma nova estratégia de terapia gênica anti-proliferação celular direcionada, principalmente, a células tumorais.

ABSTRACT

Gene therapy has been extensively investigated as a treatment for a wide variety of genetic disorders, decreasing of tumor progression, fighting viral infections and neurodegenerative diseases. Protein synthesis is an essential process to the cell, involving hundreds of macromolecules. The absence or alteration of function of any of the components of the translation system may compromise cell biology. Eukaryotic initiation factor 2 (eIF2) plays a key role on mRNA translation and its regulation, promoting binding of Met-tRNA_i to the 40S ribosomal subunit and selecting s AUG codon in mRNA to translation initiation. eIF2 is a heterotrimer consisted of α , β and γ subunits. The aminoterminal region of eIF2 β presents three lysine-rich segments containing 6 to 8 conserved lysine residues, which are responsible for binding of eIF2 to mRNA and to two other initiation factors: eIF5 and eIF2 β . Previously results showed growth inhibition in *S. cerevisiae* by expression of eIF2 β with deleted lysine-rich segments, even in the presence of wild type eIF2 β (Laurino JP, unpublished data). This finding suggests human eIF2 β gene as a strong candidate for gene therapy, especially for tumor treatment. The aim of this study was to build plasmids containing mutated human eIF2 β fragments (in relation to the presence or absence of the three lysine-rich segments), under control of a strong human promoter. These constructions could be able to express efficiently truncated eIF2 β , competing with the wild eIF2 β in human cells. For this purpose we built four tetracycline-induced expression plasmids in eukaryotes containing the following different fragments under control of the strong cytomegalovirus promoter (CMV): (1) the wild human eIF2 β ; (2) the human eIF2 β with deletion of three lysine-rich segments; (3) the amino-terminal portion of the human eIF2 β containing three lysine-rich segments); (4) the carboxy-terminal portion of the 15 eIF2 β (not containing three lysine-rich segments). We also constructed an expression plasmid containing tetracycline repressor gene and the gene of a green fluorescent protein variant (EGFP), controlled by CMV promoter. This plasmid can be used in transfection, concomitantly with one of the four constructions above mentioned. Another plasmid containing human eIF2 β cDNA fused with a biotin-tag was constructed

for expression in *Escherichia coli*. The expression of truncated human eIF2 β protein forms could be used as a new strategy for gene therapy against cell proliferation, especially for tumor cells.

Capítulo 1

Introdução

1. INTRODUÇÃO

Por décadas, técnicas de transferência gênica têm sido usadas em laboratórios para introduzir genes alterados ou exógenos em células a fim de produzir um resultado específico desejado. Desde os anos 1980, a transferência de genes vem sendo estudada como uma possível maneira de modificar o programa genético de um organismo para tratar uma doença específica (Hunt e Vorburger, 2002). Surgiu, então, o conceito de terapia gênica: a introdução de uma seqüência de ácidos nucléicos, geralmente de DNA, dentro de células, com o objetivo de alterar o curso de uma condição biológica ou de uma doença (Kay *et al.*, 1997).

Os resultados de triagens clínicas de terapia gênica tornaram-se aparentes no final dos anos 1990, quando o primeiro sucesso foi conquistado, no Hospital Necker, em Paris, com o tratamento de crianças que sofriam de um raro distúrbio imune denominado Imunodeficiência Combinada Severa Ligada ao X. Esses pacientes foram transfundidos com células-tronco hematopoiéticas transduzidas com um retrovírus carregando um transgene que codifica a cadeia alfa do receptor de interleucina-2, a proteína que era defectiva nesses pacientes. A função imune normal desses pacientes foi restituída, e os sintomas clínicos desapareceram (Mezzina e Danos, 2002; Williams e Baum, 2003). As tentativas iniciais de terapia gênica foram direcionadas ao tratamento de distúrbios monogênicos. Entretanto tem-se tornado claro que os genes podem ser considerados um novo agente farmacêutico para o tratamento de muitos outros tipos de doenças (Kay *et al.*, 1997). Atualmente, essa metodologia tem sido explorada como tratamento para uma grande variedade de distúrbios genéticos, diminuição da progressão de tumores, combate a infecções virais e a doenças neurodegenerativas (Verma e Somia, 1997; Hunt e Vorburger, 2002).

A síntese protéica é um dos mecanismos biossintéticos celulares mais complexos, e seu entendimento tem sido um dos maiores desafios na história da bioquímica. Este é um processo vital à célula que envolve centenas de macromoléculas. Provavelmente, a ausência ou a perturbação da função de qualquer um dos componentes nesse sistema de tradução cause danos à

integridade do funcionamento celular. Em vista disso, esse processo torna-se um forte alvo para a terapia gênica direcionada, principalmente no que se refere ao tratamento de tumores.

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 polipeptídeos, talvez cerca de cem enzimas adicionais para o processamento final dos diferentes tipos de proteínas existentes e quarenta ou mais tipos de RNAs transportadores (tRNAs) e ribossomais (rRNAs). Dessa forma, aproximadamente 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 consome a maior parte da energia produzida na célula, armazenada bioquimicamente na forma de adenosina trifosfato (ATP) e guanosina trifosfato (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 pequena e grande. No entanto, as características que envolvem as etapas iniciais e precedentes à formação da primeira ligação peptídica mostram-se bastante divergentes entre procariotos e eucariotos (Kozak, 1983). Isso é evidente pelo maior número de fatores que participam dessa etapa nos organismos eucariotos. Entre os diferentes organismos eucariotos, esse processo é extremamente conservado na escala filogenética, tanto no que se refere ao mecanismo propriamente dito quanto do ponto de vista molecular (Laurino *et al.*, 1999).

1.1 O processo de início de síntese protéica em eucariotos

O início da síntese protéica em eucariotos é um processo complexo que envolve a ligação de Met-tRNA_i (tRNA iniciador carregado com metionina) à subunidade 40S do ribossomo e subsequente associação ao RNA mensageiro (mRNA). Esse processo é auxiliado por uma série de fatores protéicos. O início de síntese pode ser dividido 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).

A maioria dos fatores eucarióticos de início de tradução (eIF) 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 é a formação do complexo ternário, quando ocorre a ligação do heterotrímero de eIF2 (fator eucariótico de início de tradução, no caso, o fator 2) ao Met-tRNA_i e ao GTP (eIF2.GTP.Met-tRNA_i). O principal regulador da síntese protéica é eIF2, de modo que quando sua subunidade alfa encontra-se fosforilada torna o heterotrímero inativo. A segunda etapa é a ligação do complexo ternário eIF2.GTP.Met-tRNA_i à subunidade 40S do ribossomo, dependente da prévia dissociação das subunidades do ribossomo. Esta ocorre pela interação dos fatores eIF3 e eIF1A com a subunidade 40S, e do fator eIF3A com a subunidade 60S. O fator eIF3 também estabiliza a ligação do complexo ternário à subunidade 40S do ribossomo. Assim, o complexo ternário liga-se à subunidade 40S associada aos fatores eIF3 e eIF1A, formando o complexo de pré-iniciação 43S (eIF2.GTP.Met-tRNA_i.40S.eIF3.eIF1A). A próxima etapa é a ligação do complexo 43S ao mRNA, dependente da atuação de outros fatores, tais como eIF4F, eIF4A e eIF4B. O fator eIF-4F reconhece a estrutura m⁷GTP (“cap” ou quepe) na extremidade 5’ do mRNA e promove o desdobramento das estruturas secundárias pelos fatores eIF-4A e eIF-4B, que têm atividade de helicase, com hidrólise de ATP. Com isso, a extremidade 5’ do mRNA fica acessível ao acoplamento do complexo de pré-iniciação 43S que

migra no sentido 5' -> 3' com hidrólise de ATP, 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, onde o fator eIF5 promove a hidrólise de GTP ligado ao eIF2 e a liberação de eIF2-GDP (guanosina difosfato) e de outros fatores, deixando o Met-tRNA_i no sítio P da subunidade ribossomal 40S, o que permite um perfeito acoplamento da subunidade 60S, formando, assim, o complexo de iniciação 80S. Inicia-se, então, o ciclo de alongação. O eIF2-GDP é reciclado pelo fator eIF2B, que catalisa a troca de GDP por GTP sob a forma de complexo quaternário (eIF2/eIF2B/GDP/GTP), permitindo que eIF2 participe de um novo ciclo de iniciação (Kozak, 1989) (figura 1).

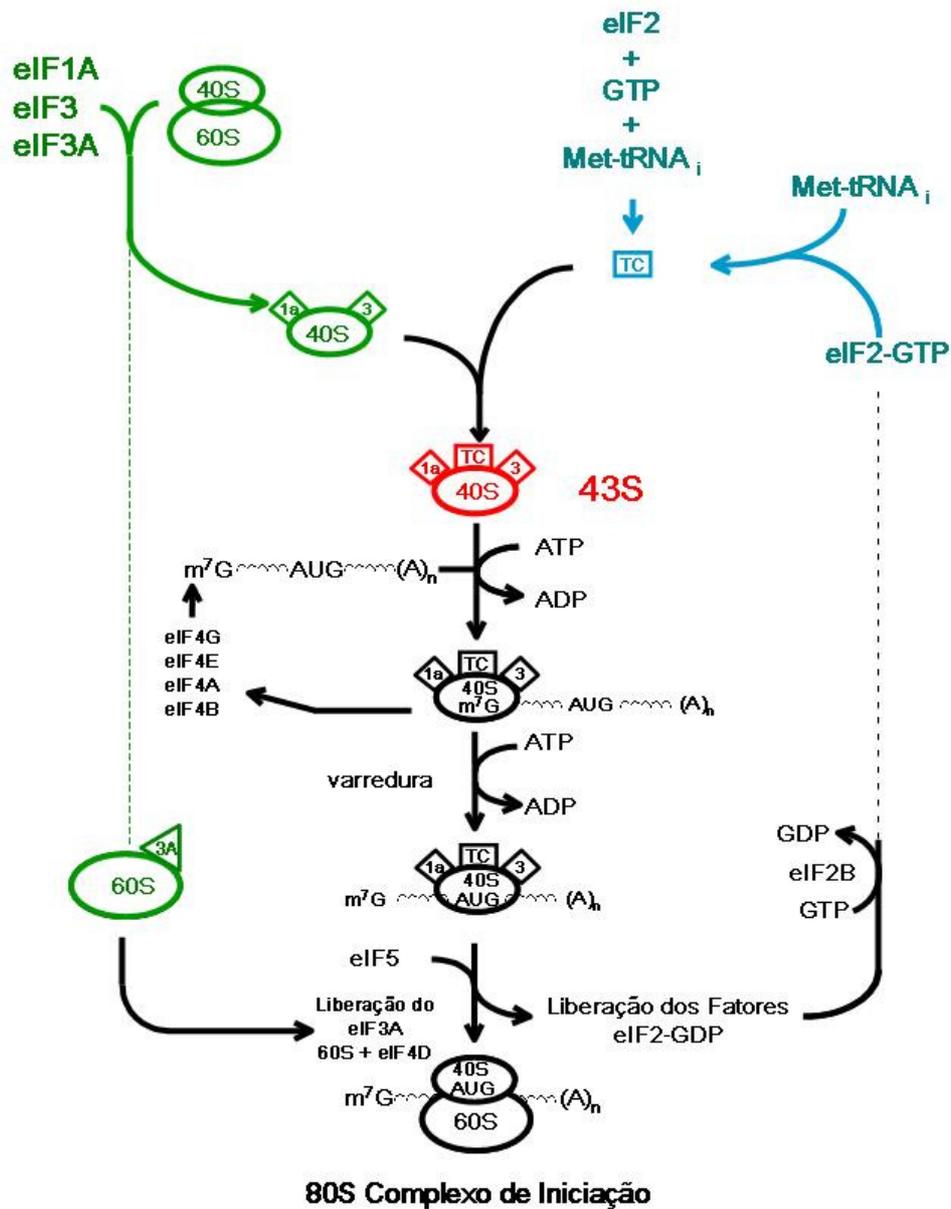


Figura 1. Representação do início da síntese proteica.

eIF: fator eucariótico de início de tradução; 60S e 40S: subunidades ribossômicas 60S e 40S respectivamente; GDP: adenosina difosfato; GTP: adenosina trifosfato; Met-TRNA_i: tRNA iniciador carregado com metionina; TC: complexo ternário; 43S: complexo de pré-iniciação composto por 40S mais TC, eIF1A e eIF3; m⁷GTP: estrutura “cap” na extremidade 5’ do RNA mensageiro; AUG: códon iniciador da tradução; A_(n): cauda de poliadenosinas; ATP: adenosina trifosfato; ADP: adenosina difosfato; 3A: eIF3A; 1a: eIF1A; 3: eIF3.

1.2 Características básicas da maquinaria de tradução

1.2.1 Os ribossomos

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).

1.2.2 O RNA transportador

Outra característica comum no processo de síntese protéica em procariotos e eucariotos é a utilização do RNA transportador como ponte de ligação entre os aminoácidos e o RNA mensageiro. 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, algumas modificações pós-transcricionais e constituição de algumas de suas alças.

No sistema eucariótico, 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 para fatores que atuam nesse processo (Kozak, 1983).

1.2.3 O RNA mensageiro

É o RNA mensageiro o protagonista de inúmeras e importantes diferenças estruturais entre eucariotos e procariotos. Talvez a maior complexidade no processo de iniciação da síntese protéica em eucariotos se deva a diferenças na estrutura de seus mRNAs, que conseqüentemente levam a profundas discrepâncias no modo de reconhecimento do primeiro códon da cadeia polipeptídica.

Algumas modificações pós-transcricionais ocorrem no mRNA eucariótico, como adição de 7-metil-guanosina (m⁷GTP) à extremidade 5' – denominada estrutura “cap” – conectada por uma ligação trifosfato 5'-5' feita pela enzima guanilil-transferase. O “cap” é uma guanosina modificada pela adição de um grupamento metil ao carbono número sete do anel purínico, formando uma estrutura 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.

Outra modificação é a adição de um segmento de poli-adenosina de 50 a 150 nucleotídeos (cauda poli(A)) às extremidades 3' da maioria dos mRNAs; que 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.

Os mRNAs de eucariotos possuem uma região 5' não traduzida, podendo apresentar uma extensão de algumas unidades até várias centenas de nucleotídeos, com uma média de cerca de 100 nucleotídeos (Kozak, 1987). O

tamanho da região 5' não traduzida do mRNA parece não influenciar na tradução da mensagem, já que deleções ou inserções de nucleotídeos, nessa região, 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. Portanto, é necessária 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).

Os RNAs mensageiros eucarióticos 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) que formariam um contexto favorável para o início da síntese protéica em eucariotos, sem no entanto caracterizar uma interação rRNA-mRNA análoga à de procariotos. Dentro desse contexto, as posições -3 e +4 são as mais conservadas, contendo purinas. Alteração de uma dessas posições para pirimidinas reduz significativamente a eficiência de utilização desse códon AUG como sítio de início de tradução. Por outro lado, experimentos *in vivo* que alteraram a seqüência consenso proposta revelaram que, apesar de influenciar o reconhecimento do AUG, as alterações não provocavam mudanças tão radicais quanto as previstas no estudo acima citado (Dasso, 1990).

Nos eucariotos, com raras exceções, as mensagens são sempre monocistrônicas, codificando, portanto, uma única proteína. A monocistronia dos mRNAs eucarióticos deve-se principalmente à propriedade intrínseca dos ribossomos (subunidade 40S) eucarióticos de não serem capazes de se ligarem diretamente a sítios internos de iniciação. Dependem, portanto, de uma extremidade 5' livre para se ligarem ao mRNA. Contudo, existem algumas exceções (Kozak, 1989).

1.2.4 Fatores protéicos envolvidos na iniciação

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-tRNAi^{met}/f-Met-tRNAi, 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. Em eucariotos, a complexidade do processo é bem maior, sendo que, até o momento, já foram isolados cerca de onze diferentes fatores (eIF-1A, eIF-2, eIF-2B, eIF-3, eIF-4A, eIF-4B, eIF-4E, eIF-4G, eIF-5 e eIF-3A), em sua maioria compostos por várias subunidades.

Baseado nas observações da monocistronia dos mRNAs eucariotos, de o início da tradução ocorrer no primeiro AUG da mensagem e em evidências bioquímicas de que RNAs circularizados não são traduzidos em sistemas eucarióticos, Kozak (1989) propôs um modelo de início de síntese protéica em eucariotos denominado “Modelo de Varredura” (“Scanning Model”). Nesse modelo, a subunidade 40S do ribossomo liga-se à extremidade 5' da mensagem, independentemente de sua seqüência, e migra, com gasto de ATP, na direção 5'-3', até encontrar o primeiro códon AUG. Nessa posição, ocorre uma pausa e a adição da subunidade 60S, formando o complexo ribossomal 80S (Kozak, 1978, 1983 e 1989). É o começo da elongação da síntese protéica.

Embora o modelo proposto por Kozak (1989) explique de uma forma geral como se dá a dinâmica do processo de localização do códon AUG inicial, ele não especifica que fator (ou fatores) do complexo de pré-iniciação é responsável pela interação e reconhecimento do AUG iniciador propriamente dito. O fator que, comprovadamente, sabia-se interagir com a subunidade ribossomal 40S antes de esta se ligar ao mRNA e a ela permanecia associado, durante todo o processo de varredura, era o complexo ternário composto por GTP, Met-tRNAi e eIF2. Portanto, esse era o principal candidato a efetuar o reconhecimento do códon AUG.

Utilizando como modelo de estudo a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, Donahue *et al.*, (1988) demonstraram o papel fundamental do Met-tRNAi no

processo de reconhecimento do códon AUG iniciador. Linhagens de levedura contendo o gene HIS4 com o códon AUG iniciador mutado para UUG, AUC, AAG, ACG ou AGG (separadamente) foram construídas e mostraram-se incapazes de crescer na ausência de histidina (His⁻). Nessas mesmas linhagens foi introduzido um gene codificador do tRNA^{iMet} com o anticódon mutado para UCC, e as células testadas para a capacidade de reversão ao fenótipo His⁺. Os resultados mostraram que apenas a linhagem de levedura contendo HIS4 com o códon AGG era capaz de crescer em meio mínimo sem histidina, evidenciando o pareamento AGG-UCC entre mRNA e tRNA como sendo imprescindível no processo de reconhecimento do códon iniciador AUG como ponto inicial da tradução (Cigan *et al.*, 1988).

O mesmo grupo realizou ensaios utilizando linhagens de levedura que continham o gene HIS4 e uma fusão HIS4-lacZ com seus códons iniciadores mutados, apresentando, portanto, os fenótipos His⁻ e β-galactosidase⁻, com o intuito de isolar mutantes espontâneos His⁺ e β-gal⁺. Estes possuiriam, portanto, alterações em outros componentes que participassem do processo de reconhecimento do códon iniciador (mutações supressoras extragênicas). Esses resultados mostraram a fundamental importância tanto do Met-tRNAⁱ como do eIF2 no processo de localização do primeiro AUG da mensagem como sítio de início da tradução. A influência na escolha do sítio de início por eIF2 foi também observada em um sistema de lisado de reticulócito de coelho, contendo altas concentrações de mRNA para β-globina, no qual a frequência de início no primeiro códon AUG diminuía em favor do segundo códon AUG distante 60 nucleotídeos do primeiro. A utilização do primeiro códon era restabelecida com a adição do fator eIF2, enquanto outros fatores como eIF3, eIF4A, eIF4B e eIF4F não apresentavam o mesmo efeito (Dasso *et al.*, 1990).

1.2.4.1 Aspectos bioquímicos dos fatores de iniciação de síntese protéica em eucariotos

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 (Pestova *et al.*, 2001). Estes fatores foram caracterizados em mamíferos, e Pestova *et al.* (1998), reportaram que eIF1 em conjunto com eIF1A promove uma formação estável do complexo 40S com ribossomos posicionados no códon AUG correto. 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 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, pois a afinidade de eIF2 por GDP é 100 vezes maior que por GTP (Merrick, 1992). Já em procaríotos, 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).

O fator **eIF2B** é responsável pela troca de GDP por GTP ligado a eIF2 após cada ciclo de iniciação (Hinnebush, 2000), pois eIF2 possui afinidade por GDP 100 vezes maior do que por GTP (Merrick, 1992,). É composto por cinco proteínas em mamíferos e levedura (Hinnebush, 1994, Price e Proud, 1994):

subunidades regulatórias alfa, beta e sigma e subunidades catalíticas lambda e epsilon (Yang e Hinnebusch, 1996; Pavitt *et al.*, 1998). As subunidades sigma e epsilon ligam-se à subunidade beta de eIF2 (Kimball *et al.*, 1998; Asano *et al.*, 1999).

Em mamíferos, **eIF3** é o mais complexo dos fatores, pois contém diferentes subunidades e participa de múltiplas etapas do início da tradução. Forma um complexo com a subunidade 40S do ribossomo e estimula a ligação do complexo ternário eIF2-GTP-Met-tRNA_i. A ligação do mRNA ao complexo de pré-iniciação 43S, produzindo o complexo 48S, também é estimulada por eIF3 (revisado em 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 possivelmente 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). Há três isoformas em mamíferos, eIF4AI, eIF4AII e eIF4AIII, sendo que eIF4AII de humanos é altamente homóloga a eIF4AI (89% de identidade), sendo funcionalmente equivalente (Yoder-Hill e Hinnebusch, 1996), mas sua expressão é tecido-específica (Nielsen e Trachsel, 1988; Gingras *et al.*, 1999).

O **eIF4B** é um estimulador de eIF-4A. Em mamíferos, essa proteína apresenta 69 kDa (Milburn *et al.*, 1990). 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 eIF-4A helicase. O RRM pode estar relacionado com interação a ribossomos (Méthot, *et al.*, 1994).

A principal função do **eIF4E** é ligar-se à estrutura m⁷GTP “cap” no mRNA. A interação está relacionada com resíduos de triptofano conservados (Altmann e Trachsel, 1989). Sua seqüência é conhecida para mamíferos, *S.cerevisiae*, trigo e *Drosophila* (Altmann *et al.*, 1989; Matsuo *et al.*, 1997).

Em mamíferos, **eIF4G**, apresenta duas isoformas, eIF4GI e eIF4GII, que possuem 46% 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). Evidências revelam que eIF4G tem como função trazer os fatores necessários para desenrolar a estrutura secundária do mRNA junto ao m⁷GTP “cap” na orientação correta. Sua porção amino-terminal contém sítio de ligação ao eIF4E e a porção carboxi-terminal liga-se a ribossomos, provavelmente por interação com eIF3 e também apresenta afinidade por eIF4A (Lamphear *et al.*, 1995).

Complexo de alto peso molecular encontrado em mamíferos, levedura, planta e *Drosophila* (Merrick, 1992), **eIF4F** 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).

Formado por uma proteína de 49 kDa em mamíferos (Das *et al.*, 1993) e de 46 kDa em levedura, **eIF5** tem atividade GTPásica ribossomo-dependente e tem como função permitir a junção das subunidades ribossomais no códon AUG após a hidrólise de GTP ligado a eIF2. (Chakravarti *et al.*, 1993, Chevesich *et al.*, 1993). Promove hidrólise de GTP somente quando interage com o complexo de iniciação 40S (40S-AUG.Met-tRNA_i.eIF2.GTP), e essa hidrólise ocorre apenas quando GTP está ligado a eIF2 no complexo de iniciação 40S. A ligação ao eIF2 ocorre entre a região carboxi-terminal de eIF5 e a subunidade beta de eIF2 (Das *et al.*, 2001; Singh *et al.*, 2004).

1.3 Mecanismos de regulação traducional em eucariotos

A forma mais eficaz de controle 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 forma mais comum e natural de modular a atividade desses complexos está na fosforilação e desfosforilação de vários sítios-alvo presentes em muitos dos fatores de iniciação. Praticamente todos os fatores envolvidos na iniciação possuem uma ou mais subunidades contendo sítios para fosforilação. Contudo, nem todas são fosforiladas de forma natural ou a fosforilação não provoca nenhuma alteração conhecida em sua atividade normal. Atualmente, os fatores eIF2, eIF2B, eIF3, eIF4B, eIF4G e eIF5 possuem uma modulação de atividade conhecida através da fosforilação de suas subunidades (Merrick, 1992, 1994).

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 150Kd e 160Kd 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 eIF2.GTP.Met-tRNAⁱ (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, através da inibição competitiva de eIF-2B (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 raio X, de dois terços da região amino-terminal de eIF2 alfa humano revelaram dois motivos: um domínio de dobra-OB (dobra de ligação a oligonucleotídeo/oligossacarídeo) e um compacto domínio de alfa-hélice (Nonato *et al.*, 2002). A fosforilação de eIF2 alfa é um ponto crítico na regulação da expressão gênica sobre diversas condições, como infecção viral (Clemens e Elia, 1997), apoptose (Salens *et al.*, 2001), carência de aminoácidos e choque térmico (Kozak, 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). Entretanto, relativamente pequenas mudanças estruturais foram observadas quando comparadas as formas GDP inativa e GTP ativa do complexo EF-Tu-GTP. Além disso, a estrutura do complexo eIF2 gama-GDP inativo assimila-se à estrutura do complexo EF-Tu-GTP ativo (Schimitt *et al.*, 2002). Desse modo, a estrutura de eIF2 gama não promove uma explicação para a dependência de GTP por Met-tRNAⁱ.

A subunidade gama de eIF-2 possui em sua seqüência de aminoácidos motivos-consenso para ligação a GTP, 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 à 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 nucléicos.

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 altamente conservadas evolutivamente nesta porção da molécula (Laurino *et al.*, 1999). Esses blocos conferem uma acentuada carga positiva à região N-terminal de eIF2 beta, mediando interações com 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, o espaçamento entre essas cisteínas ou removiam a região C₂-C₂, indicou que estes resíduos de cisteínas são indispensáveis para a função de eIF-2 beta (Donahue *et al.*, 1988; Castilho-Valavicius *et al.*, 1992). Ensaio de ligação *in vitro* ao mRNA, através de "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 RNA 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 é responsável por uma ligação com menor afinidade que a porção amino-terminal, mas talvez de maior especificidade, como indicada pela análise genética. Essa ligação da porção carboxi-terminal deve estar relacionada com a seleção do códon de início AUG, visto que análise de mutantes para a região carboxi-terminal, em *S. cerevisiae*, demonstrou que essas mutações permitiam o início da síntese protéica tendo como códon iniciador o 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 serem 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. Assim, eIF2 beta parece ser o principal mediador de contatos com diversas outras moléculas que participam do início da tradução.

Em ensaio de curva de crescimento de *S. cerevisiae*, no qual sob controle mesmo do 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) (figura 2).

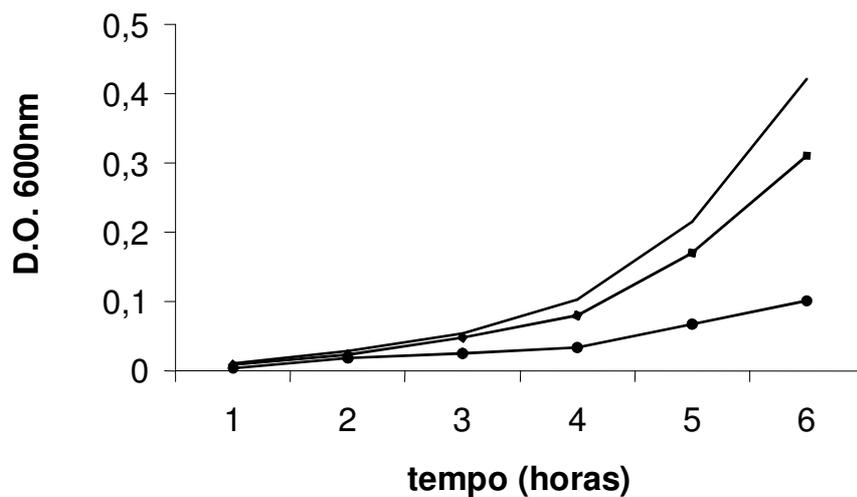


Figura 2. Curva de crescimento de *S. cerevisiae* em meio líquido. Células transformadas com o plasmídeo pLeu2 Cen4 (plasmídeo de baixo número de cópias), expressando eIF2 beta selvagem ou desprovido dos blocos de lisina sob controle de seu próprio promotor (Laurino, JP). A linha simples representa a 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.

O efeito de parada de crescimento celular pode ser explorado visando ao bloqueio da proliferação em outros tipos celulares, inclusive células oncogênicas, podendo assim ser utilizado em técnicas de terapia gênica. Conceitualmente, a terapia gênica envolve identificação apropriada do gene alvo e o direcionamento celular adequado. Em vista disso, vários problemas têm sido encontrados com relação a essa técnica, como falta de um sistema de transferência eficiente e de expressão gênica suficiente, e reações imunes do hospedeiro aos vetores virais utilizados, sendo todas essas etapas 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 forte e simples estratégia para terapia gênica direcionada por anticorpos carreadores de plasmídeos, contendo formas mutantes do gene de eIF2 beta.

Capítulo 2

Objetivos

2 Objetivos

A fim de se obterem diferentes formas truncadas de eIF2 beta humano e de serem analisadas as conseqüências da deleção dos três blocos de lisinas, os objetivos específicos do trabalho foram:

1) a construção de um plasmídeo de expressão em eucariotos controlado pela região operadora de tetraciclina, contendo eIF2 beta humano selvagem;

2) a construção de um plasmídeo de expressão em eucariotos controlado pela região operadora de tetraciclina, contendo eIF2 beta humano desprovido dos três blocos de lisinas;

3) a construção de um plasmídeo de expressão em eucariotos, controlado pela região operadora de tetraciclina, contendo apenas a porção amino-terminal do cDNA de eIF2 beta humano e abrangendo, então, apenas os referidos blocos de lisinas;

4) a construção de um plasmídeo de expressão em eucariotos controlado pela região operadora de tetraciclina, contendo apenas a porção carboxi-terminal do cDNA de eIF2 beta (não abrangendo os blocos de lisinas);

5) a construção de um plasmídeo que expresse o gene de uma variante da proteína verde fluorescente (EGFP) sob controle de promotor de citomegalovirus (CMV) e o repressor de tetraciclina para ser usado para transfecção concomitantemente com nossas construções referidas nos itens acima.

6) a construção de um plasmídeo de expressão de proteína em *E. coli*, contendo a fusão da proteína eIF2 beta humana com um “tag” de biotina.

Capítulo 3

Material e métodos

3. MATERIAL E MÉTODOS

A seguir, serão listados, para uma boa compreensão da metodologia desenvolvida, as diferentes linhagens de *Escherichia coli*, de plasmídeos e de oligonucleotídeos utilizados no presente trabalho.

3.1 Linhagens de *Escherichia 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 (r_k⁻, m_k⁺), supE44, relA 1, λ⁻, Δ(lac-proAB), [F', traD 36, proAB, lac^{pl} ZΔM15]</i>	Yanisch-Perron, C. <i>et al.</i> , 1985
BL21 DE3 STAR	<i>F, ompT, hsdS_B (r_B⁻, m_B⁻), dcm, gal, nre131, λ(DE3)</i>	Invitrogen

3.1.2 Plasmídeos adquiridos

Plasmídeos	Características	Referência ou origem
pALTER-EX1	Amp ^r , Tet ^r , plasmídeo para mutagênese <i>in vitro</i> e expressão de proteínas de interesse <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> em <i>E. coli</i>	Promega

pCR2.1-TOPO	Amp ^r , Kan ^r , plasmídeo de clonagem de produtos amplificados pela Reação em cadeia da Polimerase (PCR)	Invitrogen
pCR 3.1	Amp ^r , Kan ^r , Neo ^r , plasmídeo para clonagem e expressão de produtos da PCR em células eucarióticas	Invitrogen
pEGFP-1	Kan ^r , Neo ^r , plasmídeo para expressão de uma variação da proteína verde fluorescente (GFP) e de proteínas de interesse em células eucarióticas	BD Biosciences Clontech
pcDNA4/TO	Amp ^r , Ze ^r , plasmídeo para expressão tetraciclina-regulada de proteínas de interesse em células eucarióticas	Invitrogen
pcDNA6/TR	Amp ^r , Blast ^r , plasmídeo para expressão do repressor de tetraciclina sob controle do promotor de citomegalovírus (CMV) em células de mamíferos	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
Pin Point Xa-1-Vector	Amp ^r , plasmídeo para expressão e purificação de proteínas de fusão com biotina em <i>E. coli</i>	Promega
pET-23a(+)	Amp ^r , plasmídeo para expressão de proteínas de fusão com histidina em <i>E. coli</i>	Novagen

3.1.3 Plasmídeos construídos neste trabalho

Plasmídeo	Características
pJPL03	cDNA selvagem de eIF2 beta humano em Pin Point XaI T-Vector
pJPL07	eIF2 beta humano selvagem proveniente do pJPL03 inserido em pALTER EX1
pJPL10	resultante do primeiro ciclo de mutagênese sítio dirigida sobre o pJPL07, contém eIF2 beta humano desprovido do primeiro bloco de lisina [$\Delta(K1)$]
pJPL11	resultante do segundo ciclo de mutagênese sítio dirigida sobre o pJPL10, contém eIF2 beta humano desprovido do primeiro e segundo blocos de lisina [$\Delta(K1 K2)$]
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
pJPL15	região codificadora de eIF2 beta humano selvagem em Pin Point Xa-1 Vector
pJPL17	resultante do terceiro ciclo de mutagênese sítio dirigida sobre o pJPL11, contém eIF2 beta humano desprovido dos três blocos de lisina [$\Delta(K1 K2 K3)$]
pJPL25	PCR da região codificadora de eIF2 beta humano selvagem proveniente do pJPL07 em pCR2.1-TOPO
pJPL26	PCR da região codificadora de eIF2 beta humano [$\Delta(K1 K2 K3)$] proveniente do pJPL17 em pCR2.1-TOPO
pJPL27	PCR da região codificadora de eIF2 beta humano correspondente à porção amino-terminal da proteína proveniente do pJPL07 em pCR2.1-TOPO
pJPL30	PCR da região de eIF2 beta humano correspondente à porção carboxi-terminal da proteína proveniente do pJPL07

em pCR2.1-TOPO

- pJPL33 PCR da seqüência do promotor de CMV proveniente do pCR3.1 em pCR2.1-TOPO
- pJPL40 seqüência do promotor de CMV proveniente do pJPL33 em pEGFP-1
- pJPL43 PCR da seqüência do promotor de CMV mais a seqüência da EGFP proveniente do pJPL40 em pCR2.1-TOPO
- pJPL46 região codificadora de eIF2 beta humano selvagem proveniente do pJPL25 em pcDNA4/TO
- pJPL50 região codificadora de eIF2 beta humano [Δ (K1 K2 K3)] proveniente do pJPL26 em pcDNA4/TO
- pJPL60 região de eIF2 beta humano correspondente à porção amino-terminal da proteína proveniente do pJPL27 em pcDNA4/TO
- pJPL62 região de eIF2 beta humano correspondente à porção carboxi-terminal da proteína proveniente do pJPL30 em pcDNA4/TO
- pJPL63 EGFP sob controle do promotor de CMV proveniente do pJPL43 em pcDNA6/TR
- pJPL64 PCR da seqüência do “tag” de biotina fundido com a região codificadora de eIF2 beta humano selvagem proveniente do pJPL15 em pCR2.1-TOPO
- pJPL65 seqüência de “tag” de biotina fundido com a região codificadora de eIF2 beta selvagem proveniente do pJPL64 em pET-23 a(+)

3.1.4. Oligonucleotídeos iniciadores

ECORIF: 5' GTCTGA ATTCCCGTCCGTG 3'

BAMHIR: 5' TGAAAGGATCCCTGTTATAATAACTTTAAT 3'

NRUIF: 5' TTTTTTCGCGACGAGATGATTTTT 3'

DEL1: 5' ACGAGATGATTTTTGATCCTACTATGAGCCCTTTTATGTTAGATGAG
GAAGGGGATACC 3'

DEL2: 5' ATCTAGATGACTTGAACCTTCTTTAATCAAATATTTGATATTGATGAAG
CTGAAGAAGGT 3'

DEL3: 5' AGGATGACCTTGACATTATGCTTGGCAATTTCCAGATGAGGATGAA
ATACTAGAGAAA 3'

KPNIF: 5' CCCACTGGTACCGCAGCCATGTCT 3'

NH2R: 5' GGCCTGTCTGGATCCTGAATTAGAT 3'

COOHF: 5' CGGGGTACCGCAGGTATGTCTTTCAGTAAT 3'

CMVXF: 5' ATTTAACTCGAGTTTTAA 3'

CMVAGR: 5' CGATAAACCGGTAAGCAG 3'

EGFPXR: 5' ATTTACGCCTCGAGATACAT 3'

NDEIF: 5' CGGGAGTAACTCATATGAAAC 3'

3.2 Meios de cultura para bactérias

Meio LB (Luria-Bertaini) – triptona 10 g/l, NaCl 5 g/l, extrato de levedura 5 g/l para meio líquido, adicionado de 2% de ágar quando meio sólido e 0,67% para meio semi-sólido.

Meio SOC – triptona 20 g/l, extrato de levedura 5 g/l, NaCl 0,5 g/l, KCl 2,5 mM, ajustado para pH 7,0 e adicionado MgCl₂ para concentração final de 7 mM e glicose 20 mM.

Meio mínimo M9 – Na₂HPO₄ 6 g/l, KH₂PO₄ 3 g/l, NaCl 0,5 g/l, NH₄Cl 1g/l, MgSO₄ 0,24 g/l, CaCl₂ 0,01g/l, glicose 0,2%/l, tiamina-HCl 0,33g/l.

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 $3.200 \times g$, em centrífuga Hettich (modelo Rotina 46R, com rotor oscilante modelo 4624) a $4^{\circ}C$. O sobrenadante foi totalmente retirado, e as células, ressuspensas em 500 ml de glicerol 10% estéril a $4^{\circ}C$. A suspensão foi centrifugada como anteriormente, e o precipitado foi ressuspenso em 250 ml de glicerol 10% a $4^{\circ}C$. 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 $4^{\circ}C$. As células foram fracionadas em alíquotas de 40 μl e congeladas a $-80^{\circ}C$ para posterior utilização.

3.3.2 Transformação de *E. coli* por eletroporação

As alíquotas de 40 μl foram descongeladas em 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 μl), incubando-se no gelo por um minuto. As constantes elétricas utilizadas para a eletroporação foram: capacitância, 25 μF ; resistência, 200 $m\Omega$ 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 Gene Pulser XCell (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. Após esse tempo, as culturas foram transferidas para tubos de microcentrífuga, e as células foram então centrifugadas a 13.000 x *g* por três minutos em microcentrífuga Eppendorf (modelo 5417C), ressuspensas em 300 µl de meio SOC, plaqueadas em meio LB contendo o antibiótico adequado ao plasmídeo que estava sendo manipulado e incubadas por 16 horas a 37° C.

3.3.3 Preparação de células de *E. coli* competentes com cloreto de cálcio para transformação com DNA plasmidial

De uma cultura das linhagens de *E.coli* descritas acima, cultivadas em meio LB, sob agitação a 37° C, por 16 a 18 horas, 1 ml foi inoculado em 100 ml de meio LB e incubado a 37° C, com agitação até atingir uma densidade óptica de 0,3 A_{600nm}. A cultura foi centrifugada a 3.200 x *g*, por 10 minutos a 4° C, o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 25 ml de solução CaCl₂ 100 mM a 4° C e incubadas no gelo por 20 minutos. As células foram centrifugadas a 3.200 x *g* por 10 minutos, a 4° C, ressuspensas em 5 ml de solução CaCl₂ 100 mM gelada e incubadas, no gelo, por uma hora. Novamente, foi realizada centrifugação nas mesmas condições anteriores e o sobrenadante foi descartado. As células foram resuspensas em 5 ml de solução CaCl₂ 100 mM, glicerol 15%. Para armazenamento, as células foram fracionadas em alíquotas de 200 µl em tubos de microcentrífuga estéreis e congeladas a -80° C.

3.3.4 Transformação de *E. coli* por cloreto de cálcio

Para transformação, as células competentes alíquotadas foram descongeladas no gelo, o DNA plasmidial de interesse foi então adicionado e a mistura foi incubada no gelo por 30 minutos. O choque térmico foi dado,

incubando-se o tubo por dois minutos, a 42°C. Após o choque térmico, o tubo foi incubado no gelo por 2 minutos, em seguida 1 ml de meio SOC foi acrescentado às suspensões, seguindo-se incubação a 37° C por uma hora. As células foram centrifugadas em microcentrífuga, a 13.000 x *g* por um minuto, ressuspensas em 300 µl de meio SOC, semeadas em meio LB suplementado com agar (2%), contendo o antibiótico adequado ao plasmídeo que estava sendo manipulado e incubadas por 16 horas, a 37° C.

3.4 Manipulação de DNA

3.4.1 cDNA total utilizado

Foi utilizado para a clonagem de eIF2 beta humano o cDNA produzido a partir de RNA total de células de linhagem mielóide humana K562 , gentilmente cedido por Andres Delgado Cañedo do Laboratório de Imunogenética do Departamento de Genética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

3.4.2 Extração de DNA plasmidial

3.4.2.1 Extração de DNA plasmidial de bactéria por lise alcalina

Inocularam-se bactérias de uma colônia isolada em 2 ml de meio LB, contendo o antibiótico para seleção. Essas bactérias foram crescidas a 37° C, com agitação durante 16 horas. Um volume de 1,5 ml das culturas foi transferido para tubos de microcentrífuga e centrifugado a 12.000 x *g*, por 30 segundos, em microcentrífuga. 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 cinco 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 cinco minutos, a 12.000 x *g*, obtendo-se o sobrenadante contendo o DNA que foi transferido para novo tubo de microcentrífuga ao qual foi adicionado 1 ml de etanol absoluto gelado. Seguiu-se nova etapa de centrifugação por 10 minutos, a 14.000 x *g*. 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 ressuspense num volume de 20 a 50 µl de H₂O deionizada. A essa solução foram adicionados 10 µg de RNase-A (Invitrogen), incubando-se por 20 minutos em temperatura ambiente.

3.4.2.2 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 x *g*, por 10 minutos, e o sobrenadante foi descartado. O precipitado foi ressuspense em 250 µl de Solução de Ressuspensão (Tris-HCl 50 mM pH7,5; EDTA 10 mM; RNase 100 µg/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 cinco 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 (guanidina hidrocloreto 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 x *g*, 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 x *g* 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 x *g*, 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 em que foi centrifugada a 14.000 x *g*, durante um minuto. A microcoluna foi descartada e o DNA plasmidial armazenado a -20° C.

3.4.3 Modificações do DNA

3.4.3.1 Digestão por endonucleases de restrição

Quantidades de 0,1 μg a 0,5 μg (para análise de clones recombinantes ou para reação de ligação) e 0,5 μg a 1 μg de DNA plasmidial (para extração de fragmentos de DNA em gel de agarose) foram utilizadas. O tampão de restrição 10X específico para a(s) enzima(s) utilizada(s), segundo o fabricante (New England Biolabs ou Fermentas), foi adicionado para concentração final de 1X. Quantidades apropriadas de enzima foram adicionadas, tendo como base que uma unidade de enzima digere 1 μg de DNA em uma hora. Para completar o volume final da reação foi adicionada H₂O deionizada. A reação foi incubada na temperatura adequada para a enzima utilizada.

3.4.3.2 Defosforilação de extremidades de DNA

Em determinado volume de DNA plasmidial linearizado e ressuspenso em água deionizada, foi adicionado 1 µl de fosfatase alcalina (*Shrimp Alkaline Phosphatase* – SAP) (USB-GE healthcare). A reação foi realizada durante 30 minutos, a 37^o C seguidos de 15 minutos, a 80^o C, para desnaturar a enzima.

3.4.3.3 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^o C, por 30 minutos, e, para inativar a quinase, foi realizada uma etapa de 70^o C por 10 minutos.

3.4.3.4 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^o C durante 12 horas.

3.4.3.5 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 1 µg de cDNA ou 50 ng de DNA plasmidial, 0,2 µM de cada oligonucleotídeo iniciador, 0,2mM de dNTPs, 1,5 mM de MgCl₂, 0,5 U de Taq DNA Polimerase (Invitrogen) em 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 um minuto, a 94°C, seguida de 40 ciclos de incubações a 94° C, por um minuto, a 48 ° C -62° C, por um minuto (dependendo do conjunto de iniciadores utilizados) e a 72° C, por um a dois minutos (dependendo do tamanho do fragmento que estava sendo amplificado). Por último, seguiu-se incubação a 72° C, por 10 minutos.

3.4.3.6 Preparação de DNA simples fita

A preparação de DNA simples fita foi realizada a partir de uma colônia da linhagem de *E. coli* JM109 transfectada com o plasmídeo pJPL07, bem como com os plasmídeos contendo as sucessivas deleções dos blocos de lisina (pJPL10 e pJPL11). Essa preparação foi realizada conforme protocolo do sistema de mutagênese *in vitro* “Altered Sites II” (Promega).

Uma colônia de *E. coli* JM109 foi inoculada em 2 ml de meio M9 (meio para a seleção de colônias contendo um plasmídeo “F”), com o antibiótico adequado, e incubada sob agitação a 37° C, por 16 a 18h. Um volume de 0,5 ml desse cultivo foi inoculado em 25 ml de meio LB, com o antibiótico apropriado e incubado a 37° C, sob agitação por 30 minutos. Após esse tempo, essa cultura foi infectada com 200 µl de fago helper R408 (Promega) e incubada novamente por seis horas, com agitação vigorosa. A cultura foi então centrifugada a 3.200 x *g*, por 45 minutos, e o sobrenadante obtido foi transferido a outro tubo. O sobrenadante foi novamente centrifugado nas mesmas condições. Novamente, o sobrenadante foi transferido. A ele foram adicionados 6,25 ml de solução de precipitação de fago (acetato de amônio 3,75 M pH 7,5; PEG-8000 20%) e foi incubado a 4° C, por 60 minutos, a “overnight”. Nova centrifugação foi realizada a 3.200 x *g*, por 45 minutos, e o sobrenadante foi completamente descartado. O precipitado foi ressuspensão em 400 µl de TE (Tris-Hcl 10 mM pH 8,0; EDTA 1 mM) e transferido a um tubo de

microcentrífuga. Para a extração de DNA do fago, foram adicionados ao tubo 400 µl de solução clorofórmio: álcool isoamílico (24:1) para lisar o fago, e foi realizada agitação em vórtex por um minuto e após foi feita uma centrifugação a 12.000 x *g* por cinco minutos. A fase aquosa superior foi transferida a outro tubo de microcentrífuga e adicionaram-se 400 µl de solução de fenol saturado com TE:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1). Foi realizada agitação em vórtex por um minuto e centrifugação nas mesmas condições anteriores. A fase aquosa superior foi transferida a outro tubo e a extração com TE:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) foi mais uma vez realizada. A fase aquosa superior foi transferida e foram adicionados a ela 400 µl de clorofórmio. Agitação em vórtex por um minuto foi realizada, e nova centrifugação igual à anterior foi feita. A fase aquosa superior foi novamente transferida e foram adicionados 200 µl de acetato de amônio 7,5 M, mais 1,2 ml de etanol 100%. A mistura foi então incubada a -20° C, por 30 minutos, para precipitar o DNA do fago. Foi realizada centrifugação a 12.000 x *g*, por cinco minutos sendo o sobrenadante removido. Cuidadosamente o precipitado foi lavado com etanol 70% e nova centrifugação foi feita a 12.000 x *g*, por dois minutos. O etanol 70% foi descartado, e o precipitado secou a temperatura ambiente. Depois de seco, o material foi ressuspenso em 20 µl de H₂O deionizada.

3.4.3.7 Mutagênese sítio dirigida *in vitro*

Para a realização das três etapas consecutivas de mutagênese sítio dirigida *in vitro*, no mesmo vetor, foi utilizado o sistema de mutagênese *Altered Sites II in vitro Mutagenesis System* (Promega). Esse sistema foi projetado para permitir a criação de mutações em um fragmento de DNA clonado e usar uma alternância de resistência a antibiótico a fim de permitir a seleção positiva do DNA mutado. O vetor pALTER-Ex1 contém dois genes de resistência a antibióticos distintos, sendo um funcional e outro não-funcional, devido a uma mutação de ponto. Durante o procedimento de mutagênese, o gene primeiramente funcional é silenciado, e a mutação no gene não-funcional é reparada, sendo esta usada para

selecionar positivamente os plasmídeos recentemente mutados. Aqueles plasmídeos que tiverem a resistência reparada devem também conter a mutação desejada no DNA clonado. Podem ser feitos assim, ciclos múltiplos de mutagênese no mesmo DNA clonado, alternando os genes de resistência do plasmídeo a esses dois antibióticos quantas vezes forem necessárias.

A fim de deletar os três blocos de lisinas presentes na porção amino-terminal do eIF2 beta, descritos anteriormente, foram realizados três ciclos de mutagênese. No primeiro ciclo, o término 5' do oligonucleotídeo mutagênico DEL1 foi fosforilado, utilizando a enzima T4 polinucleotídeo quinase como descrito na seção 3.4.3.3. Uma concentração de 1,25 pmol desse oligonucleotídeo fosforilado foi adicionado a 100 ng de DNA simples fita (ssDNA) obtido do plasmídeo pJPL.07, conforme descrito na seção 3.4.3.6 Simultaneamente à DEL1, foram adicionados 0,25 pmol do oligonucleotídeo de silenciamento do gene de resistência a tetraciclina e 0,25 pmol de reparo do gene de resistência a ampicilina numa reação de anelamento, utilizando-se 2 µl de tampão de anelamento 10X (Tris-Hcl 200 mM pH7,5; MgCl₂ 100 mM; NaCl 500 mM) e produzindo-se um volume final de 20 µl. A reação ocorreu a 75° C, por 5 minutos, seguida por diminuição de 1° C por minuto, até a temperatura de 45° C e uma diminuição mais rápida até 22° C, em termociclador *DNA Thermal cycler* - MJ Research (modelo PTC 100). Essa reação proporcionou o anelamento simultâneo dos três oligonucleotídeos. Após a hibridização, a reação foi retirada do termociclador e foi colocada no gelo. Foram adicionados 3 µl de tampão de síntese 10X (Tris-Hcl pH7,5; dNTPs 5 mM; ATP 10 mM; DTT 20 mM), 1µl (5-10U) de T4 DNA polimerase, 1µl (1-3U) (Promega) de T4 DNA ligase (Promega) e 5 µl de H₂O deionizada para completar o volume final de 30 µl. A reação foi incubada a 37° C, por 90 minutos, para estender os oligonucleotídeos com T4 DNA polimerase, criando uma molécula dupla fita, e recircularizar o plasmídeo com T4 DNA ligase. Após, essa reação foi utilizada para transformar a linhagem JM109 de *E. coli* (seção 3.3.4). Os plasmídeos recombinantes, contendo o cDNA de eIF2 beta mutado pela deleção do primeiro bloco de lisinas compreendido por 24 nucleotídeos (nt) (A156-G179), foram selecionados em meio LB sólido, contendo agar 2% com o antibiótico ampicilina a uma concentração de 125 µg/ml, e tiveram

seu DNA extraído por lise alcalina conforme descrito na seção 3.4.2.1. Foi realizado seqüenciamento para análise da seqüência de DNA dos clones obtidos como mostrado na seção 3.4.4.3. Foi escolhido um clone apresentando a seqüência nucleotídica correta e com a deleção do primeiro bloco de lisina de eIF2 beta o qual foi denominado de pJPL10.

A partir desse clone, iniciou-se o segundo ciclo de mutagênese. Todo o processo foi realizado conforme descrito para o pJPL10, porém nesse ciclo utilizou-se o ssDNA do pJPL10, oligonucleotídeo DEL2, oligonucleotídeo de silenciamento do gene de resistência a ampicilina e o oligonucleotídeo de reparo do gene de resistência a tetraciclina. Desse modo, o término 5' do oligonucleotídeo mutagênico DEL2 foi fosforilado, utilizando-se a enzima T4 polinucleotídeo quinase. Esse oligonucleotídeo fosforilado foi anelado ao ssDNA obtido como descrito na seção 3.4.3.6 do plasmídeo pJPL10. Simultaneamente, foram hibridizados o oligonucleotídeo de silenciamento do gene de ampicilina e o de reparo do gene de tetraciclina sob as mesmas condições anteriores. Após a hibridização, os oligonucleotídeos foram estendidos com T4 DNA polimerase, e o plasmídeo foi então recircularizado com T4 DNA ligase e utilizado para transformar a linhagem JM109 de *E. coli* (seção 3.3.4). Os plasmídeos recombinantes contendo a deleção do 27nt que compõem o segundo bloco de lisinas (A351 – G377) foram selecionados em meio LB suplementado com agar (2%) contendo o antibiótico tetraciclina em uma concentração de 12,5 µg/ml e tiveram seu DNA extraído por lise alcalina como descrito na seção 3.4.2.1. Foi realizado seqüenciamento para análise da seqüência de DNA dos clones obtidos conforme seção 3.4.4.3 . Foi escolhido um clone apresentando a seqüência nucleotídica correta contendo agora as deleções do primeiro e do segundo bloco de lisina de eIF2 beta sendo esse denominado de pJPL11.

Utilizando o ssDNA do pJPL11 partiu-se para o terceiro e último ciclo de mutagênese. A metodologia utilizada foi a mesma que para a construção de pJPL10 e pJPL11. Entretanto nessa etapa, o término 5' fosforilado foi do oligonucleotídeo mutagênico DEL3 utilizando a enzima T4 polinucleotídeo quinase. Esse oligonucleotídeo fosforilado foi anelado ao ssDNA do plasmídeo pJPL11. Simultaneamente, foram hibridizados o oligonucleotídeo de

silenciamento do gene de resistência a tetraciclina e o de reparo do gene de resistência a ampicilina. Após a hibridização, os oligonucleotídeos foram estendidos com T4 DNA polimerase e o plasmídeo foi então recircularizado com T4 DNA ligase e utilizado para transformar a linhagem JM109 de *E. coli* (seção 3.3.4). Os plasmídeos recombinantes contendo a deleção do terceiro bloco de lisina foram selecionados em meio LB com o antibiótico ampicilina em uma concentração de 125 µg/ml e tiveram seu DNA extraído por lise alcalina. Foi novamente realizado seqüenciamento para análise da seqüência de DNA dos clones obtidos. Um clone apresentando a seqüência nucleotídica correta contendo agora as deleções do primeiro, do segundo e do terceiro blocos de lisina de eIF2 beta foi selecionado sendo denominado de pJPL17.

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 80–100V em tampão 0,5X TBE. O DNA foi visualizado por iluminação ultravioleta, a 512 nm, e fotografado em máquina digital Kodak (DC 290).

3.4.4.2 Quantificação de DNA

Quando necessário, os fragmentos de DNA foram quantificados por espectroscopia UV. O DNA de interesse e o marcador de peso molecular *Low DNA Mass Ladder* (Invitrogen) foram submetidos a eletroforese horizontal em gel

de agarose contendo 0,5 µg/ml de brometo de etídeo e visualizados por iluminação ultravioleta a 512 nm.

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 fita dupla (dsDNA) 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 95º C, por 20 segundos; 34 ciclos de incubação a 95º C, por 20 segundos; 50º C, por 15 segundos; 60º C, por um minuto; e 4º 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.(<http://www.technelysium.com.au>)

3.4.4.4 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 microcentrífuga 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 microcentrífuga. Foi realizada uma centrifugação a 14.000 x *g*, 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 EDTA; 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 microcentrífuga e a ela foram adicionados 50 µl de TE (Tris-Hcl 10 mM pH8,0; EDTA 1 mM) para eluir o DNA. Após cinco 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 de eIF2 beta humano

Para a obtenção do fragmento referente ao cDNA de eIF2 beta humano (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, M29536, figura 3), foi realizada uma reação de PCR como descrito na seção 3.4.3.5, com temperatura de anelamento de 52° C e tempo de extensão de dois minutos. A reação teve como molde cDNA total de células humanas K562 e utilizou os iniciadores ECORIF e BAMHIR que contêm em sua seqüência nucleotídica um sítio de restrição para a enzima *EcoRI* e *BamHI* respectivamente. O fragmento amplificado, de aproximadamente 1350 pb, foi submetido a eletroforese em gel de agarose 1% e quantificado conforme seção 3.4.4.2.

1 cgttgaagac attgtcgggt ggtgggagag gtatcggcag gggcagcgcct gccgccgggg
61 cctggggctg acccgtctga cttcccgtcc gtgccgagcc cactcgagcc gcagcc**atgt**
121 ctggggacga gatgattttt gatcctacta tgagc**aagaa gaaaaagaag aagaagaagc**
181 cttttatggt agatgaggaa ggggataccc aaacagagga aaccagcct tcagaaacaa
241 aagaagtgga gccagagcca actgaggaca aggatttga agctgatgaa gaggacacta
301 ggaaaaaaga tgcttctgat gatctagatg acttgaactt ctttaatca **aagaaaaaga**
361 **agaaaaaac taaaaagata** tttgatattg atgaagctga agaaggtgta aaggatctta
421 agattgaaag tgatgttcaa gaaccaactg aaccagagga tgacctgac attatgcttg
481 gcaat**aaaaa gaagaaaaag aagaatgtta ag**ttcccaga tgaggatgaa atactagaga
541 aagatgaagc tctagaagat gaagacaaca aaaaagatga tggatatctca ttcagtaatc
601 agacaggccc tgcttgggca ggctcagaaa gagactacac atacgaggag ctgctgaatc
661 gagtgttcaa catcatgagg gaaaagaatc cagatatggt tgctggggag aaaaggaaat
721 ttgtcatgaa acctccacaa gtcgtccgag taggaaccaa gaaaacttct tttgtcaact
781 ttacagatat ctgtaaaacta ttacatcgtc agcccaaaca tctccttgca tttttgttgg
841 ctgaattggg tacaagtggg tctatagatg gtaataacca acttgtaatc aaaggaagat
901 tccaacagaa acagatagaa aatgtcttga gaagatata caaggaatat gtcacttgtc
961 acacatgccg atcaccggac acaatcctgc agaaggacat acgactctat ttctacagt
1021 gcgaaacttg tcattctaga tgttctgttg ccagtatcaa aaccggcttc caggctgtca
1081 cgggcaagcg agcacagctc cgtgccaaag ctaact**taatt** tgctaatcac tgattttgca
1141 aagcttggtg tggagatgtg gctggacagg tttgccatca gagtggatat accgttgtat
1201 taaaaacaag ataaaaaagc tgccaagatt tttggcgagt ggttggctg aagtccttgc
1261 aagacgctga tgctcaagct gttgacatac tcattgccta ctttaacacc tgtcagagaa
1321 acgtgatatg gggtaaggag gtgctttttt aaaatcgttc atagacttct gtaaaatgca
1381 agataaatta aagttattat aacagtgatt ctttca

Figura 3. Seqüência do cDNA de eIF2 beta humano. Em negrito, estão representados: o códon de início da tradução (atg); os três blocos de lisinas na porção amino-terminal e o códon de término da tradução (taa). (modificado a partir de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, número de acesso M29536).

3.6 Clonagem intermediária no plasmídeo pCR2.1-TOPO

Para clonagem de produtos da PCR, foi utilizado o *TOPO TA cloning kit* que utiliza o plasmídeo pCR2.1-TOPO (Invitrogen) (figura 4), 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 pCR2.1-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 1 µl do plasmídeo. A reação foi incubada por cinco minutos, a temperatura ambiente, e logo após colocada no gelo. Posteriormente, foi utilizada para eletrotransformação 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 3.4.2.1. Para confirmar a presença do inserto nos diferentes clones, foi primeiramente feita uma triagem através de digestão com a enzima de restrição *EcoRI* (item 3.4.3.1.) cujos sítios estão localizados nas regiões flanqueadoras da região de inserção do fragmento no plasmídeo pCR2.1-TOPO. Clones que mostraram a presença de um fragmento de DNA adequado para cada construção foram tratados, concomitantemente, com as endonucleases de restrição também adequadas para cada caso (seção 3.4.3.1.).

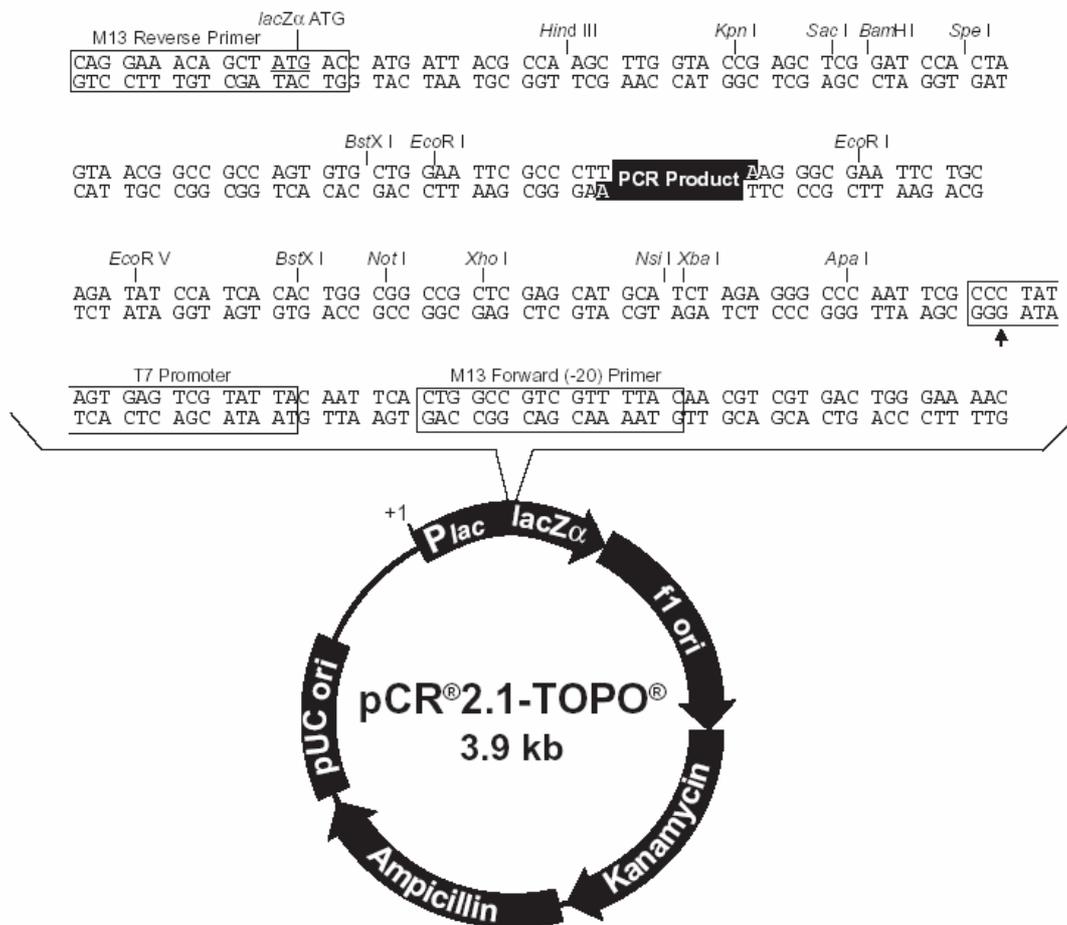


Figura 4. Representação esquemática do plasmídeo pCR2.1-TOPO e da seqüência do sítio de clonagem múltipla. Em destaque, na figura, estão os principais elementos do plasmídeo: genes de resistência aos antibióticos ampicilina e kanamicina; origem de replicação derivada do vírus f1 (f1 ori) e de PUC (pUC ori); o promotor lac (P lac); a seqüência de Lac α e a seqüência do sítio de clonagem de produtos de PCR e os sítios para as enzimas de restrição. Na parte superior da figura, estão a seqüência da região de clonagem dos produtos de PCR e os sítios para enzimas de restrição.

Modificado a partir de http://www.invitrogen.com/content/sfs/vectors/pcr2_1topo_map.pdf.

3.7 Sistema de expressão do gene de interesse, em células eucarióticas, baseado na regulação por tetraciclina

3.7.1 Sistema utilizado: *T-Rex System* (Invitrogen)

3.7.1.1 Descrição do sistema

O *T-Rex System* (Invitrogen) é um sistema de expressão em células de mamíferos regulado por tetraciclina que utiliza elementos regulatórios codificados pelo operon de resistência a tetraciclina (Tet) de *E. coli* Tn10 (Hillen e Berens, 1994; Hillen *et al.*, 1983). A regulação de tetraciclina nesse sistema é baseada na ligação de tetraciclina ao repressor Tet e desrepressão do promotor controlando a expressão do gene de interesse (Yao *et al.*, 1998). Os principais componentes do sistema T-Rex incluem:

- Um plasmídeo de expressão induzível para a expressão do gene de interesse sob o controle do forte promotor de CMV e dois sítios operadores de tetraciclina 2 (TetO₂) inseridos *in tandem*, os quais se intercalam entre o promotor de CMV e a região codificadora do gene de interesse (Boshart *et al.*, 1985; Nelson *et al.*, 1987; Anderson *et al.*, 1989). Nesse trabalho, foi utilizado o pcDNA4/TO;
- Um plasmídeo regulatório, pcDNA6/TR, que codifica o repressor Tet (TetR) sob controle do promotor de CMV humano.

No sistema *T-Rex*, a expressão do gene de interesse é reprimida na ausência de tetraciclina e induzida na presença dela (Yao *et al.*, 1998). O principal componente do sistema é o plasmídeo de expressão induzível no qual foram inseridas as seqüências de TetO₂ que consistem de duas cópias da seqüência nucleotídica 5'- TCCCTATCAGTGATAGAGA -3', separadas por dois pares de base espaçadores (Hillen *et al.*, 1983; Hillen e Berens, 1994). Cada uma dessas seqüências nucleotídicas serve como um sítio de ligação para duas moléculas do repressor Tet.

O segundo principal componente do sistema é o vetor regulatório pcDNA6/TR que expressa altos níveis do gene TetR (Postle *et al.*, 1984) sob o

controle do promotor de CMV. Ambos os vetores do sistema podem ser introduzidos em células hospedeiras de mamíferos por métodos de transfecção padrão.

3.7.1.2 Mecanismo de ação do sistema (figura 5)

Na ausência de tetraciclina, o repressor Tet forma um homodímero que se liga com alta afinidade a cada seqüência de TetO₂ à região promotora do vetor de expressão induzível (Hillen e Berens, 1994). Os sítios de TetO₂ no promotor do vetor de expressão induzível servem como sítios de ligação para quatro moléculas (dois homodímeros) do repressor Tet. A afinidade do repressor Tet pelo operador Tet é $K_B = 2 \times 10^{11} \text{ M}^{-1}$ (como mensurado sob condições fisiológicas), onde K_B é a constante de ligação (Hillen e Berens, 1994). Ligação dos homodímeros do repressor Tet à seqüência de TetO₂ reprime a transcrição do gene de interesse. Quando adicionada, a tetraciclina liga-se com alta afinidade a cada homodímero do repressor Tet em uma proporção estequiométrica de 1:1 e promove uma mudança conformacional no repressor que causa sua incapacidade de se ligar ao operador Tet. A constante de associação, K_A , de tetraciclina ao repressor Tet é de $3 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ (Hillen e Berens, 1994). O complexo repressor Tet:tetraciclina então se dissocia do operador Tet e permite a indução da transcrição do gene de interesse. Esse sistema foi elaborado para ser usado em um sistema de expressão eucariótica.

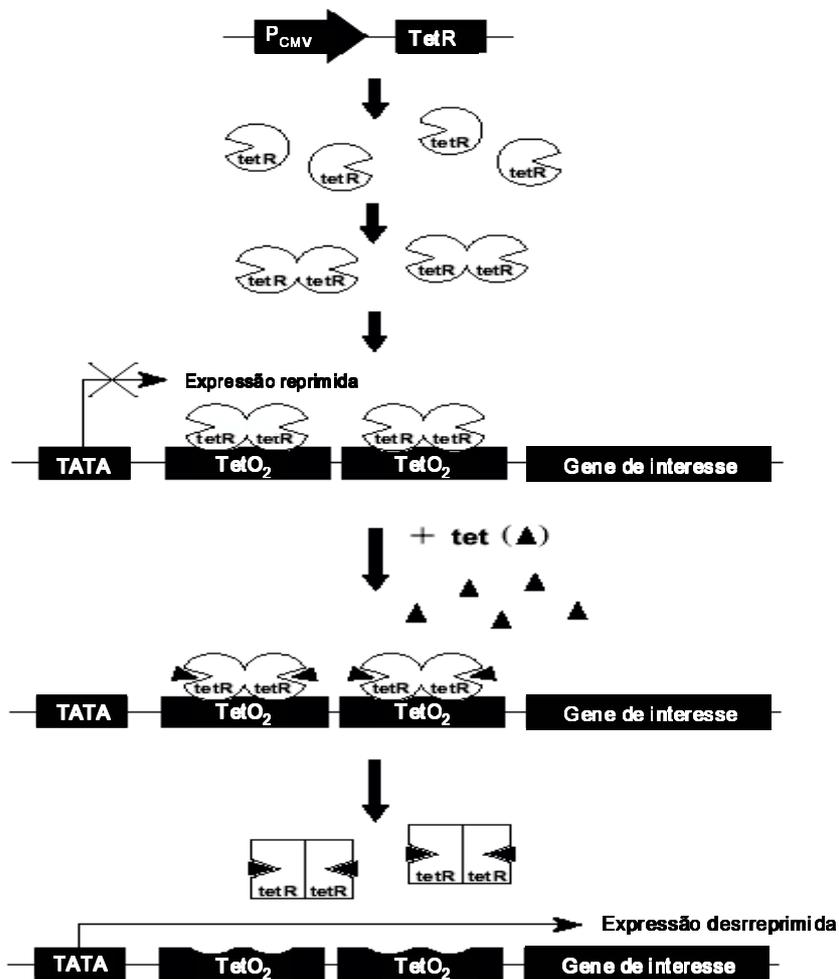


Figura 5. Representação esquemática do mecanismo de ação do T-REx System. Na ausência de tetraciclina (tet), o repressor Tet forma um homodímero que se liga com alta afinidade a cada seqüência do operador de tetraciclina (TetO₂) no promotor do vetor de expressão induzível (TATA). Os sítios de TetO₂, no promotor do vetor de expressão induzível, servem como sítios de ligação ao repressor Tet (TetR). Ligação dos homodímeros do TetR à seqüência de TetO₂ reprime a transcrição do gene de interesse. Quando adicionada, a tetraciclina liga-se com alta afinidade a cada homodímero do TetR e promove uma mudança conformacional no repressor que causa sua incapacidade de se ligar ao operador Tet. O complexo repressor TetR:tetraciclina, então, dissocia-se do operador Tet e permite a indução da transcrição do gene de interesse. PCMV: promotor de CMV. Modificado a partir de www.invitrogen.com/content/sfs/manuals/trexsystem_man.pdf

3.8 Etapas da construção do pJPL46: plasmídeo para expressar a proteína eIF2 beta selvagem em células eucarióticas

3.8.1 Construção do plasmídeo pJPL03

O produto amplificado de 1350 pb referente ao cDNA de eIF2 beta humano foi clonado no plasmídeo Pin PointXa-1 T-Vector (figura 6) em uma reação de ligação como descrito na seção 3.4.3.4. A ligação foi utilizada para transformar *E. coli* JM109 (seção 3.3.4), utilizando o antibiótico ampicilina a 100 µg/ml para seleção de clones. 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 3.4.2.1. Para confirmar a presença do inserto nos diferentes clones, foi realizado tratamento com endonucleases de restrição como mostrado na seção 3.4.3.1, utilizando-se as enzimas *EcoRI* e *BamHI*. Um clone apresentando o fragmento de interesse foi selecionado e denominado pJPL03.

3.8.2 Construção do plasmídeo pJPL07

O fragmento de 1350 pb referente ao cDNA de eIF2 beta humano, para ser subclonado no plasmídeo pALTER-Ex1 (figura 7), foi isolado do pJPL03 por tratamento com as endonucleases de restrição *EcoRI* e *BamHI* em uma reação de digestão dupla, conforme seção 3.4.3.1. Foi submetido a separação em gel de agarose 1% e extraído de acordo com o protocolo da seção 3.4.4.4. O DNA obtido foi quantificado conforme descrito na seção 3.4.4.2. Foi realizada também digestão de 0,5 µg do plasmídeo pALTER-Ex1 com as endonucleases de restrição *EcoRI* e *BamHI*. Após o término da digestão, esse plasmídeo foi defosforilado como referido na seção 3.4.3.2. O fragmento de DNA de 1350 pb foi clonado em pALTER-Ex1 por uma reação de ligação (seção 3.4.3.4), em um volume final de 20 µl. Essa reação foi utilizada para transformar *E. coli* JM109 conforme a seção 3.3.4, e os clones foram selecionados com o antibiótico tetraciclina a 12,5 µg/ml. Para determinar a presença do plasmídeo recombinante, 20 colônias isoladas da transformação foram repicadas em 2 ml de meio LB contendo tetraciclina 12,5 µg/ml e crescidas a 37° C, por 16 a 18 horas. Os DNAs plasmidiais foram extraídos por lise alcalina como descrito na seção 3.4.2.1. Para confirmar a presença do inserto nos diferentes clones, foi realizado tratamento concomitante com as endonucleases de restrição *EcoRI* e *BamHI* como referido na seção 3.4.3.1. Para análise da seqüência nucleotídica dos clones que apresentaram o inserto, foi realizado o seqüenciamento automático de DNA utilizando os oligonucleotídeos ECORIF e BAMHIR (seção 3.4.4.3). Um clone apresentando o fragmento de interesse com a seqüência correta foi selecionado e denominado pJPL07.

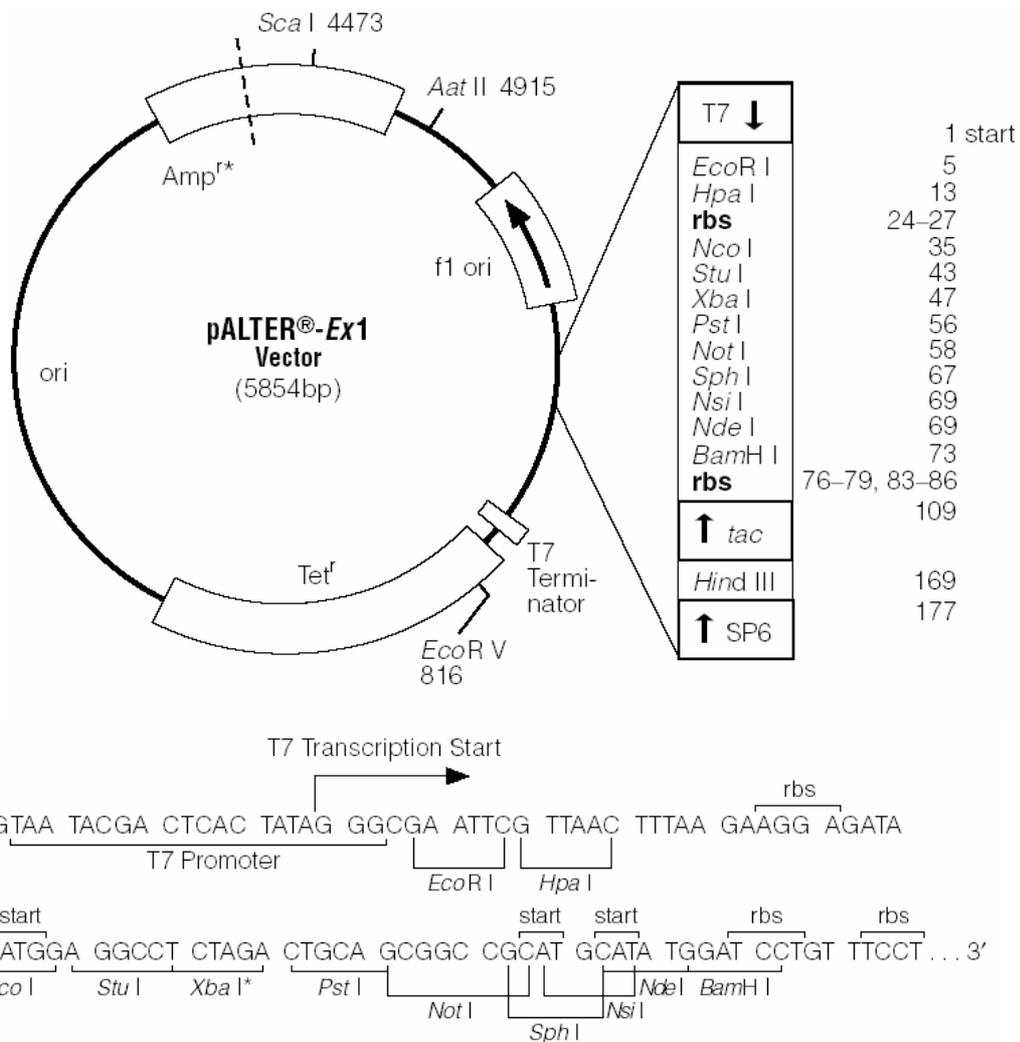


Figura 7. Representação esquemática do plasmídeo pALTER-EX1 e da seqüência do sítio de clonagem múltipla. Em destaque, na figura, estão os principais elementos do plasmídeo: genes de resistência aos antibióticos ampicilina (Amp^r) e tetraciclina (Tet^r); a origem de replicação do vírus F1 (f1 ori) e a seqüência do sítio de policlonagem. Na parte inferior da figura, estão a seqüência da região de policlonagem e os sítios para enzimas de restrição.

Modificado a partir de <http://www.promega.com/tbs/tm001/tm001.pdf>

3.8.3 Construção do plasmídeo pJPL25

Foi realizada uma reação de PCR para amplificar apenas a região codificadora do cDNA de eIF2 beta humano, que utilizou o oligonucleotídeo iniciador KPNIF, o qual contém um sítio de restrição da enzima *KpnI* na extremidade 5', além de comportar a seqüência de Kozak (A/GXXAUGG), o códon de início de tradução e o iniciador BAMHIR. O fragmento de 1318 pb referente à região codificadora do cDNA selvagem de eIF2 beta humano foi amplificado a partir do plasmídeo pJPL07, como descrito na seção 3.4.3.5, com temperatura de anelamento de 60° C e tempo de extensão de dois minutos. O produto da amplificação foi clonado em pCR2.1-TOPO, utilizando-se o *TOPO TA cloning kit* como descrito no item 3.6. Clones digeridos com a enzima de restrição *EcoRI*, que mostraram a presença de um fragmento de DNA de aproximadamente 1318 pb, foram tratados, concomitantemente, com as endonucleases de restrição *KpnI* e *BamHI*, como descrito na seção 3.4.3.1. Para análise da seqüência nucleotídica dos clones que apresentaram o inserto, foi realizado seqüenciamento de DNA utilizando os oligonucleotídeos KPNIF, COOHF e BAMHIR (seção 3.4.4.3). Um clone apresentando o fragmento de interesse com a seqüência correta foi selecionado e denominado pJPL25. O DNA desse plasmídeo foi extraído para armazenamento com o “kit” *WizardR Plus SV Minipreps DNA Purification System* (Promega), como descrito na seção 3.4.2.2.

3.8.4 Construção do plasmídeo pJPL46

A região codificadora do cDNA selvagem de eIF2 beta humano foi isolada do DNA do pJPL25. Essa reação ocorreu por tratamento concomitante com as endonucleases de restrição *KpnI* e *BamHI* de acordo com o protocolo da seção 3.4.3.1. O fragmento de DNA de 1297 pb obtido com a digestão foi isolado de gel de agarose 1% e purificado do gel, como descrito na seção 3.4.4.4. A concentração de DNA do fragmento foi estimada conforme a metodologia da seção 3.4.4.2. Uma quantidade de 0,2 µg do plasmídeo de expressão induzível

por tetraciclina pcDNA4/TO (figura 8) foi também digerida com as enzimas *KpnI* e *BamHI*. Após o término da digestão, esse plasmídeo foi defosforilado, como referido na seção 3.4.3.2. O fragmento de DNA purificado do gel de 1297 pb foi ligado ao plasmídeo pcDNA4/TO linearizado, como descrito na seção 3.4.3.4. A reação de ligação foi utilizada para a transformação por choque térmico de *E. coli* competentes por CaCl_2 , como descrito na seção 3.3.4. Os clones foram selecionados com o antibiótico ampicilina a uma concentração de 100 $\mu\text{g/ml}$. Para determinar a presença do plasmídeo recombinante, 20 colônias isoladas da transformação foram repicadas em 2 ml de meio LB, contendo ampicilina a 100 $\mu\text{g/ml}$ e crescidas a 37° C, por 16 a 18 horas. Os DNAs plasmidiais foram extraídos por lise alcalina, como descrito na seção 3.4.2.1. Para confirmar a presença do inserto nos diferentes clones, foi realizado tratamento com endonucleases de restrição, como descrito na seção 3.4.3.1, utilizando-se as enzimas *KpnI* e *BamHI*. Para análise da seqüência nucleotídica dos clones que apresentaram o inserto, foi realizado seqüenciamento de DNA utilizando os oligonucleotídeos KPNIF, COOHF e BAMHIR (seção 3.4.4.3). Um clone apresentando o fragmento de interesse com a seqüência correta foi selecionado e denominado pJPL46. O DNA desse plasmídeo foi extraído para armazenamento com “kit” *WizardR Plus SV Minipreps DNA Purification System* (Promega), como descrito na seção 3.4.2.2.

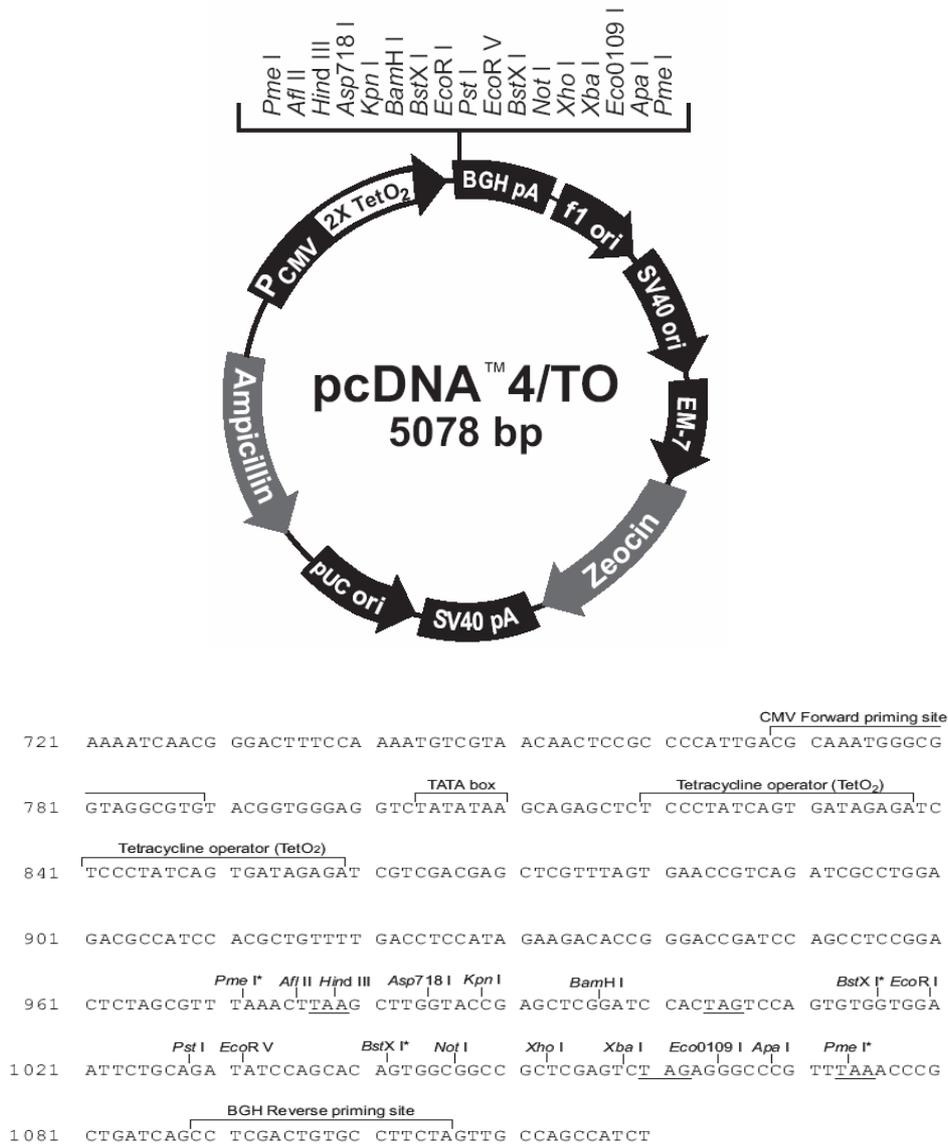


Figura 8. Representação esquemática do plasmídeo pcDNA4/TO e da seqüência do sítio de clonagem múltipla. Em destaque, na figura, estão os principais elementos do plasmídeo: genes de resistência aos antibióticos ampicilina e zeocina; origem de replicação derivada do vírus F1; origem de replicação de PUC; promotor e origem de replicação de SV40; o promotor do CMV contendo duas cópias do operador de tetraciclina e o TATAbox; SV40pA e BGHpA (sinal de poliadenilação de SV40 e do hormônio do crescimento bovino respectivamente) que permitem a adição da cauda poliA; o promotor EM-7, que é um promotor sintético que permite a expressão do gene de resistência a zeocina em *E. coli*, e o sítio de policlonagem. Na parte inferior da figura, estão representados a seqüência da região de clonagem e os sítios para as enzimas de restrição. Modificado a partir de <http://www.invitrogen.com/content/sfs/vectors/pcdna4to.pdf>

3.9 Etapas da construção do pJPL50: plasmídeo para expressar a proteína de eIF2 beta humana desprovida dos três blocos de lisina em células eucarióticas

3.9.1 Construções dos plasmídeos pJPL10, pJPL11 e pJPL17

Os plasmídeos pJPL10, pJPL11 e pJPL17, contendo a deleção do primeiro; do primeiro e segundo; do primeiro, segundo e terceiro blocos de lisina, respectivamente, foram construídos por mutagênese sítio dirigida, utilizando-se o sistema *Altered Sites II in vitro Mutagenesis System* (Promega), conforme o protocolo descrito no item 3.4.3.7. Para análise e confirmação da deleção de cada bloco de lisinas foi realizado seqüenciamento de DNA dos referidos plasmídios utilizando os oligonucleotídeos KPNIF, COOHF e BAMHIR (seção 3.4.4.3).

3.9.2 Construção do plasmídeo pJPL26

Foi realizada uma reação de PCR para amplificar apenas a região codificadora do cDNA de eIF2 beta humano desprovido dos três blocos de lisinas por mutagênese, que utilizou os oligonucleotídeos iniciadores KPNIF e BAMHIR. O fragmento de 1240 pb referente ao cDNA de eIF2 beta humano deletado foi amplificado a partir do plasmídeo pJPL17, como descrito na seção 3.4.3.5, com temperatura de anelamento de 60° C e tempo de extensão de dois minutos. O produto da amplificação foi clonado em pCR2.1-TOPO, utilizando-se o *TOPO TA cloning kit*, como descrito no item 3.6. Clones que foram digeridos com a enzima de restrição *EcoRI*, e mostraram a presença de um fragmento de DNA de aproximadamente 1240 pb, foram tratados, concomitantemente, com as endonucleases de restrição *KpnI* e *BamHI*, como descrito na seção 3.4.3.1. Para análise da seqüência nucleotídica dos clones que apresentaram o inserto, foi realizado seqüenciamento de DNA utilizando os oligonucleotídeos KPNIF, COOHF e BAMHIR (seção 3.4.4.3). Um clone apresentando o fragmento de

interesse com a seqüência correta foi selecionado e denominado pJPL26. O DNA desse plasmídeo foi extraído para armazenamento com o “kit” *WizardR Plus SV Minipreps DNA Purification System* (Promega), como descrito na seção 3.4.2.2.

3.9.3 Construção do plasmídeo pJPL50

Para essa construção, o fragmento a ser isolado correspondente à região codificadora do cDNA de eIF2 beta humano desprovido dos três blocos de lisina foi obtido a partir do pJPL26. O protocolo utilizado para isolamento do fragmento de 1219 pb, digestão desse fragmento, digestão do plasmídeo pcDNA4/TO, reação de ligação, transformação das bactérias, seleção e análise dos clones recombinantes foi o mesmo descrito na seção 3.8.4. Após a análise das seqüências dos clones por seqüenciamento de DNA utilizando os oligonucleotídeos KPNIF, COOHF e BAMHIR (seção 3.4.4.3), um clone apresentando o fragmento de interesse com a seqüência correta foi selecionado e denominado pJPL50. O DNA desse plasmídeo foi extraído para armazenamento com o “kit” *WizardR Plus SV Minipreps DNA Purification System* (Promega), como descrito no item 3.4.2.2.

3.10 Etapas da construção do pJPL60: plasmídeo para expressar a porção amino-terminal da proteína eIF2 beta em células eucarióticas

3.10.1 Construção do plasmídeo pJPL27

Essa construção foi realizada com o objetivo de obter uma forma truncada de eIF2 beta humano, contendo apenas a região do cDNA correspondente à porção amino-terminal da proteína eIF2 beta humana (aminoácido (aa) 1-157) (posição 117-587). Para isso, foi realizada uma reação de PCR, como descrito na seção 3.4.3.5, sendo a temperatura de anelamento 62° C e o tempo de extensão, um minuto. Nessa reação, o DNA molde utilizado foi o pJPL07, e os iniciadores

foram KPNIF e NH2R, os quais amplificaram um fragmento de 511 pb. No iniciador reverso NH2R, foi inserido um códon de terminação e um sítio de restrição, próximo à extremidade 5', para a endonuclease *Bam*HI. O fragmento de DNA amplificado foi clonado no plasmídeo pCR2.1-TOPO, conforme descrito no item 3.6. Clones que foram digeridos com a enzima de restrição *Eco*RI, e mostraram a presença de um fragmento de DNA de aproximadamente 511 pb, foram tratados, concomitantemente, com as endonucleases de restrição *Kpn*I e *Bam*HI, como descrito na seção 3.4.3.1. Um clone apresentando o fragmento de interesse de 486 pb foi selecionado e denominado pJPL27. O DNA desse plasmídeo foi extraído para armazenamento com “kit” *WizardR Plus SV Minipreps DNA Purification System* (Promega), como descrito na seção 3.4.2.2.

3.10.2 Construção do plasmídeo pJPL60

Nessa construção, a seqüência nucleotídica do cDNA de eIF2 beta humano referente à região que codifica a porção amino-terminal da proteína contendo 486 pb foi isolada do pJPL27 por digestão dupla com as endonucleases de restrição *Kpn*I e *Bam*HI, como descrito na seção 3.4.3.1. Esse fragmento foi, então, clonado no plasmídeo pcDNA4/TO. O protocolo utilizado para digestão do plasmídeo pcDNA4/TO, reação de ligação, transformação das bactérias, seleção e análise dos clones recombinantes foi o mesmo descrito na seção 3.8.4. Após a análise da seqüência dos clones por seqüenciamento de DNA utilizando os oligonucleotídeos KPNIF e NH2R (seção 3.4.4.3), um clone apresentando o fragmento de DNA de 486 pb de interesse com a seqüência correta foi selecionado e denominado pJPL60. O DNA desse plasmídeo foi extraído para armazenamento com o “kit” *WizardR Plus SV Minipreps DNA Purification System* (Promega), como descrito na seção 3.4.2.2.

3.11 Etapas da construção do pJPL62: plasmídeo para expressar a porção carboxi-terminal da proteína eIF2 beta humana em células eucarióticas

3.11.1 Construção do plasmídeo pJPL30

Essa construção foi realizada com o objetivo de obter outra forma truncada do cDNA de eIF2 beta humano através da clonagem apenas da região do DNA correspondente à porção carboxi-terminal da proteína (compreendido do 158aa até o codon de terminação) (posição 588 - 1416). Foi realizada uma reação de PCR que teve como molde o plasmídeo pJPL07 e que utilizou os iniciadores COOHF e BAMHIR os quais amplificaram um fragmento de 847pb. No iniciador direto COOHF foi inserido um sítio de restrição, próximo à extremidade 5', para a enzima *KpnI*, além da seqüência de Kozak e do códon de início AUG. A reação de PCR foi realizada como descrito na seção 3.4.3.5 sendo a temperatura de anelamento 55°C e o tempo de extensão 1 minuto. O fragmento amplificado de 847pb foi clonado em pCR2.1-TOPO como descrito na seção 3.6. Clones que foram digeridos com a enzima de restrição *EcoRI* e mostraram a presença de um fragmento de DNA de aproximadamente 847pb foram tratados, concomitantemente, com as endonucleases de restrição *KpnI* e *BamHI* como descrito na seção 3.4.3.1 liberando um fragmento de 829pb. Um clone apresentando o fragmento de interesse foi selecionado e denominado pJPL30. A fim de obter DNA puro, o DNA desse plasmídeo foi extraído para armazenamento com o "kit" *WizardR Plus SV Minipreps DNA Purification System* (Promega) como descrito na seção 3.4.2.2.

3.11.2 Construção do plasmídeo pJPL62

Nessa construção, a seqüência nucleotídica de 829 pb referente à região do cDNA de eIF2 beta que codifica a porção carboxi-terminal da proteína foi isolada do pJPL30 por digestão dupla com as enzimas *KpnI* e *BamHI*, como descrito na seção 3.4.3.1, e ligada ao plasmídeo pcDNA4/TO. O protocolo

utilizado para digestão do plasmídeo pcDNA4/TO, reação de ligação, transformação das bactérias, seleção e análise dos clones recombinantes foi o mesmo descrito na seção 3.8.4. Também, após a análise das seqüências dos clones obtidos por seqüenciamento de DNA utilizando os oligonucleotídeos COOHIF e BAMHIR, um clone apresentando a seqüência nucleotídica de 829 pb de interesse correta foi selecionado e denominado pJPL62. O DNA desse plasmídeo foi extraído para armazenamento com “kit” *WizardR* “Plus SV Minipreps DNA Purification System” (Promega), como descrito na seção 3.4.2.2.

3.12 Etapas da construção do pJPL63: plasmídeo para expressar o repressor Tet e a EGFP sob controle do promotor de CMV

3.12.1 Construção do plasmídeo pJPL33

Com o intuito de obter, primeiramente, a clonagem isolada da seqüência do promotor de CMV (figura 9), foi realizada uma reação de PCR que teve como molde o DNA do plasmídeo pCR 3.1 e como iniciadores os oligonucleotídeos CMVXF e CMVAGR. O iniciador CMVXF foi produzido para comportar um sítio de restrição à enzima *XhoI*, e o iniciador CMVAGR foi feito a fim de apresentar um sítio para a enzima *AgeI*. A reação foi realizada como descrito na seção 3.4.3.5, sendo a temperatura de anelamento dos iniciadores de 48° C, e o tempo de extensão de um minuto. O fragmento amplificado teve um tamanho de 676 pb e foi utilizado para ser clonado no plasmídeo pCR2.1-TOPO, como descrito na seção 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*, cujos sítios estão localizados nas regiões flanqueadoras da região de inserção do fragmento no plasmídeo pCR2.1-TOPO. Clones que mostraram a presença de um fragmento de aproximadamente 676 pb foram tratados com as endonucleases de restrição *AgeI* e *XhoI*, como referido na seção 3.4.3.1, para verificar a presença de um fragmento de 658 pb. Após a análise das seqüências desses clones por seqüenciamento de DNA utilizando os oligonucleotídeos CMVXF

e CMVAGR, um clone apresentando a sequência nucleotídica de interesse correta foi selecionado e denominado pJPL33. O DNA desse plasmídeo foi extraído para armazenamento com “kit” *WizardR Plus SV Minipreps DNA Purification System* (Promega), como descrito na seção 3.4.2.2, e foi utilizado para a construção do plasmídeo pJPL40.

```
5'...aacaaaaatttaacgcgaattttaacaaaatattaacgcttacaatttacgcgcgcttgacattgat  
tattgactagttattaatagtaatcaattacggggtcattagttcatagcccatatatggagttccgcgcttac  
ataacttacggtaaatggcccgcctggctgaccgccaacgacccccgccattgacgtcaataatgacgtat  
gttcccataagtaacgccaatagggactttccattgacgtcaatgggtggactatttacggtaaaactgccact  
tggcagtacatcaagtgtatcatatgccaagtacgccccctattgacgtcaatgacggtaaatggcccgcctg  
gcattatgccagtacatgaccttatgggactttcctacttggcagtacatctacgtattagtcacgctatt  
accatgggtgatgcggttttggcagtacatcaatgggctggatagcggtttgactcacggggatttccaagtc  
tccaccccattgacgtcaatgggagtttgttttggcaccaaaatcaacgggactttccaaaatgtcgtaacaa  
ctccgccccattgacgcaaatgggcggtaggcgtgtacgggtgggaggtctatataagcagagctctctggcta  
actagagaaccactgcttactggcttatcgaaattaatacgactcac...3'
```

Figura 9. Seqüência do promotor de citomegalovírus humano (pCMV) retirado de pCR 3.1 que permite altos níveis de expressão do gene recombinante em células eucarióticas. A seqüência em negrito corresponde à região onde foi desenhado o oligonucleotídeo iniciador direto CMVXF. A seqüência sublinhada corresponde à região onde foi desenhado o oligonucleotídeo reverso CMVAGR.

Modificado a partir de http://www.invitrogen.com/content/sfs/vectors/pcr3.1_seq.txt

3.12.2 Construção do plasmídeo pJPL40

Para obter a seqüência da GFP sob controle do promotor de CMV, esse promotor foi clonado no plasmídeo pEGFP-1 (figura 10) que codifica uma variante da GFP selvagem de 710 pb (figura 11). Primeiramente, o pJPL33 foi submetido à digestão dupla com as endonucleases de restrição *Agel* e *XhoI*, conforme seção 3.4.3.1. O fragmento de DNA de 658 pb isolado foi então submetido à eletroforese em gel de agarose 1% e extraído do gel de acordo com o protocolo da seção 3.4.4.4. A concentração de DNA obtida foi quantificada conforme descrito na seção 3.4.4.2. Foi realizada também a digestão de 0,5 µg do pEGFP-1 com as endonucleases de restrição *Agel* e *XhoI* (item 3.4.3.1). Após o término da digestão, esse plasmídeo foi defosforilado como referido na seção 3.4.3.2. O fragmento de 658 pb foi inserido em pEGFP-1 por uma reação de ligação (seção 3.4.3.4), a qual foi utilizada para transformar *E. coli* JM109 por choque térmico (seção 3.3.4). Os clones foram selecionados com o antibiótico kanamicina a 30 µg/ml, em meio LB suplementado com ágar 2%. Para determinar a presença do plasmídeo recombinante, foram isoladas 20 colônias da transformação que foram repicadas em 2 ml de meio LB, contendo kanamicina a 30 µg/ml e crescidas a 37° C, por 16 a 18 horas. Os DNAs plasmidiais foram extraídos por lise alcalina como descrito na seção 3.4.2.1. Para confirmar a presença do inserto nos diferentes clones, foi realizada digestão dupla com as endonucleases de restrição *Agel* e *XhoI*, como feito anteriormente nessa seção. Um clone apresentando a seqüência de interesse foi selecionado e denominado pJPL40. O DNA desse plasmídeo foi extraído para armazenamento com o “kit” *WizardR Plus SV Minipreps DNA Purification System* (Promega), como descrito na seção 3.4.2.2, e foi utilizado para a construção do plasmídeo pJPL43.

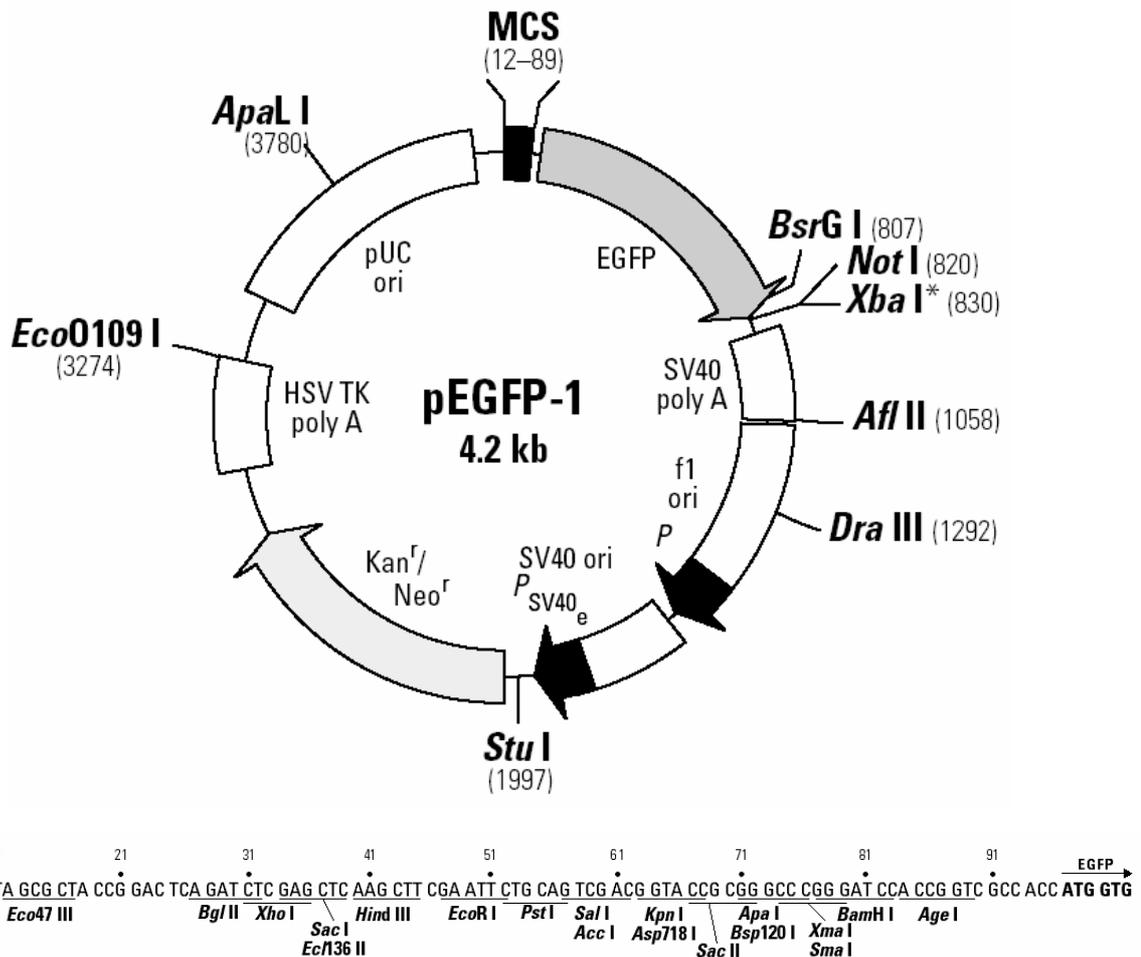


Figura 10. Representação esquemática do plasmídeo pEGFP-1 e da seqüência do sítio de clonagem múltipla. Em destaque, na figura, estão os principais elementos do plasmídeo: genes de resistência aos antibióticos neomicina (Neo^r) e kanamicina (Kan^r); origem de replicação derivada do vírus f1 (f1 ori) e de pUC (pUC ori); sinal de poliadenilação de SV40 (SV40 polyA) sinal de poliadenilação de timidina quinase de virus *Herpes simplex* (HSV TK polyA); origem de SV40 (SV40 ori); promotor de SV40 (PSV40). Na parte inferior da figura, estão representados a seqüência da região de clonagem e os sítios para as enzimas de restrição. Modificado a partir de <http://www.bdbioscience.com/clontech/techinfo/vectors/vectorsE/pdf/PT3026-5.pdf>

```

...5'61 acggtaccgc gggcccggga tccaccggtc gccaccatgg tgagcaaggg gaggagctg
121 ttcaccgggg tggtgcccat cctggtcgag ctggacggcg acgtaaacgg ccacaagttc
181 agcgtgtccg gcgagggcga gggcgatgcc acctacggca agctgaccct gaagttcatc
241 tgcaccaccg gcaagctgcc cgtgccctgg cccaccctcg tgaccacct gacctacggc
301 gtgcagtgct tcagccgcta ccccgaccac atgaagcagc acgacttctt caagtccgcc
361 atgcccgaag gctacgtcca ggagcgcacc atcttcttca aggacgacgg caactacaag
421 acccgcgccg aggtgaagtt cgagggcgac accctgggta accgcatcga gctgaagggc
481 atcgacttca aggaggacgg caacatcctg gggcacaagc tggagtacaa ctacaacagc
541 cacaacgtct atatcatggc cgacaagcag aagaacggca tcaaggtgaa cttcaagatc
601 cgccacaaca tcgaggacgg cagcgtgcag ctgcgccgacc actaccagca gaacaccccc
661 atcggcgacg gccccgtgct gctgcccgcac aaccactacc tgagcaccca gtccgccctg
721 agcaaagacc ccaacgagaa gcgcgatcac atggtcctgc tggagtctgt gaccgccgcc
781 gggatcactc tcggcatgga cgagctgtac aagtaaagcg gccgcgactc tagatcataa
841 tcagccatac cacatcttga gaggttttac ttgctttaa aaacctccca cacctcccc
901 tgaacctgaa acataaaatg aatgcaattg ttgttgtaa cttgtttatt gcagcttata
961 atggttacia ataaagcaat agcatcacia atttcacaaa taaagcattt ttttactgc
1021 attctagttg tggtttgtcc aaactcatca atgtatctta aggcgtaaat tgtaag 3'.
..

```

Figura 11. Representação da seqüência da variante de GFP no plasmídeo pEGFP-1. Em destaque, em negrito, estão os códons de início (atg) e de terminação (taa). A seqüência sublinhada representa a seqüência original do oligonucleotídeo iniciador EGFPXI. Modificação a partir de <http://www.bdbiosciences.com/clontech/techinfo/vectors/vectorsE/text/pEGFP-1.txt>

3.12.3 Construção do plasmídeo pJPL43

Com o intuito de isolar o fragmento referente à EGFP sob controle do promotor CMV e inserir um sítio de restrição para a endonuclease *XhoI* na região flanqueadora 3' dessa seqüência, foi realizada uma reação de PCR, tendo como molde o DNA do plasmídeo pJPL40. Na reação, foram utilizados os iniciadores CMVXF e EGFPXR. Esse último continha o sítio de restrição para *XhoI*. A reação ocorreu como descrita na seção 3.4.3.5, sendo a temperatura de anelamento dos iniciadores de 48° C e o tempo de extensão de dois minutos. O fragmento de DNA amplificado apresentou 1.660 pb e foi clonado em pCR2.1-TOPO, como descrito na seção 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*. Clones digeridos que mostraram a presença de um fragmento de aproximadamente 1.660 pb foram tratados com a endonuclease de restrição *XhoI*, como descrito no item 3.4.3.1, para liberar um fragmento de 1.631 pb. Para análise da seqüência nucleotídica dos clones que mostraram apresentar o inserto, foi realizado seqüenciamento de DNA utilizando os oligonucleotídeos CMVXF, CMVAGR e EGFPXR (seção 3.4.4.3). Um clone apresentando a seqüência nucleotídica de interesse correta foi selecionado e denominado pJPL43. O DNA desse plasmídeo foi extraído para armazenamento com o "kit" *WizardR Plus SV Minipreps DNA Purification System* (Promega), como descrito na seção 3.4.2.2, e foi utilizado para a construção do plasmídeo pJPL63.

3.12.4 Construção do plasmídeo pJPL63

Com o propósito de construir um plasmídeo que expresse o repressor de tetraciclina e a GFP sob controle do promotor de CMV, foi construído o plasmídeo pJPL63. A seqüência nucleotídica referente ao promotor de CMV mais a proteína EGFP foi isolada do pJPL43, por tratamento com a endonuclease de restrição *XhoI*, de acordo com o protocolo da seção 3.4.3.1. O fragmento de DNA de 1.631

pb obtido com a digestão foi submetido a eletroforese em gel de agarose 1% e purificado do gel como descrito na seção 3.4.4.4. A concentração de DNA do fragmento foi estimada conforme a metodologia da seção 3.4.4.2. Uma quantidade de 0,2 µg do plasmídeo pcDNA6/TR, que expressa o repressor Tet (figura 12), foi também digerida com a endonuclease de restrição *Xho*I de acordo com o item 3.4.3.1. Após o término da digestão, esse plasmídeo foi defosforilado como mostrado na seção 3.4.3.2. O fragmento de DNA purificado do gel foi ligado ao plasmídeo pcDNA6/TR (seção 3.4.3.4). A reação de ligação foi utilizada para a transformação de *E. coli* JM109 por choque térmico como descrito no item 3.3.4. Os clones foram selecionados com o antibiótico ampicilina a uma concentração de 100 µg/ml. Para determinar a presença do plasmídeo recombinante, 20 colônias foram isoladas da transformação, 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 3.4.2.1. Para confirmar a presença do inserto nos diferentes clones, foi, primeiramente, realizado tratamento com a enzima de restrição *Xho*I e, posteriormente, foi realizada digestão dupla com as enzimas *Xho*I e *Age*I. (seção 3.4.3.1). Para análise da seqüência nucleotídica dos clones que mostraram apresentar o inserto, foi realizado seqüenciamento de DNA utilizando os oligonucleotídeos CMVXF, CMVAGR e EGFPXR (seção 3.4.4.3). Um clone apresentando o fragmento de interesse foi selecionado e denominado pJPL63. O DNA desse plasmídeo foi extraído para armazenamento com o “kit” *WizardR Plus SV Minipreps DNA Purification System* (Promega), como descrito na seção 3.4.2.2.

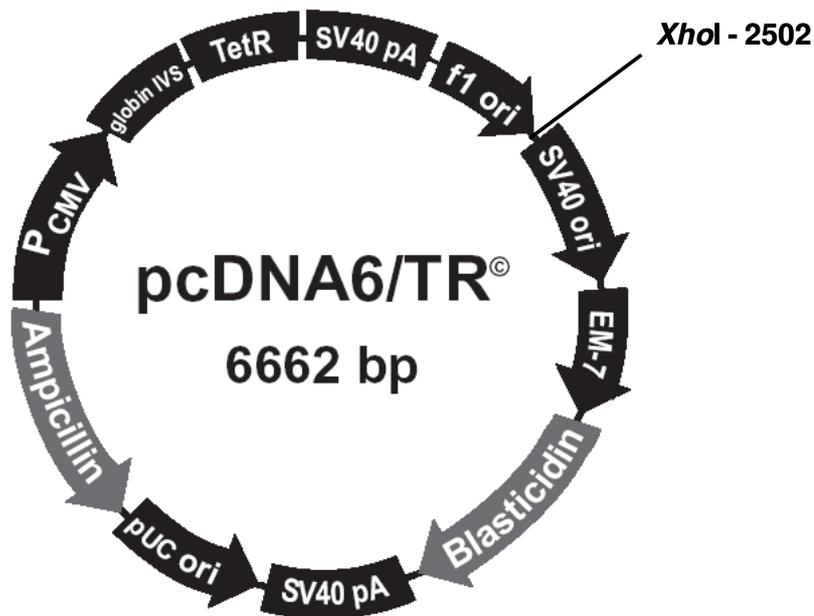


Figura 12. Representação esquemática do plasmídeo pcDNA6/TR. Em destaque, na figura, estão os principais elementos do plasmídeo: genes de resistência aos antibióticos ampicilina e blastidina; origem de replicação derivada do vírus F1 (f1 ori); origem de replicação de pUC (pUC ori); promotor do CMV (PCMV); o gene do repressor de tetraciclina (TetR); sinal de poliadenilação de SV40 (SV40pA) que permite a adição da cauda poliA; o promotor EM-7 que é um promotor sintético de procaríotos e permite a expressão do gene de resistência à blastidina em *E. coli*. e Intron II de beta-globina de coelho (IVS) (globin IVS). Modificado a partir de http://www.invitrogen.com/content/sfs/vectors/pcdna6tr_map.pdf

3.13 Construções de vetores para a expressão da proteína eIF2 beta humana em células procarióticas

3.13.1 Obtenção da região codificadora de eIF2 beta humano

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 nos vetores de expressão em células procarióticas Pin Point Xa-1 T-Vector e Pin Point Xa-1 Vector quando esses vetores são clivados 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 pJPL03. A reação foi feita conforme descrito na seção 3.4.3.5, apresentando temperatura de anelamento de 52° C e tempo de extensão de dois minutos. 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.

3.13.2 Construção do plasmídeo pJPL13

Para a construção de um plasmídeo que expressasse a proteína eIF2 beta humana, foi escolhido o vetor Pin Point Xa-1 T-Vector (figura 6) que permite a clonagem direta de produtos de PCR. Esse plasmídeo compõe o sistema *Pin Point Xa-1 T-Vector Systems* (Promega) o qual permite a expressão e purificação de proteínas biotinizadas devido à presença de um “tag” de biotina no plasmídeo.

O produto amplificado na seção 3.13.1 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 para completar o volume. Essa reação foi utilizada para transformação em *E. coli* JM109, como descrito na seção 3.3.4. 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 3.4.2.1. Para confirmar a presença do inserto nos diferentes clones, foi realizada digestão dupla com endonucleases de restrição, como mostrado na seção 3.4.3.1, utilizando-se as enzimas *NruI* e *BamHI*. Um clone apresentando o fragmento de interesse de 1.292 pb foi selecionado e denominado pJPL13.

3.13.3 Construção do plasmídeo pJPL14

Para que o gene de eIF2 beta fosse colocado em fase de leitura correta, o pJPL13 foi tratado com a endonuclease *NruI*, como descrito na seção 3.4.3.1, 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 3.3.4. 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 3.4.2.1. Para confirmar a presença do inserto nos diferentes clones, foi realizado tratamento duplo com endonucleases de restrição, com as enzimas *NruI* e *BamHI*, como descrito na seção 3.4.3.1. Para análise da seqüência nucleotídica dos clones que mostraram apresentar o inserto, foi realizado seqüenciamento de DNA utilizando os oligonucleotídeos NRUIF, COOHF e BAMHIR (seção 3.4.4.3). Um clone apresentando o fragmento de interesse de 1.292 pb com a seqüência nucleotídica correta foi selecionado e denominado pJPL14.

3.13.4 Construção do plasmídeo pJPL15

Para a realização desta construção, foi utilizado o plasmídeo Pin Point Xa-1 Vector (figura 13) que integra o *Pin Point Xa Protein Purification System* (Promega). Esse sistema foi elaborado para a expressão e purificação de proteínas biotinizadas, devido à presença de um “tag” de biotina na seqüência nucleotídica do vetor Pin Point Xa-1 Vector.

A partir do plasmídeo pJPL14, o fragmento referente ao cDNA de eIF2 beta humano selvagem foi isolado por digestão dupla com as enzimas *NruI* e *BamHI*, como descrito na seção 3.4.3.1. O fragmento de 1.292 pb foi submetido a migração em gel de agarose 1% e retirado do gel de acordo com a seção 3.4.4.4. O plasmídeo Pin Point Xa-1 Vector, foi também digerido concomitantemente com as enzimas *NruI* e *BamHI*, conforme a seção 3.4.3.1. O fragmento tirado do gel foi ligado ao Pin Point Xa-1 Vector, como descrito na seção 3.4.3.4. A reação de ligação foi transformada em *E. coli* JM109 por choque térmico, como referenciado no item 3.3.4. 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 3.4.2.1. Para confirmar a presença do inserto de 1.282 pb nos diferentes clones, foi realizado tratamento com as endonucleases de restrição *NruI* e *BamHI*, como descrito no item 3.4.3.1. Para análise da seqüência nucleotídica dos clones que mostraram apresentar o inserto, foi realizado seqüenciamento de DNA utilizando os oligonucleotídeos NRUIF, COOHF e BAMHIR (seção 3.4.4.3). Um clone apresentando o fragmento de interesse foi selecionado e denominado pJPL15.

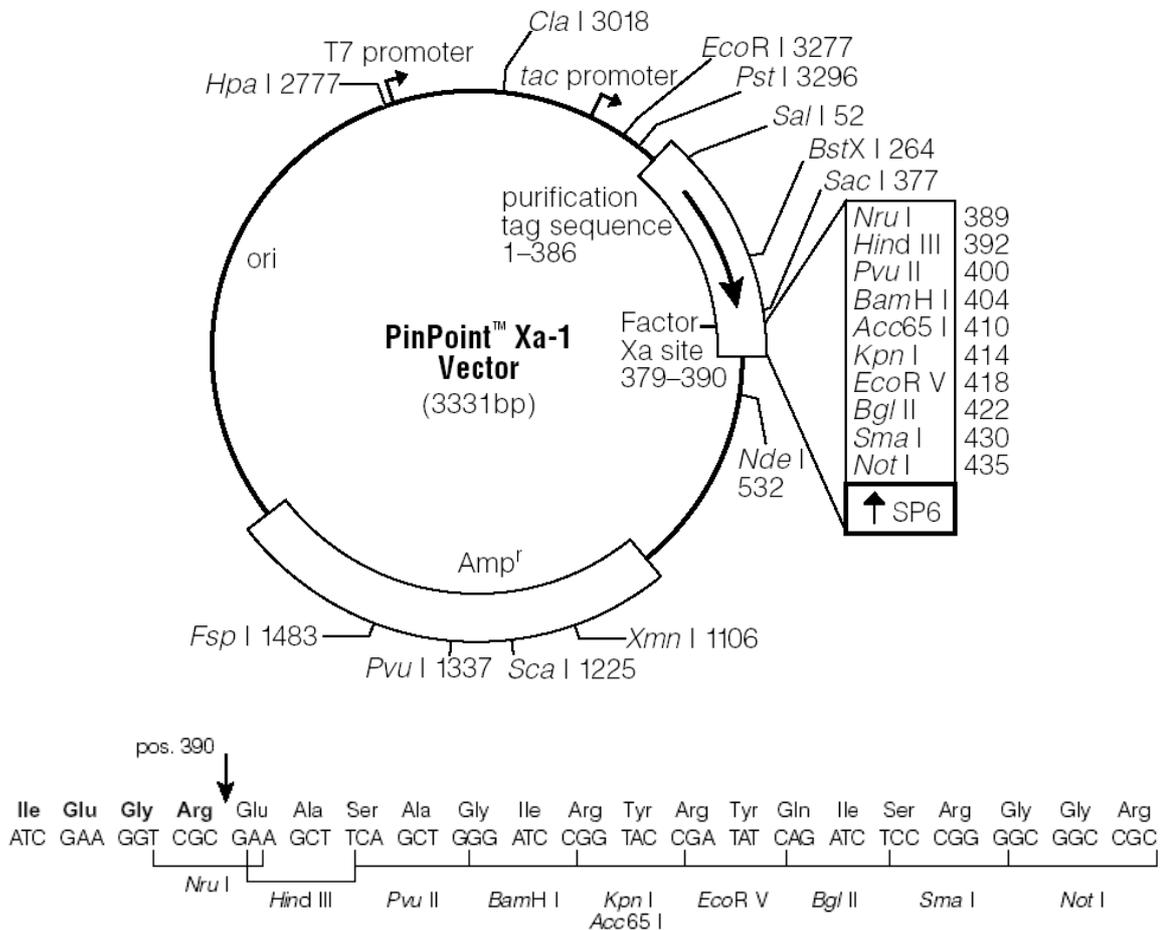


Figura 13. Representação esquemática do plasmídeo Pin Point Xa-1 Vector e da seqüência do sítio de clonagem múltipla. Em destaque, na figura, estão os principais elementos do plasmídeo: gene de resistência ao antibiótico ampicilina (Amp^r), seqüência do “tag” de biotina para purificação, sítio de reconhecimento da endoproteínase fator Xa e o sítio de policlonagem. Na parte inferior da figura, estão a seqüência da região de clonagem e os sítios para enzimas de restrição. Modificado a partir de <http://www.promega.com/tbs/tm028/tm028.pdf>

3.13.5 Construção do plasmídeo pJPL64

Para a obtenção de um fragmento composto por um “tag” de biotina, encontrado no plasmídeo Pin Point Xa-1 Vector, mais a região codificadora de eIF2 beta humano selvagem, foi realizada uma reação de PCR que teve como DNA molde o pJPL15. Para a realização dessa reação, foi criado o oligonucleotídeo iniciador NDEIF, que contém por 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 3.4.3.5. Esse produto de PCR foi ligado ao plasmídeo pCR2.1-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 3.4.3.1. 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 3.4.3.1). Um clone apresentando o fragmento de interesse foi selecionado e denominado pJP64. O DNA desse plasmídeo foi extraído para armazenamento pelo “kit” *WizardR Plus SV Minipreps DNA Purification System* (Promega), como descrito na seção 3.4.2.2.

3.13.6 Construção do plasmídeo pJPL65

O 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 3.4.4.4). O plasmídeo pET-23a(+) (figura 14) também foi do mesmo modo digerido com essas duas enzimas. A reação de ligação foi realizada num volume final de 20 µl, como descrito na seção 3.4.3.4, e transformada em *E. coli* JM109, como na seção 3.3.4. 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 3.4.2.1. A presença de plasmídeos recombinantes foi analisada por digestão dupla com as enzimas *NdeI* e *BamHI*, como referido na seção 3.4.3.1. A análise da seqüência dos clones que apresentaram o fragmento de interesse foi realizada por seqüenciamento de DNA utilizando os oligonucleotídeos NDEIF, COOHF e BAMHIR, como descrito na seção 3.4.4.3. Foi selecionado um plasmídeo recombinante com a seqüência correta que 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 3.4.2.2.

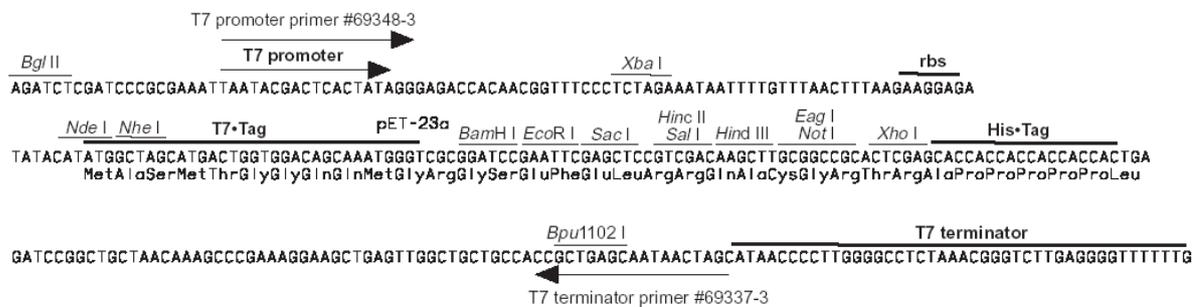
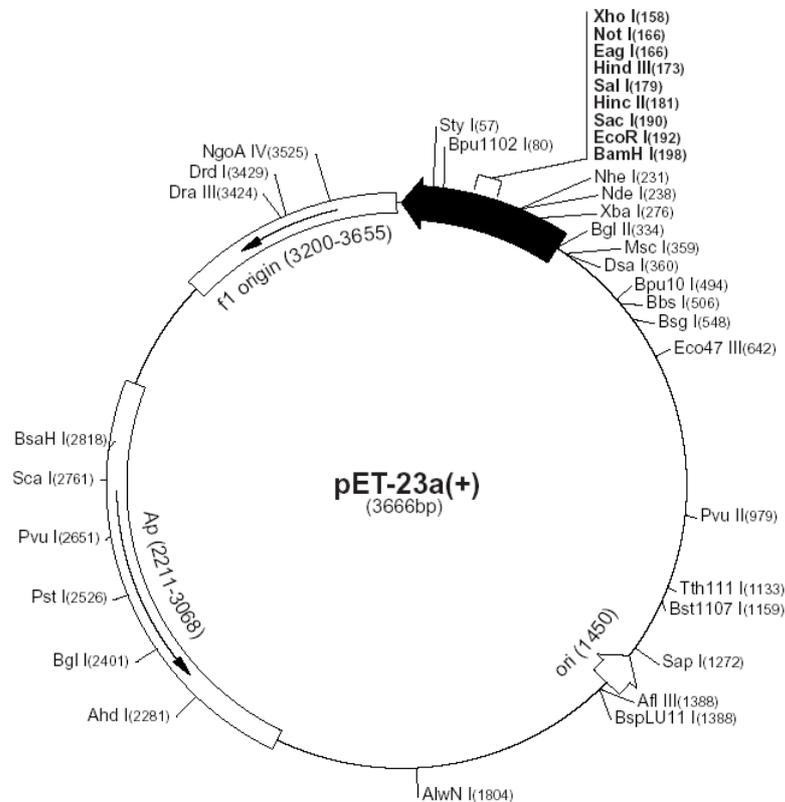


Figura 14. Representação esquemática do plasmídeo pET-23^a(+) e da seqüência do sítio de clonagem múltipla. Em destaque, na figura, estão os principais elementos do plasmídeo: gene de resistência ao antibiótico ampicilina (Ap), seqüência do “tag” de histidina para purificação, seqüência do “tag” T7 e promotor T7 contidos na seta preta; origem de replicação derivada do vírus f1; origem de replicação do pBR322 (ori-1450); sítio de policlonagem. Na parte inferior da figura, estão a seqüência da região de clonagem e os sítios para enzimas de restrição. Modificado a partir de <http://www.merckbiosciences.com/docs/docs/PROT/TB051.pdf>

Capítulo 4

Resultados

4. RESULTADOS

4.1 Obtenção de eIF2 beta humano selvagem

Foi realizada uma reação de PCR, utilizando os oligonucleotídeos iniciadores ECORIF e BAMHIR que inserem sítios de restrição para as endonucleases *EcoRI* e *BamHI* respectivamente. A reação teve como molde cDNA total de células K562 e amplificou um fragmento de 1342 pb (figura 15).

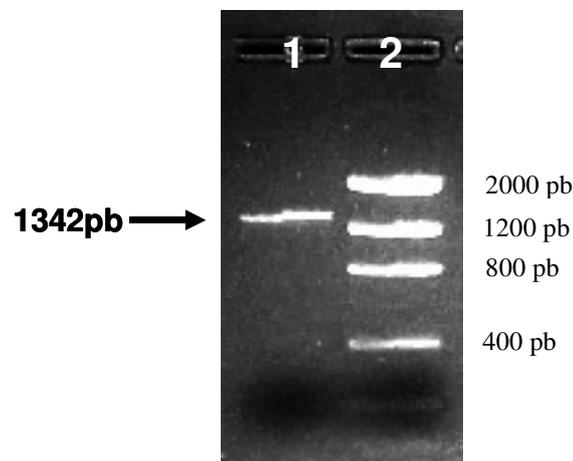


Figura 15. Produto de PCR gerado com a enzima Taq DNA Polimerase. Linha 1: produto de amplificação por PCR do fragmento de 1318 pb referente ao cDNA de eIF2 beta humano selvagem, utilizando os oligonucleotídeos iniciadores ECORIF e BAMHIR; linha 2: marcador de peso molecular DNA Low Mass Ladder. A seta indica o fragmento de interesse.

Esse fragmento de PCR foi clonado no plasmídeo Pin Point Xa-1 T-Vector o qual é elaborado para esse tipo de clonagem (figura 16).

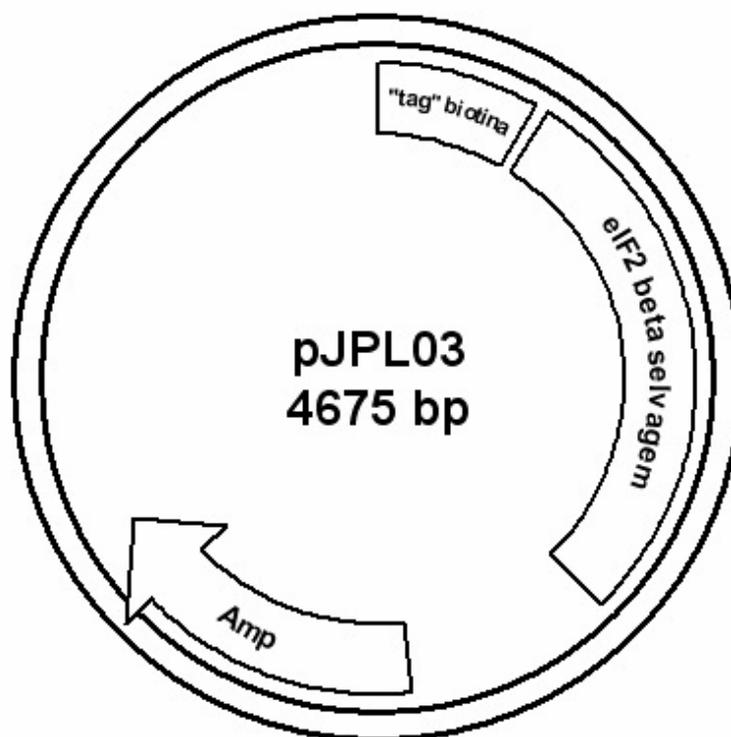


Figura 16. Representação do plasmídeo pJPL03. No plasmídeo de expressão Pin Poin Xa-1 T-Vector, foi inserido o produto de PCR de eIF2 beta selvagem humano, utilizando os iniciadores ECORIF e BAMHIR que inserem sítios de restrição para as enzimas *EcoRI* e *BamHI* respectivamente. Em destaque, estão os elementos principais: o produto do PCR de eIF2 beta humano de 1342 pb; o gene de resistência à ampicilina (Amp) e o “tag” de biotina para purificação de proteínas expressas nesse vetor.

A fim de isolar o fragmento referente ao cDNA de eIF beta humano selvagem de pJPL03, esse plasmídeo foi digerido com as endonucleases de restrição *EcoRI* e *BamHI* como demonstrado na figura 17.

Esse fragmento de 1326 pb foi então subclonado no plasmídeo pALTER-EX1, nos sítios de restrição de *EcoRI* e *BamHI*. Os clones foram seqüenciados, e um clone com a seqüência correta originou o plasmídeo pJPL07 (figuras 18 e 19).

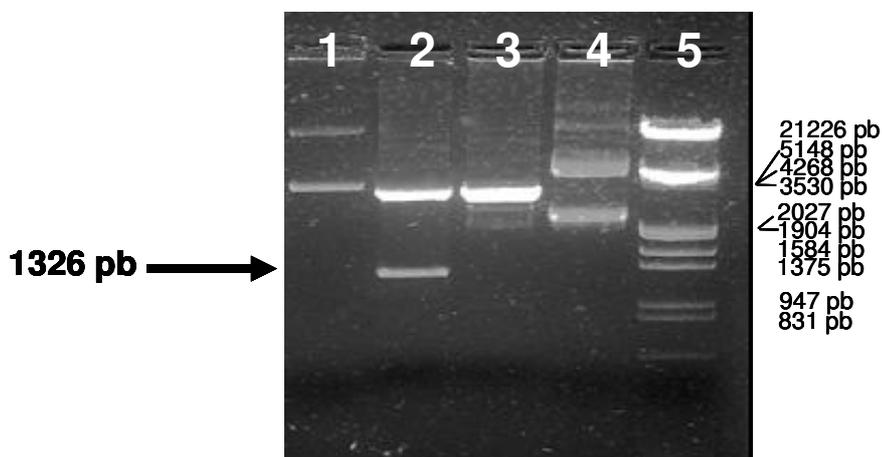


Figura 17. Padrão de digestão com *EcoRI* e *BamHI* do plasmídeo pJPL03. Gel de agarose 1% corado com EtBr e observado sob luz ultravioleta. Linha 1: plasmídeo pJPL03 não clivado; linha 2: plasmídeo pJPL03 clivado com *EcoRI* e *BamHI*, mostrando um fragmento de aproximadamente 3331 pb referente a Pin Point Xa-1 T-Vector e um fragmento de 1326 pb referente ao cDNA de eIF2 beta selvagem; linha 3: plasmídeo Pin Point Xa-1 T-Vector clivado *EcoRI* e *BamHI*, mostrando um fragmento de aproximadamente 3331 pb; linha 4: plasmídeo Pin Point Xa-1 T-Vector não-clivado; linha 5: marcador de peso molecular lambda *EcoRI/HindIII*. A seta indica o fragmento de interesse.

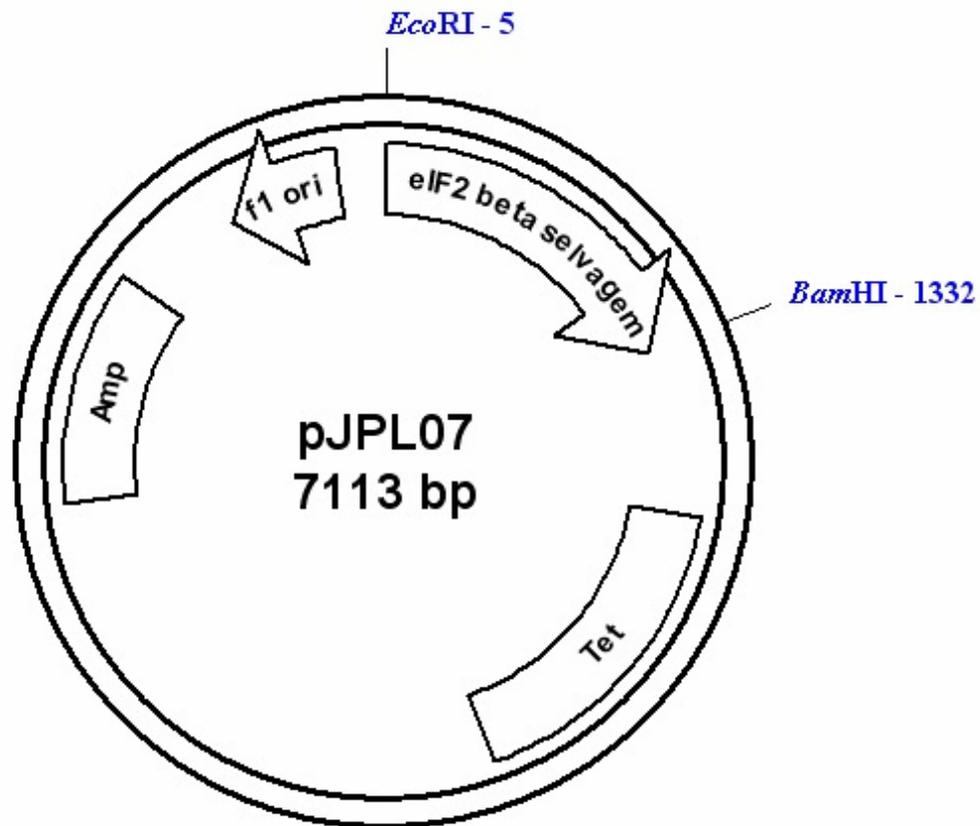


Figura 18. Representação do plasmídeo pJPL07. O fragmento referente ao cDNA de eIF2 beta humano selvagem foi clonado no plasmídeo pALTER-EX1' nos sítios de restrição das enzimas *EcoRI* e *BamHI*, originando o plasmídeo pJPL07. Em destaque, estão os principais componentes do plasmídeo: o fragmento referente ao cDNA de eIF2 beta selvagem humano (eIF2 beta selvagem), os genes de resistência aos antibióticos ampicilina (Amp) e tetraciclina (Tet) e a origem de replicação derivada do vírus f1 (f1 ori).

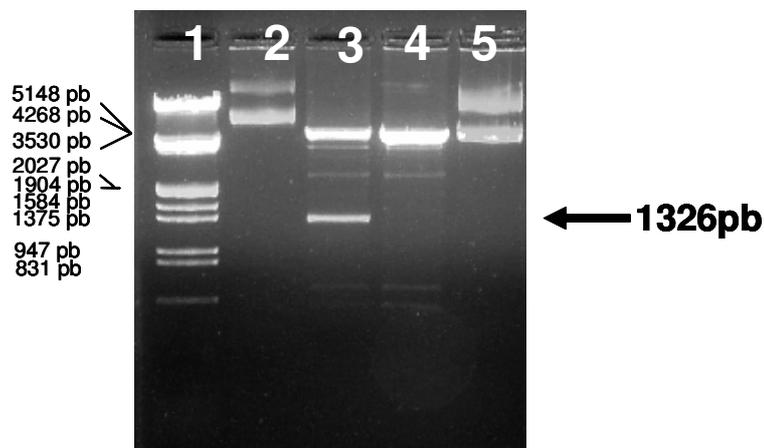


Figura 19. Padrão de digestão dupla com *EcoRI* e *BamHI* do plasmídeo pJPL07. Gel de agarose 1% corado com EtBr e observado sob luz ultravioleta. Linha 1: marcador de peso molecular lambda *EcoRI/HindIII*; linha 2: plasmídeo pJPL07 não-clivado; linha 3; plasmídeo pJPL07 clivado com *EcoRI* e *BamHI*, mostrando um fragmento de aproximadamente 5854 pb referente a pALTER-EX1 e um fragmento de 1326 pb referente ao cDNA de eIF2 beta humano selvagem; linha 4: plasmídeo pALTER-EX1 clivado com *EcoRI* e *BamHI*, mostrando um fragmento de aproximadamente 5854 pb; linha 5: plasmídeo pALTER-EX1 não-clivado. A seta indica o fragmento de interesse.

4.2 Etapas da construção do plasmídeo pJPL46

Esse plasmídeo foi construído com o objetivo de obter a região codificadora do cDNA de eIF2 beta humano selvagem clonado em uma plasmídeo de expressão para células eucarióticas que tenha sua expressão regulada pelo antibiótico tetraciclina. Para essa construção, bem como para as construções dos plasmídeos pJPL50, pJPL60 e pJPL62, foi escolhido o vetor de expressão pcDNA4/TO, que integra o sistema de expressão para células de mamíferos regulado por tetraciclina *T-REx System*.

Inicialmente, tendo como molde o plasmídeo pJPL07, foi realizada uma reação de PCR que amplificasse um fragmento referente ao cDNA de eIF2 beta

humano selvagem de 1318 pb. Foram utilizados o iniciador direto KPNIF, que contém a seqüência de Kozak, o códon de início e um sítio de restrição à enzima *KpnI* e o iniciador reverso BAMHIR. Esse produto de PCR foi clonado no plasmídeo pCR2.1-TOPO usando-se “kit” *TOPO TA cloning kit*, originando o plasmídeo pJPL25 mostrado na figura 20. O fragmento referente ao cDNA de eIF2 beta humano selvagem foi isolado do pJPL25 por digestão dupla com as enzimas *KpnI* e *BamHI* (figura 21).

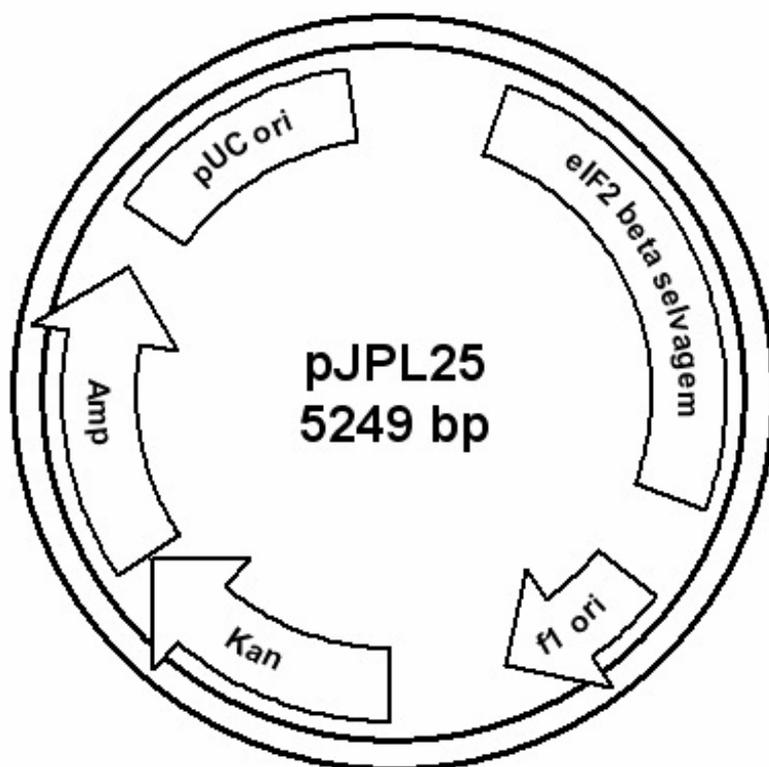


Figura 20. Representação esquemática do plasmídeo pJPL25. Em destaque, na figura, estão os principais componentes do plasmídeo: o fragmento referente ao cDNA de eIF2 beta humano selvagem amplificado por PCR, utilizando os iniciadores KPNIF e BAMHIR; a origem de replicação derivada do vírus f1 (f1 ori); os genes de resistência à kanamicina (Kan) e à ampicilina (Amp); e a origem de replicação derivada do plasmídeo pUC (pUC).

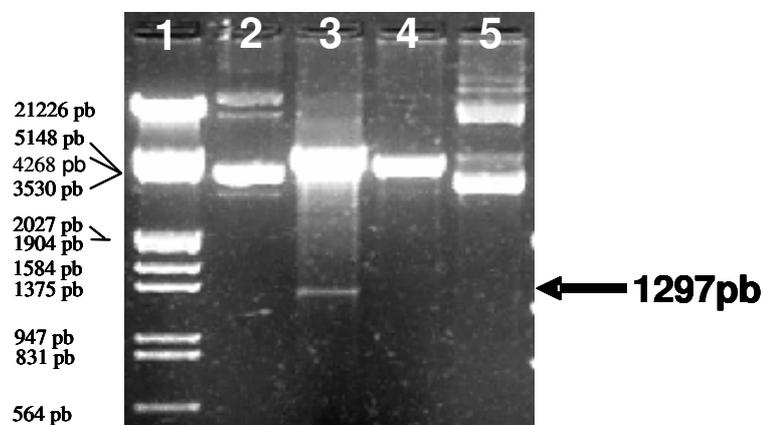


Figura 21. Padrão de digestão dupla com *KpnI* e *Bam*HI do plasmídeo pJPL25. Gel de agarose 1% corado com EtBr e observado sob luz ultravioleta. Linha 1: marcador de peso molecular lambda *Eco*RI/*Hind*III; linha 2: plasmídeo pJPL25 não-clivado; linha 3; plasmídeo pJPL25 clivado com *KpnI* e *Bam*HI, mostrando um fragmento de aproximadamente 3931 pb referente a pCR2.1-TOPO e um fragmento de 1297 pb referente ao cDNA de eIF2 beta humano selvagem; linha 4: plasmídeo pCR2.1-TOPO clivado com *KpnI* e *Bam*HI, mostrando um fragmento de aproximadamente 3931 pb; linha 5: plasmídeo pCR2.1-TOPO não-clivado. A seta indica o fragmento de interesse.

Esse fragmento de 1297 pb foi purificado do gel de agarose e subclonado no plasmídeo pcDNA4/TO linearizado por *KpnI* e *Bam*HI. Clones que apresentaram o inserto de 1297 pb foram seqüenciados. Por comparação com a seqüência publicada no banco de dados (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, número de acesso M29536, figura 3), um clone com a seqüência nucleotídica correta foi selecionado (figura 22) e originou o plasmídeo pJPL46 (figura 23).

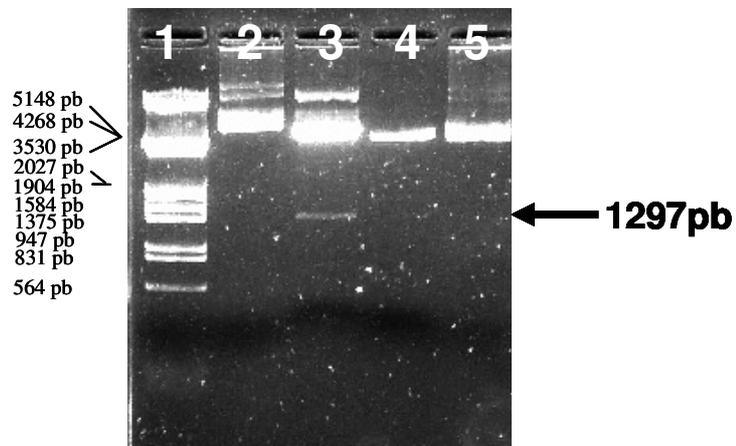


Figura 22. Padrão de digestão dupla com *KpnI* e *Bam*HI do plasmídeo pJPL46. Gel de agarose 1% corado com EtBr e observado sob luz ultravioleta. Linha 1: marcador de peso molecular lambda *Eco*RI/*Hind*III; linha 2: plasmídeo pJPL46 não-clivado; linha 3; plasmídeo pJPL46 clivado com *KpnI* e *Bam*HI, mostrando um fragmento de aproximadamente 5078 pb referente a pcDNA4/TO e um fragmento de 1297 pb referente ao cDNA de eIF2 beta humano selvagem; linha 4: plasmídeo pcDNA4/TO clivado com *KpnI* e *Bam*HI, mostrando um fragmento de aproximadamente 5078 pb; linha 5: plasmídeo pcDNA4/TO não-clivado. A seta indica o fragmento de interesse.

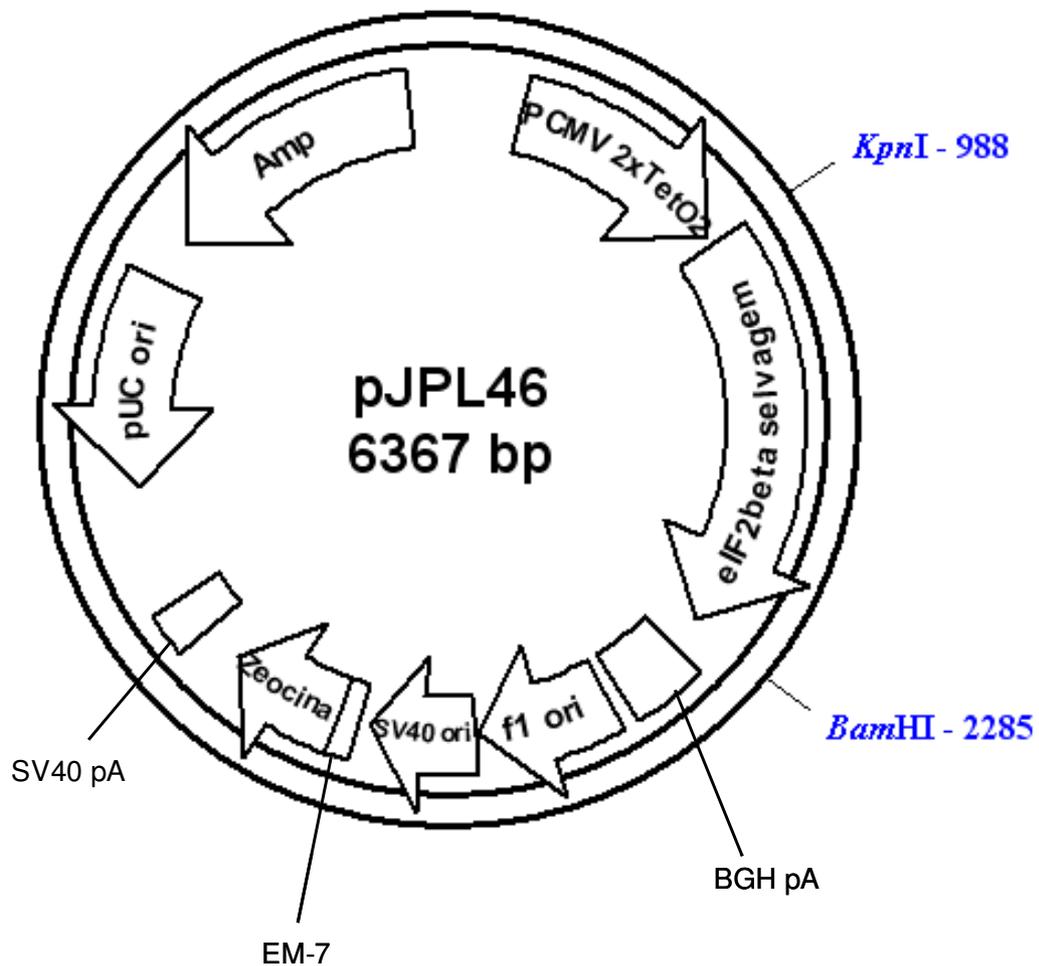


Figura 23. Representação esquemática do plasmídeo pJPL46. Em destaque, na figura, estão os principais elementos do plasmídeo: o fragmento referente à região codificadora do cDNA de eIF2 beta selvagem humano (eIF2 beta selvagem) inserido nos sítios *KpnI* e *BamHI*; genes de resistência aos antibióticos ampicilina (Amp) e zeocina; origem de replicação derivada do vírus F1 (f1 ori); origem de replicação de pUC (pUC ori); origem de replicação de SV40 (SV40 ori); promotor do CMV contendo duas cópias do operador de tetraciclina e o TATAbox (PCMV 2xTtO2); sinal de poliadenilação de SV40 (SV40pA) e sinal de poliadenilação do hormônio do crescimento bovino (BGHpA) que permitem a adição da cauda poliA; promotor EM-7 sintético, que permite a expressão do gene de resistência à zeocina em *E. coli*.

4.3 Etapas da construção do plasmídeo pJPL50

Esse plasmídeo foi construído com o intuito de ter-se clonado o fragmento referente à região codificadora do cDNA de eIF2 beta humano desprovido dos três blocos de lisinas, anteriormente mencionados, em um plasmídeo de expressão para células eucarióticas controlado por tetraciclina.

Para a obtenção da deleção dos três blocos de lisinas, o DNA do plasmídeo pJPL07 foi submetido a uma preparação de ssDNA. O ssDNA desse plasmídeo foi, então, submetido a uma primeira etapa de mutagênese sítio dirigida, utilizando-se o sistema *Altered Sites II in vitro Mutagenesis System* (Promega). Após essa primeira etapa de mutagênese, clones com a deleção dos 24 nt, que compõem o primeiro bloco de lisinas (A156-G179) (figura 24), foram selecionados com ampicilina pois, nessa primeira etapa, o gene de resistência a esse antibiótico foi reparado. Suas seqüências foram analisadas por seqüenciamento de DNA. Um clone com a seqüência nucleotídica correta em relação à do banco de dados (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, número de acesso M29536, figura 3) originou o plasmídeo pJPL10 (figura 25).

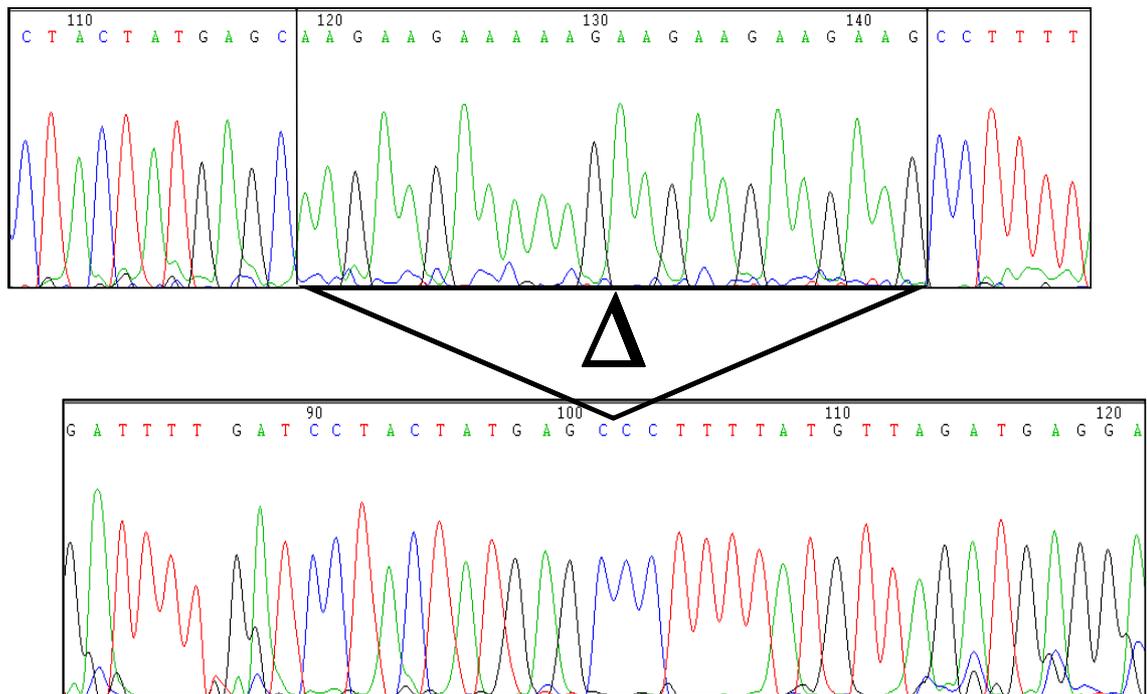


Figura 24. Representação da deleção do primeiro bloco de lisinas. Cromatogramas com código de quatro letras, A, C, G, T, representando a deleção dos 24 nucleotídeos que compõem o primeiro bloco de lisinas (A156 – G179). O quadro acima mostra uma região da seqüência do cDNA de eIF2 beta humano selvagem. O quadro abaixo mostra uma região da seqüência do cDNA de eIF2 beta humano desprovido do primeiro bloco de lisinas. O símbolo Δ identifica a deleção.

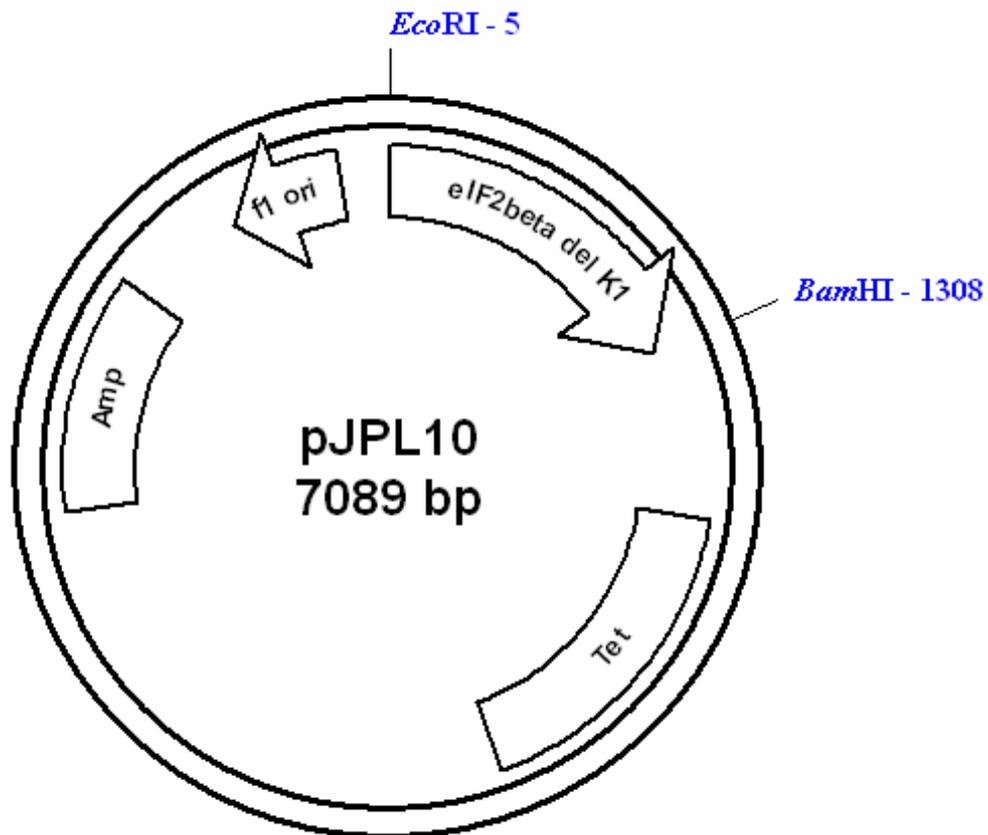


Figura 25. Representação do plasmídeo pJPL10. Em destaque, na figura, estão os principais elementos do plasmídeo: o fragmento referente ao cDNA de eIF2 beta humano com o primeiro bloco de lisina deletado (eIF2 beta del K1), os genes de resistência aos antibióticos ampicilina (Amp) e tetraciclina (Tet) e a origem de replicação derivada do vírus f1 (f1 ori).

Para a segunda etapa de mutagênese, foi preparado ssDNA do plasmídeo pJPL10. Esse ssDNA foi submetido ao protocolo de mutagênese sítio dirigida, utilizando-se o mesmo sistema anterior. Clones apresentando a deleção dos 27 nt do segundo bloco de lisinas (A351 – G377) (figura 26) foram selecionados com tetraciclina, pois, nessa etapa, o gene de resistência a esse antibiótico foi reparado. As seqüências nucleotídicas dos clones foram analisadas por seqüenciamento de DNA. Um clone com a seqüência correta se comparada à do banco de dados (M29536) originou o plasmídeo pJPL11 (figura 27).

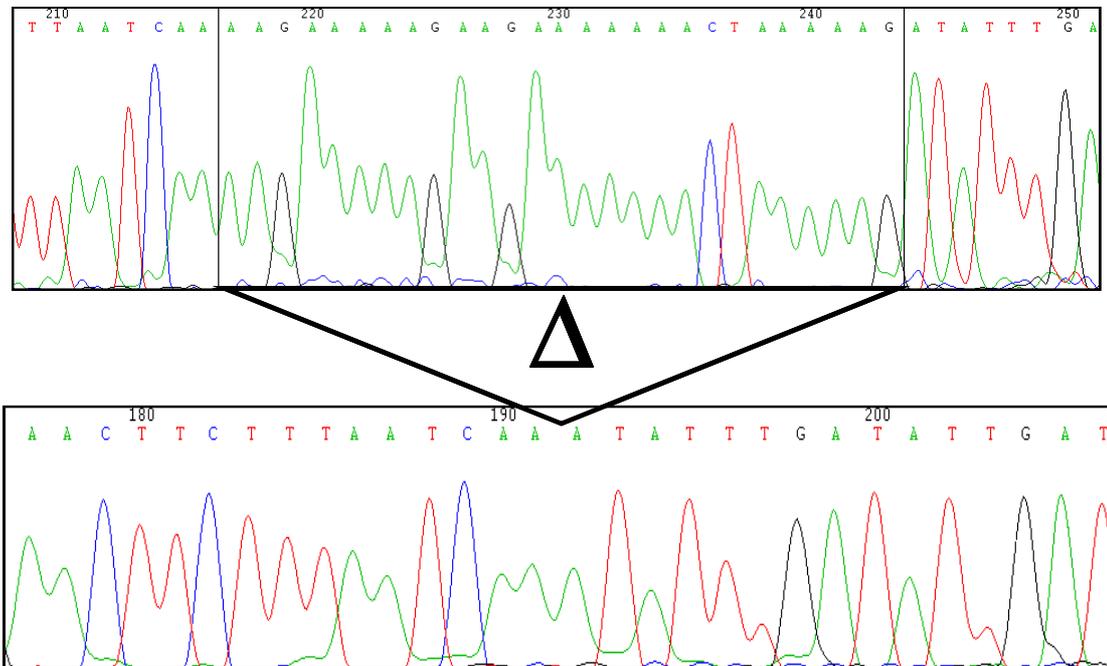


Figura 26. Representação da deleção do segundo bloco de lisinas. Cromatogramas com código de quatro letras, A, C, G, T, representando a deleção dos 27 nt que compõem o segundo bloco de lisinas (A351 – G377). O quadro acima mostra uma região da seqüência do cDNA de eIF2 beta humano selvagem. O quadro abaixo mostra uma região da seqüência do cDNA de eIF2 beta humano desprovido do segundo bloco de lisinas. O símbolo Δ identifica a deleção.

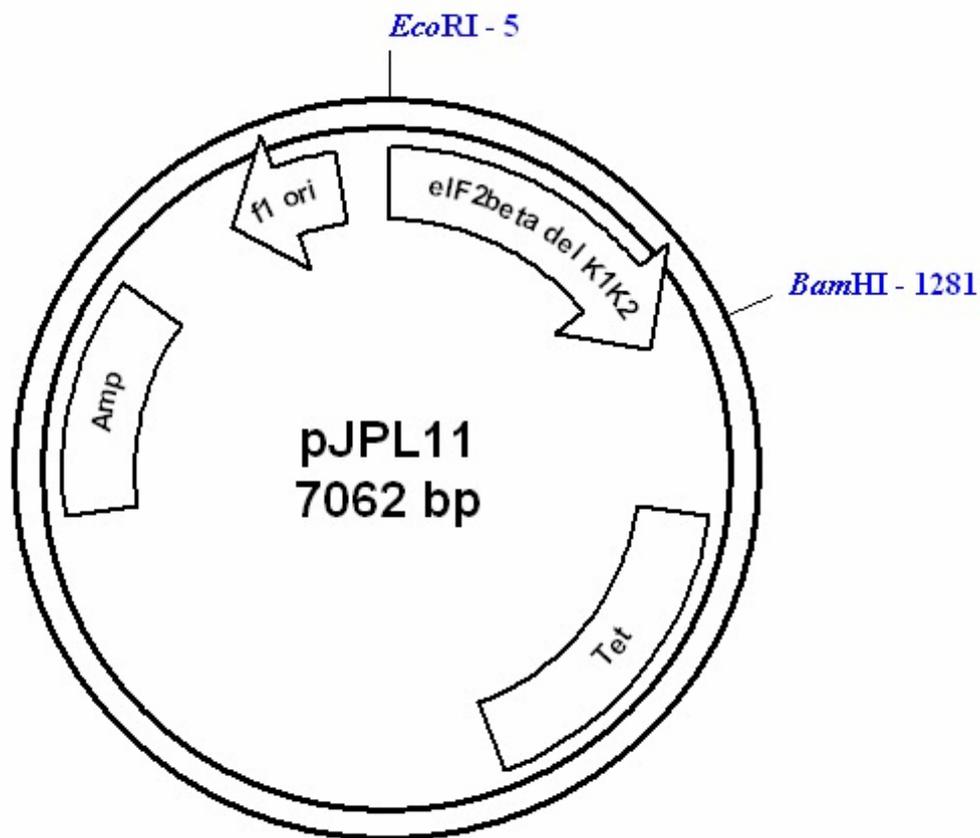


Figura 27. Representação do plasmídeo pJPL11. Em destaque, na figura, estão os principais elementos do plasmídeo: o fragmento referente ao cDNA de eIF2 beta humano com o primeiro e o segundo blocos de lisinas deletados (eIF2 beta del K1K2), os genes de resistência aos antibióticos ampicilina (Amp) e tetraciclina (Tet) e a origem de replicação derivada do vírus f1 (f1 ori).

Na terceira e última etapa da mutagênese, foi preparado ssDNA do plasmídeo pJPL11 o qual foi submetido ao protocolo de mutagênese sítio dirigida com o mesmo sistema utilizado nas duas primeiras etapas. Os clones que apresentaram a deleção dos 27 nt que compõem o terceiro bloco de lisinas (A487 – G513) (figura 28) foram selecionados novamente com ampicilina, pois, nessa etapa, recuperou-se o gene de resistência a esse antibiótico. As seqüências nucleotídicas foram seqüenciadas, e um clone com a seqüência correta em

relação à do banco de dados (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, número de acesso M29536, figura 3) originou o plasmídeo pJPL17 (figura 29).

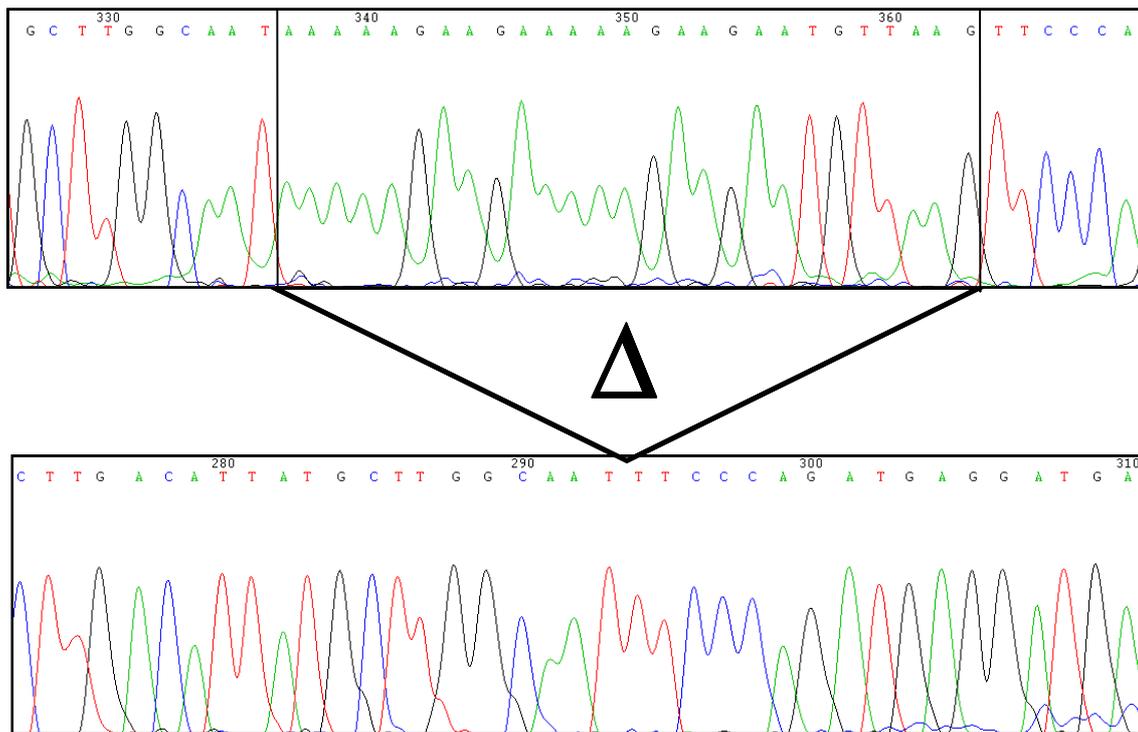


Figura 28. Representação da deleção do terceiro bloco de lisinas. Cromatogramas com código de quatro letras, A, C, G, T, representando a deleção dos 27nt que compõem o terceiro bloco de lisinas (A487 – G513). O quadro acima mostra uma região da seqüência do cDNA de eIF2 beta humano selvagem. O quadro abaixo mostra uma região da seqüência do cDNA de eIF2 beta humano desprovido do segundo bloco de lisinas. O símbolo Δ identifica a deleção.

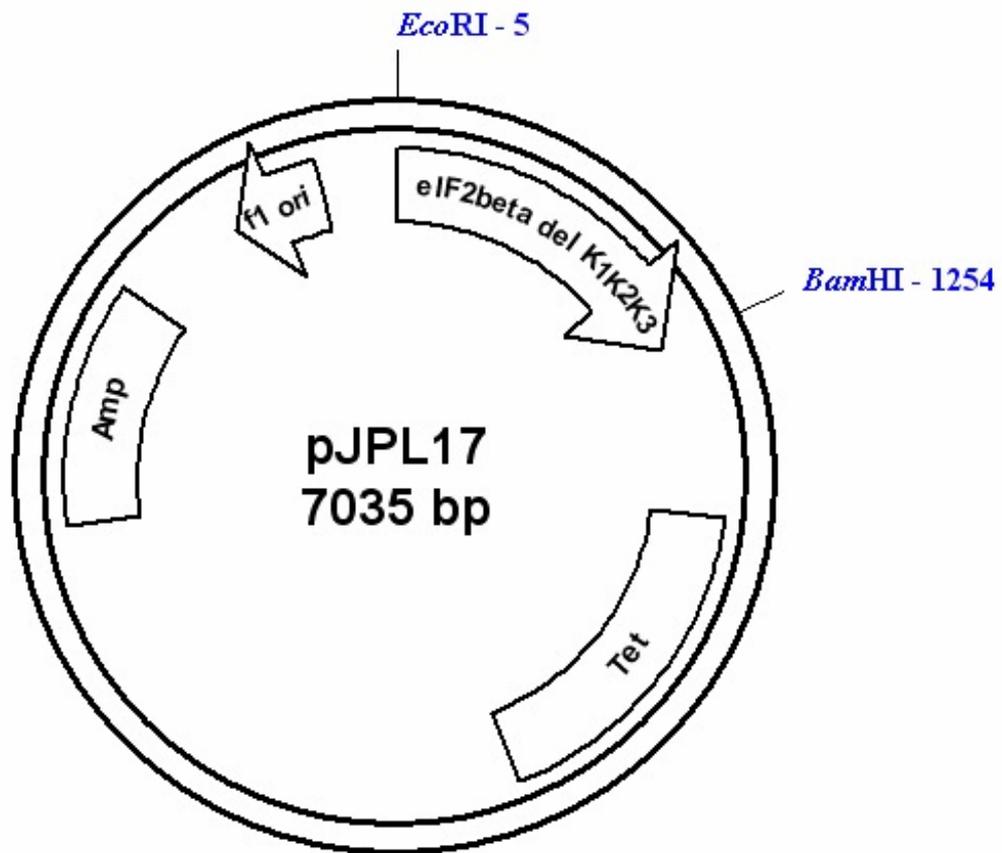


Figura 29. Representação do plasmídeo pJPL17. Em destaque, na figura, estão os principais elementos do plasmídeo: o fragmento referente ao cDNA de eIF2 beta humano com o primeiro, segundo e terceiro blocos de lisinas deletados (eIF2 beta del K1K2K3), os genes de resistência aos antibióticos ampicilina (Amp) e tetraciclina (Tet) e a origem de replicação derivada do vírus f1 (f1 ori).

O plasmídeo pJPL17 contendo a deleção dos três blocos de lisinas foi utilizado como molde para uma reação de amplificação por PCR, utilizando os oligonucleotídeos iniciadores KPNIF e BAMHIR. O fragmento amplificado de 1240 pb referente ao cDNA de eIF2 beta humano desprovido dos três blocos de lisinas foi clonado em pCR2.1-TOPO usando-se *TOPO TA cloning Kit*. Um clone

contendo o fragmento de interesse (mostrado na figura 30) foi denominado pJPL26.

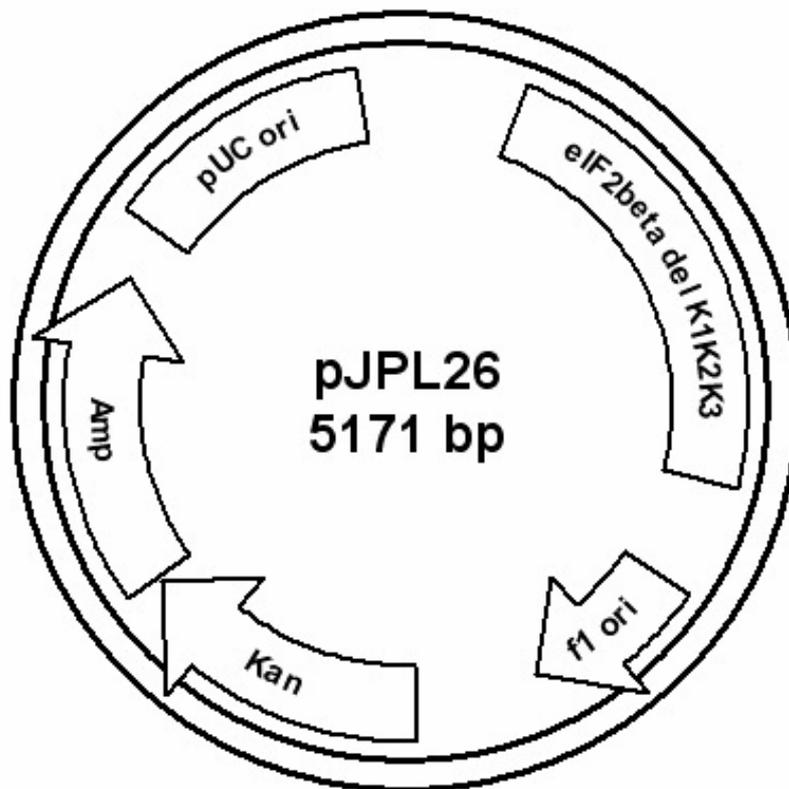


Figura 30. Representação esquemática do plasmídeo pJPL26. Em destaque, na figura, estão os principais componentes do plasmídeo: o fragmento referente ao cDNA de eIF2 beta humano desprovido dos três blocos de lisina (eIF2 beta del K1K2K3), amplificado por PCR, utilizando os iniciadores KPNIF e BAMHIR; a origem de replicação derivada do vírus f1 (f1 ori); os genes de resistência à kanamicina (Kan) e à ampicilina (Amp); e a origem de replicação derivada do plasmídeo pUC (pUC ori).

O fragmento inserido em pCR2.1-TOPO referente ao cDNA de eIF2 beta humano desprovido dos três blocos de lisinas foi isolado desse plasmídeo por digestão dupla com as enzimas *KpnI* e *BamHI* (figura 31). Após a digestão, foi submetido a eletroforese em gel de agarose 1% e foi retirado e purificado do gel.

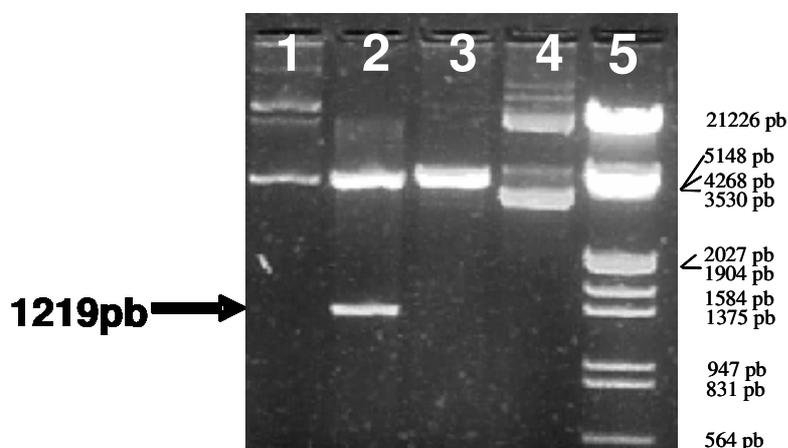


Figura 31. Padrão de digestão dupla com *KpnI* e *BamHI* do plasmídeo pJPL26. Gel de agarose 1% corado com EtBr e observado sob luz ultravioleta. Linha 1: plasmídeo pJPL26 não-clivado; linha 2; plasmídeo pJPL26 clivado com *KpnI* e *BamHI*, mostrando um fragmento de aproximadamente 3931 pb referente a pCR2.1-TOPO e um fragmento de 1219 pb referente ao cDNA de eIF2 beta humano desprovido dos três blocos de lisinas; linha 3: plasmídeo pCR2.1-TOPO clivado com *KpnI* e *BamHI*, mostrando um fragmento de aproximadamente 3931 pb; linha 4: plasmídeo pCR2.1-TOPO não-clivado; linha 5: marcador de peso molecular lambda *EcoRI/HindIII*. A seta indica o fragmento de interesse.

Esse fragmento purificado foi subclonado em pcDNA4/TO e também digerido com *KpnI* e *BamHI*. Clones que apresentaram o fragmento de interesse de 1219 pb, quando clivados com as enzimas *KpnI* e *BamHI*, tiveram sua seqüência nucleotídica analisada por seqüenciamento de DNA. Um clone com seqüência nucleotídica correta por comparação com a seqüência publicada no banco de dados (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, número de acesso M29536, figura 3) foi selecionado (figura 32) e originou o plasmídeo pJPL50 (figura 33).

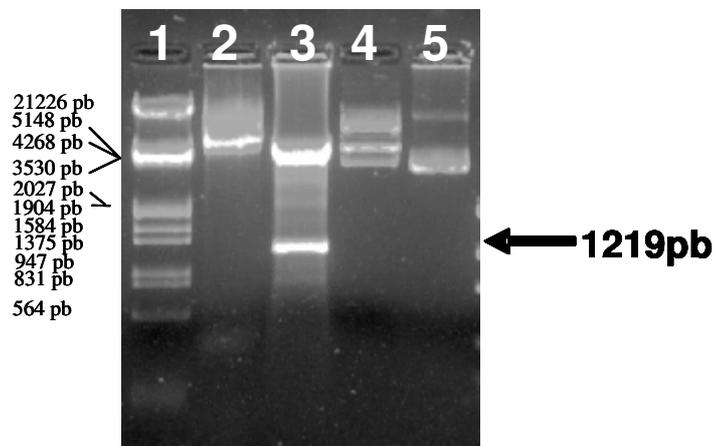


Figura 32. Padrão de digestão dupla com *KpnI* e *BamHI* do plasmídeo pJPL50. Gel de agarose 1% corado com EtBr e observado sob luz ultravioleta. Linha 1: marcador de peso molecular lambda *EcoRI/HindIII*; linha 2: plasmídeo pJPL50 não-clivado; linha 3; plasmídeo pJPL50 clivado com *KpnI* e *BamHI*, mostrando um fragmento de aproximadamente 5078 pb referente a pcDNA4/TO e um fragmento de 1219 pb referente ao cDNA de eIF2 beta humano selvagem; linha 4: plasmídeo pcDNA4/TO clivado com *KpnI* e *BamHI*, mostrando um fragmento de aproximadamente 5078pb, bem como um fragmento mais leve e outro mais pesado devido à digestão parcial; linha 5: plasmídeo pcDNA4/TO não-clivado. A seta indica o fragmento de interesse.

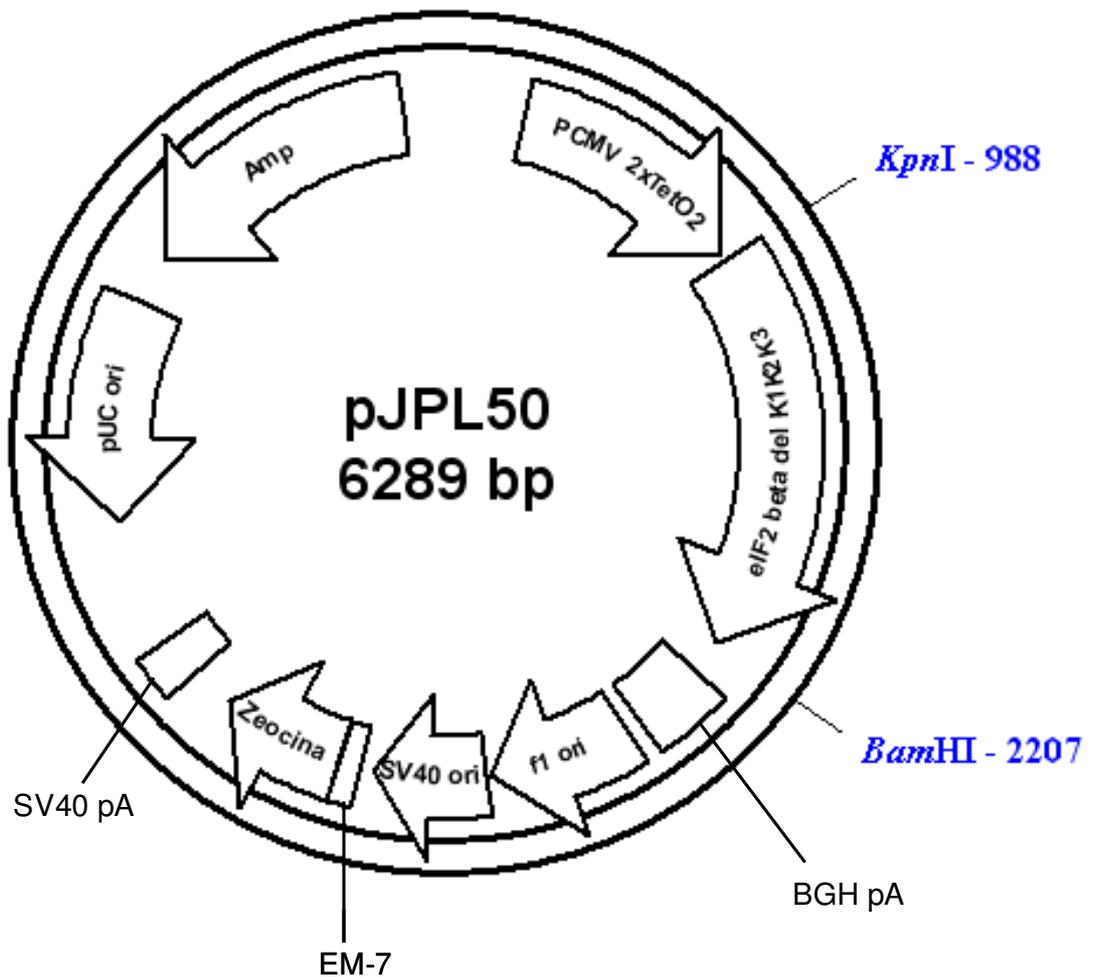


Figura 33. Representação esquemática do plasmídeo pJPL50. Em destaque, na figura, estão os principais elementos do plasmídeo: o fragmento referente à região codificadora do cDNA de eIF2 beta humano desprovido dos três blocos de lisinas (eIF2 beta del K1K2K3) inserido nos sítios *KpnI* e *BamHI*; genes de resistência aos antibióticos ampicilina (Amp) e zeocina; origem de replicação derivada do vírus F1 (f1 ori); origem de replicação de pUC (pUC ori); promotor e origem de replicação de SV40 (SV40 ori); promotor do CMV contendo duas cópias do operador de tetraciclina e o TATAbox (PCMV 2x TetO2); sinal de poliadenilação de SV40 (SV40pA) e sinal de poliadenilação do hormônio do crescimento bovino (BGHpA) que permitem a adição da cauda poliA; promotor EM-7, que é sintético e permite a expressão do gene de resistência à zeocina em *E. coli*.

4.4 Etapas da construção do plasmídeo pJPL60

Esse plasmídeo foi construído com o objetivo de obter uma forma truncada de eIF2 beta humano contendo apenas a região correspondente à porção amino-terminal da proteína (1-157aa) (posição 117-587) para ser expressa em células eucarióticas. A construção iniciou-se pela amplificação de um fragmento de 511 pb correspondente à região de interesse, realizada por PCR a partir do DNA do plasmídeo pJPL07. Nessa reação, foram utilizados o oligonucleotídeo iniciador direto KPNIF e o iniciador reverso NH2R, o qual contém um códon de terminação e um sítio de restrição para *Bam*HI em sua seqüência. Esse produto de PCR foi clonado no plasmídeo pCR2.1-TOPO, utilizando-se o “kit” *TOPO TA cloning Kit*. Os clones obtidos foram digeridos com as enzimas de restrição *Kpn*I e *Bam*HI para a confirmação da presença do inserto. Um clone que apresentou o fragmento de interesse de 486 pb, como demonstrado na figura 34, originou o plasmídeo pJPL27 (figura 35).

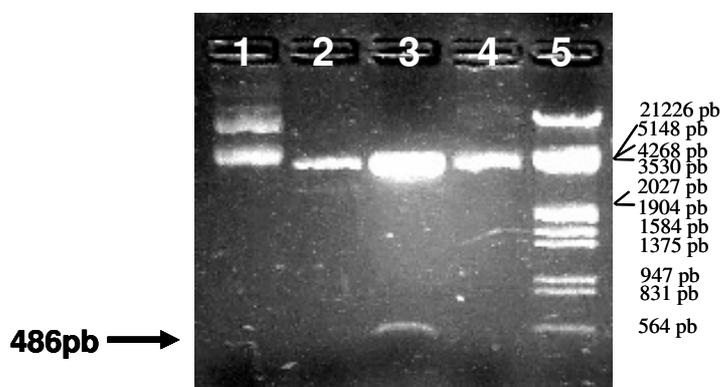


Figura 34. Padrão de digestão dupla com *Kpn*I e *Bam*HI do plasmídeo pJPL27. Gel de agarose 1% corado com EtBr e observado sob luz ultravioleta; linha 1: plasmídeo pCR2.1-TOPO não-clivado; linha 2: plasmídeo pCR2.1-TOPO clivado com *Kpn*I e *Bam*HI, mostrando um fragmento de aproximadamente 3931 pb; linha 3: plasmídeo pJPL27 clivado com *Kpn*I e *Bam*HI, mostrando um fragmento de aproximadamente 3931 pb referente a pCR2.1-TOPO e um fragmento de 486 pb referente à região do cDNA de eIF2 beta humano correspondente à porção amino-terminal da proteína eIF2 beta humana; linha 4: plasmídeo pJPL27 não-clivado; linha 5: marcador de peso molecular lambda *Eco*RI/*Hind*III. A seta indica o fragmento de interesse.

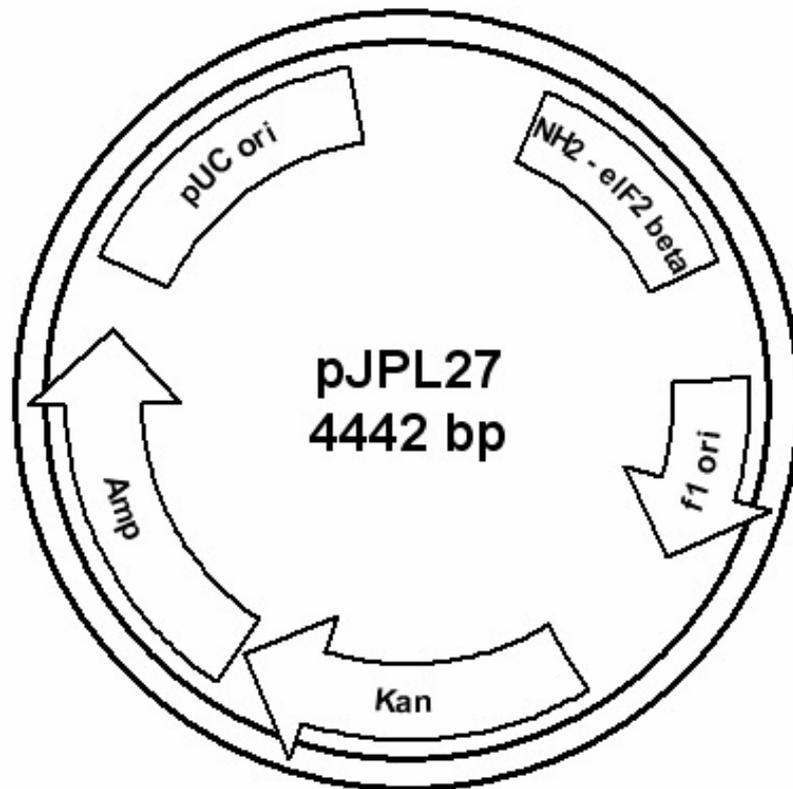


Figura 35. Representação esquemática do plasmídeo pJPL27. Em destaque, na figura, estão os principais componentes do plasmídeo: o fragmento referente à região do cDNA de eIF2 beta humano correspondente à porção amino-terminal da proteína (NH2 de eIF2beta) amplificado por PCR, utilizando os iniciadores KPNIF e NH2R; a origem de replicação derivada do vírus f1 (f1 ori); os genes de resistência à kanamicina (Kan) e à ampicilina (Amp); e a origem de replicação derivada do plasmídeo pUC (pUC ori).

Esse plasmídeo foi então digerido com as enzimas de restrição *KpnI* e *BamHI* para isolar o fragmento de interesse. Após ser purificado do gel de agarose, o fragmento foi subclonado no plasmídeo pcDNA4/TO. Os clones que foram submetidos à digestão dupla com as enzimas *KpnI* e *BamHI* e que apresentaram o fragmento (figura 36) tiveram sua seqüência analisada por seqüenciamento de DNA. Um clone que apresentou sua seqüência correta quando comparada com a publicada no banco de dados

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, número de acesso M29536, figura 3) foi selecionado e originou o plasmídeo pJPL60 (figura 37).

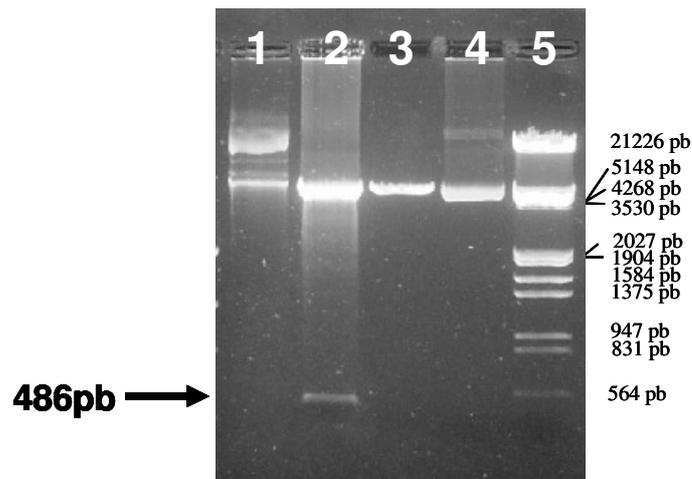


Figura 36. Padrão de digestão dupla com *KpnI* e *BamHI* do plasmídeo pJPL60. Gel de agarose 1% corado com EtBr e observado sob luz ultravioleta. Linha 1: plasmídeo pJPL60 não-clivado; linha 2; plasmídeo pJPL60 clivado com *KpnI* e *BamHI*, mostrando um fragmento de aproximadamente 5078 pb referente a pcDNA4/TO e um fragmento de 486 pb referente à região do cDNA de eIF2 beta humano correspondente à porção amino-terminal da proteína eIF2 beta humana; linha 3: plasmídeo pcDNA4/TO clivado com *KpnI* e *BamHI*, mostrando um fragmento de aproximadamente 5078 pb; linha 4: plasmídeo pcDNA4/TO não-clivado; linha 5: marcador de peso molecular lambda *EcoRI/HindIII*. A seta indica o fragmento de interesse.

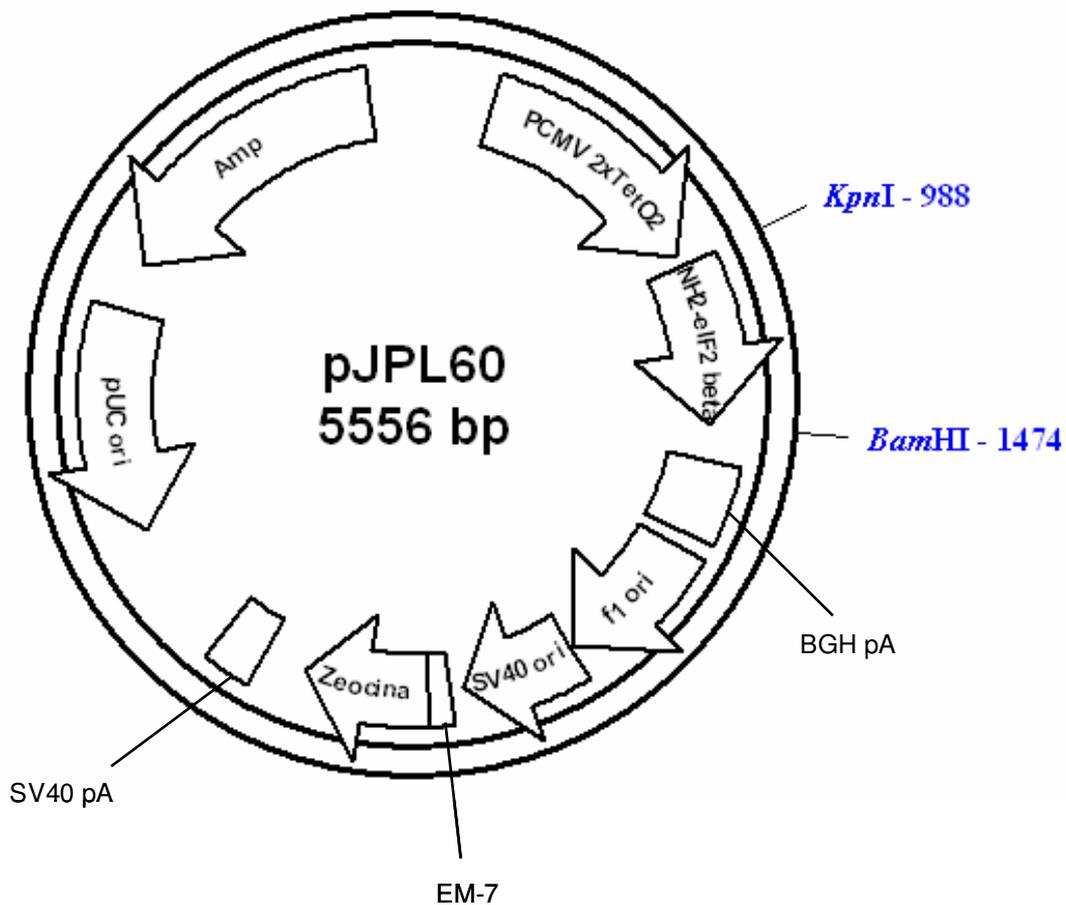


Figura 37. Representação esquemática do plasmídeo pJPL60. Em destaque, na figura, estão os principais elementos do plasmídeo: o fragmento referente à região do cDNA de eIF2 beta humano correspondente à porção amino-terminal da proteína (NH2-eIF2 beta) inserido nos sítios *KpnI* e *BamHI*; genes de resistência aos antibióticos ampicilina (Amp) e zeocina; origem de replicação derivada do vírus F1 (f1 ori); origem de replicação de pUC (pUC ori); promotor e origem de replicação de SV40 (SV40 ori); promotor do CMV contendo duas cópias do operador de tetraciclina e TATAbox (PCMV 2xTeto2); sinal de poliadenilação de SV40 (SV40pA) e sinal de poliadenilação do hormônio do crescimento bovino (BGHpA), que permitem a adição da cauda poliA; promotor EM-7, que é sintético e permite a expressão do gene de resistência à zeocina em *E. coli*.

4.5 Etapas da construção do plasmídeo pJPL62

Esse plasmídeo foi construído com o objetivo de obter uma forma truncada de eIF2 beta humano, contendo apenas a região correspondente à porção carboxi-terminal da proteína (158aa – códon de terminação) (posição 588-1416) para ser expressa em células eucarióticas.

Para isso, foi amplificado por PCR um fragmento de 847 pb referente à região de interesse. Para a reação, foram utilizados o oligonucleotídeo iniciador direto COOHF que contém a seqüência de Kozak, o códon de início e um sítio de restrição para a enzima *KpnI* e o iniciador reverso BAMHIR. O produto da PCR foi clonado em pCR2.1-TOPO, utilizando-se o *TOPO TA cloning Kit*. Um clone que, ao ser digerido com *KpnI* e *BamHI*, apresentou o fragmento de interesse (figura 38) e originou o plasmídeo pJPL30 (figura 39).

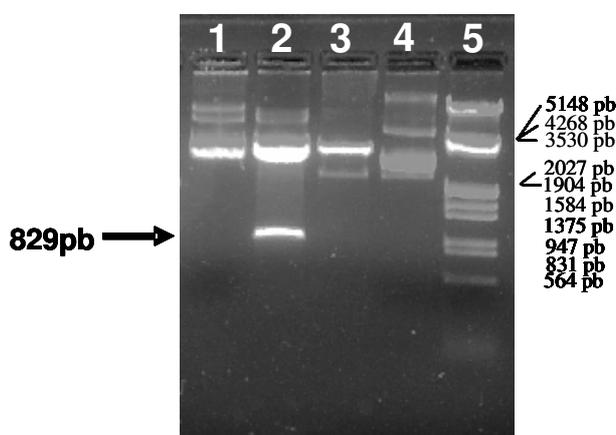


Figura 38. Padrão de digestão dupla com *KpnI* e *BamHI* do plasmídeo pJPL30. Gel de agarose 1% corado com EtBr e observado sob luz ultravioleta. Linha 1: plasmídeo pJPL30 não-clivado; linha 2: plasmídeo pJPL30 clivado com *KpnI* e *BamHI*, mostrando um fragmento de aproximadamente 3931 pb referente a pCR2.1-TOPO e um fragmento de 829 pb referente à região do cDNA de eIF2 beta humano correspondente à porção carboxi-terminal da proteína eIF2 beta humana; linha 3: plasmídeo pCR2.1-TOPO clivado com *KpnI* e *BamHI*, mostrando um fragmento de aproximadamente 3931 pb; linha 4: plasmídeo pCR2.1-TOPO não-clivado; linha 5: marcador de peso molecular lambda *EcoRI/HindIII*. A seta indica o fragmento de interesse.

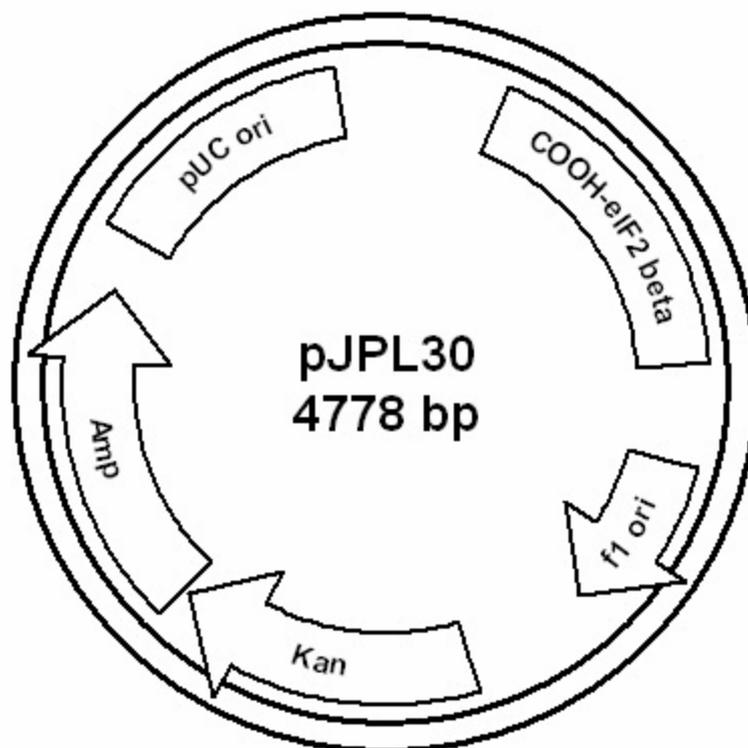


Figura 39. Representação esquemática do plasmídeo pJPL30. Em destaque, na figura, estão os principais componentes do plasmídeo: o fragmento referente à região do cDNA de eIF2 beta humano correspondente à porção carboxi-terminal da proteína (COOH-eIF2beta) amplificado por PCR, utilizando os iniciadores COOHF e BAMHIR; a origem de replicação derivada do vírus f1 (f1 ori); os genes de resistência à kanamicina (Kan) e à ampicilina (Amp); e a origem de replicação derivada do plasmídeo pUC (pUC ori).

O plasmídeo foi digerido com as endonucleases *KpnI* e *BamHI*, liberando um fragmento de 829 pb referente à região do cDNA de eIF2 beta humano correspondente à porção carboxi-terminal da proteína eIF2 beta. Purificado do gel de agarose, o fragmento foi subclonado no plasmídeo pcDNA4/TO. Os clones obtidos foram submetidos à nova digestão dupla com as enzimas *KpnI* e *BamHI*. Apenas um clone apresentou o fragmento de interesse com o padrão de restrição demonstrado na figura 40. Esse clone foi então seqüenciado. Por comparação com a seqüência publicada no banco de dados (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, número de acesso M29536, figura 3), podê-se observar a existência de uma transição A→G na posição 694, que causa uma troca do aminoácido ácido

aspártico para o aminoácido glicina, Asp→Gly. Esse clone originou o plasmídeo pJPL62 (figura 41).

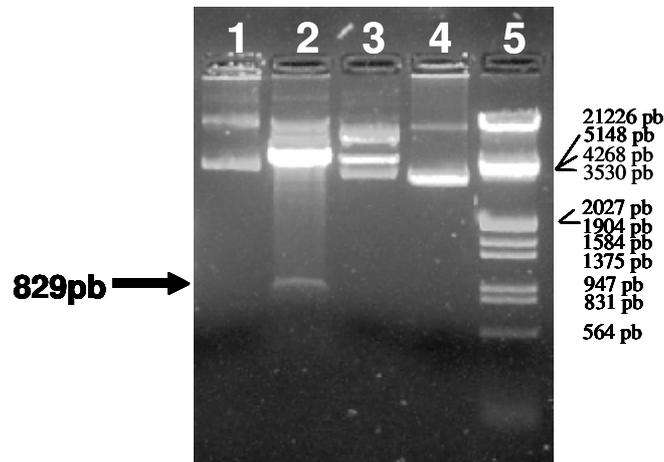


Figura 40. Padrão de digestão dupla com *KpnI* e *BamHI* do plasmídeo pJPL62. Gel de agarose 1% corado com EtBr e observado sob luz ultravioleta. Linha 1: plasmídeo pJPL62 não-clivado; linha 2; plasmídeo pJPL62 clivado com *KpnI* e *BamHI*, mostrando um fragmento de aproximadamente 5078 pb referente a pcDNA4/TO e um fragmento de 829 pb referente à região do cDNA de eIF2 beta humano correspondente à porção carboxi-terminal da proteína eIF2 beta humana; linha 3: plasmídeo pcDNA4/TO clivado com *KpnI* e *BamHI*, mostrando um fragmento de aproximadamente 5078 pb, bem como um fragmento mais leve e outro mais pesado devido à digestão parcial; linha 4: plasmídeo pcDNA4/TO não-clivado; linha 5: marcador de peso molecular lambda *EcoRI/HindIII*. A seta indica o fragmento de interesse.

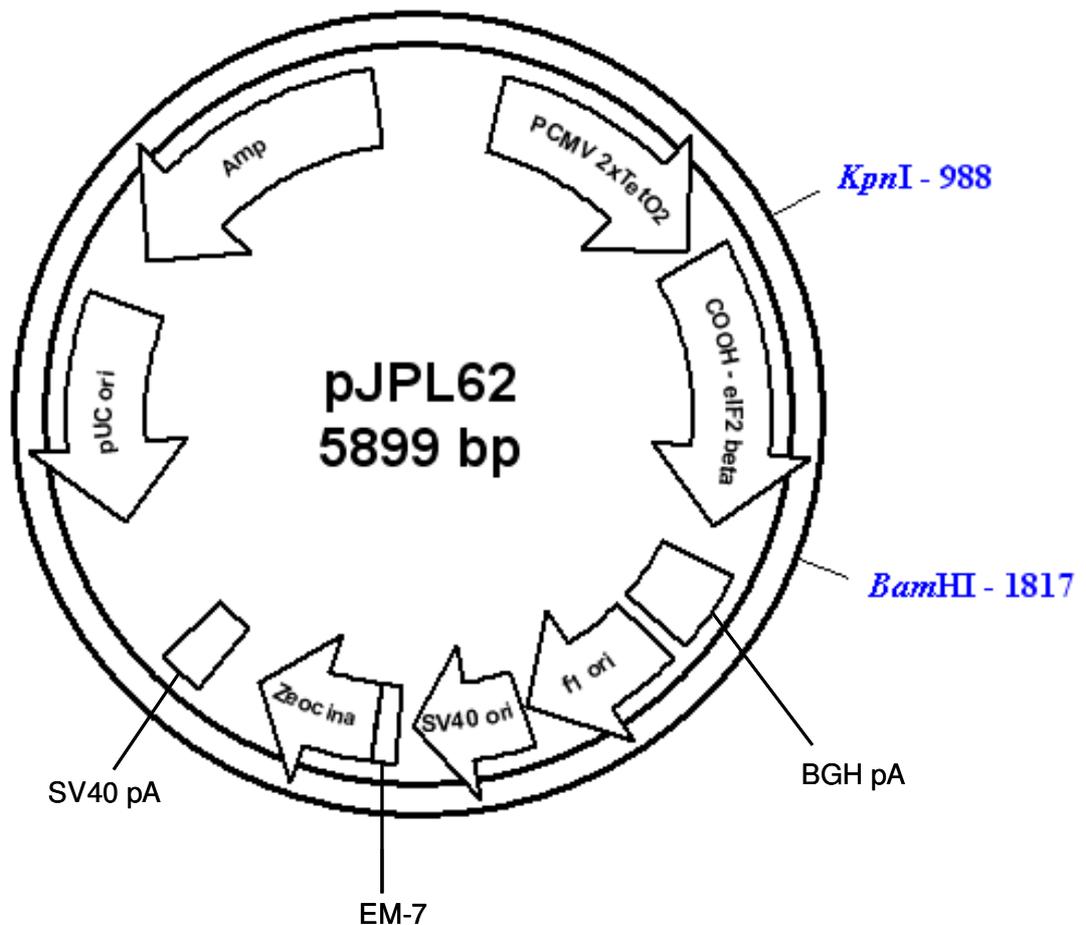


Figura 41. Representação esquemática do plasmídeo pJPL62. Em destaque, na figura, estão os principais elementos do plasmídeo: o fragmento referente à região do cDNA de eIF2 beta humano correspondente à porção carboxi-terminal da proteína (COOH-eIF2 beta) inserido nos sítios *KpnI* e *BamHI*; genes de resistência aos antibióticos ampicilina (Amp) e zeocina; origem de replicação derivada do vírus F1 (f1 ori); origem de replicação de pUC (pUC ori); promotor e origem de replicação de SV40 (SV40 ori); promotor do CMV contendo duas cópias do operador de tetraciclina e TATAbox (PCMV 2xTeto2); sinal de poliadenilação de SV40 (SV40pA) e sinal de poliadenilação do hormônio do crescimento bovino (BGHpA), que permitem a adição da cauda poliA; promotor EM-7, que é sintético e permite a expressão do gene de resistência à zeocina em *E. coli*.

4.6 Etapas da construção do plasmídeo pJPL63

Com o objetivo de obter um plasmídeo que expresse a EGFP sob controle do promotor de CMV e também o repressor de tetraciclina, foi elaborada a construção do plasmídeo pJPL63. Primeiramente, a partir do DNA do plasmídeo pCR3.1, a seqüência do promotor de CMV foi amplificada por uma reação de PCR, utilizando os iniciadores CMVXF e CMVAGR. O primeiro contém um sítio de restrição à endonuclease *Xho*I e o segundo contém o sítio para *Age*I. O fragmento de 676 pb amplificado nessa reação foi clonado no vetor pCR2.1-TOPO, utilizando-se o *TOPO TA cloning Kit*. Clones obtidos apresentaram o fragmento de interesse de 658 pb quando digeridos com *Xho*I e *Age*I, como pode ser observado através do padrão de restrição mostrado na figura 42. Um desses clones originou o plasmídeo pJPL33 (figura 43), o qual foi novamente digerido com as endonucleases *Xho*I e *Age*I para isolar o fragmento referente ao promotor de CMV.

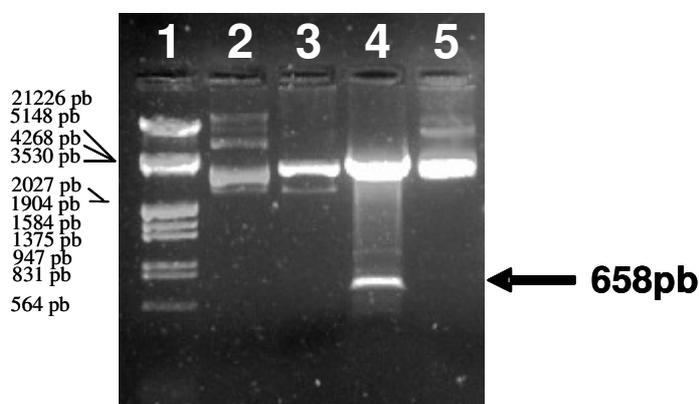


Figura 42. Padrão de digestão dupla com as *Agel* e *Xho*I do plasmídeo pJPL33. Gel de agarose 1% corado com EtBr e observado sob luz ultravioleta. Linha 1: marcador de peso molecular lambda *Eco*RI/*Hind*III; linha 2: plasmídeo pCR2.1-TOPO não-clivado; linha 3: plasmídeo pCR2.1-TOPO clivado com *Agel* e *Xho*I, mostrando um fragmento de 3931 pb; linha 4: plasmídeo pJPL33 clivado com *Agel* e *Xho*I, mostrando um fragmento de aproximadamente 3931 pb referente a pCR2.1-TOPO e um fragmento de 658 pb referente ao promotor de CMV derivado do plasmídeo pCR3.1; linha 5: plasmídeo pJPL33 não-clivado. A seta indica o fragmento de interesse.

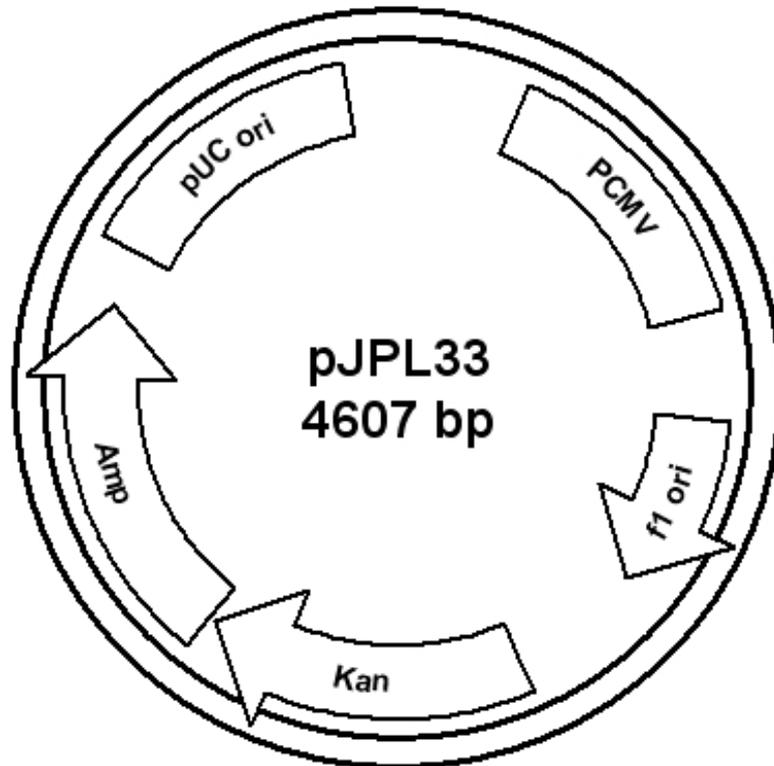


Figura 43. Representação esquemática do plasmídeo pJPL33. Em destaque, na figura, estão os principais componentes do plasmídeo: o fragmento referente à seqüência do promotor de CMV; a origem de replicação derivada do vírus f1 (f1 ori); os genes de resistência à kanamicina (Kan) e à ampicilina (Amp); e a origem de replicação derivada do plasmídeo pUC (pUC ori).

Após ser isolado de gel de agarose, o inserto foi subclonado no plasmídeo pEGFP-1 linearizado pelas mesmas enzimas de restrição. Os clones obtidos foram digeridos com *Xho*I e *Age*I para a análise da presença do fragmento de interesse de 658 pb (figura 44).

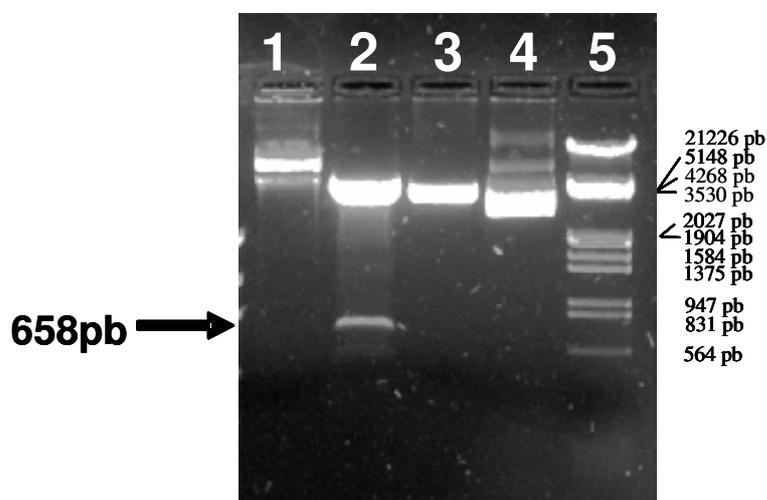


Figura 44. Padrão de digestão dupla com as *AgeI* e *XhoI* do plasmídeo pJPL40. Gel de agarose 1% corado com EtBr e observado sob luz ultravioleta. Linha 1: plasmídeo pJPL40 não-clivado; linha 2; plasmídeo pJPL40 clivado com *AgeI* e *XhoI*, mostrando um fragmento de aproximadamente 4151 pb referente ao plasmídeo pEGFP-1 e um fragmento de 658 pb referente ao promotor de CMV derivado do plasmídeo pCR3.1; linha 3: plasmídeo pEGFP-1 clivado com *AgeI* e *XhoI*, mostrando um fragmento de aproximadamente 4151 pb; linha 4: plasmídeo pEGFP-1 não-clivado; linha 5: marcador de peso molecular lambda *EcoRI/HindIII*. A seta indica o fragmento d interesse.

Um clone apresentando o fragmento originou o plasmídeo pJPL40, o qual apresenta a EGFP sendo precedida pelo promotor de CMV conforme mostrado na figura 45.

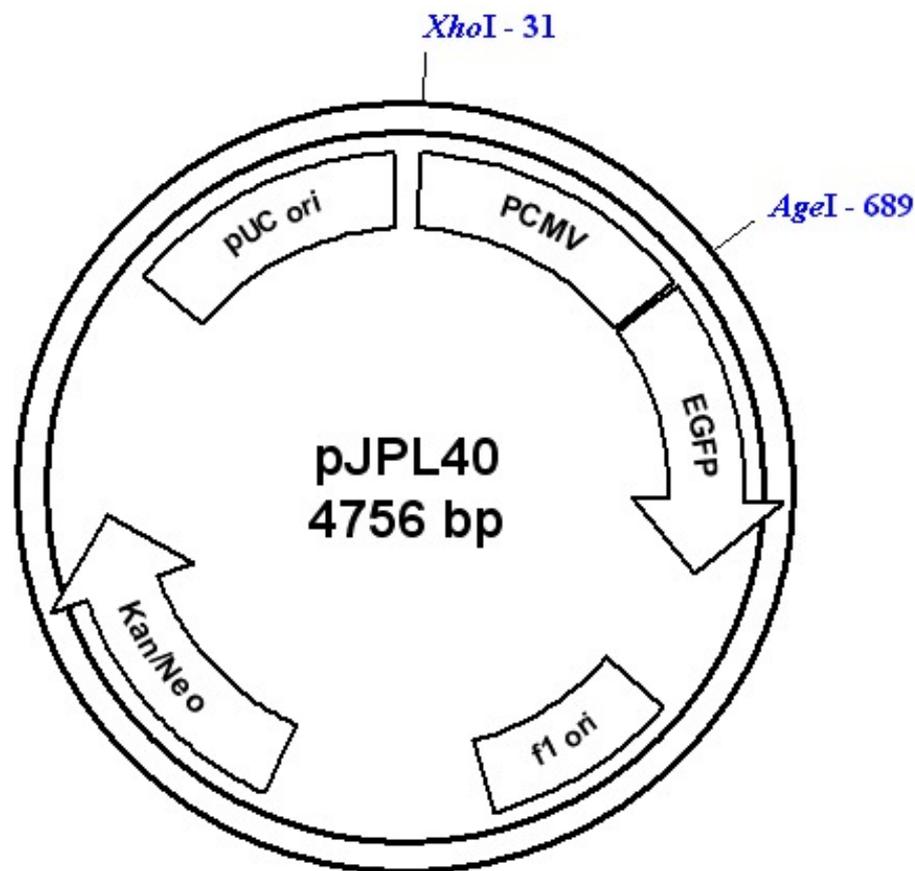


Figura 45 Representação esquemática do plasmídeo pJPL40. Em destaque, na figura, estão os principais elementos do plasmídeo: seqüência do promotor de CMV (PCMV) inserido nos sítios *AgeI* e *XhoI* seguida da seqüência da EGFP (EGFP); genes de resistência aos antibióticos neomicina (Neo) e kanamicina (Kan) e origem de replicação derivada do vírus f1 (f1 ori) e de pUC (pUC ori).

Para obter apenas a seqüência da EGFP precedida pelo promotor de CMV, efetuou-se uma reação de PCR para amplificar todo esse fragmento. A reação da PCR teve como molde o pJPL40 e utilizou os oligonucleotídeo iniciadores CMVXF e EGFPXR. Tal como o primeiro, o segundo oligonucleotídeo também contém um sítio de restrição para a enzima *XhoI*. O produto amplificado apresentou 1650 pb e foi clonado no plasmídeo pCR2.1-TOPO. Os clones obtidos foram tratados com a enzima *XhoI* para confirmar a presença do fragmento de interesse. Um clone

que apresentou o fragmento de 1631 pb (figura 46) foi selecionado e originou o plasmídeo pJPL43 (figura 47).

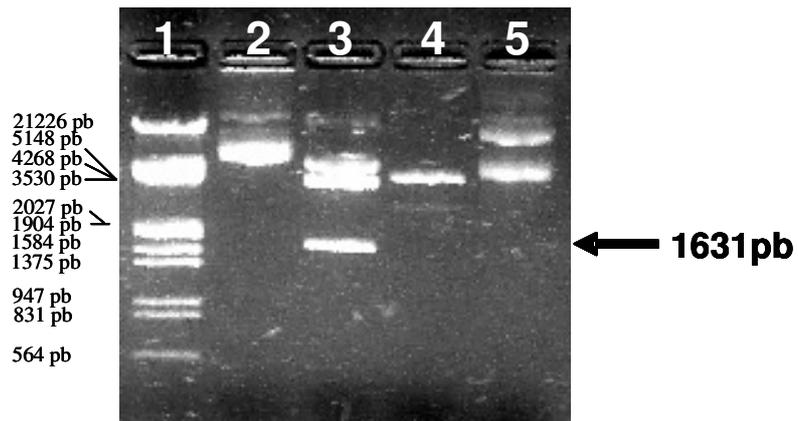


Figura 46. Padrão de digestão com *XhoI* do plasmídeo pJPL43. Gel de agarose 1% corado com EtBr e observado sob luz ultravioleta. Linha 1: marcador de peso molecular lambda *EcoRI/HindIII*; linha 2: plasmídeo pJPL43 não-clivado; linha 3: plasmídeo pJPL43 clivado com *AgeI* e *XhoI*, mostrando um fragmento de aproximadamente 3931 pb referente a pCR2.1-TOPO e um fragmento de 1631 pb referente ao promotor de CMV mais a proteína EGFP; linha 4: plasmídeo pCR2.1-TOPO clivado *XhoI*, mostrando um fragmento de 3931 pb; linha 5: plasmídeo pCR2.1-TOPO não-clivado. A seta indica o fragmento de interesse.

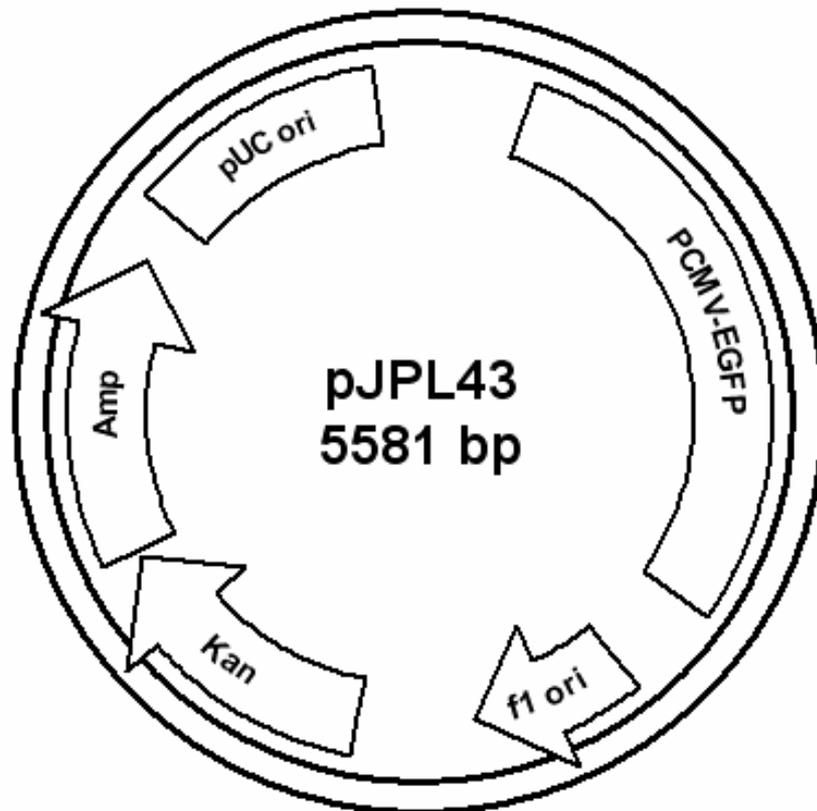


Figura 47. Representação esquemática do plasmídeo pJPL43. Em destaque, na figura, estão os principais componentes do plasmídeo: o fragmento referente à seqüência do promotor de CMV, seguida pela seqüência da EGFP (PCMV-EGFP); a origem de replicação derivada do vírus f1 (f1 ori); os genes de resistência à kanamicina (Kan) e à ampicilina (Amp); e a origem de replicação derivada do plasmídeo pUC (pUC ori).

O segmento nucleotídico composto pela seqüência do promotor de CMV mais a seqüência de EGFP foi isolado do plasmídeo pJPL43 pela digestão com a enzima *Xho*I e foi subclonado no plasmídeo pcDNA6/TR. Para a confirmação da presença do fragmento de interesse, os clones obtidos foram digeridos com *Xho*I. Dos clones obtidos, apenas um mostrou possuir o fragmento de interesse de 1631 pb (figura 48). A seqüência nucleotídica do plasmídeo, até o momento, foi analisada, parcialmente, por seqüenciamento automático e mostrou apresentar tanto a seqüência do promotor de CMV quanto a da EGFP. Esse clone foi denominado pJPL63 (figura 49) e caracteriza-se por ser um plasmídeo que

expressa o repressor de tetraciclina e também a proteína EGFP sob controle do promotor de CMV.

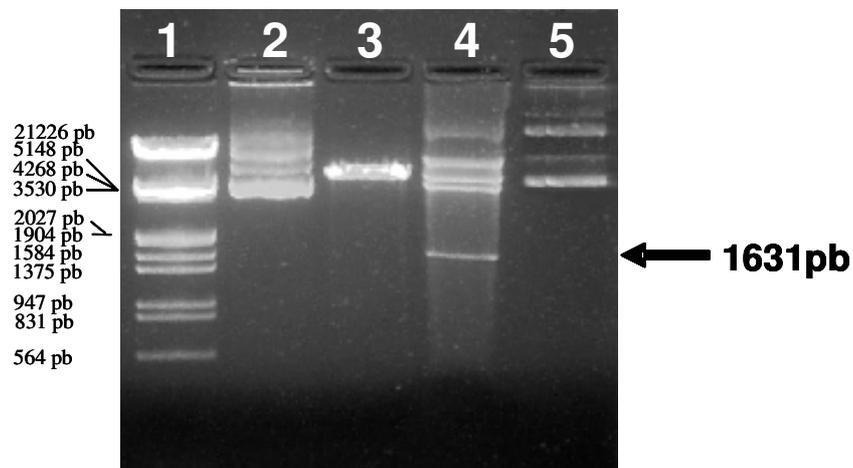


Figura 48. Padrão de digestão com *Xho*I do plasmídeo pJPL63. Gel de agarose 1% corado com EtBr e observado sob luz ultravioleta. Linha 1: marcador de peso molecular lambda *Eco*RI/*Hind*III; linha 2: plasmídeo pcDNA6/TR não-clivado; linha 3: plasmídeo pcDNA6/TR digerido com *Xho*I; linha 4: plasmídeo pJPL63 digerido com *Xho*I mostrando, um fragmento de 1631 pb referente à seqüência do promotor de CMV mais a seqüência da EGFP, um fragmento de aproximadamente 6662 pb referente ao plasmídeo pcDNA6/TR e fragmentos característicos de clivagem parcial;. Linha 5: plasmídeo pJPL63 não-clivado. A seta indica o fragmento de interesse.

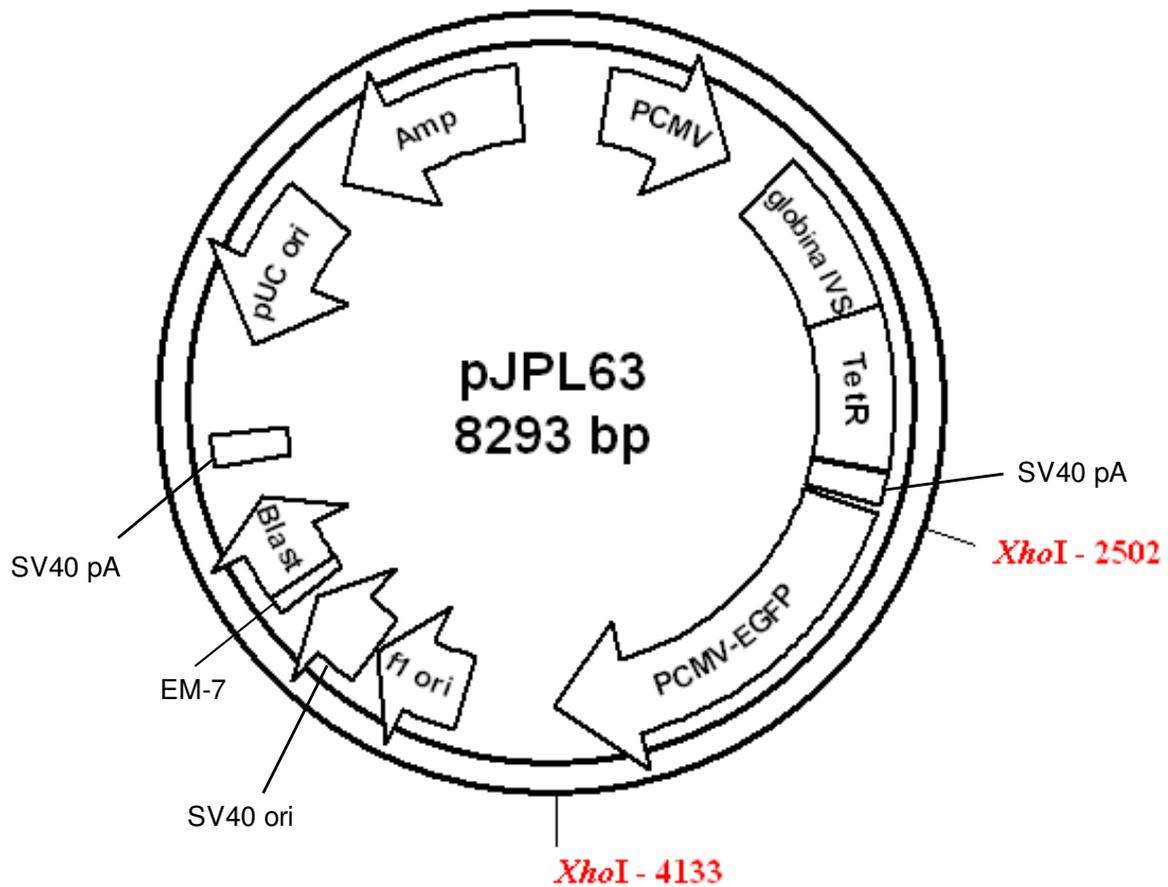


Figura 49. Representação esquemática do plasmídeo pJPL63. Em destaque, na figura, estão os principais elementos do plasmídeo: gene da EGFP sob controle do promotor de CMV (PCMV-EGFP); genes de resistência aos antibióticos ampicilina (Amp) e blastocidina (Blast); origem de replicação derivada do vírus F1 (f1 ori); origem de replicação de PUC (pUC ori); promotor do CMV (PCMV); gene do repressor de tetraciclina (TetR); sinal de poliadenilação de SV40 (SV40pA); promotor EM-7 sintético de procaríotos, que permite a expressão do gene de resistência à blastocidina em *E. coli*. Intron II de beta-globina de coelho (IVS) (globin IVS).

4.7 Construções de plasmídeos para expressar a proteína eIF2 beta humana em células procarióticas

4.7.1 Obtenção da região codificadora de eIF2 beta humano

Foi realizada uma PCR para obter o fragmento referente ao cDNA de eIF2 beta humano (figura 50), que teve como molde o plasmídeo pJP07. Essa reação utilizou o iniciador direto NRUIF, que contém um sítio de restrição para a enzima *NruI* e o iniciador reverso BAMHIR.

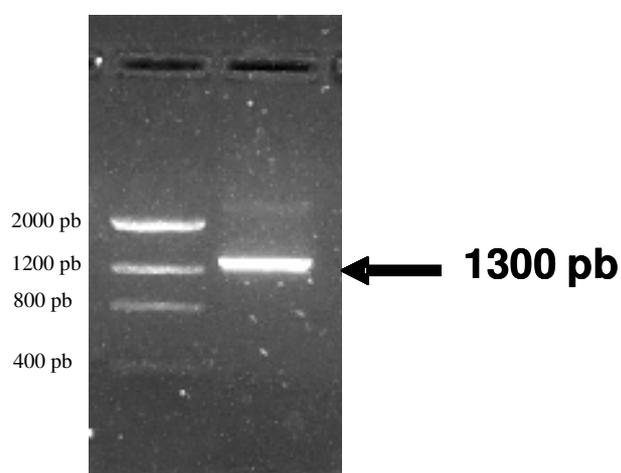


Figura 50. Produto de PCR gerado com a enzima Taq DNA Polimerase. Linha 1: marcador de peso molecular DNA Low Mass Ladder (Ivitrogen); linha 2: produto de amplificação por PCR do fragmento de 1300 pb referente ao cDNA de eIF2 beta humano selvagem, utilizando os oligonucleotídeos iniciadores NRUIF e BAMHIR. A seta indica o fragmento de interesse.

4.7.2 Etapas da construção do plasmídeo pJPL14

4.7.2.1 Construção do plasmídeo pJPL13

O produto amplificado de 1300 pb referente ao cDNA de eIF2 beta humano selvagem 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 *NruI* e *BamHI* 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 (figura 51).

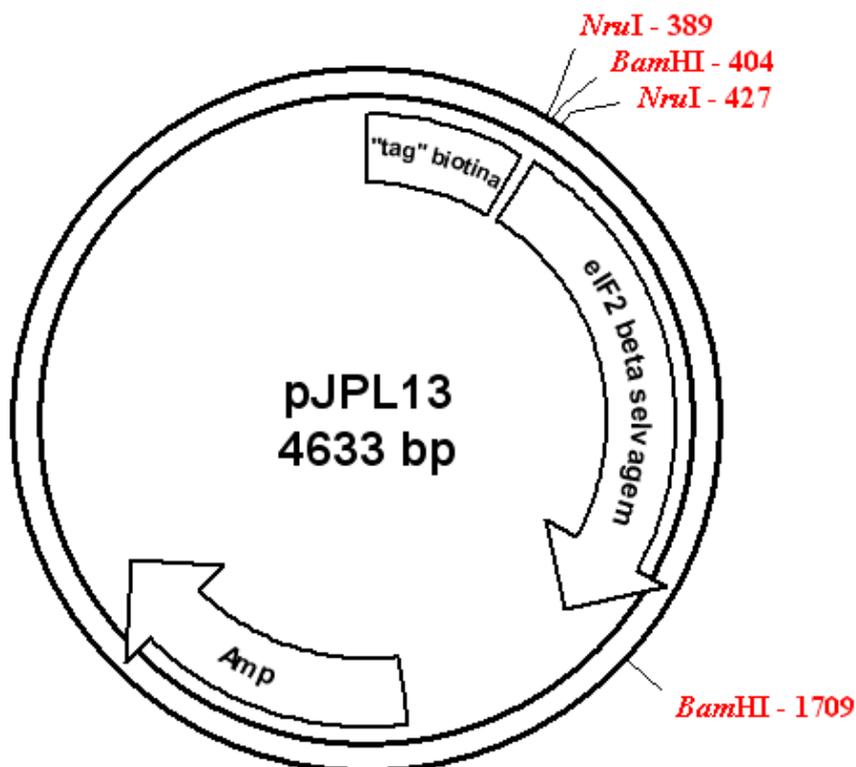


Figura 51. Representação esquemática do plasmídeo pJPL13. Em destaque, na figura, estão os principais elementos do plasmídeo: gene de resistência ao antibiótico ampicilina; seqüência do “tag” de biotina para purificação (“tag” biotina) e o fragmento referente ao cDNA de eIF2 beta selvagem, amplificado por PCR, utilizando os oligonucleotídeos iniciadores NRUIF e BAMHIR (eIF2 beta selvagem).

4.7.2.2 Construção do plasmídeo pJPL14

Para que o gene de eIF2 beta fosse colocado em fase de leitura correta no pJPL13, esse foi tratado com a endonuclease de restrição *NruI* e foi religado. Os clones resultantes da transformação foram digeridos com as enzimas de restrição *NruI* e *BamHI* para confirmação da presença do fragmento de interesse (figura 52). 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 (figura 53).

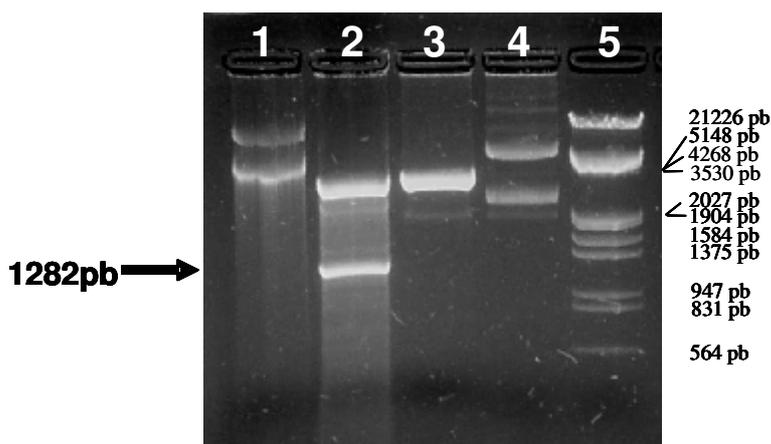


Figura 52. Padrão de digestão com *NruI* e *BamHI* do plasmídeo pJPL14. Gel de agarose 1% corado com EtBr e observado sob luz ultravioleta. Linha 1: plasmídeo pJPL14 não-clivado; linha 2: plasmídeo pJPL14 clivado com *NruI* e *BamHI*, mostrando um fragmento de aproximadamente 3331 pb referente a Pin Point Xa-1 T-Vector e um fragmento de 1282 pb referente à região codificadora do cDNA de eIF2 beta selvagem; linha 3: plasmídeo Pin Point Xa-1 T-Vector clivado *NruI* e *BamHI*, mostrando um fragmento de aproximadamente 3331 pb; linha 4: plasmídeo Pin Point Xa-1 T-Vector não-clivado; linha 5: marcador de peso molecular lambda *EcoRI/HindIII*. A seta indica o fragmento de interesse.

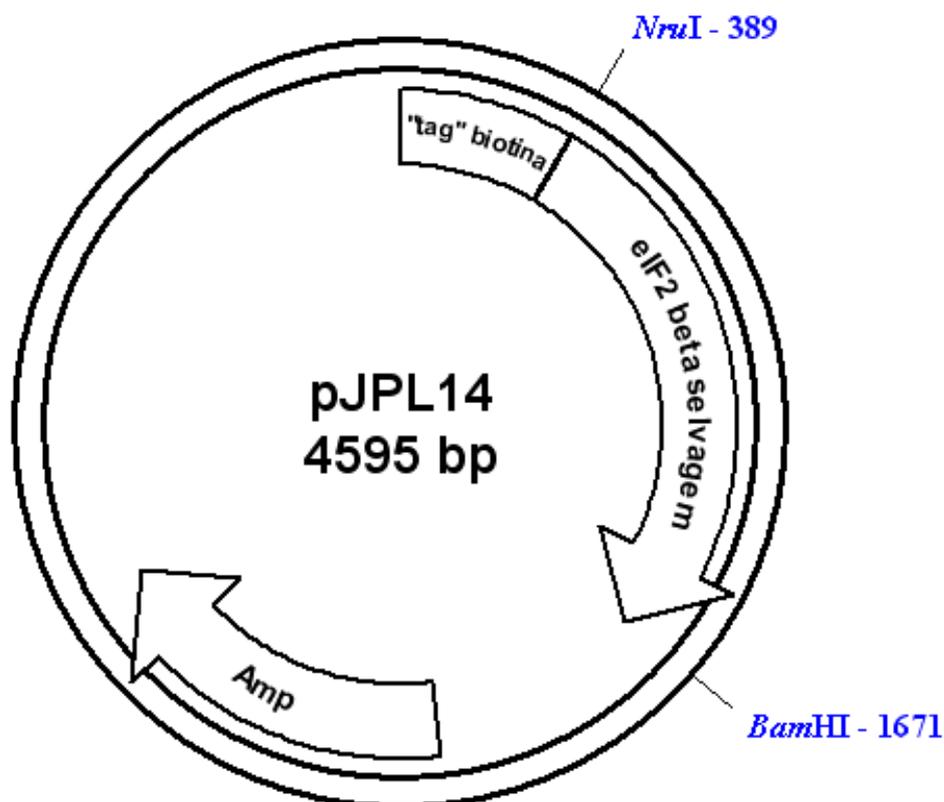


Figura 53. Representação esquemática do plasmídeo pJPL14. Em destaque, na figura, estão os principais elementos do plasmídeo: gene de resistência ao antibiótico ampicilina (Amp); seqüência do “tag” de biotina para purificação (“tag” biotina) e o fragmento referente à região codificadora do cDNA de eIF2 beta selvagem (eIF2 beta selvagem).

4.7.3 Construção do plasmídeo pJPL15

O fragmento referente à região codificadora do cDNA de eIF2 beta humano selvagem foi isolado do plasmídeo pJPL14 por digestão dupla com as enzimas *NruI* e *BamHI*. Após, foi subclonado no plasmídeo Pin Point Xa-1 Vector, que integra o *Pin Point Xa Protein Purification System*, também digerido com as mesmas enzimas. Os clones resultantes da transformação foram tratados com essas endonucleases para análise da presença do inserto de 1282 pb. Clones positivos apresentaram o fragmento de interesse como mostrado na figura 54 e

tiveram toda sua seqüência nucleotídica analisada por seqüenciamento. Um clone apresentando a seqüência correta originou o pJPL15 (figura 55).

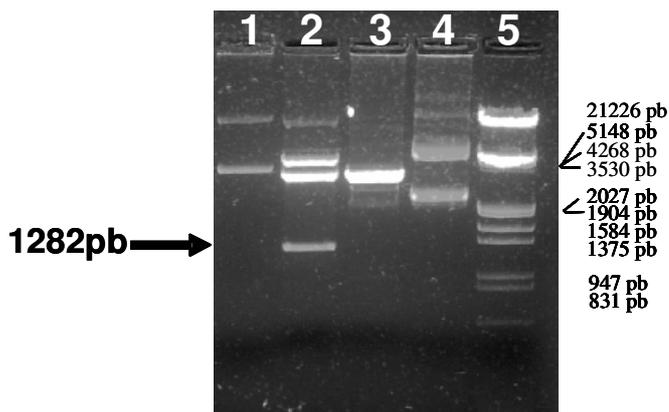


Figura 54. Padrão de digestão com *NruI* e *Bam*HI do plasmídeo pJPL15. Gel de agarose 1% corado com EtBr e observado sob luz ultravioleta. Linha 1: plasmídeo pJPL15 não- clivado; linha 2; plasmídeo pJPL15 clivado com *NruI* e *Bam*HI, mostrando um fragmento de aproximadamente 3331 pb referente a Pin Point Xa-1 Vector , um fragmento de 1282 pb referente à região codificadora do cDNA de eIF2 beta selvagem e, no caso, dois fragmentos mais pesados referentes ao plasmídeo não- clivado devido à clivagem parcial das enzimas; linha 3: plasmídeo Pin Point Xa-1 Vector clivado *NruI* e *Bam*HI, mostrando um fragmento de aproximadamente 3331 pb; linha 4: plasmídeo Pin Point Xa-1 Vector não-clivado; linha 5: marcador de peso molecular lambda *Eco*RI/*Hind*III. A seta indica o fragmento de interesse.

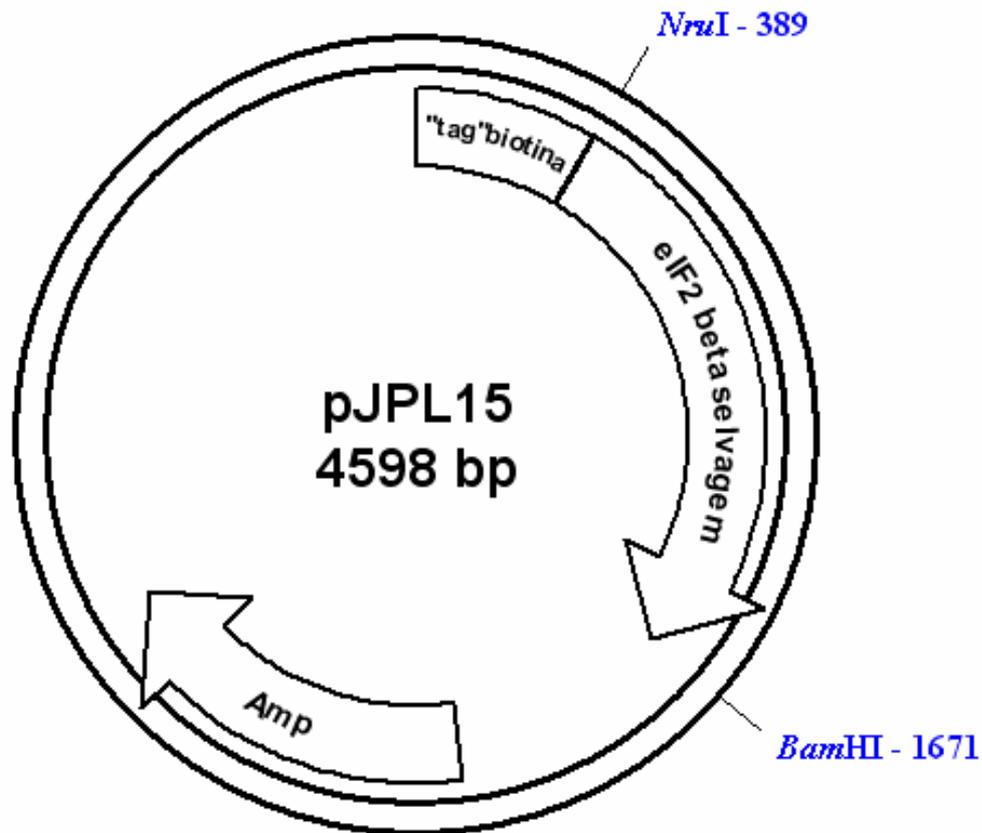


Figura 55. Representação esquemática do plasmídeo pJPL15. Em destaque, na figura, estão os principais elementos do plasmídeo: gene de resistência ao antibiótico ampicilina (Amp); seqüência do “tag” de biotina para purificação (“tag” biotina); e fragmento referente à região codificadora do cDNA de eIF2 beta selvagem (eIF2 beta selvagem).

4.7.4 Etapas da construção do plasmídeo pJPL65

4.7.4.1 Construção do plasmídeo pJPL64

Para a obtenção de um fragmento composto por um “tag” de biotina encontrado no plasmídeo Pin point Xa-1 Vector, juntamente com a região codificadora de eIF2 beta, foi efetuada uma reação de PCR que teve como DNA

molde o pJPL15. Foram utilizados o oligonucleotídeo iniciador direto NDEIF, que é composto por um sítio de restrição para a enzima *NdeI*, e o iniciador reverso BAMHIR. O fragmento de 1695 pb amplificado foi clonado no plasmídeo pCR2.1-TOPO. 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 (figura 56) foi selecionado e originou o plasmídeo pJPL64 (figura 57).

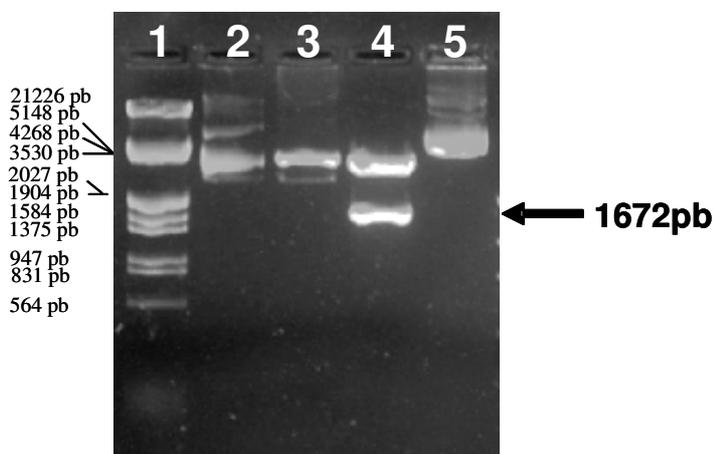


Figura 56. Padrão de digestão com *NdeI* e *BamHI* do plasmídeo pJPL64. Gel de agarose 1% corado com EtBr e observado sob luz ultravioleta. Linha 1: marcador de peso molecular lambda *EcoRI/HindIII*; linha 2: plasmídeo pCR2.1-TOPO não-clivado; linha 3: plasmídeo pCR2.1-TOPO clivado *NdeI* e *BamHI*, mostrando um fragmento de aproximadamente 3931 pb e um fragmento mais leve devido à clivagem parcial; linha 4; plasmídeo pJPL64 clivado com *NdeI* e *BamHI*, mostrando um fragmento de aproximadamente 3931 pb referente a pCR2.1-TOPO e um fragmento de 1672 pb referente ao fragmento composto pelo “tag” de biotina mais a região codificadora do eIF2 beta humano; linha 5: plasmídeo pJPL64 não-clivado. A seta indica o fragmento de interesse.

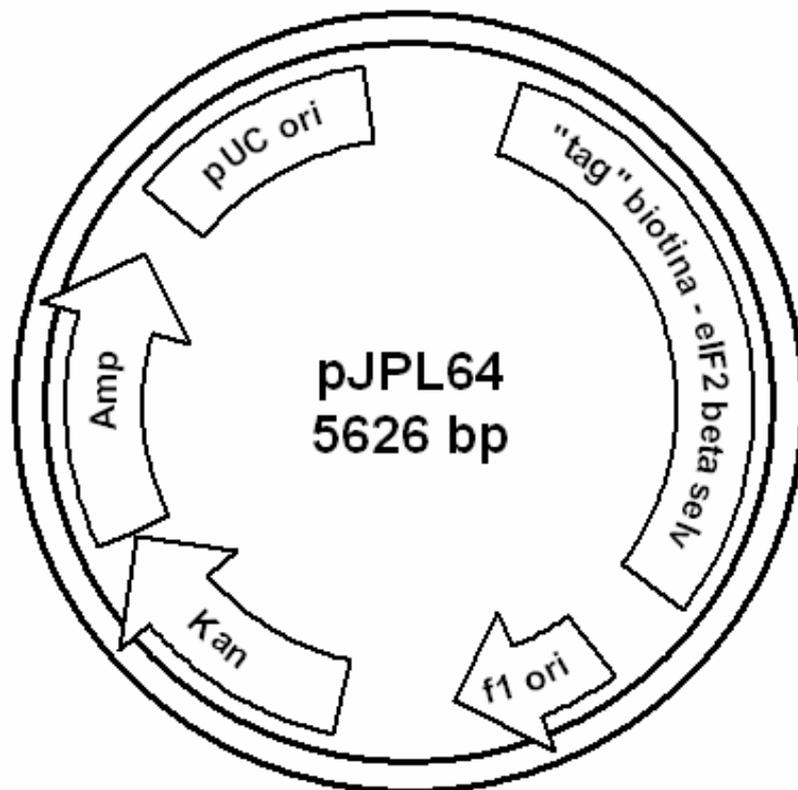


Figura 57. Representação esquemática do plasmídeo pJPL64. Em destaque, na figura, estão os principais componentes do plasmídeo: o fragmento referente ao "tag" de biotina mais a região codificadora do eIF2 beta humano selvagem ("tag" biotina – eIF2 beta selvagem); origem de replicação derivada do vírus f1 (f1 ori); os genes de resistência à kanamicina (Kan) e à ampicilina (Amp); e a origem de replicação derivada do plasmídeo pUC (pUC ori).

4.7.4.2 Construção do plasmídeo pJPL65

A fim de obter outro plasmídeo de expressão em células procarióticas contendo a região codificadora do cDNA de eIF2 beta humano precedida de um “tag” de biotina, foi elaborado o plasmídeo pJPL65. Para isso, o fragmento de interesse foi isolado do plasmídeo pJPL64 por tratamento com as endonucleases *NdeI* e *BamHI* e foi clonado no plasmídeo pET-23 a(+) também digerido com as mesmas enzimas. Para a confirmação da presença de um fragmento de 1672 pb referente ao “tag” de biotina mais a região codificadora de eIF2 beta humano, os clones foram tratados com *NdeI* e *BamHI*, e aqueles com resultado positivo apresentaram o fragmento de interesse como mostrado na figura 58. O clone 1 (linha 2) da figura 58 foi selecionado e parcialmente seqüenciado, originando o plasmídeo pJPL65 (figura 59).

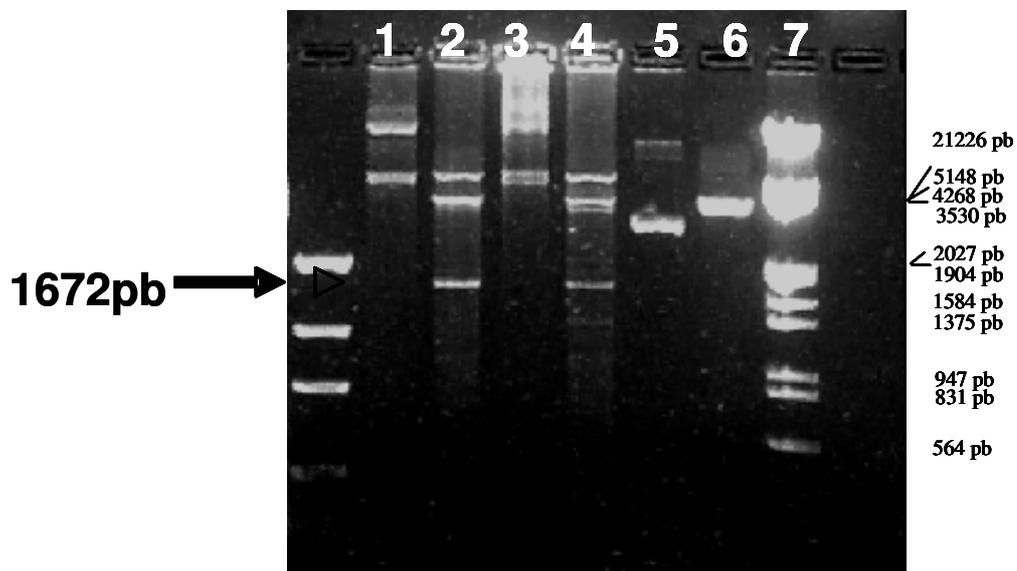


Figura 58. Padrão de digestão com *NdeI* e *BamHI* do plasmídeo pJPL65. Gel de agarose 1% corado com EtBr e observado sob luz ultravioleta. Linha 1: clone 1 que originou o plasmídeo pJPL65 não-clivado; linha 2: clone 1 clivado com *NdeI* e *BamHI*, mostrando um fragmento de aproximadamente 3666 pb referente a pET-23 a(+), um fragmento mais pesado devido à clivagem parcial e um fragmento de 1672 pb referente ao segmento nucleotídico do “tag” de biotina mais a região codificadora do cDNA de eIF2 beta humano selvagem que originou o plasmídeo pJPL65; linha 3: clone 2 referente a pET-23 a(+) contendo o “tag” de biotina mais a região codificadora de eIF2 beta humano selvagem não-clivado; linha 4: clone 2 clivado com *NdeI* e *BamHI*, mostrando um fragmento de aproximadamente 3666 pb referente a pET-23 a(+), um fragmento mais pesado devido à clivagem parcial e um fragmento de 1672 pb referente ao segmento nucleotídico do “tag” de biotina mais a região codificadora do cDNA de eIF2 beta humano selvagem; linha 5: plasmídeo pET-23 a(+) não-clivado; linha 6: plasmídeo pET-23 a(+) clivado *NdeI* e *BamHI*, mostrando um fragmento de 3666 pb; linha 7: marcador de peso molecular lambda *EcoRI/HindIII*.

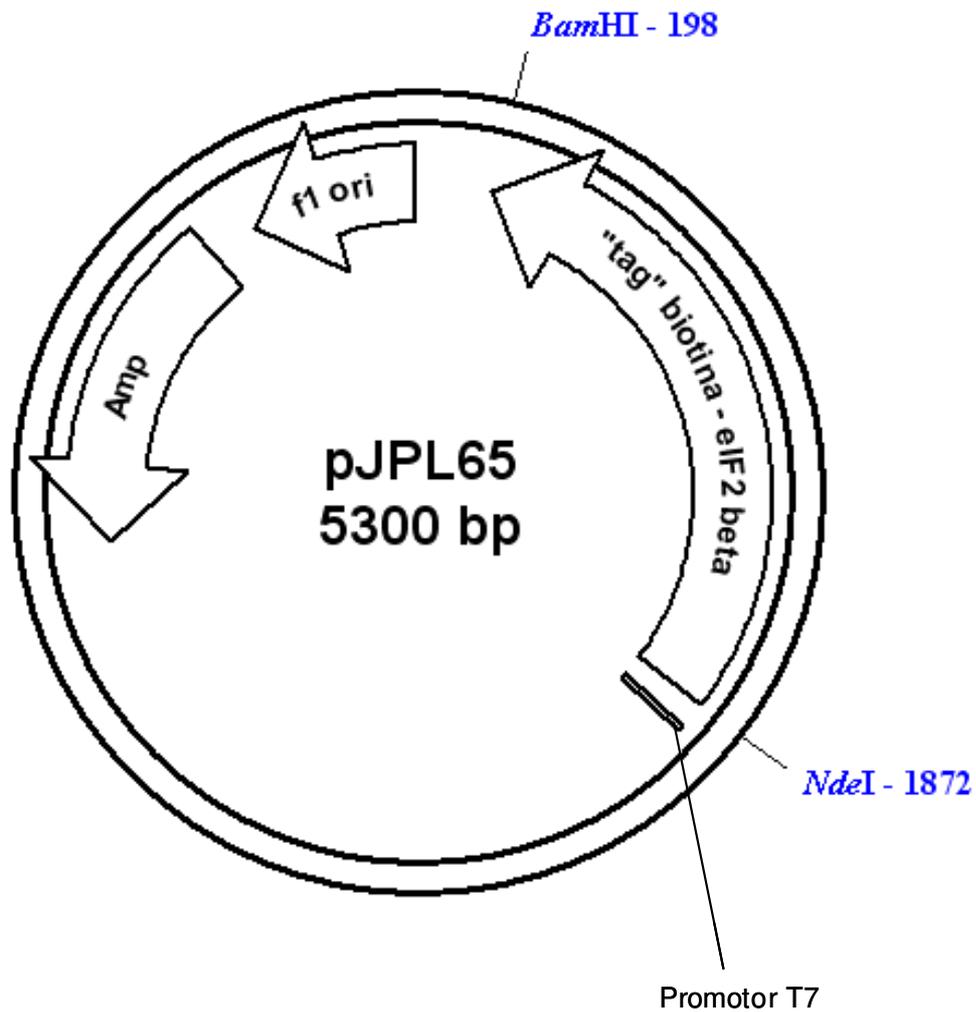


Figura 59. Representação esquemática do plasmídeo pJPL65. Em destaque, na figura, estão os principais componentes do plasmídeo: seqüência do promotor T7 (promotor T7), fragmento referente ao "tag" de biotina mais a região codificadora de eIF2 beta humano ("tag" biotina – eIF2 beta), a origem de replicação derivada do vírus f1 (f1 ori) e gene de resistência ao antibiótico ampicilina (Amp).

Capítulo 5

Discussão

5. DISCUSSÃO

O uso 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.*, 2002) 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 de doenças auto-imunes (Baum *et al.*, 2003), diminuição da progressão de tumores, combate de 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 Institutes of Health Recombinant DNA Advisory Committee", em março de 2000, das 350 terapias de terapia gênica, 67% visavam o tratamento de câncer. Destas, 31% usavam imunoterapias *in vitro*, 32% usavam imunoterapias *in vivo*, 15% eram baseadas em terapias suicidas pró-drogas e somente 2% utilizavam uma abordagem de lise celular direcionada por vetor (Anderson, 2000). Conceitualmente, a terapia gênica envolve identificação apropriada do gene-alvo e do direcionamento celular adequado. Em vista disso, vários problemas relacionados a essa técnica têm sido encontrados, como falta de um sistema de transferência eficiente, falta de expressão gênica suficiente e reações imunes do hospedeiro aos vetores utilizados, sendo esses desafios a serem superados (Verma e Somia, 1997).

A síntese protéica é um processo vital à célula que 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 a perturbação da função de qualquer um dos componentes nesse sistema de tradução cause danos à integridade correta do funcionamento celular. Em vista disso, esse processo torna-se um forte alvo para a terapia gênica direcionada, principalmente no que se refere ao tratamento de tumores.

Para o tratamento de câncer, que freqüentemente ocorre como o resultado múltiplo de mudanças genéticas ou como consequência de uma única mutação em células tronco, a terapia gênica envolve a substituição de genes supressores de tumor perdidos e/ou o bloqueio de oncogenes ou genes proinflamatórios. Uma vez que nenhum sistema simples de vetor pode satisfazer todos os critérios pontuais para cada situação e ser eficiente em todas as aplicações potenciais de terapia gênica (Hunt e Vorburger, 2002), torna-se extremamente valioso o direcionamento desse tipo de terapia a um processo vital da célula, como o de síntese protéica. Além disso, 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. Esses se tornam fortes alvos para a terapia gênica direcionada ao tratamento de tumores.

O processo de síntese protéica é dividido em três etapas, apresentando fatores protéicos específicos envolvidos no processo: o início da síntese que é a etapa regulatória do processo; a etapa de alongamento da cadeia polipeptídica e o término da síntese.

A forma mais eficaz de controle da síntese de proteínas em eucariotos encontra-se na regulação da atividade ou na quantidade dos complexos envolvidos no processo de início de tradução. O controle do processo global de síntese protéica é geralmente realizado pela modulação da atividade desses complexos por mudanças no estado de fosforilação de vários sítios-alvo. Estes estão presentes em muitos dos fatores de iniciação ou nos reguladores que interagem com eles (Gebauer e Hentze, 2004).

O fator 2 da etapa de início da tradução de eucariotos, eIF2, apresenta um papel-chave no processo global e na sua regulação (Sonenberg e Dever, 2003; 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; Hinnebush, 2000). O eIF2 humano é formado por três subunidades não-idênticas, denominadas eIF2 alfa (36Kd), eIF2 gama (52 Kd) e eIF2 beta (38 Kd), que permanecem associadas durante todo o ciclo. A fosforilação da subunidade alfa em sua serina 51 faz com que eIF2 tenha maior afinidade pelo fator de troca eIF2B, bloqueando a reação de troca de GDP por GTP. Isso causa o seqüestro de eIF2B e conseqüentemente a falta de troca de GDP por GTP, o que acarreta uma redução de complexos ternários ativos e a inibição do processo global 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 de proteínas, 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, (Proud, 2005), como infecção viral (Clemens e Elia, 1997), apoptose (Salens *et al.*, 2001), carência de aminoácidos, choque térmico e circunstâncias de estresse do retículo endoplasmático (Kozak, 1999). Em mamíferos, essas diversas condições de estresse causam a ativação de quatro diferentes quinases (Gebauer e Hentze, 2004; Proud, 2005). Percebe-se, então, que esse processo bioquímico de fosforilação é bastante complexo e instável, envolvendo variáveis em demasia para ser um alvo de terapia gênica a qual também é difícil de ser padronizada.

Desse modo, neste trabalho, sugerimos como alvo esse importante fator de iniciação eIF2. Entretanto, evitamos utilizar a subunidade modulada pelo complexo processo de fosforilação. Optamos por trabalhar com a subunidade beta desse fator que apresenta suas principais funções relacionadas a características estruturais. A subunidade beta é responsável por funções essenciais à integridade do processo de síntese protéica que são: 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 hidroliza 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). Interessantemente, 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, como já se salientou, são altamente conservados entre eucariotos e são os verdadeiros responsáveis pela interação entre eIF2 e o 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 heterotrímero (Laurino *et al.*, 1999). Dados não-publicados de Laurino JP (1999) mostraram que, em ensaio de curva de crescimento de *S. cerevisiae*, genes desprovidos dos blocos de lisinas competindo com genes selvagens, sob controle do mesmo promotor, eram capazes de induzir parada do crescimento celular.

Considerando a fundamental e particular característica estrutural, essencial ao processo de síntese protéica, e com base nos dados não publicados de Laurino JP, identificou-se o gene de eIF2 beta humano como um forte e simples candidato à terapia gênica direcionada principalmente ao tratamento de tumores.

Nossos objetivos foram, então, construir plasmídeos contendo fragmentos truncados de eIF2 beta sob o controle de expressão de um forte promotor humano capaz de induzir a expressão dessas proteínas truncadas de maneira eficiente e competitiva em relação à molécula humana selvagem em células humanas.

Inicialmente, deletamos esses três blocos de lisinas do segmento nucleotídico referente ao cDNA de eIF2 beta humano. O fragmento referente ao cDNA de eIF2 beta humano selvagem foi clonado no plasmídeo pALTER-EX1 (Promega), que integra o sistema de mutagênese *Altered Sites II in vitro Mutagenesis System* (Promega). Este é um sistema que permite fazer ciclos múltiplos de mutagênese no mesmo vetor. Isso se torna possível devido à presença, no plasmídeo pALTER-EX1, de dois genes de resistência a antibióticos distintos que proporcionam alternância de resistência a antibiótico entre um ciclo

de mutagênese e outro. Essa alternância ocorre devido à utilização concomitante de dois oligonucleotídeos: um para o reparo de um gene e outro para o silenciamento do outro gene de resistência a determinado antibiótico. Desse modo, pode-se alternar a funcionalidade dos genes de resistência do plasmídeo a esses dois antibióticos quantas vezes forem necessárias e, assim, realizar quantos ciclos de mutagênese forem necessários sobre o mesmo plasmídeo. Essa estratégia foi escolhida por aumentar a eficiência da formação da fita de DNA mutado, uma vez que para gerá-la são utilizados ao mesmo tempo três oligonucleotídeos distintos (o da mutação sítio dirigida propriamente dita, além do de mutação pontual de reparo e do oligonucleotídeo de silenciamento da atividade de resistência ao antibiótico).

Após ter sido obtida o fragmento referente ao cDNA de eIF2 beta humano desprovido dos três blocos de lisinas, partiu-se para as etapas que resultaram na construção de quatro plasmídeos de expressão para células eucarióticas: A) pJPL46, contendo a seqüência referente à região codificadora do cDNA de eIF2 beta humano; B) pJPL50, contendo a seqüência referente à região codificadora do cDNA de eIF2 beta humano desprovida dos três blocos de lisinas; C) pJPL60, contendo a seqüência referente à região do cDNA de eIF2 beta humano correspondente à porção amino-terminal da proteína; e D) pJPL62, contendo a seqüência referente à região do cDNA de eIF2 beta humano correspondente à porção carboxi-terminal da proteína. Para a obtenção desse fragmento, foram realizadas reações de amplificação por PCR. Para as construções de pJPL46, 60 e 62, o molde para a reação de PCR foi o plasmídeo contendo o fragmento referente ao cDNA selvagem de eIF2 beta pJPL07. Para a reação do pJPL50, o DNA molde foi o plasmídeo de mutagênese contendo o fragmento referente ao cDNA de eIF2 beta desprovido dos três blocos de lisinas pJPL17. Os produtos amplificados foram clonados no plasmídeo pCR2.1-TOPO^o utilizando-se o *TOPO TA cloning Kit* (Invitrogen). Esse plasmídeo foi escolhido por permitir a clonagem direta de produtos de PCR gerados com extremidades cegas. Os quatro fragmentos de interesse foram isolados de pCR2.1-TOPO e foi realizada clonagem direcionada através do tratamento com as enzimas de restrição *KpnI* e *BamHI* no plasmídeo pcDNA4/TO que é o principal componente do sistema de

expressão para células de mamíferos regulado por tetraciclina, *T-REx System* (Invitrogen). Esse é um plasmídeo de expressão induzível por tetraciclina para células eucarióticas, o qual expressa a proteína de interesse sob controle do forte promotor de CMV, além de possuir a origem de replicação de SV40 que lhe fornece replicação em alto número de cópias.

Para a etapa inicial de teste e aplicação de nossas construções em cultura de células humanas, foi escolhido o sistema *T-REx*, pois este permite controlar e regular o tempo e os níveis da expressão do gene de interesse, e essa característica tem-se mostrado essencial tanto para análises *in vitro* quanto *in vivo* da função gênica nas células em que se está trabalhando (Xu *et al.*, 2003). Essa regulação permite um maior controle dos experimentos e confiabilidade dos resultados obtidos, promovendo, assim, uma maior eficácia e segurança da terapia gênica nessa fase de teste. Outra vantagem desse sistema é que, diferentemente de outros sistemas regulados por tetraciclina, que utilizam moléculas regulatórias híbridas e domínios de transativação viral (Gossen e Bujard, 1992), esse usa somente elementos regulatórios do operon Tet de *E. coli* Tn10 nativo (Yao *et al.*, 1998). Ele se aproxima mais da regulação do operon *tet* bacteriano (Hillen *et al.*, 1983; Hillen e Berens, 1994) e evita, assim, os efeitos potencialmente tóxicos de domínios de transativação virais observados em algumas linhagens de células de mamíferos.

Após a clonagem de nossos fragmentos de interesse em pcDNA4/TO, os clones recombinantes obtidos tiveram toda sua seqüência nucleotídica analisada por seqüenciamento automático. Por comparação com a seqüência publicada no banco de dados (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, número de acesso M29536, figura 3), as seqüências obtidas a partir de seqüenciamento automático de DNA do plasmídeo pJPL46 contendo a região codificadora selvagem de eIF2 beta humano, do plasmídeo pJPL50 contendo o fragmento referente à região codificadora de eIF2 beta humano desprovido dos blocos de lisinas e do pJPL60 com o fragmento referente a região correspondente à porção amino-terminal da proteína foram identificadas como isentas de mutações. No entanto, a seqüência do plasmídeo pJPL62, contendo a região do cDNA correspondente à porção carboxi-terminal da proteína eIF2 beta humana, apresentou uma transição A→G,

na posição 694, que causa a troca do aminoácido Asp, que tem cadeia lateral ácida pelo aminoácido Gly que possui cadeia lateral apolar. Isso provavelmente se deve ao processo de polimerização realizado durante as reações de PCR com *Taq* DNA Polimerase a qual não apresenta a atividade exonucleásica 3' → 5', o que aumenta a probabilidade de introdução de mutações. O pJPL62 foi elaborado para que se tenha mais um controle dos experimentos no que se refere à presença ou à ausência dos três blocos de lisinas. Por esse motivo, sua aplicação não será eliminada desses testes.

O outro componente principal desse sistema é o plasmídeo regulatório pcDNA6/TR que codifica o repressor de tetraciclina. No sistema *T-Rex*, a expressão do gene de interesse é reprimida na ausência de tetraciclina e induzida em sua presença. (Yao *et al.*, 1998).

Para refinar este trabalho e alcançar um controle mais efetivo da proliferação celular quando as construções forem testadas em células humanas, resolveu-se elaborar a construção do vetor que foi denominado pJPL63. O objetivo foi obter um plasmídeo que contivesse o repressor de tetraciclina essencial ao sistema *T-Rex*, além de apresentar uma variante da GFP (EGFP) sob controle do forte promotor de CMV. Após ser isolado do plasmídeo pJPL43, o fragmento composto pela seqüência do promotor de CMV e da seqüência da EGFP foi clonado de maneira não-direcionada no sítio de restrição para a enzima *Xho*I no plasmídeo pcDNA6/TR. A presença do fragmento foi confirmada por digestão com *Xho*I. O clone obtido ainda não foi completamente seqüenciado, entretanto tanto a seqüência do promotor de CMV quanto da EGFP foram identificadas por seqüenciamento.

Um segundo e não menos importante objetivo deste trabalho foi clonar a seqüência referente à região codificadora do cDNA de eIF2 beta humano selvagem em um vetor para expressão em células procarióticas. A intenção de expressar essa proteína é produzir anticorpos contra eIF2 beta humano que poderão ser utilizados para a confirmação da presença de sua forma selvagem, bem como de suas formas truncadas nas células humanas tratadas.

Foi obtido um produto de PCR correspondente a essa seqüência de interesse o qual foi clonado no vetor Pin Point Xa-1 T-Vector que, além de permitir

a clonagem direta de produtos de PCR, permite também a expressão de proteínas fundidas com biotina em células procarióticas para posterior purificação. Após muitas tentativas de clonagem sem sucesso, essa foi realizada e originou o plasmídeo pJPL13. O clone obtido foi seqüenciado e, por comparação com a seqüência publicada no banco de dados, não apresentou nenhuma mutação.

Foi iniciada a etapa de expressão da proteína eIF2 beta humana e também, após várias tentativas, não se obteve sucesso. Uma nova tentativa foi utilizar outro plasmídeo de expressão que como o anterior contivesse o “tag” de biotina. O fragmento de interesse foi isolado e clonado no vetor Pin Point Xa-1 Vector que integra o *Pin Point Xa Protein Purification System* (Promega) e se diferencia do outro apenas por não permitir a clonagem direta de produtos de PCR. Essa construção originou o plasmídeo pJPL15. Novamente, depois de repetidos testes, a expressão da proteína não foi obtida.

Uma outra estratégia para tentar solucionar o problema foi obter a seqüência do “tag” de biotina mais a seqüência referente à região codificadora selvagem de eIF2 beta humano em um único fragmento e cloná-la em outro plasmídeo de expressão para células procarióticas denominado pET-23 a(+) (Novagen). Com esse intuito, foi realizada uma reação de PCR, tendo como molde o plasmídeo pJPL15. O produto de PCR foi clonado em pCR2.1-TOPO. Posteriormente, foi isolado e clonado de forma direcionada, utilizando as enzimas de restrição *NdeI* e *BamHI*. O clone selecionado originou o plasmídeo pJPL65 que foi confirmado por análise de restrição e por seqüenciamento automático. A etapa de expressão da proteína eIF2 beta humana fundida com biotina nesse plasmídeo ainda não foi iniciada.

Portanto, neste trabalho, foi possível obter seis diferentes ferramentas moleculares para a análise das conseqüências da deleção dos três blocos de lisinas da subunidade beta do eIF2 humano em relação à proliferação de células humanas. Quatro dessas ferramentas, pJPL46, pJPL50, pJPL60 e pJPL62, contendo as diferentes formas de eIF2 beta humano, estão diretamente relacionadas com a presença ou ausência desses blocos. As outras duas – pJPL63 contendo o repressor de tetraciclina e EGFP sob controle do promotor de CMV e pJPL65 contendo eIF2 beta humano para ser expresso em células

procarióticas – foram elaboradas com o intuito de analisar as conseqüências das quatro primeiras.

Os objetivos futuros são aplicar essas ferramentas em cultura de células humanas para analisar sua influência na proliferação celular. É possível que formas truncadas da proteína eIF2 beta humana, competindo com a forma selvagem da célula, tornem-se uma forte e simples estratégia para terapia gênica, a qual pode ser direcionada por anticorpos carreadores de plasmídeos de alto número de cópias, contendo formas mutantes do gene de eIF2 beta sob controle de um forte promotor. Esta estratégia pode ser principalmente testada em tratamento de tumores.

Capítulo 6

Referências bibliográficas

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Anderson WF (2000) Gene therapy scores against cancer. *Nature Medicine* 6, 862-863.
- Andersson S, Davis DL, Dahlback H, Jornvall H, Russell DW (1989) Cloning, structure, and expression of the mitochondrial cytochrome P-450 sterol 26-hydroxylase, a bile acid biosynthetic enzyme. *J Biol Chem* 264: 8222-8229.
- 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, Muller PP, Pelletier J, Sonenberg N, Trachsel H (1989) A mammalian translation initiation factor can substitute for its yeast homologue in vivo. *J. Biol. Chem* 264: 12145-12147.
- 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: 1673-1688.
- 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: 18573-18585.
- 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: 27042-27052.
- 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* 90:145-149.
- BD Bioscience Homepage. <http://www.bdbiosciences.com> acessado em fevereiro/2005.
- Bommer JA, Kraft R, Kurzchalia TV, Price NT, Proud CG (1991) Amino acid sequence analysis of the β and γ subunits of eucaryotic initiation factor eIF-2. Identification of regions interacting with GTP. *Biochim Biophys Acta* 1079: 308-315.

- Boshart M, Weber F, Jahn G, Dorsch-Hasler K, Fleckenstein B, Schaffner W (1985) A very strong enhancer is located upstream of an immediate early gene of human cytomegalovirus. *Cell* 41:521-530.
- Castilho-Valavicius B, Thompson GM, Donahue TF (1992) Mutation analysis of the Cys-X₂-Cys-X₁₉-Cys-X₂-Cys motif in the β subunit of eukaryotic translation initiation factor 2. *Gene Exp* 3: 297-309.
- 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.
- Chiorini JA, Miyamoto S, Harkin SJ, Safer B (1999) Genomic cloning and characterization of the human eukaryotic initiation factor-2beta promoter. *J Biol Chem* 274: 4195-4201.
- Chromas Homepage. <http://www.technelysium.com.au/chromas.html> acessado em fevereiro/2005.
- Cigan AM, Feng L, Donahue TF (1988) tRNA^{Met} functions in directing the scanning ribosome to the site of translation. *Science* 242: 93-97.
- Clemens MJ, Elia A (1997) The double-stranded RNA-dependent protein kinase PKR: structure and function. *J Interferon Cytokine Res.* 9: 503-524.
- Conese M, Auriche C, Ascenzioni F (2004) Gene therapy progress and prospects: episomally maintained self-replicating systems. *Gene Ther* 11: 1735-1741.
- Das S, Ghosh R, Maitra U (2001) Eukaryotic translation initiation factor 5 functions as a GTPase-activating protein. *J Biol Chem* 276: 6720-6726.
- 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: 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: 3942-50.
- Dasso MC, Milburn SC, Hershey JWB and Jackson RJ (1990) Selection of the 5'-proximal translation initiation site influenced by mRNA and eIF-2 concentrations. *Eur J Biochem* 187: 361-371.

- Dever TE, Feng L, Wek RC, Cigan AM, Donahue TF, Hinnebusch AG (1992) Phosphorylation of initiation factor 2 α by protein kinase GCN2 mediates gene-specific translational control of GCN4 in yeast. *Cell* 68: 585-596.
- Dever TE, Yang W, Astrom S, Bystrom AS, Hinnebusch AG (1995) Modulation of tRNA_i^{met}, eIF-2 and eIF-2B expression shows that GCN4 translation is inversely coupled to the level of eIF-2.GTP.Met- tRNA_i^{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-2 β 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* 52:1-3.
- 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: 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* 18:334-342.
- Friedmann T (2001) Stanfield Rogers: insights into virus vectors and failure of an early gene therapy model. *Mol Ther* 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.
- 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).
- Hillen W, Berens C (1994) Mechanisms underlying expression of Tn10 encoded tetracycline resistance. *Annu Rev Microbiol* 48: 345-369.
- Hillen W, Gatz C, Altschmied L, Schollmeier K, Meier I (1983) Control of expression of the Tn10-encoded tetracycline resistance genes. Equilibrium and kinetic investigation of the regulatory reactions. *J Mol Biol* 169: 707-721.
- Hinnebush AG (1994) Translational control of GCN4: an *in vivo* barometer of initiation factor activity. *TIBS* 19: 409-414.
- Hinnebush 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/> acessado em fevereiro/2005.
- Kaempfer R, Hollender R, Abrams WR, Israeli R (1978) Specific binding of messenger RNA and methionyl-tRNA^{Met} 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: 12744-12746.
- Kimball SR (1999) Eukaryotic initiation factor eIF2. *Int J Biochem Cell Biol* 31: 25-29.
- Kimball SR, Heinzinger NK, Horetsky RL, Jefferson LS (1998) Identification of interprotein interactions between the subunits of eukaryotic initiation factors eIF2 and eIF2B. *J Biol Chem* 273: 3039-3044.
- Kozak M (1978) How do eucaryotic ribosomes select initiation regions in messenger RNA? *Cell* 15: 1109-1123.

- 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 (1987) Effects of intercistronic length on the efficiency of reinitiation by eucaryotic ribosomes. *Mol Cell Biol* 7: 438-3445.
- 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 eucaryotic ribosomes. *Gene Expr* 1: 11-115.
- Lamphear BJ, Kirchweger R, Skern T, Rhoads RE (1995) Mapping of functional domains in eukaryotic protein synthesis initiation factor 4G (eIF-4G) with picornaviral proteases. *J Biol Chem* 270: 21975-21983.
- 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 pp.960.
- Majumdar R, Bandyopadhyay A, Maitra U (2003) Mammalian translation initiation factor eIF1 functions with eIF1A and eIF3 in the formation of a stable 40 S preinitiation complex. *J Biol Chem* 278: 6580-6587.
- Matsuo H, Li H, McGuire AM, Fletcher CM, Gingras AC, Sonenberg N, Wagner G (1997) Structure of translation factor eIF4E bound to m7GDP and interaction with 4E-binding protein. *Nat Struct Biol* 4: 717-724.
- 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.
- Mezzina M, Danos O (2002) Five years of vector service for gene therapy. *Trends Genet* 18:118-119.

- Milburn SC, Hershey JW, Davies MV, Kelleher K, Kaufman RJ (1990) Cloning and expression of eukaryotic initiation factor 4B cDNA: sequence determination identifies a common RNA recognition motif. *EMBO J* 9: 2783-2790.
- Moldave K (1985) Eukaryotic protein synthesis. *Annu Rev Biochem* 54: 1109-1149.
- National Center for Biotechnology and Information Homepage (NCBI). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> acessado em fevereiro/2005.
- Nelson JA, Reynolds-Kohler C, Smith BA (1987) Negative and positive regulation by a short segment in the 5'-flanking region of the human cytomegalovirus major immediate-early gene. *Mol Cell Biol* 7: 4125-4129.
- Nielsen PJ, Trachsel H (1988) The mouse protein synthesis initiation factor 4A gene family includes two related functional genes which are differentially expressed. *EMBO J* 7: 2097-2105.
- 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: 17057-17061.
- Novagen Homepage. <http://www.emdbiosciences.com/html/NVG/home.html> acessado em fevereiro/2005.
- Olsen DS, Savner EM, Mathew A, Zhang F, Krishnamoorthy T, Phan L, Hinnebusch AG (2003) Domains of eIF1A that mediate binding to eIF2, eIF3 and eIF5B and promote ternary complex recruitment in vivo. *EMBO J* 22: 193-204.
- 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: 514-526.
- Pestova TV, Borukhov SI, Hellen CU (1998) Eukaryotic ribosomes require initiation factors 1 and 1A to locate initiation codons. *Nature* 394: 854-859.

- 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 U S A. 98: 7029-7036.
- 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: 2954-2965.
- 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.
- Postle K, Nguyen TT, Bertrand KP (1984) Nucleotide sequence of the repressor gene of the TN10 tetracycline resistance determinant. Nucleic Acids Res 12: 4849-4863.
- Price N, Proud C (1994) The guanine nucleotide-exchange factor, eIF-2B. Biochimie, 76: 748-760.
- Promega Corporation Homepage. <http://www.promega.com> acessado em fevereiro/2005.
- Proud CG (2005) eIF2 and the control of cell physiology. Semin Cell Dev Biol 1: 3-12.
- Saelens X, Kalai M, Vandenabeele P (2001) Translation inhibition in apoptosis: caspase-dependent PKR activation and eIF2-alpha phosphorylation. J Biol Chem 276: 41620-41628.
- Safer B (1983) 2B or no 2B: regulation of the catalytic utilization of eIF-2. Cell 33: 7-8.
- 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: 49644-49655.
- Schmitt E, Blanquet S, Mechulam Y (2002) The large subunit of initiation factor aIF2 is a close structural homologue of elongation factors. EMBO J 21: 1821-1832.
- Sonenberg N, Dever TE (2003) Eukaryotic translation initiation factors and regulators. Curr Opin Struct Biol 13: 56-63.
- 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.

- Verma IM, Somia N (1997) Gene therapy: promises, problems and prospects. *Nature* 389: 239-242.
- Xu ZL, Mizuguchi H, Mayumi T, Hayakawa T (2003) Regulated gene expression from adenovirus vectors: a systematic comparison of various inducible systems. *Gene* 309: 145-151.
- 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.
- Yanisch-Perron C, Vieira J, Messing J (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* 33: 103-119.
- Yao F, Svensjo T, Winkler T, Lu M, Eriksson C, Eriksson E (1998) Tetracycline repressor, tetR, rather than the tetR-mammalian cell transcription factor fusion derivatives, regulates inducible gene expression in mammalian cells. *Hum Gene Ther* 9: 1939-1950.
- Yoder-Hill J, Pause A, Sonenberg N, Merrick WC (1993) The p46 subunit of eukaryotic initiation factor (eIF)-4F exchanges with eIF-4A. *J Biol Chem* 268: 5566-5573.
- Williams DA, Baum C (2003) Gene Therapy--New Challenges Ahead *Science* 302: 400-401.
- Williams DD, Price NT, Loughlin AJ, Proud CG (2001) Characterization of the mammalian initiation factor eIF2B complex as a GDP dissociation stimulator protein. *J Biol Chem* 276: 24697-24703.