

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

SZE MEI LO

CONSTRUÇÃO DE VETORES DE EXPRESSÃO EUCARIÓTICA DA PROTEÍNA  
AIF1 (*apoptosis-inducing factor 1*) E SEUS MUTANTES DE CISTEÍNA:  
FERRAMENTAS PARA INVESTIGAR OS PAPÉIS REDOX DO AIF1.

CURITIBA

2015

SZE MEI LO

CONSTRUÇÃO DE VETORES DE EXPRESSÃO EUCARIÓTICA DA PROTEÍNA  
AIF1 (*apoptosis-inducing factor 1*) E SEUS MUTANTES DE CISTEÍNA:  
FERRAMENTAS PARA INVESTIGAR OS PAPÉIS REDOX DO AIF1.

Monografia apresentada à disciplina  
Estágio Supervisionada em Biologia como  
requisito parcial para obtenção do título  
de bacharel em Ciências Biológicas, setor  
de Ciências Biológicas, da Universidade  
Federal do Paraná.

Orientadora: Lia Sumie Nakao

CURITIBA

2015

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus, por tudo que tenho. Por ser a paz nos momentos de aflição, por secar minhas lágrimas nos momentos de tristeza, por ser a minha salvação. Por ser a minha companhia de todos os momentos, por me levar para o caminho certo, e acima de tudo pelo amor infinito que posso usufruir todos os dias.

À prof. Dra. Lia Sumie Nakao, pela oportunidade de aprendizado que me ofereceu, pela orientação, paciência, atenção e ajuda em todos os momentos que precisei.

À prof. Dra. Giseli Klassen e à Msc. Larissa Morato, pela correção do trabalho.

Aos professores Dr. Silvio Marque Zanata e Dra. Adriana Mercadante, pelo uso da estrutura do laboratório e pela disposição de me ensinar.

Aos meus colegas do Laboratório de Neurobiologia e Patologia Redox, especialmente Carla, Larissa, Letícia, Maiara, Ingrid, Luiz, Zaine e todos que me ajudaram. Obrigada pela amizade e a companhia.

A todos de colaboraram para minha formação.

Aos meus pais, Hon Yuen Lo e Kuen Fung Chan, por terem me criado e educado para me tornar a pessoa que sou hoje. Por todo o apoio e pelos os conselhos em todos os momentos que necessitei.

A minha irmã, Rute Lo, que apesar de irritante, é única que tenho. Por ser além de uma irmã, uma amiga.

A toda minha família, que apesar de estarem do outro lado do planeta se preocupam comigo.

As minhas colegas, Karin, Débora, Mariana e Sabrina, pela companhia, por todos os momentos de descontração e por me aguentarem durante esses quase 5 anos.

As minhas “irmãs”, Juliana, Giovana, Karol, Helen, Isa, Liqi, Michele, Su e Lê pelas conversas e por todos os momentos bons.

Obrigada a todos que fazem parte da minha vida.

## RESUMO

Inicialmente descoberto pela função de indução à apoptose, o *apoptosis-inducing factor* (AIF) é uma proteína monomérica que se encontra fixada na membrana interna da mitocôndria. O AIF faz parte da classe das flavoproteínas, ou seja dependente do cofator FAD, especificamente para a função de NADH oxidoreductase. AIF, entretanto, é reconhecido como proteína envolvida na indução da apoptose. Quando ocorre o estímulo apoptótico, o AIF é clivado e é liberado para o citosol e posteriormente para o núcleo, onde promove fragmentação de DNA em larga escala, levando assim à morte celular. No entanto, estudos posteriores mostraram a importância do AIF na manutenção fisiológica do complexo I da cadeia transportadora de elétrons. E, além disso, foi mostrado que o AIF é capaz de se ligar à proteína tioredoxina, através de pontes de dissulfeto, a qual pode estar relacionada com suas funções. Portanto, esse trabalho teve como objetivo principal a construção de vetores de expressão eucariótica do AIF1 humano, assim como mutantes de cada uma das cisteínas, que servirão como ferramentas para estudos das funções redox do AIF. A clonagem do gene AIF1 foi realizada a partir de um plasmídeo contendo o gene da AIF em um vetor comercialmente disponível. Uma etiqueta de hemaglutinina (HA) foi fundida na porção C-terminal, originando a proteína de fusão AIF-HA. A partir dessa construção a técnica de mutação sítio dirigida foi usada para produzir os três mutantes de cisteína para serina (C255S, C316S e C440S), impedindo a formação de pontes de dissulfeto. O sucesso da clonagem e das mutagêneses foram avaliadas através de sequenciamento de DNA e expressão dos vetores em células HEK293T, que confirmaram a integridade da sequência de interesse e a expressão correta do gene. Os resultados de expressão mostraram que o AIF selvagem é expressa em quantidades mais altas do que os AIFs mutados. Em conclusão, este trabalho resultou na produção e na caracterização de ferramentas que servirão para estudos posteriores da importância das cisteínas na função redox do AIF1.

Palavras-chave: *Apoptosis-inducing factor*. Cisteína. Mutação sítio dirigida

## ABSTRACT

Originally discovered by the apoptosis-inducing function, apoptosis-inducing factor (AIF) is a monomeric protein located in the inner membrane of mitochondria. AIF is a flavoprotein that needs cofactor FAD for its NADH oxidoreductase function. The most recognized function of AIF is, however, to induce apoptosis. After an apoptotic stimulus, AIF is cleaved and released to the cytosol and then translocated to the nucleus, where it promotes large scale DNA fragmentation, thus leading to cell death. However, recent studies showed the importance of the AIF for the maintenance of Complex I of the electron transport chain. In addition, a recent study showed that AIF binds thioredoxin, through disulfide bridge, which could be related to its functions. Therefore, the present study aimed at constructing eukaryotic expression vectors to express human AIF1, both wild type and mutants of the three cysteines of the sequence that will be employed as tools for studies of AIF redox functions. AIF gene was cloned from an AIF plasmid into a commercially available vector. A hemagglutinin tag (HA) was fused to the C-terminus, resulting in the AIF-HA fusion protein. Using this construction, site directed mutagenesis was performed to produce three mutants from cysteine to serine (C255S, C316S and C440S), blocking the formation of disulfides. The success of cloning and mutagenesis were evaluated through DNA sequencing and expression of the vectors in HEK293T cells. The results confirmed the integrity of the sequence and the correct gene expression and also showed that expression of the wild-AIF is higher than the mutated AIFs. In conclusion, this work resulted in the production and characterization of tools that will be useful to further studies about the importance of cysteines in AIF redox function.

Key-words: Apoptosis-inducing factor. Cysteine. Site directed mutagenesis.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Esquema representativo da estrutura do AIF1 .....	16
Figura 2 – Esquema da clonagem de AIF-HA no vetor pCIneo.....	23
Figura 3 – Sequência do AIF-HA clonada no vetor pCIneo.....	27
Figura 4 – Eletroforese em agarose do amplicon referente ao AIF-HA. ....	30
Figura 5 – Alinhamento da sequência contendo a mutação C255S.....	31
Figura 6 – Alinhamento da sequência contendo a mutação C316S.....	31
Figura 7 – Alinhamento da sequência contendo a mutação C440S.....	32
Figura 8 – Relevação do Western Blot com anticorpos $\alpha$ -AIF, $\alpha$ -HA e $\alpha$ - $\beta$ actina.....	33
Figura 9 – Semi-quantificação da expressão das AIF-HA em células HEK293T .....	33

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Sequências dos <i>primers</i> usado para clonagem.....	23
Tabela 2 – Sequências dos <i>primers</i> utilizados para sequenciamento.....	25
Tabela 3 – Condições da PCR de sequenciamento.....	25
Tabela 4 – Sequência dos 3 pares de <i>primers</i> usados para mutagênese.....	26

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIF1	–	<i>Apoptosis-inducing factor 1</i>
Bcl-2	–	<i>B-cell lymphoma 2</i>
CTE	–	Cadeia transportadora de elétrons
ddNTP	–	<i>2',3' Dideoxynucleotides triphosphate</i>
DMSO	–	<i>Dimethyl sulfoxide</i>
DNA	–	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
dNTP	–	<i>Deoxynucleotides triphosphate</i>
DO <sub>600</sub>	–	Densidade ótica no comprimento de onda 600 nm
EDTA	–	<i>2,2',2'',2'''-(Ethane-1,2-diyl)dinitrilo)tetraacetic acid</i>
EROs	–	Espécies reativas de oxigênio
FAD	–	<i>Flavin adenine dinucleotide</i>
GFP	–	<i>Green fluorescent protein</i>
HA	–	Hemaglutinina de influenza humana
HEK293T	–	<i>Human embrionary kidney 293T</i>
Hq	–	<i>Harlequin mouse</i>
HRP	–	<i>Horseradish peroxidase</i>
kDa	–	Kilodaltons
LB	–	<i>Luria Bertani broth</i>
MCS	–	<i>Multi cloning site</i>
MLS	–	<i>Mitochondrial localization sequence</i>
NAD(P)H	–	<i>Nicotinamide adenine dinucleotide (phosphate)</i>
NB	–	<i>Novablue</i>
NLS	–	<i>Nuclear leading sequence</i>
pb	–	Pares de base

- PEG – Polietileno glicol
- PCR – *Polymerase chain reaction*
- rpm – Rotações por minuto
- Trx1 – *Thioredoxin 1*
- Z-VAD.fmk – *N-benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp(O-Me) fluoromethylketone*

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>12</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>13</b>
2.1 <i>Apoptosis-inducing factor 1</i> (AIF1) .....	13
2.1.1 Estrutura do AIF .....	13
2.1.2 Funções do AIF .....	14
2.1.3 Interações do AIF .....	15
2.2 TÉCNICAS DE BIOLOGIA MOLECULAR PARA PRODUÇÃO DE FERRAMENTAS PARA ESTUDO DE PROTEÍNAS .....	17
2.2.1 Clonagem .....	18
2.2.2 Mutação sítio dirigida.....	18
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	<b>20</b>
3.1 OBJETIVO GERAL .....	20
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	20
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>21</b>
4.1 BACTÉRIAS QUIMIOCOMPETENTES.....	21
4.2 MINI E MAXIPREPARAÇÃO.....	21
4.3 CLONAGEM DO AIF1 .....	22
4.4 SEQUENCIAMENTO .....	24
4.5 MUTAÇÃO SÍTIO DIRIGIDA .....	25
4.5 TRANSFEÇÃO EM HEK293T .....	28
4.6 SDS-PAGE/ <i>WESTERN BLOT</i> .....	28
4.7 DENSITOMETRIA.....	29
<b>5 RESULTADOS</b> .....	<b>30</b>
<b>6 DISCUSSÃO</b> .....	<b>34</b>

<b>7 CONCLUSÃO .....</b>	<b>36</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>37</b>

## 1 INTRODUÇÃO

*Apoptosis-inducing factor* (AIF1) é uma flavoproteína que se encontra com a porção N-terminal fixada na membrana interna da mitocôndria e com a porção C-terminal voltada para o espaço intermembranas. A estrutura primária da proteína precursora do AIF1 humano possui 613 aminoácidos (67 kDa) e é direcionada para o espaço intermembranas da mitocôndria, onde é processada para a forma madura de 62 kDa e fixada na membrana interna. Esta forma contém 3 resíduos de cisteínas nas posições 255, 316 e 440 (SUSIN *et al.*, 1999). Quando a célula recebe um sinal apoptótico específico, o AIF1 maduro é clivado proteoliticamente para uma forma de 57 kDa e transloca para o núcleo, onde degrada o DNA, induzindo a morte celular via apoptose independente de caspase (SUSIN *et al.*, 1999).

Embora AIF1 tenha sido primeiramente descoberto como uma molécula pró-apoptótica, também pode fazer parte do complexo I da cadeia transportadora de elétrons (VAHSEN *et al.*, 2004). O camundongo Harlequin (Hq), que possui redução de 80% da expressão de AIF, por uma inserção retroviral no primeiro íntron do gene do AIF, mostra sinais de danos oxidativos (KLEIN *et al.*, 2002). Entretanto, a relação entre AIF1 e suas funções redox ainda não está bem estabelecida.

Um dos resíduos de cisteína da AIF pode estar também modulando de forma redox a atividade apoptogênica, pois em outros estudos foram observados que quando o AIF é incubado com *para-chloromercuriphenylsulfonic acid* (PCMPS), um bloqueador de tiol, ocorre a diminuição da atividade apoptótica do AIF1 (SUSIN *et al.*, 1999; MIRAMAR *et al.*, 2001). Além disso, um estudo recente (NAKAO *et al.*, 2015) mostrou que AIF1 é uma das proteínas que interagem com a tioredoxina (Trx1), por mecanismo redox, mediada pela ligação entre um resíduo de cisteína do AIF com a cisteína nucleofílica da Trx1. Portanto, no presente trabalho foi realizada a construção de vetores de expressão eucariótica para AIF e mutantes para cada uma das cisteínas presentes na sequência primária, que servirão como ferramentas para posteriores estudos do papel redox do AIF.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 *Apoptosis-inducing factor 1* (AIF1)

#### 2.1.1 Estrutura do AIF

Descoberto em 1996 (SUSIN *et al.*, 1996; ZAMZAMI *et al.*, 1996), AIF é uma flavoproteína, dependente do cofator FAD, codificada por um único gene no cromossomo Xq25-26 na região A6 em humanos (DAUGAS *et al.*, 2000), com 92% de homologia com o AIF de camundongos (SUSIN *et al.*, 1999).

O transcrito de AIF, que contém 16 éxons, pode sofrer *splicing* alternativo dependente do tecido em que se encontra, apresentando além da isoforma mais abundante, o AIF1, outras três isoformas mais curtas, que são variantes de *splicing* (DELETTRE *et al.*, 2006) (Figura 1).

A forma humana precursora do AIF1 possui 613 aminoácidos (67kDa), que após sintetizada no citosol é endereçada para a mitocôndria pela sequência de localização mitocondrial (MLS) (SUSIN *et al.*, 1999). Na mitocôndria ocorre uma clivagem no aminoácido 54, retirando a MLS da região N-terminal (OTERA *et al.*, 2005). Em seguida a proteína de 62kDa é ancorada na membrana interna, através da região transmembrânica, localizada entre os resíduos 66 a 84, deixando o carboxi-terminal voltado para o espaço intermembranas. Os aminoácidos restantes do C-terminal possuem um homologia com ferredoxinas ou NADPH oxidoredutases de plantas, fungos, eubactérias (LORENZO *et al.*, 1999). Nessa estrutura encontram-se dois sítios de ligação de FAD, intercalados por um segmento de ligação ao NAD, além de duas sequências nucleares (NLS) (SUSIN *et al.*, 1999) (Figura 1). Nessa sequência primária do AIF estão presentes 3 resíduos de cisteínas, nas posições 255, 316 e 440 (SUSIN *et al.*, 1999).

### 2.1.2 Funções do AIF

O AIF é uma proteína monomérica com duas atividades distintas descritas: atividade de NAD(P)H oxidase e atividade apoptogênica. A função de oxidoreductase, que necessita da ligação de 1 mol de FAD por mol de proteína, atua como um catalisador da transferência de elétrons do NADH para O<sub>2</sub>, gerando superóxido (MIRAMAR *et al.*, 2001). A atividade do AIF na apoptose ocorre após a sua clivagem, originando uma forma de 57kDa, que sai para o citosol e posteriormente é translocado para o núcleo, onde causa condensação periférica da cromatina em larga escala (~50kB). O AIF não possui atividade de nuclease intrínseca, mas a estrutura cristalográfica revelou, além da região de atividade oxidoreductase, um sítio de ligação ao DNA (YE *et al.*, 2002). No trabalho de Susin e colaboradores, foi caracterizado que a apoptose induzida pelo AIF é independente da proteína Bcl-2 e da via de caspases, pois na presença do bloqueador de caspases Z-VAD.fmk os efeitos do AIF na apoptose se mantiveram. No mesmo trabalho foi caracterizado o fenótipo apoptótico gerado pelo AIF, que envolve: a indução da condensação da cromatina, a fragmentação nuclear (cariorréxis) e a dissipação do potencial transmembrânico da mitocôndria. A função apoptogênica independe da presença de FAD, entretanto essa atividade depende da conformação do AIF (SUSIN *et al.*, 1999).

Além das atividades NAD(P)H oxidase e apoptogênica, o AIF parece desempenhar outras funções fisiológicas, como manutenção da cadeia respiratória mitocondrial e funções antioxidantes. Foi descoberto que o AIF pode estar envolvido na biogênese e/ou manutenção da cadeia transportadora de elétrons, pois mutantes dessa proteína resultaram na perda de proteínas do Complexo I e III (VAHSEN *et al.*, 2004). Em estudos com células tumorais foi demonstrado uma elevação da quantidade de AIF, que ao invés de provocar a morte celular por apoptose, auxiliou na sobrevivência, crescimento e invasão das células cancerígenas. Esse achado sugere a importância do AIF no complexo I da cadeia transportadora de elétrons (CTE), estabilizando a fosforilação oxidativa (LEWIS *et al.*, 2012). O camundongo Harlequin (Hq), que possui redução de 80% da expressão de AIF por uma inserção retroviral no primeiro íntron do gene do AIF, mostra sinais de danos oxidativos, como a degeneração progressiva do cerebelo e envelhecimento dos neurônios da retina

(KLEIN *et al.*, 2002). Um achado interessante deste estudo é o aumento da suscetibilidade à apoptose induzida por peróxido de hidrogênio dos camundongos Harlequin em relação ao camundongo selvagem, sugerindo que AIF pode agir como um “*scavenger*” de espécies oxidantes, ao invés de gerador de superóxido. As células knockdown de AIF apresentaram aumento dos níveis de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e outras EROs, derivadas da CTE devido ao distúrbio de consumo de oxigênio no Complexo I (APOSTOLOVA *et al.*, 2006).

### 2.1.3 Interações do AIF

As três cisteínas presentes no AIF1 possuem como cadeia lateral o grupo tiol (SH) e portanto são passíveis de formar ligações de dissulfeto. Um estudo recente (NAKAO *et al.*, 2015) mostrou que AIF1 é uma das proteínas que interagem com a tioredoxina (Trx1), por mecanismo redox, mediada pela ligação entre um resíduo de cisteína do AIF com a cisteína nucleofílica da Trx1.

O dado acima leva a conclusão de que pelo menos uma das cisteínas do AIF1 é responsável pela formação de dissulfeto com Trx1. Segundo o trabalho de Miramar e colaboradores, de 2001, as 3 cisteínas da AIF recombinante estariam reduzidas. Contudo, uma hipótese seria que a AIF1 pudesse ser oxidada a dissulfeto em condições de estresse oxidativo e ser reduzida pela Trx1. Ou seja, em condições basais, não oxidantes, AIF estaria reduzida, como mostrado por Miramar, entretanto quando em estresse oxidativo, ficaria na forma oxidada. A interação Trx1-AIF1 é intensificada quando as células são incubadas com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (NAKAO *et al.*, 2015). Esta hipótese é corroborada pelos dados descritos por Apostolova em 2006, que mostraram que o AIF é um possível “*scavenger*” de EROs.

Finalmente, um ou mais dos resíduos de cisteína do AIF pode estar também modulando de forma redox a atividade apoptogênica, pois em outro estudo foi observado que quando o AIF é incubado com *para-chloromercuriphenylsulfonic acid* (PCMPS), um bloqueador de tiol, ocorre a diminuição da atividade apoptótica do AIF1 (SUSIN *et al.*, 1999; MIRAMAR *et al.*, 2001).

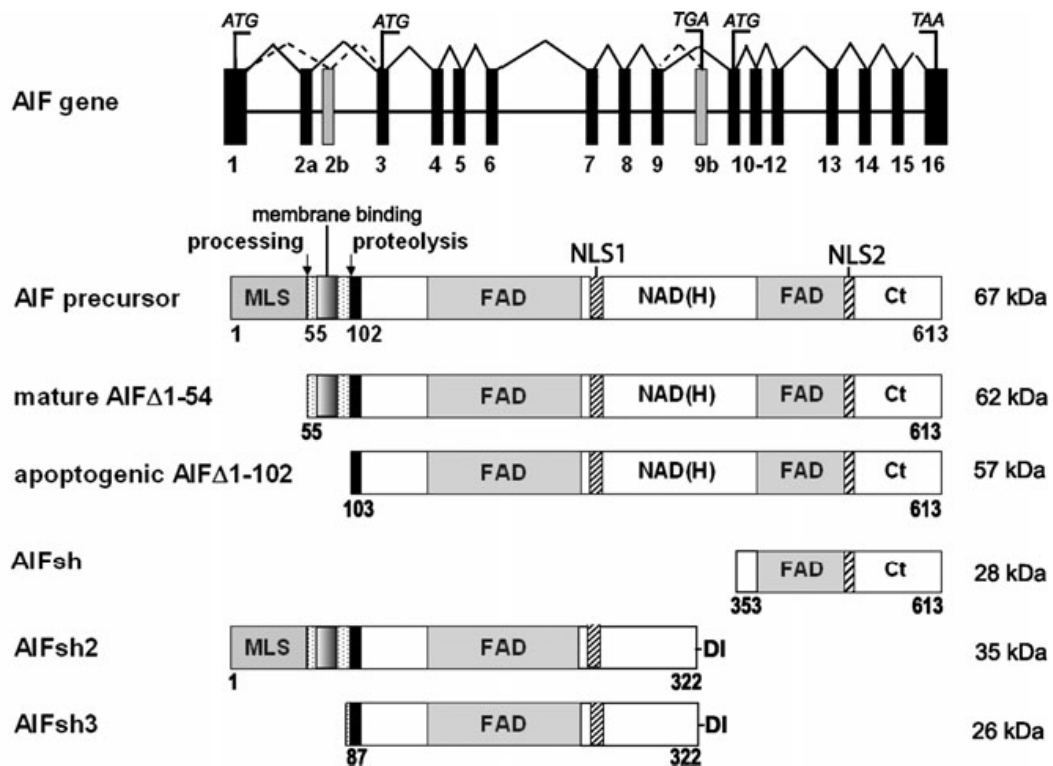


Figura 1 – Esquema representativo da estrutura do AIF1. Gene do AIF com 16 éxons, forma precursora do AIF com 613 aminoácidos (67 kDa), forma madura da AIF, sem MLS (62kDa), forma apoptogênica da AIF, após proteólise ( 57 kDa) e outras três isoformas curtas da AIF (28 kDa, 35 kDa e 26 kDa). MLS, *mitochondrial localization sequence*. NLS, *nuclear leading sequence*.

Fonte: Adaptado de Sevrioukova *et al.* (2011)

## 2.2 TÉCNICAS DE BIOLOGIA MOLECULAR PARA PRODUÇÃO DE FERRAMENTAS PARA ESTUDO DE PROTEÍNAS

Aperfeiçoada por Kary Mullis, em 1980, a reação de polimerase em cadeia (PCR) é uma ferramenta importante para a biologia molecular por permitir a amplificação de DNA a partir de pequena quantidade inicial (WATSON *et al.*, 2009). A exposição de uma mistura com DNA molde dupla fita, iniciadores (*primers*), dNTPs, enzima DNA polimerase e  $Mg^{2+}$ , a ciclos com variação de temperatura determinada permite que ao final obtenha-se  $2^n$  moléculas a partir de uma DNA dupla fita, sendo  $n$  o número de ciclos. Essa variação de temperatura permite a desnaturação da dupla fita, anelamento dos iniciadores e a síntese das fitas novas, que quando repetidas diversas vezes obtêm-se o acréscimo da quantidade de DNA de forma exponencial. A escolha dos *primers* é essencial para delimitar a sequência desejada, portanto, para amplificar um gene é comum usar um par de *primers*, o qual um deles se anela no início na sequência em uma fita e o outro que se anela na região posterior da outra fita, originando assim uma dupla fita da sequência de interesse.

A técnica de eletroforese em gel de agarose permite a separação por tamanho, através de um campo magnético movimentando o DNA carregado negativamente. Desenvolvida em 1926, por Arne Tiselius e Theodor Svedberg, essa técnica separa as moléculas por diferença de tamanho, carga e forma, sendo que os fragmentos menores são atraídos mais rapidamente para o eletrodo positivo (WATSON *et al.*, 2009). Para a visualização dos fragmentos de DNA é usado o corante brometo de etídeo, que se intercala entre as fitas. Geralmente, após o processo de PCR as amostras são analisadas por eletroforese, o qual permite a visualização do DNA, analisando a presença ou ausência de banda no tamanho esperado do produto amplificado.

As enzimas de restrição são nucleases, descobertas em cepas de bactérias, que clivam em sítios específicos no DNA, sendo capazes de reconhecer sítios de 4 a 8 pares de bases (WATSON *et al.*, 2009). As DNA ligases fazem a ligação das extremidades produzidas por enzimas de restrição, sendo essa uma poderosa ferramenta para manipular fragmentos de DNA, servindo para a recombinação.

As sequências de interesse são colocadas em veículos (vetor), como plasmídeos ou bacteriófagos. A inserção do DNA de interesse é feita pela ligação das DNA ligases, juntado o fragmento ao vetor, através de complementaridade de sítios de restrição, originando o DNA recombinante. Esses veículos possuem características responsáveis pela replicação do vetor, resistência a antibiótico para a células hospedeira, entre outros (BROWN, 2003).

O DNA recombinante pode ser multiplicado utilizando bactérias, e para isso primeiro é necessário a incorporação do DNA pelas células bacterianas. Denominado de transformação, as bactérias competentes, previamente tratadas com  $\text{CaCl}_2$ , são incubadas com o DNA que provavelmente precipita na superfície pela ação do  $\text{CaCl}_2$  e quando expostas a um choque térmico (ou elétrico), incorporam o DNA (BROWN, 2003). A seguir, a colônia que possui o DNA recombinante, selecionada através de antibiótico no meio de cultura, é crescida em meio líquido, para a extração do DNA recombinante.

### 2.2.1 Clonagem

As etapas da clonagem de um gene são: inserção do DNA de interesse em um vetor formando uma molécula de DNA recombinante, transformação em célula hospedeira e a multiplicação dessas células para produção de cópias (BROWN, 2003). A clonagem de um gene é importante para estudo estrutural e funcional do mesmo, pois possibilita o isolamento e a manipulação da sequência, assim como a purificação da proteína expressa pelo gene em estudos para pesquisas *in vitro* (WATSON *et al.*, 2009).

### 2.2.2 Mutação sítio dirigida

A mutação sítio dirigida baseia-se na alteração de um aminoácido a partir da mudança de uma ou mais bases nitrogenadas. Essa alteração é realizada a partir de

uma PCR com *primers* que se anelam na região de interesse. Para tanto, tais *primers* precisam possuir a alteração na base nitrogenada necessária para a mutação.

Os *primers* são desenhados com a alteração de interesse. Esses quando usados na PCR serão hibridizados com a sequência no DNA original. Todos os produtos da amplificação, iniciados a partir desses *primers*, possuirão a mutação. Entretanto, o DNA usado como molde presente na amostra ainda contém a sequência original. Esses são eliminados com a digestão com a enzima *DpnI*, a qual corta somente os sítios metilados GATC, já que a metilação é um processo natural das células e, por isso, somente o DNA produzido em uma célula possuirá as metilações (WATSON *et al.*, 2009).

A obtenção de mutantes *in vitro* é uma ferramenta para a análise da função de uma proteína, portanto, a mutação deve ser planejada de acordo com o interesse da investigação.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Construção de vetor AIF1 e mutantes de cisteína, para expressão eucariótica que servirão como ferramentas para o estudo do papel redox do AIF1.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Clonagem da sequência codificadora de AIF1 fusionada a uma etiqueta de hemaglutinina (HA) na porção C-terminal (AIF-HA) no vetor de expressão pCIneo.
- Mutação dos 3 resíduos de cisteínas na sequência do AIF1 para resíduos de serina.
- Expressão das construções para verificar a expressão proteica em células HEK293T.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 BACTÉRIAS QUIMIOCOMPETENTES

As bactérias quimiocompetentes NOVABLUE *Competent Cells* (Novagen) foram preparadas de acordo com o protocolo descrito por Chung e colaboradores, em 1989. Uma colônia foi incubada em 25 mL de meio LB para crescer até a  $DO_{600}$  0,3-0,5. Em seguida foram centrifugadas a 3.000 g por 10 minutos a 4°C, e ressuspendidas em 2,5 mL de tampão TSS (10% PEG 3350, 5% DMSO, 25 mM  $MgCl_2$ , 25 mM  $MgSO_4$  em 50 mL de LB, pH 6,5). Após 10 minutos no gelo, alíquotas de 50  $\mu$ L foram feitas e estocadas a -80°C imediatamente (CHUNG *et al.*, 1989)

Para a transformação, as bactérias NB foram retiradas do -80°C, descongeladas e colocadas em contato com 1 a 10 ng de DNA. Após 5 minutos no gelo, o choque térmico foi feito a 42°C por 30 segundos. Depois disso foram expostas ao gelo por mais 2 minutos e em seguida incubados a 37°C por uma hora com 1 mL de meio Luria Bertani, no *shaker* (220 rpm). Após esse período, foi feito o plaqueamento em meio LB com ágar e deixadas na estufa 37°C até o dia seguinte.

### 4.2 MINI E MAXIPREPARAÇÃO

Os plasmídeos foram transformados por choque térmico em bactérias quimiocompetentes (NOVABLUE *Competent Cells*- Novagen), que serviram para mini e maxipreparação do plasmídeo. Em ambos a extração do plasmídeo foi realizado com kits comerciais GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Fermentas) e PureLink™ HiPure Plasmid Maxiprep Kit (Invitrogen), respectivamente. Os produtos

das minipreparações serviram para as reações de sequenciamento, enquanto os produtos das maxipreparações foram usados nas transfecções para expressão eucariótica.

### 4.3 CLONAGEM DO AIF1

Primeiramente, a sequência de AIF1 humano (NM\_004208.3) foi amplificada a partir de um vetor de que dispomos (Harvard Plasmid Database, Clone ID #HsCD00347250). Uma sequência codificadora de hemaglutinina de influenza humana - HA (5'TACCCATACGATGTTCCAGATTACGCA3') foi adicionada através do primer reverso, para produzir uma proteína de fusão AIF-HA, com a etiqueta na porção C-terminal do AIF (Figura 2). A amplificação foi realizada por PCR, com o par de *primers* descritos na tabela 1, utilizando a enzima Pfx (Invitrogen). As condições de PCR foram 94°C por 4 minutos, 25 ciclos de 94°C por 15 segundos, 55°C por 30 segundos, 68°C por 2 minutos e por fim 68°C por 5 minutos. O produto da amplificação foi separado eletroforicamente em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo, possibilitando a visualização do produto amplificado (*amplicon*) de cerca de 1881 nucleotídeos. Este produto foi inserido no vetor comercial pCI-neo (Promega). Para isso, foi feita uma dupla digestão do *amplicon* e do vetor com as enzimas *EcoRI* e *Sall*, por 3 horas a 37°C. A ligação foi feita com a enzima T4 DNA ligase (Thermo Scientific) por 1 hora a 22°C. O produto de ligação foi usado para transformar bactérias NB quimiocompetentes, segundo o protocolo descrito no item 4.1. Quatro colônias foram sequenciadas. Para isso, elas foram inoculadas em meio LB e antibióticos *overnight*. Os plasmídeos amplificados foram isolados por minipreparação (item 4.2). A confirmação da sequência clonada foi realizada por sequenciamento de DNA.

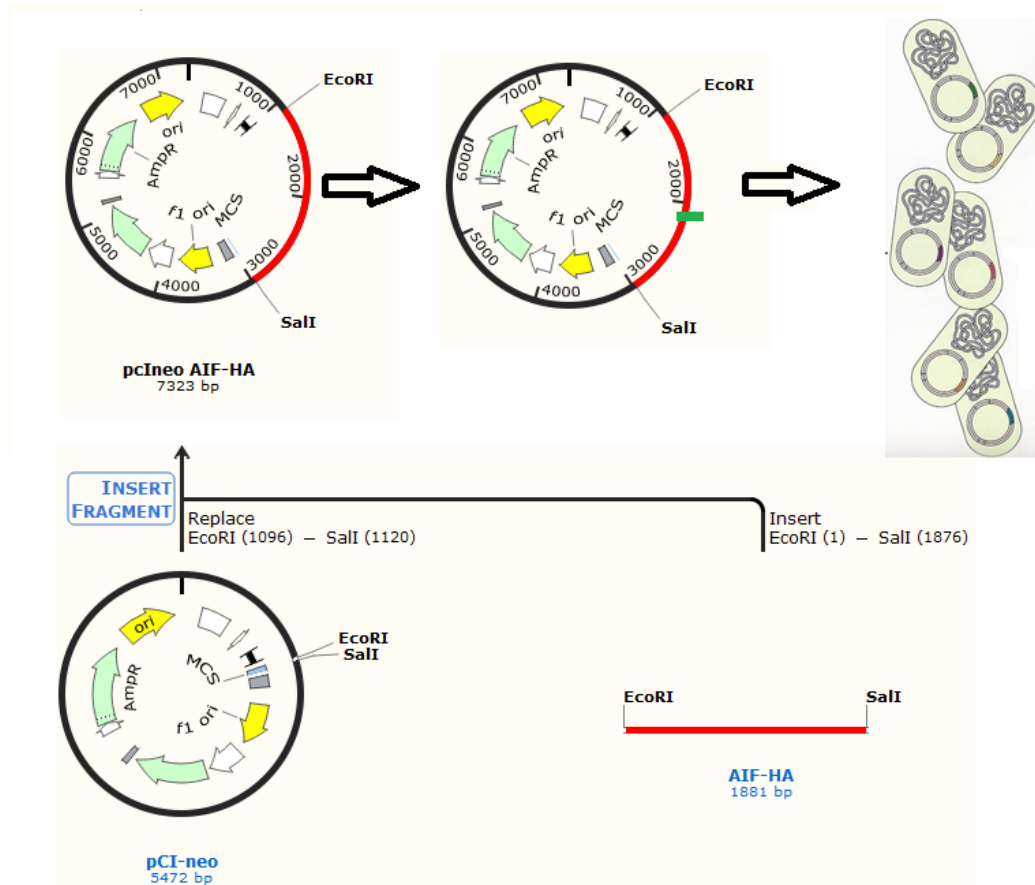


Figura 2 – Esquema da clonagem de AIF-HA no vetor pCIneo. Clonagem do AIF-HA no vetor pCIneo, no sítio de policlonagem (MCS) utilizando as enzimas *EcoRI* e *SalI*. Marca verde representa a mutação sítio dirigida, a partir do plasmídeo clonado.

Fonte: A autora (2015)

Tabela 1 – Sequências dos *primers* usado para clonagem. Sequência sublinhada refere-se ao sítio de restrição *EcoRI* e *SalI*, respectivamente, e em **negrito** a sequência de HA.

Primer	Sequência
hAIF-HA <i>EcoRI</i>	5' <u>CGGAATTC</u> ATGTTCCGGTGTGGAGGC 3'
hAIF-HA <i>SalI</i>	5'CAGGGT <u>CGACTC</u> ATGCGTAATCTGGAACATCGTATGGGTAGTCTTCATGAATGTTG 3'

Fonte: A autora (2015)

#### 4.4 SEQUENCIAMENTO

Os sequenciamentos das clonagens foram realizados utilizando o método de Sanger, no qual a PCR é feita com mistura de dNTP e ddNTP, que param a polimerização e possuem fluorescências distintas para cada base nitrogenada. As amostras pós PCR foram colocadas no equipamento que separa os fragmentos por diferença de tamanho, identificando a fluorescência de cada um. Esse método permitiu a obtenção de sequências de 800-1000 pares de base, mas como o AIF-HA possui cerca de 1881 pb foram usados 4 *primers*, dois externos e dois internos para cobrir a sequência de interesse (Tabela 2).

Para sequenciar cada plasmídeo foram feitas quatro reações, cada uma com um *primer*, citados na tabela 2. As PCRs de sequenciamento foram feitas de acordo com as condições descritas na tabela 3. Em seguida, para precipitar o DNA foram adicionados em cada amostra, 10% do volume de 1,5M acetato de sódio e 0,5M de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) e três vezes o volume de etanol 100%. Após a homogeneização e incubação a 4°C por 10 minutos, as amostras foram centrifugadas a 20.000 g por 20 minutos a 4°C. Logo depois de retirar o sobrenadante, foram adicionados 500 µL de etanol 70% e novamente centrifugadas. Após a secagem do DNA precipitado, foi feita a ressuspensão com 10 µL de Hi-Di™ formamida (Life Technologies), o aquecimento a 95°C por 5 minutos e a aplicação em placas de 96 poços para análise no sequenciador Applied Biosystems® 3500 and 3500xL Genetic Analyzers (Life Technologies).

As sequências obtidas foram analisadas com auxílio do programa ClustalW e ExpASy *translate tools*.

Tabela 2 – Sequências dos *primers* utilizados para sequenciamento.

<i>Primer</i>	Sequência
T7 EEV	5' AAGGCTAGAGTACTTAATACG 3'
T3	5' GTTCAGGGGGAGATGTG 3'
hAIF-HA Eco RIF	5' GAGGAAGTTCCTCAA 3'
hAIF-HA Sal I	5' AGGGTCGACTCATGCGTAATCTGGAACATCGTATGGGTAGTCTTCATGAATGTTG 3'

Fonte: A autora (2015)

Tabela 3 – Condições da PCR de sequenciamento.

Temperatura	Tempo
96°C	2 minutos
96°C	15 segundos
50°C	15 segundos
60°C	4 minutos
4°C	∞

} 30 ciclos

Fonte: A autora (2015)

#### 4.5 MUTAÇÃO SÍTIO DIRIGIDA

Para a construção dos vetores com AIF mutantes, ou seja, com cada resíduo de cisteína substituído por um resíduo de serina (C255S, C316S e C440S), usamos *primers* mutagênicos, contendo alteração de uma base nitrogenada, transformando o códon de cisteína (TGC/TCT) para um códon de serina (AGC) (Figura 3). Portanto, um par de *primer* para cada mutante foi desenhado com auxílio do programa PrimerX (Tabela 4).

Como base para mutação das cisteínas, a construção pCIneo-AIF-HA foi submetida à PCR com o par de *primers* correspondente à respectiva cisteína a ser

mutada. Para as PCRs de mutagênese foram utilizadas a enzima PfuUltra AD (Agilent), uma DNA polimerase de alta fidelidade, com as seguintes condições: 95°C por 1 minuto, 15 ciclos de 95°C por 30 segundos, 56°C por 30 segundos e 68°C por 8 minutos. Após a PCR com os *primers* mutagênicos, foram adicionadas às amostras 5U de *DpnI* (Fermentas), uma enzima que degrada o DNA metilado. Portanto, o produto final apresenta apenas os plasmídeos que foram sintetizados a partir dos *primers*, garantindo que todos contenham a mutação.

Os produtos da mutagênese foram usados para transformar bactérias quimiocompetentes, como descrito acima (item 4.1). Os plasmídeos obtidos após a minipreparação dessas bactérias competentes (item 4.2) foram utilizados para a confirmação das mutações, através do sequenciamento dos vetores, como descrito acima (item 4.4). Apenas as colônias que possuíam as sequências desejadas passaram por maxipreparação e esses plasmídeos foram utilizados para transfecção (item a seguir, 4.5)

Tabela 4 – Sequência dos 3 pares de *primers* usados para mutagênese. A base nitrogenada sublinhada é onde há a mutação da sequência original.

<i>Primer</i>	Sequência
C255SF	5' CTCAAATAACCTATGAAAAG <u>A</u> GCTTGATTGCAACAGGAGG 3'
C255SR	5' CCTCCTGTTGCAATCAAGC <u>I</u> CTTTTCATAGGTTATTTGAG 3'
C316SF	5' GTAGCGAACTGGCC <u>A</u> GCGCTCTTGGCAGAAAG 3'
C316SR	5' CTTTCTGCCAAGAGCGC <u>I</u> GGCCAGTTCGCTAC 3'
C440SF	5' GGCAGGAGATGCTGCA <u>A</u> GCTTCTACGATATAAAG 3'
C440SR	5' CTTTATATCGTAGAAGC <u>I</u> TGCAGCATCTCCTGCC 3'

Fonte: A autora (2015)

```

atgttccgggtgtggaggcctggcggggggtgcttttgaagcagaagctgggtgcccttgggtg
M F R C G G L A A G A L K Q K L V P L V
cggacccgtgtgcctccgaagcccgagggcagaggaacccggcctccaggcaactgtgtccag
R T V C V R S P R Q R N R L P G N L F Q
cgatggcctgttccctctagaacccagatgacaaagcaaaaaggctagctctgggtgcatca
R W H V P L E L Q M T R Q M A S S G A S
gggggcaaaaatcgataaattctgtgtttagctcttatgtgggcttatacaacagtaggagct
G G K I D N S V L V L I V G L S T V G A
gggtccctatgecta caaga cta tgaagaggga tga aaaaagatacaatga aagaat tcca
G A Y A Y K T M K E D E K R Y N E R I S
gggttagggctgacaccagaacagaaa cag aaaaaggccggcttatactgtctccagaa gga
G L G L T P E Q K Q K K A A L S A S E G
gaggaaagttccctcaagcaaggcgccaagtca tgt tcccttctctgcta at tgggtgagggc
E E V P Q D K A P S H V P F L L I G G G
acagctgcttttgcctgacagcagabccatccgggctcgggctcctggggccaggggtactgt
T A A F A A A R S I R A R D P G A R V L
attgtatctgaaagacccctgagctgcccgtacatgagacccctcttttcaaaagaaactgtgtg
I V S E D P E L P Y M R P P L S K E L W
ttttcagatgacccaaa tgtca caaagaca ctgagat tca aa cagtggaa tggaa aagag
F S D D P N V T K T L R F K Q W N G K E
agaagcatabat tccagccacccctctcttctctgtctctctgagcctgcccataat t
R S I Y F Q P P S F Y V S A Q D L P H I
gagaatgggtgggtgtggctgtctcactgggaagaaaggtagta cagctggatgtgagagac
E N G G V A V L T G K K V V Q L D V R D
aacatgggtgaaaactbaa tgatggctctcaaat aacctatgaaaagg ggcttgatgcaaca
N M V K L N D G S Q I T Y E K C L I A T
ggaggtactccaagaa gctgtctgccattgataggggctggagcagaggtgaaagagtaga
G G T P R S L S A I D R A G A E V K S R
acaaagcctttccagaaa gattggagac tttagaagcttggagaa gatttccagggaa gctc
T T L F R K I G D F R S L E K I S R E V
aaatcaattacgat taccgtgggggcttccctgtgta gcaactggcc gtgctcttggc
K S I T I I G G G F L G S E L A C A L G
agaaagggctcga gcttgggca cagaagtgat tcaactcttcccccagaaaggaaatag
R K A R A L G T E V I Q L F P E K G N M
ggaaagactcctcccgat accctagcaactggac ca tggaaa aagctcagacagagagggg
G K I L P E Y L S N W T M E K V R R E G
gttaagggtgatgccc aatgtctatgtgcaatccgttggagtcagcagtggaagttacttt
V K V M P N A I V Q S V G V S S G K L L
atcaagctgaaaagacggcaggaaggta gaaactga ccaatagtgccagctgtgtggcctg
I K L K D G R K V E T D H I V A A V G L
gagcccaatggtgagttggccaagactggggcctggaaa tagactca gattttgtgggc
E P N V E L A K T G G L E I D S D F G G
tcccggttaaatgcagagctcaagca cgcctcaacatctgggtg gcaagaga tgcctgca
F R V N A E L Q A R S N I W V A G D A A
gcttctaccgat ataaa gttgggaaggaggcgggttagagc ac catgat cagctgtgtgtg
C F Y D I K L G R R R V E H H D H A V V
agtggaa gattggctggagaaa atatgactggagctgctaa gccgtactggca tca gctca
S G R L A G E N M T G A A K P Y W H Q S
atgttctggagtgat tttggggcccgatgttggctatgaa gctattggctctgtgtgacagt
M F W S D L G P D V G Y E A I G L V D S
agtttggcccagatgggtgtttttgcaaaa gcaaac tgcacaa gacaa ccccaatctgcc
S L P T V G V F A K A T A Q D N P K S A
acagagcagtcagg aactggta tccga tca gaggtaga ca gaggccagggcctcagaa
T E Q S G T G I R S E S E T E S E A S E
attaactattcctccagca ccccgga gttccacaggtctc cgtccaggggga ggaactac
I T I P P S T P A V P Q A P V Q G E D Y
ggcaaa ggtgtctctctaccctcaggacaa agtggctgtggggattgtgctatggaa c
G K G V I F Y L R D K V V V G I V L W N
atctttaac cgaatgccaatagca aggaagat cat taaggacgggtgagcagca tgaagat
I F N R M P I A R K I I K D G E Q H E D
ctcaatgaa gtagcaaac tctcaacattca tgaagac gaccca ta cga tgt tccagat
L N E V A K L F N I H E D Y P Y D V P D
taagcatga
Y A -

```

Figura 3 – Sequência do AIF-HA clonada no vetor pCIneo. Sequências sublinhadas são os locais onde os *primers*, C255S, C316S e C440S se anelam. Em azul a base nitrogenada timina mutada para adenina, pela mutação sítio dirigida. Em amarelo as cisteínas mutadas para serina e em verde a sequência da etiqueta HA adicionada no C-terminal.

Fonte: A autora (2015)

#### 4.5 TRANSFECCÃO EM HEK293T

O cultivo da linhagem HEK293T, célula embrionária de rim humano, foi realizado com meio de cultura MEM (modified Eagle medium) com 10% de soro bovino fetal e antibiótico, em 37°C com 95% O<sub>2</sub> e 5% CO<sub>2</sub>. Essa linhagem foi escolhida pela alta eficiência na transfecção, inclusive com o método da precipitação de fosfato de cálcio (KINGSTON *et al.*, 1999). Portanto, 12 µg de plasmídeo foram transfectados em HEK293T em uma placa 100mm, e após 5 horas de exposição ao meio de transfecção, as células foram mantidas em cultura por 48 horas para expressão proteica. Como controle positivo da transfecção foi usado o vetor que expressa a *green fluorescent protein* (GFP), uma proteína fluorescente.

Após esse período, o extrato total celular foi feito a partir da lise com tampão RIPA (NaCl 150 mM, Tris 50 mM, EDTA 1 mM, deoxicolato de sódio 1%, SDS 0,1%, Triton X-100 1%) e a concentração proteica foi determinada pelo ensaio de Bradford, baseada na intensidade colorimétrica gerada a partir da conjugação com o corante Coomassie.

#### 4.6 SDS-PAGE/ WESTERN BLOT

Cerca de 50-80 µg de proteína total, reduzidas com β-mercaptoetanol, foram separadas eletroforéticamente em gel de acrilamida desnaturante (SDS-PAGE), corridas primeiramente a 15 mA e depois 30 mA, e em seguida imobilizadas em membrana de nitrocelulose por transferência *semi-dry*, 10 V por 40 minutos. A expressão do AIF-HA foi detectada por *Western blotting* usando o anticorpo anti-AIF H-300 (sc-5586, Santa Cruz) ou *rabbit* anti-HA (71-5500, Invitrogen), com anticorpo secundário ligado à HRP (Sigma) e revelação com kit quimioluminescente (Pierce).

#### 4.7 DENSITOMETRIA

O resultado da revelação foi digitalizado e as intensidades das bandas foram densitometradas com auxílio do programa IMAGEJ. O resultado foi apresentado em forma de gráfico construído com auxílio do programa Origin61.

## 5 RESULTADOS

Primeiramente a sequência de AIF1 foi amplificada a partir de um vetor contendo a sequência da AIF. Após a reação de PCR, o produto (AIF-HA) foi separado eletroforéticamente para verificar o tamanho do *amplicon* estimado em 1881 nucleotídeos. O gel obtido mostrou que o amplicon apresentava o tamanho esperado (Figura 4). Em seguida, o vetor pCIneo e o AIF-HA foram ambos duplo digeridos, com as enzimas Sall e EcoRI, e ligados pela T4 DNA ligase originando o pCIneo-AIF-HA. Através do sequenciamento, a integridade da sequência do AIF, bem como a inserção da etiqueta HA foi confirmada. Após cada uma das mutações sítio dirigidas das 3 cisteínas presentes no AIF1, o sequenciamento confirmou a efetividade da mutagênese de todas as três construções (Figuras 5, 6 e 7).

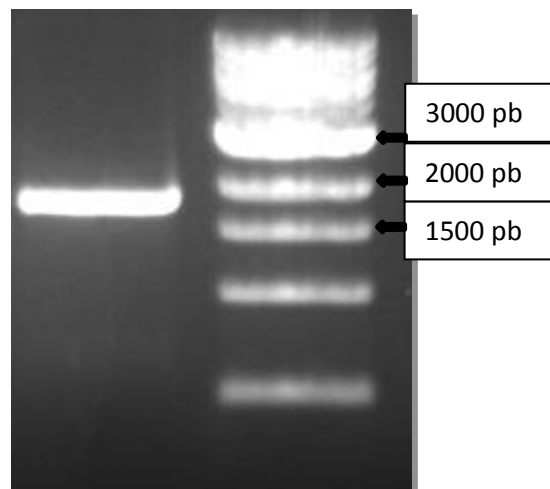


Figura 4 – Eletroforese em agarose do amplicon referente ao AIF-HA. Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. Banda localizada entre 1500pb e 2000pb refere-se ao AIF-HA clonado a partir de um vetor de que dispomos (Harvard Plasmid Database, Clone ID #HsCD00347250).

Fonte: A autora (2015)

```

TTCTATGTCTCTGCTCAGGACCTGCCTCATATTGAGAAATGGTGGTGTGGCTGTCTCCTCACT 687
TTCTATGTCTCTGCTCAGGACCTGCCTCATATTGAGAAATGGTGGTGTGGCTGTCTCCTCACT 719
*****

GGGAAGAAGGTAGTACAGCTGGATGTGAGAGACAAACATGGTGAACCTTAATGATGGCTCT 747
GGGAAGAAGGTAGTACAGCTGGATGTGAGAGACAAACATGGTGAACCTTAATGATGGCTCT 779
*****

CAAATAACCTATGAAAAGTGCCTGATTGCAACAGGAGGTACTCCAAGAAGTCTGTCTGCC 807
CAAATAACCTATGAAAAGTGCCTGATTGCAACAGGAGGTACTCCAAGAAGTCTGTCTGCC 839
*****

ATTGATAGGGCTGGAGCAGAGGTGAAGAGTAGAACCAACGCTTTTCAGAAAGATTGGGAGAC 867
ATTGATAGGGCTGGAGCAGAGGTGAAGAGTAGAACCAACGCTTTTCAGAAAGATTGGGAGAC 899
*****

```

Figura 5 – Alinhamento da sequência contendo a mutação C255S. Alinhamento da sequência original e da obtida no sequenciamento do vetor AIF-HA após a mutagênese da primeira cisteína (posição 255), em destaque o códon mutado e em vermelho a base nitrogenada alterada.

Fonte: A autora (2015)

```

GGAGGTACTCCAAGAAGTCTGTCGCAATTGATAGGGCTGGAGCAGAGGTGAAGAGTAGA 840
GGAGGTACTCCAAGAAGTCTGTCGCAATTGATAGGGCTGGAGCAGAGGTGAAGAGTAGA 453
*****

ACAACGCTTTTCAGAAAGATTGGAGACTTTAGAAGCTTGGAGAAGATTTCACGGGAAGTC 900
ACAACGCTTTTCAGAAAGATTGGAGACTTTAGAAGCTTGGAGAAGATTTCACGGGAAGTC 513
*****

AAATCAATTACGATTATCGGTGGGGCTTCCTTGGTAGCGAACTGGCCGCTCTTTGGC 960
AAATCAATTACGATTATCGGTGGGGCTTCCTTGGTAGCGAACTGGCCGCTCTTTGGC 573
*****

AGAAAGGCTCGAGCCTTGGGCACAGAAGTGATTCAACTCTTCCCAGAGAAAGGAAATATG 1020
AGAAAGGCTCGAGCCTTGGGCACAGAAGTGATTCAACTCTTCCCAGAGAAAGGAAATATG 633
*****

```

Figura 6 – Alinhamento da sequência contendo a mutação C316S. Alinhamento da sequência original e da obtida no sequenciamento do vetor AIF-HA após a mutagênese da segunda cisteína (posição 316), em destaque o códon mutado e em vermelho as bases nitrogenadas alteradas.

Fonte: A autora (2015)

```

ATGCCCAATGCTATTGTGCAATCCGTTGGAGTCAGCAGTGGCAAGTTACTTATCAAGCTG 1620
ATGCCCAATGCTATTGTGCAATCCGTTGGAGTCAGCAGTGGCAAGTTACTTATCAAGCTG 766
*****

AAAGACGGCAGGAAGGTAGAACTGACCACATAGTGGCAGCTGTGGCCCTGGAGCCCAAT 1680
AAAGACGGCAGGAAGGTAGAACTGACCACATAGTGGCAGCTGTGGCCCTGGAGCCCAAT 826
*****

GTTGAGTTGGCCAAGACTGGTGGCCTGGAAATAGACTCAGATTTGGTGGCTTCCGGGTA 1740
GTTGAGTTGGCCAAGACTGGTGGCCTGGAAATAGACTCAGATTTGGTGGCTTCCGGGTA 886
*****

AATGCAGAGCTACAAGCAGCTCTAACATCTGGGTGGCAGGAGATGCTGCATGCTTCTAC 1800
AATGCAGAGCTACAAGCAGCTCTAACATCTGGGTGGCAGGAGATGCTGCATGCTTCTAC 946
*****

```

Figura 7 – Alinhamento da sequência contendo a mutação C440S. Alinhamento da sequência original e da obtida no sequenciamento do vetor AIF-HA após a mutagênese da terceira cisteína (posição 440), em destaque o códon mutado e em vermelho a base nitrogenada alterada.

Fonte: A autora (2015)

*Western Blot* dos extratos celulares das HEK293T transfectadas com cada um dos plasmídeos foi realizado, utilizando anticorpo  $\alpha$ -AIF, na diluição de 1:1000 (Figura 8). O controle negativo (MOCK) foi feito através de células não transfectadas, ou seja, sem AIF exógeno. Observamos que todas as construções levaram à superexpressão da proteína AIF, particularmente a que expressa o AIF selvagem. AIF endógena, migrando na mesma mobilidade eletroforética que as superexpressas, foi também detectada nas células não transfectadas, o que era esperado.

As mesmas amostras foram incubadas com anticorpo  $\alpha$ -HA, na diluição de 1:500 (Figura 8). Todas as células transfectadas com os construtos de AIF-HA expressaram a etiqueta HA. Particularmente a construção de AIF1 selvagem levou a uma expressão mais intensa do que as construções de AIF1 mutadas, confirmando o *western blotting* com anti-AIF. A ausência de detecção no extrato MOCK condiz com a ausência de HA endógeno, portanto a presença de HA representa a proteína superexpressa. A presença de duas bandas nos construtos de AIF selvagem, 255, 316 e 440 pode refletir a presença de AIF1 em diferentes estados de processamento. A banda fraca, que possui migração mais lenta, pode corresponder à AIF-HA recém sintetizada que ainda com a sequência de localização mitocondrial.

As intensidades das bandas nas revelações com  $\alpha$ -HA foram densitometradas, e normalizadas com  $\beta$ -actina, uma proteína constitutiva, para

verificar a diferença de expressão entre os vetores. O AIF-HA que possui mutação no cisteína posição 316 e a que possui alteração na posição 440 apresentaram o nível de expressão cerca de duas vezes menor que as demais construções. (Figura 9)

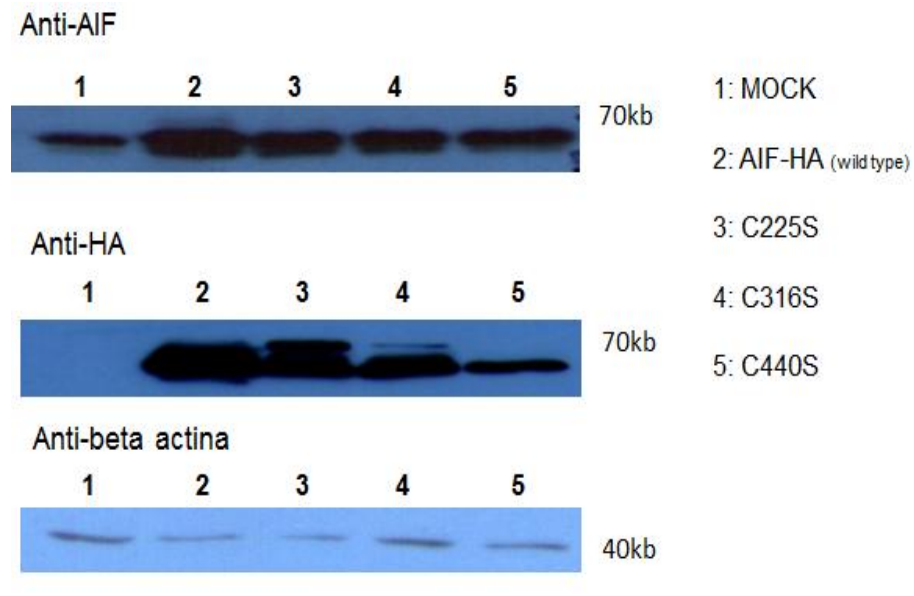


Figura 8 – Relevação do Western Blot com anticorpos  $\alpha$ -AIF,  $\alpha$ -HA e  $\alpha$ - $\beta$  actina, nas amostras tranfectadas com: 1-não tranfectadas (MOCK); 2- AIF-HA; 3-C255S; 4-C316S; 5- C440S. Diluição dos anticorpos usados :  $\alpha$ -AIF (1:1000),  $\alpha$ -HA (1:500) e  $\beta$ -actina (1:3000).

Fonte: A autora (2015)

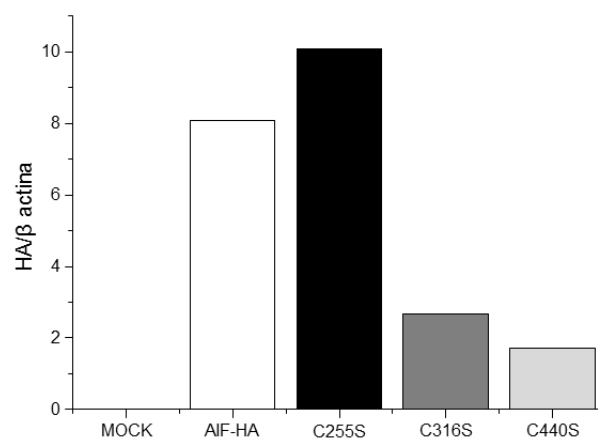


Figura 9 – Semi-quantificação da expressão das AIF-HA em células HEK293T. Gráfico do resultado da densitometria das bandas reveladas com  $\alpha$ -HA dividida pela intensidade das bandas reveladas com  $\alpha$ - $\beta$  actina.

Fonte: A autora (2015)

## 6 DISCUSSÃO

Neste trabalho produzimos construtos para expressar a proteína AIF-HA selvagem e mutadas em cada uma de suas 3 cisteínas de sua sequência primária.

A fusão da sequência de HA na extremidade C-terminal foi planejada dessa maneira, pois no N-terminal há a sequência de localização mitocondrial (MLS) que posteriormente é clivada e perdida permitindo o ancoramento do AIF na membrana interna mitocondrial. Essa proteína de fusão foi escolhida por questão de praticidade, pois o laboratório já dispunha de anticorpo e resina de agarose  $\alpha$ -HA.

A partir da confirmação por sequenciamento do sucesso da clonagem do AIF-HA no vetor pCIneo, esse plasmídeo foi usado como base para fazer as mutações sítio dirigidas. Três pares de *primers* foram desenhados, uma para cada cisteína a ser mutada. A única alteração presente nesses *primers* é a troca de um nucleotídeo, que acarretará a mudança do códon, resultando assim a alteração do aminoácido a ser incorporado na determinada posição. Portanto a alteração que ocorreu na sequência clonada foi de TGC/TGT para AGC, mudando o aminoácido de cisteína para serina. Ambos aminoácidos possuem o mesmo tamanho, são polares e não possuem carga, sendo a única diferença a troca do tiol (-SH) pela hidroxila (-OH) na cadeia lateral do aminoácido. Portanto, tais mutações não devem causar alterações estruturais e conformacionais drásticas na proteína, mas apenas impedir a formação da ponte de dissulfeto. As três cisteínas da sequência foram mutadas originando um plasmídeo com cada mutação, todas confirmadas por sequenciamento.

A transfecção, e posterior expressão desses plasmídeos em células eucariotas HEK293T, analisadas por *Western Blot* demonstrou que tanto a proteína AIF, quanto o polipeptídeo fundido estavam sendo corretamente expressos. A ausência da detecção na amostra MOCK quando revelada com  $\alpha$ -HA condiz com a ausência do HA endógeno, portanto, podemos afirmar que a transfecção e a expressão do AIF-HA foram bem sucedidas.

A diferença de intensidade das bandas nas revelações com  $\alpha$ -AIF e  $\alpha$ -HA sugerem que o nível de expressão das construções são diferentes, mesmo sendo a

partir do mesmo vetor de expressão. Portanto, as bandas reveladas com  $\alpha$ -HA foram densitometradas e normalizadas com  $\beta$ -actina, para verificar a diferença de expressão entre os AIFs. Optamos por avaliar apenas a diferença de expressão pelo resultado do  $\alpha$ -HA, pois isso garante que a análise está sendo feita apenas no AIF-HA transfectada, podendo concluir assim, que as diferenças encontradas são independentes do AIF endógeno.

Foi observado, através da densitometria das intensidades das bandas, que o nível de expressão do AIF-HA sem mutação e das três construções mutadas apresentavam diferença quanto ao nível de expressão. Este resultado sugere que a mutação na cisteína das posições 316 e 440, as quais apresentaram menor expressão, possam influenciar a expressão proteica. A influência pode ocorrer tanto inibindo a velocidade da tradução da cadeia polipeptídica como aumentando a taxa de degradação desses mutantes. Não analisamos estas hipóteses neste trabalho.

A redução das amostras com  $\beta$ -mercaptoetanol, antes de correr o SDS-PAGE, causa a desnaturação das pontes de dissulfeto. Essas podem ser responsáveis pelo dobramento/estrutura terciária da proteína ou pela interação entre proteínas. Por isso o resultado que aparece na revelação do *Western Blot* não se remete à conformação da proteína, não sendo essa a justificativa para a diferença de nível de expressão.

Quanto às perspectivas de utilizar as ferramentas caracterizadas no presente trabalho, pretendemos identificar a cisteína do AIF responsável pela interação com a Trx1, assim como avaliar se estas cisteínas são capazes de formar pontes de dissulfeto, intramolecular e/ou intermolecular. Estudos anteriores já mostraram que outras proteínas, são capazes de formar pontes de dissulfeto entre as cisteínas da própria estrutura primária, assim como ligações através das cisteínas entre duas proteínas iguais ou distintas, podendo alterar a atividade enzimática (FOUQUET *et al.*, 2010).

Outra possibilidade de estudo é analisar o papel dessas cisteínas da AIF na via apoptótica, já que em um estudo anterior, foi relatado que o bloqueio com *para-chloromercuriphenylsulfonic acid* (PCMPs), um bloqueador de tiol, resultou na diminuição da atividade apoptótica do AIF1. (SUSIN *et al.*, 1999; MIRAMAR *et al.*, 2001)

## 7 CONCLUSÃO

A clonagem da proteína *apoptosis inducing factor 1*, fundida à sequência polipeptídica HA no C-terminal, foi bem sucedida. A construção dos 3 vetores, cada um com uma cisteína mutada para serina, foi realizada a partir do produto da clonagem. O sequenciamento confirmou a integridade da sequência, e a transfecção em células HEK293T confirmou a expressão correta de todas as construções.

As diferenças no nível de expressão podem sugerir que a mutação, nas posições 316 e 440 venham a interferir de algum modo, e é um indicativo para posteriores estudos.

Os vetores serão utilizados para estudos posteriores, que irão ajudar a definir o papel redox na função da proteína AIF1.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

APOSTOLOVA, N.; CERVERA, A.M.; VICTOR, V.M.; CADENAS, S.; *et al.* Loss of apoptosis-inducing factor leads to an increase in reactive oxygen species, and an impairment of respiration that can be reversed by antioxidants. **Cell and Death Differentiation**, v.13, p.354-357, 2006.

BROWN, T.A.; **Clonagem gênica e análise de DNA: uma introdução** 4.ed. Porto Alegre: Artmed, 2003.

CHUNG, C.T. ; NIEMELA, S.L.; MILLER, R.H.; One-step preparation of competent *Escherichia coli*: Transformation and storage of bacterial cells in the same solution. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the USA**, v.86, p.2172-2175, abr. 1989,

DAUGAS, E.; NOCKY, D.; RAVAGNAN, L.; LOEFFLER, M.; SUSIN, S.A.; ZAMZAMI, N.; KROEMER, G. Apoptosis-inducing factor (AIF): a ubiquitous mitochondrial oxidoreductase involved in apoptosis. **The EMBO Journal**, v. 476, p. 118-123, 2000.

DELETTRE, C.; YUTSE, V.J.; MOUBARAK, R.S.; *et al.* AIFsh, a novel apoptosis-inducing factor (AIF) pro-apoptotic isoform with potential pathological relevance in human cancer. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 281, p. 6413-6427, mar. 2006.

DELETTRE, C.; YUTSE, V.J.; MOUBARAK, R.S.; *et al.* Identification and characterization of AIFsh2, a mitochondrial apoptosis-inducing factor (AIF) isoform with NADH oxidase activity. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 27, p. 18507-18518, jul. 2006.

FOUQUET, S.; GUEROIS, R.; BIARD, D.; TOLEDANO, M.B. Activation of NFR2 by Nitrosative Agents and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Involves KEAP1 disulfide formation. **The Journal of Biological Chemistry**, v.285, n. 11, p. 8463-8471, mar. 2010.

Harvard Plasmid Database. **Harvard Medical School**. Disponível em: <<http://plasmid.med.harvard.edu/PLASMID/GetCloneDetail.do?cloneid=347250&species=>>. Acesso em : 19 de fevereiro de 2015.

KINGSTON, R. E., *et al.* Calcium Phosphate Transfection. **Current Protocols in Immunology**, Molecular Biology, Supplement 3, Unit 10.13 ,1999.

KLEIN, J.A.; LONGO-GUESS, C.M.; ROSSMANN, M.P.; *et al.* The harlequin mouse mutation downregulates apoptosis-inducing factor. **Nature** v.419, p. 367-374, 2002.

LEWIS, E.M.; WILKINSON, A.S.; JACKSON, J.S.; MEHRA, R.; *et al.* The enzymatic activity of apoptosis-inducing factor supports energy metabolism benefiting the growth and invasiveness of advanced prostate cancer cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 52, p. 43862-43875, dez. 2012.

LORENZO, H.K.; SUSIN, S.A., PENNINGER, J.; KROMER, G. Apoptosis inducing factor (AIF): a phylogenetically old, caspase independent effector of cell death. **Cell Death Differentiation**, v. 6, n. 6, p. 516-524, jun. 1999.

MIRAMAR, M.D.; CONSTANTINI, P.; RAVAGNAN, L.; *et al.* NADH oxidase activity of mitochondrial apoptosis-inducing factor. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 19, p.16391-16398, feb. 2001.

NAKAO, L.S.; EVERLEY, R.A.; MARTINO, S.M.; *et al.* Mechanism-based proteomic screening identifies targets of thioredoxin-like proteins. **The Journal of Biological Chemistry**, v.290,p. 5685-5695,feb. 2015.

OTERA, H.; OHSAKAYA, S.;NAUGARA ,Z.I.; *et al.* Export of mitochondrial AIF in response to proapoptotic stimuli depends on processing at the intermembrane space. **The EMBO Journal**. 24, 1375-1386. 2005

PfuUltra High Fidelity DNA polymerase AD. Disponível em:  
<http://www.chem.agilent.com/Library/usermanuals/Public/600385.pdf>. Acesso em: 25 de maio de 2015

SEVRIOUKOVA, I.F. Apoptosis-inducing factor: structure, function, and redox regulation. **Antioxidants & Redox Signaling**, v.14, n.12, 2011.

SUSIN, S.A.; ZAMZAMI, N.; CASTEDO, M.; *et al.* Bcl-2 inhibits the mitochondrial release of an apoptogenic protease. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 184, p.1331-1341, out. 1996.

SUSIN, S.A.; LORENZO, H.K.; ZAMZAMI,N.; *et al.* Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. **Nature**, v. 397,p. 441-446, feb. 1999.

VAHSEN, N.; CANDE, C.; BRIERE, J.J.; BENIT,P.; *et al.* AIF deficiency compromises oxidative phosphorylation. **The EMBO Journal**, v. 23, p. 4679-4689, nov. 2004.

YE, H.; CANDE, C.; STHEPHANOU, N.C.; *et al.* DNA binding is required for apoptogenic action of apoptosis inducing factor. **Nature Structure & Molecular Biology**, v.9, p. 680-684, ago. 2002.

WATSON, J.D.; MYERS, R.M.; CAUDY, A.A.; WITKOWSKI, J.A. **DNA Recombinante**: Genes e Genomas. 3.ed. Porto Alegre: Artmed, 2009.

ZAMZAMI, N.; SUSIN, S.A.; HIRSCH, T.; GOMEZ-MONTERREY, I.; CASTELO, M.; KROEMER, G. Mitochondrial control of nuclear apoptosis. *al.*, **The Journal of Experimental Medicine**, v.183, p. 1533–1544, 1996.