AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

CLONAGEM, EXPRESSÃO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DA REGIÂO AP-1 DA ONCOPROTEÍNA JUN

FLAVIO SOUSA SILVA

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do Grau de Mestre em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear – Aplicações.

São Paulo
2014

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Autarquia associada à Universidade de São Paulo

CLONAGEM, EXPRESSÃO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DA REGIÂO AP-1 DA ONCOPROTEÍNA JUN

FLAVIO SOUSA SILVA

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do Grau de Mestre em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear – Aplicações.

Orientadora:
Profa. Dra. Regina Affonso

Versão Corrigida
Versão Original disponível no IPEN

São Paulo
2014

Dedico este trabalho:

Aos meus pais Walmir e Maria do Socorro por todo apoio, incentivo e por todos os conselhos.

Aos meus avós paternos Anise e David.

Em memória dos meus avós maternos Maria das Graças e Demetrio e aos meu tios Carlos José e Valmir.

Aos meus irmãos Willian e Jessica.

Agradeço a Eliza Higuti por todo apoio, por sempre estar do meu lado e por me fazer feliz.

E a todos meus familiares.

Agradecimentos

A Dr.ª Regina Affonso pela oportunidade, confiança e pelos bons momentos que passamos ao longo deste trabalho.

Aos companheiros Marcão, Roberto e Carol, por essa amizade que já dura há tantos anos.

Ao Dr. Nélio grande amigo sempre disposto a ajudar e por todo conhecimento compartilhado.

Ao Dr. Patrick Jack Spencer por toda a ajuda ao longo deste trabalho.

A Eliza, Claudinha e Renata por toda alegria e bons momentos compartilhados.

Aos amigos Natan, Ary e Fernando.

A todo grupo de Biofármacos, Dr.ª Maria Helena, Dr.ª Olga, Dr.ª Ligia, Dr.ª Nanci, Tamara, Vicent, Mariana, Ed Carlos, Karina, Brunão, Alisson, Natalia, Douglas, Karen, Rosa.

A todo grupo de hormônios, Dr.ª Mirian, Dr. Carlos, Dr. Ezequiel, Dr. Paolo, Dr. Daniel Peres, Dr.ª Tereza, Beatriz, Fernanda, Eliana, Thais Sevilhano, Zé Maria e Junqueira.

A todos os funcionários do Centro de Biotecnologia em especial Arlete e Rute.

Ao Dr. Daniel Pimenta pela ajuda e por ter cedido gentilmente seu laboratório.

A Prof. ª Dr. ª Dulce Elena Casarine, Daniele Aragão, Larissa, Claudina C. Andrade e do laboratório de nefrologia da UNIFESP.

Ao Dr. Paulo Lee Ho do Centro de Biotecnologia do Instituto Butantan.

A CAPES e FAPESP pelo apoio financeiro.

Ao Laboratório Nacional de Luz Síncrotron.

Ao Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares e ao programa de pós-graduação da Universidade de São Paulo.

“Impossível é apenas uma grande palavra usada por gente fraca que prefere viver no mundo como está em vez de usar o poder que tem para mudá-lo. Impossível não é um fato, é uma opinião. Impossível não é uma declaração, é um desafio. Impossível é hipotético. Impossível é temporário”

Muhammad Ali

CLONAGEM, EXPRESSÃO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DA REGIÂO AP-1 DA ONCOPROTEÍNA JUN

FLAVIO SOUSA SILVA

RESUMO

A proteína jun é um dos principais integrantes do complexo AP-1 e está envolvido nos processos inflamatórios, diferenciação, apoptose e migração celular. Esta proteína pode formar homodímeros e heterodímeros por meio da dimerização que ocorre pelo sítio de sequências de leucinas. Existem evidências de que a proteína jun pode ser inibida pela proteína RPL10 mediante a ligação destas proteínas, no mesmo sítio de sequências de leucinas no núcleo celular, parando a progressão de tumores. O objetivo deste trabalho foi expressar, isolar e caracterizar a região de ligação das sequências de leucinas (região AP-1), para estudos posteriores de ligação com a proteína RPL10. O cDNA para proteína jun foi amplificado por PCR e clonado nos vetores de expressão pET 26b(+), pET 28a-c(+) e p1813 e expressa em *E.coli* BL21 (DE3). A proteína expressa em vetor pET28_AP1 foi eficientemente purificada pela técnica de cromatografia de afinidade a íons metálicos, por possuir uma sequência (poli)histidina que facilitou a purificação, apresentando um excelente grau de pureza. A identidade da proteína foi confirmada através de análise feita por *western blotting e dot blotting* e também por analise por espectrometria de massas.

CLONING, EXPRESSION, PURIFICATION AND STRUCTURAL EVALUATION OF THE REGION AP-1 ONCOPROTEIN JUN

FLAVIO SOUSA SILVA

ABSTRACT

The jun protein is one of the main AP-1 complex members and is involved in the inflammatory process, differentiation, apoptosis and cell migration. The Jun protein may form homodimers and heterodimers by dimerization in the leucines sequences site. There are evidences that jun protein can be inhibited by RPL10 protein through these protein binding in the same leucine sequences site, in the cell nucleus, stopping the tumor progress. The objective of this study was to express, isolate and characterize the binding region of the leucine sequences (AP-1 region) for subsequent binding studies with RPL10 protein. The jun protein cDNA was amplified by PCR and cloned into pET 26b(+), pET 28a-c(+) and p1813 expression vectors, and was expressed in *E.coli* BL21 (DE3). The protein expressed in pET28_AP1 vector was efficiently purified by the affinity chromatography technique to metal ions because have a (poly)histidine sequence which facilitate the protein purification, showing an excellent high purity. The protein identity was confirmed by western blotting and dot blotting and also by mass spectrometry analysis.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AP-1	Proteína Ativadora 1
Da	Dalton
D.O	Densidade Óptica
DNA	Ácido desoxirribonucléico
cDNA	DNA complementar
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos fosfatados
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
INCa	Instituto Nacional do câncer
IPTG	Isopropil β-D-tiogalactopiranosídeo
JNK	c-Jun N terminal quinase
LB	Meio *Luria-Bertani*
MM	Massa molecular
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	Tampão Fosfato Salino
PMSF	Fluoreto fenil metano sulfonil
PCR	Reação de polimerização em cadeia
pI	Ponto isoelétrico
RNA	Ácido ribonucléico
RNAm	Ácido ribonucléico mensageiro
RPM	Rotações por minuto
SDS-PAGE	Gel de poliacrilamida – dodecil sulfato de sódio
SOC	Meio super ótimo com repressão de catabólitos
µL	microlitros
µg	microgramas

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....1

1.1 Câncer 1

1.2 Oncogenes.....3

1.3 Oncoproteína jun e fator de transcrição AP-1.....4

1.4 Genes supressores de tumor 7

1.5 Sistema bacteriano de expressão 7

2 OBJETIVOS 9

3 MATERIAIS E MÉTODOS.....10

3.1 Material 10

3.1.1 Equipamentos e acessórios principais 10

3.1.2 Principais reagentes para biologia molecular 11

3.1.3 Meios de cultura.....11

3.1.4 Principais reagentes utilizados para análise da proteína expressa.....12

3.1.5 Colunas cromatográficas.....13

3.2 Métodos 13

3.2.1 Obtenção do DNA complementar (cDNA) 13

3.2.2 Obtenção dos cDNAs da a proteína jun e da região AP-1.....13

3.2.3 Eletroforese de DNA em gel de agarose 14

3.2.4 Vetor de expressão bacteriano.....15

3.2.5 Minipreparação de DNA plasmidial 16

3.2.6 Purificação do cDNA 17

3.2.7 Sequenciamento 17

3.2.8 Preparação do inserto e vetor 18

3.2.9 Ligação do inserto ao vetor 18

3.2.10 Obtenção de células competente *E.coli*.....18

3.2.11 Transformação de bactérias *E.coli* 18

3.2.12 Teste para clones positivos ao cDNA da região AP-1 19

3.2.13 Expressão da proteína recombinante 19

3.2.14 Extração da proteína recombinante.....20

3.2.15 Purificação 20

3.2.16 Cromatografia de troca iônica 20

3.2.17 Cromatografia por afinidade a íons imobilizados (IMAC) 20

3.2.18 Cromatografia por exclusão molecular (HPSEC) 21

3.2.19 Liofilização 21

3.2.20 Análises da proteína recombinante 21

3.2.21 Espectrometria de Massas 23

4 RESULTADOS 25

4.1 Obtenção do cDNA 25

4.1.2 Construções dos vetores de expressão bacterianos 27

4.1.3 Expressão da proteína recombinante 31

4.1.4 Caracterização imunológica da proteína AP-1 34

4.1.5 Purificação e Liofilização 35

5 DISCUSSÃO.....44

6 CONCLUSÕES.....49

REFERÊNCIAS 50

1 INTRODUÇÃO

1.1 Câncer

Câncer é a denominação dada a um grupo de doenças que possui em comum o crescimento descontrolado das células. Conhecida pelo homem desde épocas antigas, existem registros datados do século 7 a.C pelo sacerdote egípcio Imhotep, que informam casos de tumores nos seios, reportando-os como uma massa protuberante que foram tratados por meio de cauterizações.

A palavra câncer deriva do grego *Karkinos* “caranguejo”, este termo foi utilizado por Hipócrates após notar uma semelhança entre o tumor e os vasos sanguíneos periféricos com um caranguejo. O termo *carcinos* é utilizado quando não ocorre a formação de úlceras e *carcinoma* quando ocorre a formação (MALZYNER; CAPONEIRO, 2013).

Com o passar dos anos foram sugeridas muitas hipóteses para o surgimento da doença, porém foi em 1775 que o cirurgião Percival Pott observou que o câncer na bolsa escrotal era comum entre limpadores de chaminés, levando assim a uma série de estudo dos possíveis agentes que poderiam levar a manifestação da doença (BROWN; THORNTON; PERCIVALL, 1957).

Com o advento da biologia molecular foi possível compreender que o câncer ocorre a partir de danos no material genético das células, que podem ser potencializados por agentes químicos, físicos ou virais. Estão diretamente relacionadas ao desenvolvimento do câncer em humanos pelo menos 291 mutações genéticas. Aproximadamente 25.000 genes do genoma humano foram decodificados e destes, 1% está relacionado ao desenvolvimento do câncer (FUTREAL et al., 2004).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), o câncer é a segunda doença que mais causa mortes no mundo. Durante muitos anos foi considerada uma doença que acometia apenas países desenvolvidos, porém este cenário vem mudando e aproximadamente 50% dos casos já foram registrados em países em desenvolvimento.

Um levantamento sobre a doença realizado pela Global Câncer (Globocan) e divulgado pela Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (IARC), mostra um aumento no número de casos da doença (Fig. 1), uma vez que foram registrados 12,7 milhões de novos casos, e 7,6 milhões de mortes em

decorrência da doença. A expectativa para 2030 é que esse número aumente para 13,1 milhões de mortes.

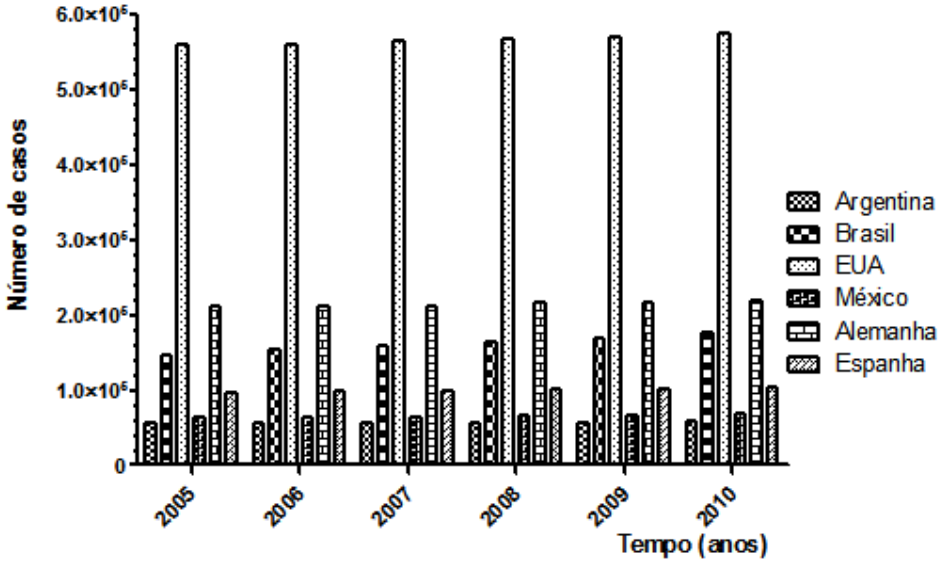


Figura 1: Distribuição do número de pessoas afetadas em decorrência do tempo (anos) em alguns países (OMS, 2010).

No mundo os tipos de cânceres que mais causam mortes são os de pulmão, fígado e estômago e juntos representam 37,3% de mortes em decorrência da doença. Dentre todos os tipos de cânceres, a incidência entre homens (52%) é maior que em mulheres.

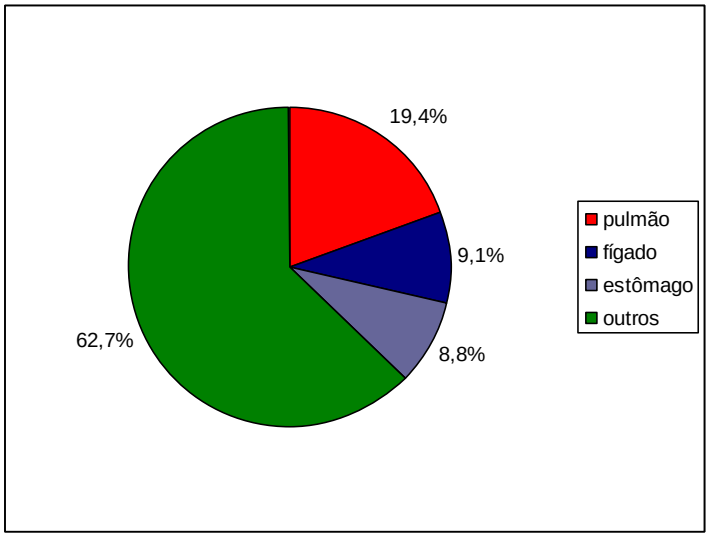


Figura 2: Representação dos três principais tipos de cânceres que mais causam mortes no mundo (OMS, 2013).

A carcinogênese é o processo de formação do câncer e ocorre de forma lenta, podendo durar vários anos até dar origem a um tumor visível. Este processo passa por vários estágios, dentre eles estão:

- O estágio de iniciação, onde as células sofrem os efeitos dos agentes oncopromotores, alterando-as geneticamente; nesta fase não é possível detectar o tumor.
- O segundo estágio é o de promoção, que transforma as células de forma lenta e gradual sob o contínuo efeito dos oncopromotores.
- O terceiro e último é o estágio de progressão, e caracteriza-se pela multiplicação descontrolada e irreversível das células alteradas, evoluindo até o surgimento das primeiras manifestações clínicas da doença (INCa, 2014).

Durante o estágio de iniciação da oncogênese, alterações na via de sinalização dos fatores de transcrição levam à alterações na síntese protéica. Somente um grupo limitado dos mais de 2000 fatores de transcrição codificados pelo genoma humano, aumenta sua atividade em tumores. Muitos destes fatores são nucleares, como a Proteína Ativadora-1 (Ativator Protein -1, AP-1), esta quando ativada permite a promoção e progressão das etapas da carcinogênese (MATTHEWS; COLBURN; YOUNG, 2007).

1.2 Oncogenes

A primeira observação da indução de tumores por vírus, foi em 1911 em certos sarcomas de galinhas realizada pelo pesquisador Peyton Rous, e este vírus recebeu o nome de vírus do sarcoma de Rous (RSV). O gene responsável por esse tipo de sarcoma foi chamado de v-src e caracterizado como um oncogene, dando inicio a descoberta de vários outros vírus tumorais (VOET, 2013).

Em 1976, Michael Bishop e Harold Varmus observaram que células de galinhas não infectadas com o vírus RSV tinham o gene c-src, essencial para as células, conservado em vários eucariotos e homólogo ao v-src. Concluíram que o vírus pode estar relacionado à mudanças nas sequências de DNA das células normais que foram infectadas. As sequências normais não-mutantes que não sofreram nenhuma alteração foram denominadas proto-oncogenes (VOET, 2013).

Na literatura mais de 50 proto-oncogenes são conhecidos, e estes genes quando alterados, passam a ser chamados de oncogenes. Existem três mecanismos genéticos para a alteração de um proto-oncogene como:

- Mutações com alteração ou deleção de algum códon.
- Mudanças na amplificação do gene, resultando na expressão inadequada da proteína.
- Translocações cromossômicas nas quais pode ser adicionado ao gene um promotor forte, altamente ativo e pertencente a outro gene ou também, ocorrer à fusão de dois genes gerando um gene anormal. (KUMAR; ABBAS; ASTER, 2013).

Os oncogenes atuam como aceleradores da proliferação celular, de maneira descontrolada, no desenvolvimento de tumores, na inibição da diferenciação celular e inibição da apoptose.

1.3 Oncoproteína jun e fator de transcrição AP-1

O oncogene jun foi identificado pela primeira vez no genoma do retrovírus *Avian Sarcoma Vírus 17* (ASV 17), é capaz de induzir câncer em aves, transformando os fibroblastos em células neoplásicas. Possui uma uma alta homologia com a região de domínio de ligação ao DNA da proteína GCN4, que é um ativador transcricional de leveduras e responsável por regular a expressão de genes envolvidos na biossíntese de aminoácidos, quando ligado à regiões especificas do DNA (BOHMANN et al.,1987; WATSON et al., 2006).

A proteína Jun é indispensável para a proliferação celular por controlar a expressão de ciclina D1, um regulador positivo do ciclo celular, e também por regular a expressão da proteína p53 que é um regulador negativo do ciclo celular. Esta proteína é encontrada em vários tipos de células, sendo bem expressa naquelas que compõem o pulmão, próstata, tireóide, coração entre outros (Fig. 3).

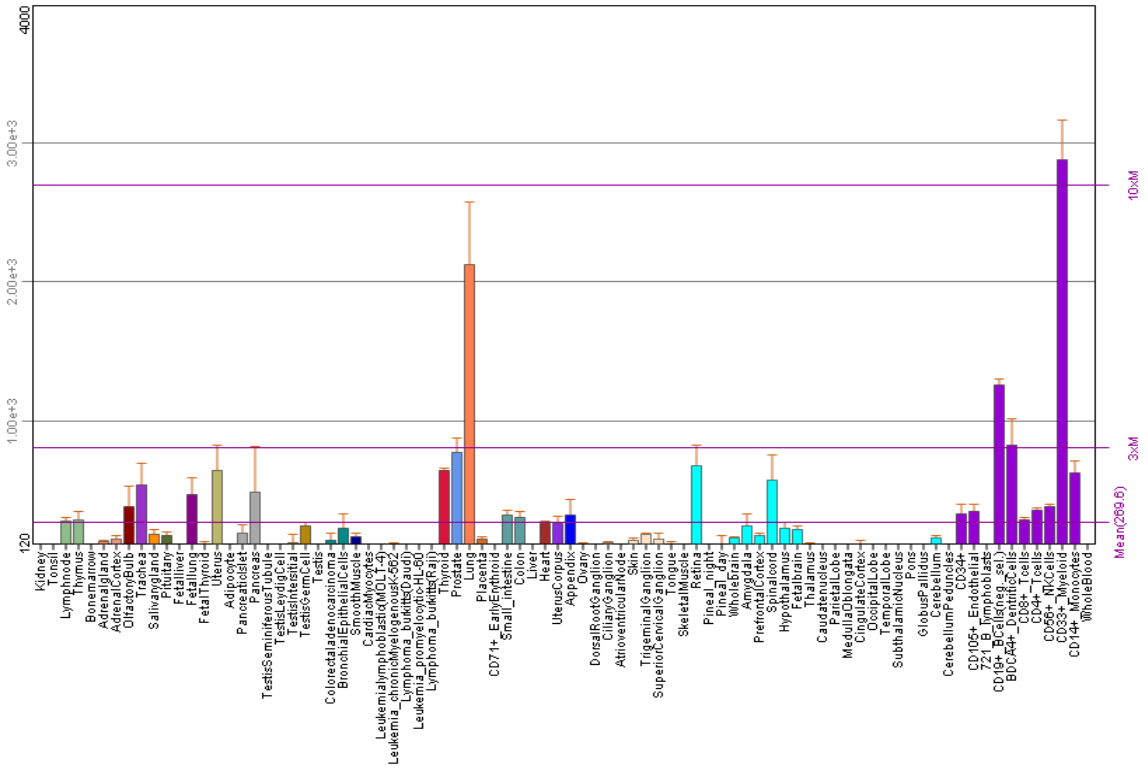


Figura 3: Indicação da quantidade da proteína c-jun em diversos tecidos humanos [1]

O fator de transcrição AP-1 é um complexo formado pela dimerização de duas proteínas, tendo a oncoproteína jun como o componente de maior importância (Fig. 4) (SHAULIAN, 2010).

De acordo com Van Dam e Castellazi (2001), os ativadores AP-1 podem ser homodímeros, quando ocorre a dimerização entre os membros da família jun (Jun, Jun B e Jun D), ou heterodímeros quando a dimerização dos membros da família jun ocorre com proteínas pertencentes às famílias Fos (Fos, FosB, Fra1 e Fra2), ATF (ATF2, LRF1/ATF3, B-ATF, JDP1, JDP2) e Maf (c-Maf, MafA/B/G/F/K, Nrl).

[1] http://www.biogps.org/

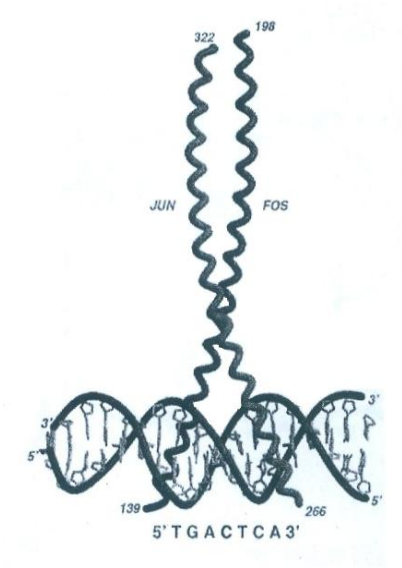


Figura 4: Estrutura obtida da análise do cristal de um heterodímero jun. Onde pode ser Observada a ligação de duas α–hélices Jun:Fos interagindo na extremidade C-terminal com uma dupla hélice de DNA (GLOVER; HARRISON, 1995).

O AP-1 é capaz de modular funções opostas tanto na supressão do tumor quanto no desenvolvimento, e isso irá depender da dimerização feita pela proteína jun e também pela proteína quinase, responsável pela sua regulação (c-Jun N-terminal Kinase) (SHAULIAN, 2010). Esta dimerização ocorre entre as extremidades C-terminal da região AP-1 da proteína jun, a qual contém uma sequência de 5 aminoácidos leucina (COOPER, 1995). Esta região é denominada de zíper de leucinas (*Leucine Zipper - zif*) e está representada na Figura 5. A extremidade N-terminal deste complexo liga-se a sequências consenso de DNA constituídas por um heptâmero TGA (C/G) TCA (SHAULIAN, 2010)

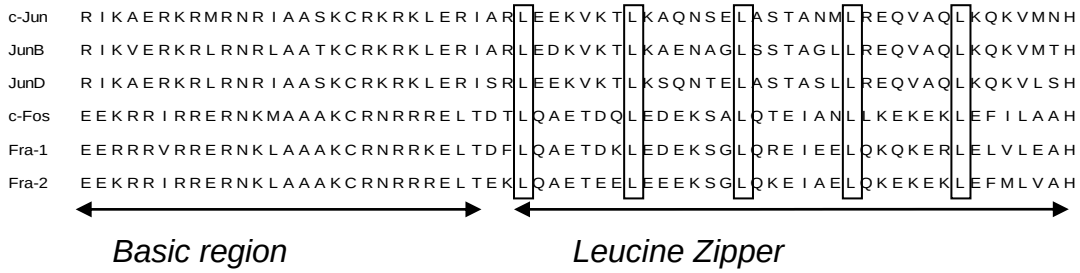


Figura 5: Esquema do alinhamento das sequências de aminoácidos das proteínas que dimerizam com a proteína jun. Em destaque o zíper de leucinas, comum em todas as proteínas analisadas (ANGEL; KARIN, 1991).

Desde sua descoberta o fator de transcrição AP-1 tem sido muito estudado não apenas pela sua atividade na proliferação celular, mas também por seu

envolvimento na inflamação, diferenciação celular, migração celular e cicatrização de feridas.

1.4 Genes supressores de tumor

Os genes supressores de tumor codificam proteínas responsáveis por inibir a divisão celular incontrolada. Quando ocorre a perda desta função, os riscos de transformação de células normais em células neoplásicas aumentam.

Existem dois tipos de proteínas supressoras tumorais, algumas delas funcionam suprimindo diretamente a proliferação das células em resposta a uma variedade de sinais inibidores de crescimento e indutores da diferenciação. Outras são componentes do circuito de controle celular, e inibem a proliferação em resposta a desequilíbrios metabólicos e danos genômicos.

Aproximadamente 30 genes supressores tumorais foram identificados; o primeiro foi o gene Rb (retinoblastoma) que é responsável pelo controle do ponto G1/S (intervalo 1 /síntese de DNA) do ciclo celular, e possui um papel central na divisão celular, diferenciação, apoptose e outros processos (KUMAR; ABBAS; ASTER, 2013).

Outra proteína supressora de tumor muito importante é a proteína p53, cujo gene é ativado em resposta a danos celulares, impedindo a progressão da divisão celular e consequentemente permitindo o reparo do DNA antes de sua duplicação.

Com base nas informações descritas, estudos com a região onde ocorre a dimerização da proteína e de ligação ao DNA (região AP-1) são de grande interesse no entendimento de sua ação na área de oncologia e de alguns de seus inibidores.

1.5 Sistema bacteriano de expressão

Dentre as estratégias utilizadas para expressão de proteínas, uma bastante interessante para a proteína jun, é a expressão em sistema bacteriano, uma vez que pode possibilitar grandes rendimentos em um curto período de tempo e seu custo ser relativamente baixo (SORENSEN; MORTENSEN, 2005).

No sistema bacteriano, a proteína recombinante expressa pode ser enviada para três regiões diferentes:

- Meio extracelular - a proteína recombinante é enviada para o meio de cultura. A expressão pode resultar em altas quantidades de proteína e esta ter a conformação nativa. Porém, durante o cultivo, o meio passa a produzir proteases que podem degradar as proteínas produzidas, além de diluí-las (SORENSEN; MORTENSEN, 2005).
- Periplasma bacteriano - região localizada entre a membrana celular e a parede bacteriana. Neste ambiente, o meio é oxidativo e possui enzimas que possibilitam a conformação natural da proteína. Porém, a expressão tem um baixo rendimento. (MAKRIDES, 1996).
- Citoplasma bacteriano – a proteína é expressa em grandes quantidades, porém de forma agregada (corpos de inclusão). Estes agregados podem conter 90% da proteína de interesse, mas para a obtenção da proteína solúvel é necessário o uso de reagentes desagregadores (Guanidina ou Uréia), ou a utilização de técnicas com alta pressão hidrostática ou baixas temperaturas de cultivo (CLARK, 2001).

Nos estudos estruturais e de bioatividade, há a necessidade de se obter grandes quantidades de proteínas solúveis, por isso é muito importante a escolha do tipo de sistema no qual se pretende expressar a proteína de estudo e da estratégia a ser utilizada.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Obter a região AP1 da oncoproteína jun expresso no citoplasma da bactéria *E.Coli* para estudos de ligação com DNA

2.2 Específicos:

- Amplificar por PCR o cDNA para a região AP1 (186pb) da oncoproteína jun humana obtido de células PC3
- Clonar nos vetores de expressão p1813, pET 26b(+), pET 28a-c(+)
- Expressar esta região em sistema bacteriano BL21(DH3) e HB2151
- Isolar a proteína por técnicas cromatográfica e caracterizá-la (troca catiônica, afinidade a íons metálicos e exclusão molecular e caracterizá-la por SDS- PAGE, *western blotting*, *dot blotting* e espectrometria de massas

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Material

3.1.1 Equipamentos e acessórios principais

- Aparelho Mili-Q-plus, purificador de água – MILLIPORE (Bedford, MA, EUA)
- Autoclave, modelo SS-245E – TOMY DIGITAL BIOLOGY (Tokyo, Japão)
- Balança analítica, modelo AW 220 – SHIMADZU (Quioto, KYT, Japão)
- Balança de precisão, modelo P1200 – METTLER (Columbus, Ohio, EUA)
- Banho-maria, modelo 100 - FANEM (São Paulo, Brasil)
- Banho-maria, modelo Type 16500 Dri-Bath – THERMO SCIENTIFIC (Waltham, EUA)
- Centricon Filter Devices 3 kDa – MILLIPORE (Bedford, MA, EUA)
- Centrífuga refrigerada automática, modelo 5810R – EPPENDORF (Hamburgo, Alemanha)
- Centrífuga refrigerada automática, modelo Sorvall ST16R - THERMO SCIENTIFIC (Waltham, EUA)
- Espectrofotômetro de massas – WATERS (Milford, MA, EUA)
- Estufa bacteriológica – QUIMIS (São Paulo, Brasil)
- Filmes radiográficos - KODAK (Rochester, NY,EUA)
- Fluxo laminar modelo 2256 – TROX (São Paulo, Brasil)
- Freezer – 80 ºC, modelo 939 - THERMO SCIENTIFIC (Waltham, EUA)
- Incubadora refrigerada com agitação, modelo TE421 – TECNAL (São Paulo, Brasil
- Integrated Speed Vack System, SAVANT Instruments Farmingdale (NY,EUA)
- Liofilizador Modulyo freeze dryers - THERMO SCIENTIFIC (Waltham, EUA)
- Sistema de eletroforese vertical, Mini-Protean - BIO-RAD (Hercules, CA, EUA)
- Sistema de purificação de proteínas Akta-Purifier – GE HEALTHCARE (Fairfield, CT, EUA)
- Sistema semi-seco de eletrotransferência - BIO-RAD (Hercules, CA, EUA)
- Sonicador - SONICS & MATERIAS (Danbury, Connecticut, EUA)

- Termociclador geneamp PCR system 2400 termociclador geneamp PCR system 2400 - PERKIN ELMER (Waltham, USA)
- Transiluminador de luz ultravioleta T26M – Bioagency (São Paulo, Brasil)

3.1.2 Principais reagentes para biologia molecular

- Agarose, Grau Biologia Molecular BIO-RAD (Hercules, CA, EUA)
- Antibióticos: Canamicina – INVITROGEN (Carlsbad, CA, EUA)
- Corante EZ-Vision DNA Dye – AMRESCO (Solon, OH, EUA)
- Enzimas de restrição - FERMENTAS (Burlington, ON, Canadá)
- IPTG - USB (Cleveland, Ohio, EUA)
- Marcador de peso molecular Lambda DNA/*HindIII* - PROMEGA (Madison, WI, EUA)
- Marcador de peso molecular PCR Markers - PROMEGA (Madison, WI, EUA)
- Sistema de purificação de DNA plasmidial, WizardPlus S. V. - PROMEGA (Madison, WI, EUA)
- Sistema de reação para Transcripstase reversa GoScript Reverse Transcription System - PROMEGA (Madison, WI, EUA)
- Sistema para extração de DNA PureYiel Plasmid Miniprep – PROMEGA (Madison, WI, EUA)
- Sistema Wizard SV Gel and PCR Clean-up System – PROMEGA (Madison, WI, EUA)
- T4 DNA Ligase - PROMEGA (Madison, WI, EUA)
- TAE (0,04 M Tris-acetato, 0,002 M EDTA pH 8,0)
- Taq DNA Polimerase - BIOTOOLS (Madrid, Espanha)
- Vetor de expressão p1813 (LUCK et al., 1989)
- Vetores de Expressão pET 26b(+), pET 28a-c(+) - NOVAGEN (Bedford, MA, EUA)

3.1.3 Meios de cultura

- LB-ágar – 15 g de Agar bacteriológico para 1L de meio de cultura líquido.

- SOC - Triptona 20 g/L, extrato de levedura 5 g/L, cloreto de sódio 0,5 g/L, 0,0025 M de KCl, esterilizado e suplementado com 0,01 M de MgCl2 e 0,02 M de glicose.
- Solução alcalina I: 0,05 M de Glicose, 0,025 M de tris-HCl (pH 8,0) e 0,01 M de EDTA (pH 8,0).
- Solução alcalina II: 0,2 N de NaOH e 1% de SDS.
- Solução alcalina III: 5 M de acetato de potássio, 3 M de ácido acético glacial, q.s.p 50 mL.

3.1.4 Principais reagentes utilizados para análise da proteína expressa

- Anticorpo policlonal anti-c-jun - MILLIPORE (Bedford, MA, EUA)
- Anticorpo secundário conjugado a peroxidase - ARMESHAN PHARMACIA BIOTECH (Amersham, Inglaterra)
- Glicerol 0,1%, β-mercaptoetanol 10%, SDS 0,1 M, tris-HCl 0,05 M, pH 6,8.
- Leite em pó Molico - NESTLÉ (Vevey, Vaud, Suíça)
- PBS – Cloreto de potássio 0,0027 M, cloreto de sódio 0,137 M, fosfato dibásico de sódio 0,0081 M, fosfato monobásico de potássio 0,0015 M pH 7,4.
- Sistema de coloração com prata Silver Stain Plus – BIO-RAD (Hercules, CA, EUA)
- Sistema de detecção de proteina por ECL - GE HEALTHCARE (Fairfield, CT, EUA)
- Solução de acrilamida 30% – acrilamida 29%, N, N'-metilenobisacrilamida 1% em água deionizada.
- Solução de azul de Comassie – ácido acético glacial 10%, azul de Comassie R250 0,25%, etanol 45%.
- Solução de extração I – Ácido fórmico 5% em água MilliQ.
- Solução de extração II – Ácido fórmico 5% em acetronitrila 50%
- Solução descorante – ácido acético glacial 10%, metanol 30%.
- Solução fixadora – água destilada 45%, metanol 45%, acido acético 10%.
- Tampão de amostra 5x para SDS-PAGE – azul de bromofenol.
- Tampão de corrida Tris-glicina – 0,1M Tris, 0.1 M glicina e 1% SDS.
- Tampão de corrida Tris-tricina – 0,1 M Tris, 0,1 M tricina e 0,1% SDS.

- Tampão de transferência – glicina 0,192 M, metanol 20%, SDS 0,01%, tris 0,025 M, ph 8,3.

3.1.5 Colunas Cromatográficas

- HisTrap FF crude - GE HEALTHCARE (Fairfield, CT, EUA)
- Hitrap SP FF - GE HEALTHCARE (Fairfield, CT, EUA)
- Superdex 75 10/300 GL - GE HEALTHCARE (Fairfield, CT, EUA)

3.2 Métodos

3.2.1 Obtenção do DNA complementar (cDNA)

Os cDNAs utilizados neste estudo foram obtidos a partir do RNA total de sangue humano e de cultura de células de câncer de próstata PC-3.

Para obtenção destes cDNAs, foram feitas reações de transcriptase reversa utilizando o *Kit GoScript Reverse Transcription System.* Foram adicionados às reações do *kit* 1,5 μg de RNA total, 0,5 μg de Oligos (DT) e água livre de nuclease (DEPC) q.s.p. 5 μL. Para separação das fitas hibridizadas de RNA ou Oligo (DT), a reação foi incubada a 70 ºC durante 5 min e em seguida colocada em gelo por no mínimo 5 min.

A reação com a enzima transcriptase reversa foi composta por 5 μl da reação descrita anteriormente, 4 μl de tampão de reação *GoScript*, $MgCl_2$ 0,005 M (1,5 μL), 1μl dNTps 0,01 M (dTTP, dATP, dGTP, dCTP), 1 μL *GoScript Reverse Transcriptase* e água DEPC q.s.p. 15 μL.

Todas as reações foram conduzidas em termocilador nas seguintes condições de tempo e temperatura: 25 °C por 5 min para anelamento, 42 °C por 60 min para extensão da dupla fita de cDNA e inativação da enzima transcriptase reversa após esse período a 70 ºC por 15 min.

3.2.2 Obtenção dos cDNAs da proteína jun e da região AP-1

Os oligos utilizados para a Reação em cadeia da Polimerase (PCR) foram baseados na sequência do RNA mensageiro (mRNA) c-jun de aproximadamente 1000pb (NCBI: NM_002228.3) e também da região AP-1 de aproximadamente 186 pb. (GLOVER; HARRISON, 1995).

A amplificação do segmento foi realizada em duas etapas: a primeira os oligos usados na PCR permitiram a amplificação da sequência do cDNA para a proteína jun de 1000 pares de bases (pb) descritos no Oligo Jun-I . Na segunda reação foi amplificada a sequência de interesse com o Oligo Jun-II, incluindo na extremidade 5´- senso um sítio para a enzima *BamHI* seguida de um códon correspondente ao aminoácido metionina (ATG); e o anti - senso, um sítio para a enzima *HindIII* seguido do códon correspondente ao código de parada da síntese da proteína (TGA).

Oligo Jun I Fow 5' GTTCTATGACTGCAAAGATGG 3'

Oligo Jun I Rev 5' CTCTCTTCAAAATGTTTGCAAC 3'

Oligo Jun II Bam HI 5' CGGGATCCATGAAAGCGGAGAGG 3'

Oligo Jun II Hind III 5' CCCAAGCTTCAGTGGTTCATGAC 3'

Cada reação de PCR foi composta por 5 µL de tampão da reação (*Reaction Buffer* 10x 0,750 M Tris HCl Ph 9.0, 0,5 M KCl, 0,2 M, 0,2 M $(NH_4)_2SO_4$ e 0,02 M $MgCl_2$), 1 µL de dNTPs a 0,01 M, 5 µL de cada oligonucleotídeo iniciador, 0.25 µL de cDNA da amostra e 1,25 µL da enzima *Taq DNA Polimerase* e água ultra pura estéril q.s.p. 50 µL.

As reações foram conduzidas em termocilador nas seguintes condições de tempo e temperatura: 94 °C durante 1 min para desnaturação da dupla fita de DNA; 30 ciclos divididos em três etapas: 94 °C por 30 seg para desnaturação da dupla fita de DNA, 55 °C por 30 seg para hibridização com os oligos e 72 °C por 30 seg para síntese do cDNA; finalizando a reação com uma temperatura de 72 ºC durante 3 min.

3.2.3 Eletroforese de DNA em gel de agarose

Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese horizontal em gel de agarose a 1,5%, em tampão de corrida TAE e foi realizada a 100 V e 60 mA durante 30 min. Para a determinação dos produtos amplificados foram utilizado marcadores de peso molecular de 23,130 pb (*Lambda DNA/HindIII e EcoRI)* e 1000 pb (*PCR Markers*); para visualização do DNA, foram adicionados às amostras o corante *Ez-Vision* e a análise do gel foi realizada utilizando um transiluminador de luz ultravioleta.

3.2.4 Vetor de expressão bacteriano

Foram utilizados neste trabalho três vetores para a expressão da região AP-1 da proteína jun: pET 26b(+), pET 28a-c(+) e p1813 e o esquema de cada um destes vetores está representado na Figura 6.

O primeiro vetor de expressão pET26b(+), foi transformado em células de *E.coli* competentes da linhagem BL21 (DH3). O segundo foi o pET 28a-c(+), que permite a expressão da proteína fusionada a 6 resíduos de histidina, tanto na extremidade amino-Terminal (N-Terminal) quanto na extremidade carboxi-Terminal (C-Terminal), o que facilita a purificação da proteína.

O vetor p1813 possui o gene repressor *lac* clonado no próprio vetor, portanto quando há adição de IPTG ocorre a liberação da transcrição do cDNA de interesse, isto em cepa HB 2151 (LUCK et al., 1989). Este último vetor quando comparado com os outros dois é capaz de produzir uma quantidade superior de proteína (PEREIRA, 2009).

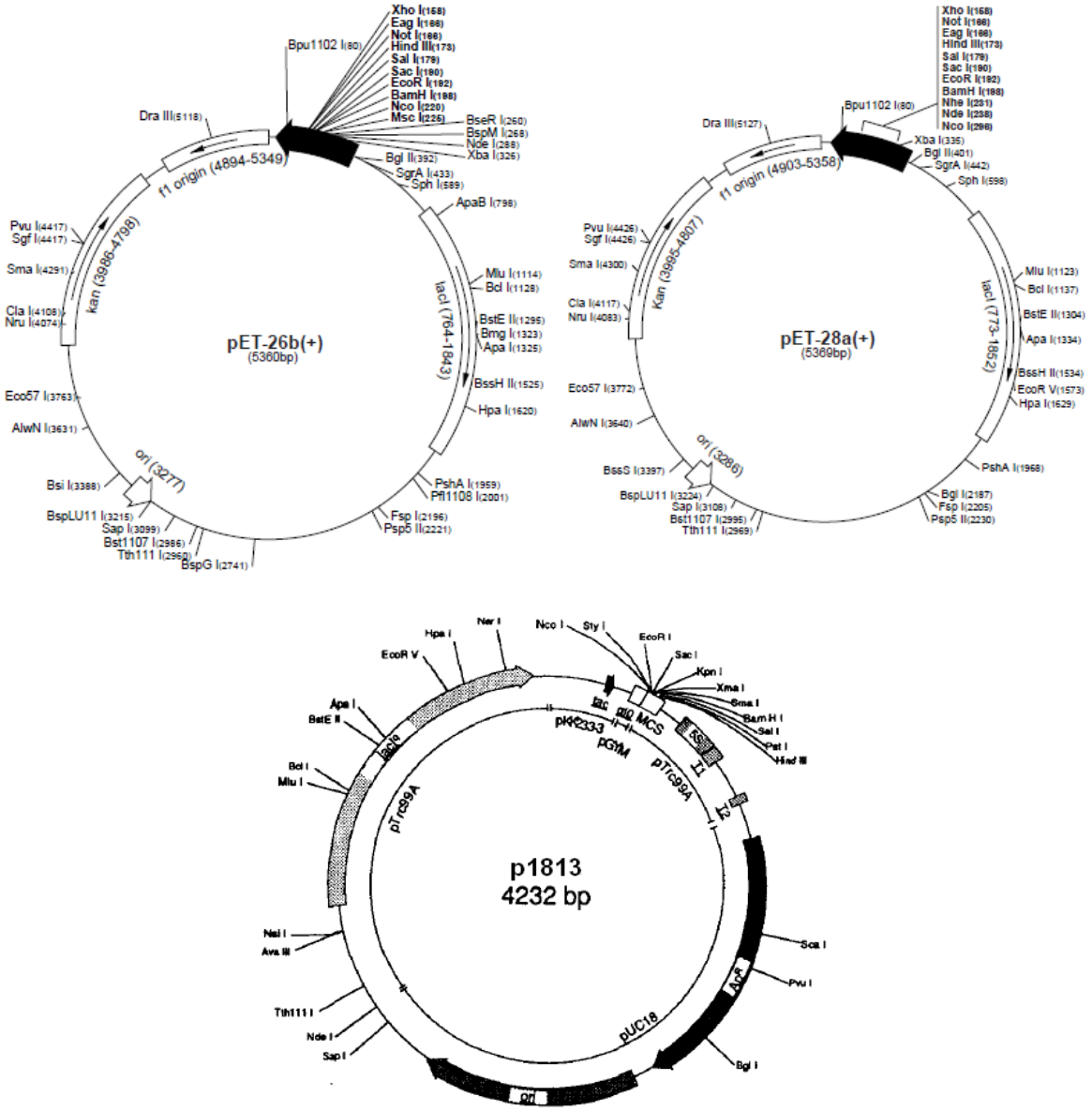


Figura 6: Esquemas dos vetores utilizados para a expressão da proteína AP-1. Vetores da linha pET 26b+ e 28a+ (*Novagen*); p1813 segundo Grahan et al.

3.2.5 Minipreparação de DNA plasmidial

A preparação do plasmídeo p1813 foi realizada por lise alcalina seguida de uma etapa de purificação e precipitação do DNA.

Primeiramente, foi inoculado em 12 mL de meio de cultura LB acrescido de antibiótico apropriado ao crescimento, uma colônia de bactéria transformada com o plasmídeo de interesse. Este inóculo foi incubado durante 16 horas a 37°C com agitação de aproximadamente 180 RPM. Após esta etapa, 10 mL desta cultura foi centrifugada, 10 min a 4 °C, e então foi descartado o sobrenadante.

O precipitado foi ressuspenso em 200 μL de solução alcalina I gelada e após agitação, foram adicionados 200 μL de solução alcalina II recém preparada e colocado em gelo por 2 min. Após esta etapa foram adicionados 150 μL de solução alcalina III gelada e o tubo foi colocado em gelo durante 5 min.

Após este período, a amostra foi centrifugada a 14.000 RPM, 10 min e a 4 °C. Ao sobrenadante foram adicionados 600 μL de solução de fenol-clorofórmio e centrifugado novamente; após a coleta da fase superior, foi adicionado isopropanol seguido de centrifugação. Para lavagem e hidratação do DNA, foi adicionado etanol 70% e centrifugado; o sobrenadante foi removido e o *pellet* secado em centrifuga a vácuo. O DNA plasmidial purificado, foi ressuspenso em água *Milli-Q* estéril.

Os plasmideos pET 26b(+) e pET 28a-c(+) foram extraídos e purificados utilizando o sistema de extração de DNA *PureYiel Plasmid Miniprep System* seguindo o protocolo do fabricante.

3.2.6 Purificação do cDNA

Após a etapa de PCR foi realizada uma eletroforese em gel de agarose e após a visualização da banda correspondente ao cDNA, esta foi recortada do gel com auxílio de um bisturi e purificada mediante o protocolo do sistema de purificação de DNA em gel de agarose *Wizard SV Gel na PCR Clean-up System*.

3.2.7 Sequenciamento

Os sequenciamentos foram realizados no Centro de Estudos do Genoma Humano (USP-SP- Brasil), e foram utilizados 25 e 15 ng do cDNA obtido por PCR para as reações.

Os resultados foram comparados com o banco de dados de sequências genéticas *GenBank* mantido pelo *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) com a ferramenta *Basic Local Alignment Search Tool* (*BLAST*) utilizando o programa *Biological Sequence Alignment Editor* (*Bioedit*) um editor de alinhamento de sequência biológicas.

3.2.8 Preparação do inserto e vetor

O cDNA de 186 pb foi clivado com as enzimas de restrição *BamHI* e *HindIII,* originando duas extremidades coesivas. Os vetores também foram clivados com as mesmas enzimas de restrição e desfosforilados para excluir a possibilidade de união das duas extremidades sem a incorporação do inserto na reação de ligação.

3.2.9 Ligação do inserto ao vetor

A ligação do fragmento de cDNA de interesse ao vetor foi feita em uma reação contendo o vetor e inserto na proporção de 1:5, 5 U enzima *T4 DNA Ligase,* 2 µL do tampão *T4 DNA ligase* 10x e q.s.p. 20 µL de H_2O ultra pura. A reação de ligação foi incubada durante 16 horas a 8 °C.

3.2.10 Obtenção de células competente *E.coli*

As cepas de bactérias *E. coli* foram estriadas em placas de meio LB - ágar, e incubadas durante 16 horas a 37 ºC. Após este período as colônias foram inoculadas em 2 mL de meio LB, e mantidas sob agitação durante 16 horas. O inóculo foi diluído em 100 mL de meio LB e deixado sob agitação até atingir a densidade óptica (DO_{600} ~ 0,6) e então a cultura foi incubada em gelo durante 10 min.

O inóculo foi centrifugado e o *pellet* foi ressuspenso em solução de $CaCl_2$ gelada. Após 15 min de incubação em gelo, a suspensão foi centrifugada e o *pellet* foi novamente ressuspenso em solução de $CaCl_2$.

Quando adicionado à solução de cloreto cálcio, os íons Ca^{+2} formam um complexo com os fosfatos carregados na membrana, cobrindo as cargas negativas, o que facilita a atração eletrostático com o DNA.

3.2.11 Transformação de bactérias *E.coli*

Para a transformação das bactérias foi utilizado o método do choque térmico. Para esta reação foram adicionados 20 µL do produto de ligação em 200 µL de células competentes e mantida em gelo durante 10 min., em seguida foi colocado em banho-maria a 42 ºC por 1 min e novamente em banho de gelo por 5 min.

Foram adicionados 200 µL de meio SOC (CARVALHO; RICCI; AFFONSO, 2010) e as células transformadas foram incubadas 1 hora a 37 ºC sob agitação. Após esse período as bactérias foram inoculadas em meio LB - ágar com antibiótico canamicina. Após 16 horas a 37 ºC foram selecionadas algumas colônias de bactérias e estas foram inoculadas em 3 ml de meio LB com 50 µg/mL de canamicina e incubadas a 37 ºC por 16 horas.

3.2.12 Teste para clones positivos do cDNA região AP-1

A ligação do inserto aos vetores pET 26b(+) e pET 28a-c(+) foi confirmada mediante reações de PCR, utilizando oligos desenhados a partir da sequência do próprio vetor, denominados T7 promotor e terminador; foram utilizadas as mesmas condições descritas no item 3.2.

Oligo T7 promotor : 5' TTTTGTTTAACTTTAAGAAGG 3'

Oligo T7 terminador: 5' TAGTTATTGCTCAGCGG 3'

Para o vetor p1813 foi realizado uma mini preparação plasmidial, e o produto foi clivado sob ação das enzimas de restrição *BamHI* e *HindIII*, o fragmento gerado foi recortado do gel, purificado e sequenciado.

3.2.13 Expressão da proteína recombinante

Para expressão da proteína recombinante, colônias bacterianas confirmadas quanto à presença do plasmídeo com o inserto, foram inoculadas em meio LB com canamicina (50 µg/mL) e este inóculo foi mantido sob agitação de ~160 rpm, durante 16 horas a 37°C.

Ao final deste período a cultura foi diluída na proporção 1:20 em meio LB e mantida sob as mesmas condições de crescimento até atingir a fase midi-log de crescimento (DO_{600} ~ 0,4-0,8) (AFFONSO, 2000). Nesta faixa de absorbância foi adicionado o reagente IPTG (0,5 M), necessário para a ativação do promotor. Em seguida a cultura foi fracionada e submetida às condições de crescimento: 5h a 37 °C; 16 h a 18 °C, 25 °C, 30 °C e 37 °C e agitação a 150 rpm (PEREIRA, 2009). Foram coletadas amostras de todas as condições incluindo amostras controle sem a adição de IPTG.

3.2.14 Extração da proteína recombinante

Após o período de expressão a cultura foi centrifugada a 7.000 rpm, 10 min a 4 °C e o *pellet* de bactérias foi ressuspenso em solução de fosfato de sódio 0,02 M, pH 7,4 e submetido à lise celular em um sonicador de células, por sete vezes, com intervalos de 30 seg. em gelo. Essa suspensão foi centrifugada a 7.000 rpm, 10 min a 4 °C e o sobrenadante contendo as proteínas solúveis foi clarificado em filtro de 0.22 µm (CARVALHO; RICCI; AFFONSO, 2010).

3.2.15 Purificação

A partir dos extratos bacterianos, as proteínas recombinantes foram purificadas em duas etapas, utilizando duas técnicas cromatográficas distintas. A primeira metodologia utilizada foi a cromatografia por afinidade a íons metálicos ou troca iônica e a segunda mediante exclusão molecular. Todas foram realizadas no equipamento ÄKTA PURIFIER.

3.2.16 Cromatografia de troca iônica

Para a purificação das proteínas expressas com os vetores p1813_AP1 e pET 26b_AP1, a escolha da cromatografia de troca iônica foi baseada no ponto isoelétrico da proteína de 11.3, o que possibilita a utilização de uma coluna de troca catiônica Hitrap SP FF.

Para a preparação da coluna, esta foi lavada com H_2O *Milli-Q* e posteriormente com fosfato de sódio. A coluna foi carregada com tampão fosfato de sódio 0,02 M pH 7,4 e NaCl 1 M e depois lavada novamente com tampão fosfato de sódio 0,02 M pH 7,4. Após a passagem do extrato, a proteína foi eluída com um gradiente de NaCl de 0 a 1 M.

3.2.17 Cromatografia por afinidade a íons imobilizados (IMAC)

A escolha do método de purificação da proteína expressa com o vetor pET 28_AP-1 foi baseado na expressão desta proteína recombinante fusionada à 6 histidinas.

Para a preparação da coluna de cromatografia de afinidade HisTrap FF crude, foi realizada uma lavagem com solução contendo 0,02 M de fosfato de sódio, 0,5 M de NaCl e 0,05 M de EDTA, seguida de lavagens de 5 volumes de coluna com tampão fosfato de sódio. A coluna foi carregada com íons níquel após

a aplicação de $NiSO_4$ 0,1 M e para a retirada do excesso de íons, a coluna foi lavada com H_2O *Milli-Q*.

O material obtido após a lise celular foi aplicado à coluna e esta foi equilibrada com uma solução de fosfato de sódio 0,02 M pH 7,4. Após a passagem do extrato, a proteína foi eluída em um gradiente de Imidazol de 0 a 0,5 M

3.2.18 Cromatografia por exclusão molecular (HPSEC)

O *pool* das amostras obtidas após a primeira etapa de purificação foi concentrado em *Centricon Filter Devices* 3 kDa até atingir aproximadamente o volume de 500 µl. A coluna cromatográfica Superdex 75 10/300 GL utilizada nessa etapa de purificação foi ambientada com tampão bicarbonato de amônio 0,1 M e o fluxo utilizado para eluição da proteína foi de 0,5 mL/min.

3.2.19 Liofilização

Logo após a etapa de purificação por cromatografia de exclusão molecular, a fração correspondente ao pico selecionado foi congelada gradativamente por 90 min a -20 ºC e durante 30 min em freezer -80 ºC. Esse processo de congelamento é muito importante na técnica de liofilização, pois uma vez que a água atinge seu ponto de fusão, ela ainda pode permanecer líquida pelo fenômeno da sobrefusão e esta etapa garante um congelamento total. Após o congelamento a amostra foi colocada no liofilizador, à temperatura de -50 ºC e pressão de 0,1 Torr.

3.2.20 Análises da proteína recombinante

3.2.20.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

A análise da região AP-1 da proteína jun foi realizada por eletroforese das amostras em gel de poliacrilamida SDS-PAGE utilizando gel de separação a 10% ou 15% e o de empilhamento a 4% (LAEMMLI, 1970). Foram analisadas as amostras de cultura bacteriana com e sem ativação por IPTG, lise por sonicação, amostras purificadas em colunas de afinidade e exclusão molecular. As amostras foram aplicadas diretamente no gel e foram preparadas utilizando tampão de amostra, homogeneizadas e aquecidas por 10 min a 95 ºC.

A migração das amostras foi feita em tampão de corrida Tris-Glicina e Tris-Tricina, a 25 mA durante 90 min.

3.2.20.2 Coloração da proteína

Após a eletroforese, os géis foram transferidos para uma cuba contendo solução de *Coomassie Brilliant Blue* R-250 e deixados sob baixa agitação por até 20 min. Para a descoloração dos géis, foi utilizada uma solução descorante. Por ser um método de coloração muito sensível na detecção de proteínas, foi também utilizado o método de coloração com prata.

As proteínas separadas por eletroforese foram fixadas no gel de poliacrilamida com a solução fixadora por 1 hora, o gel foi lavado com H_2O e então corado com sistema de coloração com prata (*Silver Stain Plus*). A parada da reação de coloração foi realizada com ácido acético 5%.

3.2.20.3 *Western Blotting* e *Dot blotting*

Amostras do extrato de bactérias após a indução e lise por sonicação foram analisadas por *western blotting* e *dot blotting*.

Para a análise por *western blotting* as proteínas separadas no SDS-PAGE (descrito no item 3.2.20.1), foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose previamente incubada em tampão de transferência. Utilizou-se o sistema semi-seco de eletrotransferência e a corrente foi fixada de acordo com a área do gel (0,85 mA por cm^2).

Após a transferência a membrana de nitrocelulose foi incubada em PBS acrescido de 5% de leite em pó desnatado por 10 min, sob baixa agitação para a saturação dos sítios de ligação inespecíficas. A membrana foi então incubada com soro contendo anticorpos anti-c-jun diluído em PBS (1:500) e 5% de leite em pó, a 8 ºC durante 16 horas, sob agitação lenta. Após esta incubação, a membrana foi submetida a 5 lavagens consecutivas com PBS + 5% de leite. Em seguida foi incubada com anticorpo secundário conjugado com *horseradish peroxidase* diluído 1:2000 em PBS e 5% de leite em pó durante 3 horas. Ao final a membrana foi novamente lavada com PBS + 5% de leite. A detecção da proteína de interesse foi feita utilizando o sistema de detecção de proteínas por ECL e as membranas foram expostas a filmes radiográficos e revelados.

Para análise por *dot blotting* uma membrana de nitrocelulose foi recortada e lavada com água destilada, após ser completamente seca foi aplicado 3 μL da amostra e incubada em PBS acrescido de 5% de leite em pó desnatado, por 10 min. Após esta etapa, a membrana foi incubada com soro contendo anticorpos

anti-c-jun em PBS e 5% de leite em pó durante 1 hora a 8 ºC. Após esta incubação, a membrana foi submetida a 2 lavagens consecutivas com PBS e 5% de leite por 15 min cada. Em seguida foi incubada com anticorpo secundário conjugado com *horseradish peroxidase* por 30 min. Para detecção da proteína também foi utilizado o sistema de detecção de proteínas por ECL.

3.2.21 Espectrometria de Massas

3.2.21.1 Digestão tríptica da proteína em gel de poliacrilamida

Após a eletroforese o gel foi corado pelo método de prata (item 3. 20.2), e a banda selecionada foi recortada do gel e dividida em pequenos pedaços. Em seguida o gel foi descorado (47,5% de água MilliQ, 50% de metanol e 2,5% de ácido acético). Após esta etapa, o gel contendo a proteína de interesse foi desidratado com a adição de 200 μL de acetonitrila 100% e posteriormente secado em *Speed Vac.*

Após a desidratação foi realizada a redução das pontes de dissulfeto da proteína adicionando 30 μL da solução de ditiotreitol 0,01 M e após a solução redutora ser removida, para evitar a reoxidação do grupamento SH, foi feito uma reação de alquilação adicionando 30 μL de solução iodoacetamida 0,05 M. Após a remoção da solução alquilante, o gel foi lavado com 100 μL de bicarbonato de amônio 0,1 M.

Com a redução e a alquilação da proteína, o gel foi submetido a uma etapa de desidratação feita com a adição de 200 μL de acetonitrila a 100%, seguida de uma etapa de a reidratação com 200 μL de bicarbonato de amônio 0,1 M. Para a clivagem da proteína, foi adicionada de 30 μL a 50 μL de solução de tripsina (20μg/mL) e incubada por 30 min em gelo, após esse período a amostra foi centrifugada e foi adicionado de 5μL a 20μL de bicarbonato de amônio 0,05 M e incubado a temperatura ambiente por 16 horas.

3.2.21.2 Extração dos peptídeos

Após a amostra ser digerida, a extração dos peptídeos do gel foi feita mediante a adição de 10 μL de solução de extração I e incubação de 10 min, após esse período a amostra foi centrifugada e o sobrenadante contendo o produto da clivagem coletado. Para uma nova extração dos peptídeos, foi adicionado 12 μL

de solução de extração II e incubado durante 10 min. A amostra foi centrifugada novamente e o sobrenadante coletado.

Os dois volumes da solução de extração foram combinadas e concentradas em *Speed Vac* por 40 min até o volume ~2 μL

3.2.21.3 Espectrometria de massas Q-Tof MS/MS

Para determinação da massa dos peptídeos obtidos da digestão tríptica (item 3.2.21.1), foi utilizada a espectrometria de massas (Q-Tof MS/MS) e os resultados foram analisados por um programa (MASCOT), que compara o espectro obtido com um banco de dados (NCBI). Os ensaios foram realizados no LNLS (Laboratório Nacional de Luz Sincroton) em um Espectrômetro de Massas acoplado a um sistema de cromatografia líquida (Waters).

4 RESULTADOS

4.1 Obtenção do cDNA

A primeira etapa para a construção do vetor contendo a sequência para a região AP-1 da proteína jun consistiu na amplificação do cDNA a partir do RNA extraído de células de sangue humano de dois doadores (sangue I e II) e de cultura de células PC3. Os resultados das amplificações foram negativos, ou seja, o cDNA não correspondia a região AP-1 do proto-oncogene.

Diante destes resultados iniciais optou-se por amplificar a sequência total do cDNA c-jun, uma vez que é maior e mais específica que a da região AP-1. Os cDNAs utilizados para esta amplificação foram os obtidos a partir de sangue e de células PC3.

A amplificação realizada a partir do cDNA total de células PC3 obteve melhor resultado, quando comparado com as amostras de sangue I, a qual não obteve amplificação, e sangue II o qual foi pouco amplificado. Na Figura 7 pode ser visualizada a banda correspondente ao cDNA para o proto-oncogene c-jun de aproximadamente 1000 pb (3). Nas amostras em que o cDNA de interesse não houve uma boa amplificação podem ser visualizadas a formação de dímeros de *primers* (1 e 2).

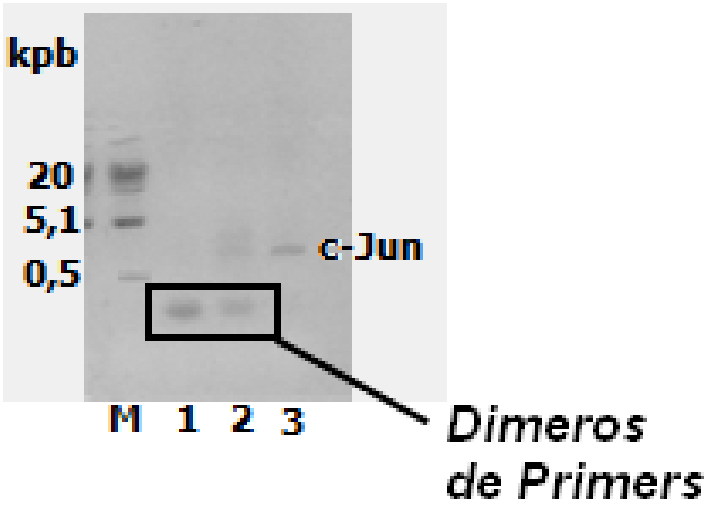


Figura 7: Análise em gel de agarose 1% das amostras obtidas da amplificação do cDNA para a proteína jun: (M) marcador de peso molecular Lambda *EcoRI / HindIII*; (1), sangue I; (2), sangue II; e (3), células PC3.

O cDNA de ~1000 pb foi sequenciado para a confirmação de sua identidade e o resultado do sequenciamento após a análise pelo banco de dados NCBI, a confirmação com a sequência fornecida pelo NCBI, NM_002228.3, pode ser visualizada na Figura 8.

Sequences producing significant alignments:

Select: All None Selected:0

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Synthetic construct DNA, clone: pF1KB5556, Homo sapiens JUN gene for transcription factor AP-1, complete c	1504	1504	95%	0.0	96%	AB385120.1
Synthetic construct Homo sapiens clone IMAGE:100010892; FLH194262.01L; RZPDo839H0469D v-jun sarcoma	1504	1504	95%	0.0	96%	DQ896432.2
Homo sapiens jun proto-oncogene (JUN), mRNA	1504	1504	95%	0.0	96%	NM_002228.3
Homo sapiens jun oncogene, mRNA (cDNA clone IMAGE:3606344)	1504	1504	95%	0.0	96%	BC002646.2
Human DNA sequence from clone RP11-63G10 on chromosome 1p32.1-32.3, complete sequence	1504	1504	95%	0.0	96%	AL136985.11
Homo sapiens v-jun sarcoma virus 17 oncogene homolog (avian) (JUN) gene, complete cds	1504	1504	95%	0.0	96%	AY217548.1

Homo sapiens jun proto-oncogene (JUN), mRNA
Sequence ID: ref|NM_002228.3| Length: 3338 Number of Matches: 1

Range 1: 1083 to 2015 GenBank Graphics Next Match Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1504 bits(814)	0.0	893/933(96%)	26/933(2%)	Plus/Plus

```
Query  13    CTC-ACGCCTCGNNCSTCCCGTCCGAGAGCGGACCTTATGGCTACAGTAACCCCAAGATC  71
             ||| ||||||||  | |||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1083  CTCAACGCCTCGTTCCTCCCGTCCGAGAGCGGACCTTATGGCTACAGTAACCCCAAGATC  1142

Query  72    CTGAMNCAGAGCATGACCCTGAACCTGGGCGACCCAGTGGGGAGCCTGAAGCCGCACCTC  131
             ||||  |||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1143  CTGAAACAGAGCATGACCCTGAACCTGGCCGACCCAGTGGGGAGCCTGAAGCCGCACCTC  1202

Query  132   CGCGCCAAGAACTCGGACCTCCTCACCTCGCCCGACGTGGGGCTGCTCAMGCTGGCGTCS  191
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| |||||||||
Sbjct  1203  CGCGCCAAGAACTCGGACCTCCTCACCTCGCCCGACGTGGGGCTGCTCAAGCTGGCGTCG  1262

Query  192   CCCGAGGTGGAGCGCCTGATAATCCAGTCCAGMAACGGGCACATCACCACCGCCGACC  251
             |||||| |||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1263  CCCGAGCTGGAGCGCCTGATAATCCAGTCCAGCAACGGGCACATCACCACCGCCGACC  1322

Query  252   CCCACCCAGWTCSTGTGCCCCAAGAACGTGACAGATGAGCAGGAGGGCTTCGCCGAGGGC  311
             ||||||||| || ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1323  CCCACCCAGTTCCTGTGCCCCAAGAACGTGACAGATGAGCAGGAGGGCTTCGCCGAGGGC  1382

Query  312   TTCGTGCGCGCCCTGGCCGAACTGCACAGCCAGAACACGCTGCCCAGCGTCACGTCGGCG  371
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1383  TTCGTGCGCGCCCTGGCCGAACTGCACAGCCAGAACACGCTGCCCAGCGTCACGTCGGCG  1442

Query  372   GCGCAGCCGGTCAACGGGGCAGGCATGGTGGCTCCCGCGGTAGCCTCGGTGGCAGGGGGC  431
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1443  GCGCAGCCGGTCAACGGGGCAGGCATGGTGGCTCCCGCGGTAGCCTCGGTGGCAGGGGGC  1502

Query  432   AGCGGCAGCGGCGGCTTCAGCGCCAGCCTGCACAGCGAGCCGCCGGTCTACGCAAACCTC  491
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1503  AGCGGCAGCGGCGGCTTCAGCGCCAGCCTGCACAGCGAGCCGCCGGTCTACGCAAACCTC  1562

Query  492   AGCAACTTCAACCCAGGCGCGCTGAGCAGCGGCGGCGGGGCGCCCTCCTACGGCGCGGCC  551
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1563  AGCAACTTCAACCCAGGCGCGCTGAGCAGCGGCGGCGGGGCGCCCTCCTACGGCGCGGCC  1622

Query  552   GGCCTGGCCTTTCCCGCgcaacccagcagcagcagcagccgccgcaccacctgcccccag  611
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1623  GGCCTGGCCTTTCCCGCGCAACCCCAGCAGCAGCAGCAGCCGCCGCACCACCTGCCCCAG  1682

Query  612   cagatgccccgtgcagcacccgCGGCTGCAGGCCCTGAAGGAGGAGCCTCAGACAGTGCCC  671
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1683  CAGATGCCCCGTGCAGCACCCGCGGCTGCAGGCCCTGAAGGAGGAGCCTCAGACAGTGCCC  1742

Query  672   GAGATGCCCGGCGAGACACCGCCCCTGTCCCCCATCGACATGGAGTCCCAGGAGCGGATC  731
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1743  GAGATGCCCGGCGAGACACCGCCCCTGTCCCCCATCGACATGGAGTCCCAGGAGCGGATC  1802

Query  732   AAGGCGGAGAGGAAGCGCATGAGGAACCGCATCGCTGCCTCCAAGTGCCG-AAAAGGAAG  790
             |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| |||||||||
Sbjct  1803  AAGGCGGAGAGGAAGCGCATGAGGAACCGCATCGCTGCCTCCAAGTGCCGAAAAAGGAAG  1862

Query  791   CTGGAGAGAATCGCCCGGCTG-AG-AAAA-GTGAAA-CCTTGAA-GCTCAGA-CTCG-AG  849
             |||||||||||||||||||| || |||| |||||| |||||||| |||||||| |||| ||
Sbjct  1863  CTGGAGAGAATCGCCCGGCTGGAGGAAAAAGTGAAAACCTTGAAAGCTCAGAACTCGGAG  1922

Query  844   CTG-CGTC-ACGGC-A-CATGCTCAGG-A-CAG-TG-CACAGCT-AAM-AGAA-GTCATG  892
             ||| |||| ||||| | |||||||||| | ||| || ||||||| ||  |||| ||||||
Sbjct  1923  CTGGCGTCCACGGCCAACATGCTCAGGGAACAGGTGGCACAGCTTAAACAGAAAGTCATG  1982

Query  893   A-C-ACG-TAACAGTGGGTGC-A-CTCA-GCTA  919
             | | ||| ||||||||||||| | |||| ||||
Sbjct  1983  AACCACGTTAACAGTGGGTGCCAACTCATGCTA  2015
```

Figura 8: Resultados dos sequenciamento do cDNA para a proteína jun de 1000 pb analisado pelo banco de dados NCBI Blast.

Com a sequência do cDNA confirmada iniciou-se a amplificação da região AP-1 do proto-oncogene. Para a reação de PCR desta amplificação, foram utilizados os oligos Jun II descritos em Materias e Métodos item 3.2.2.

O resultado desta amplificação foi analisada em gel de agarose e está representada na Figura 9. Nesta figura pode ser observado o resultado positivo desta reação de PCR, com a banda de cDNA para região AP-1 do proto-oncogene. Este cDNA foi clivado com as enzimas de restrição *BamHI* e *HindIII*, purificado e quantificado.

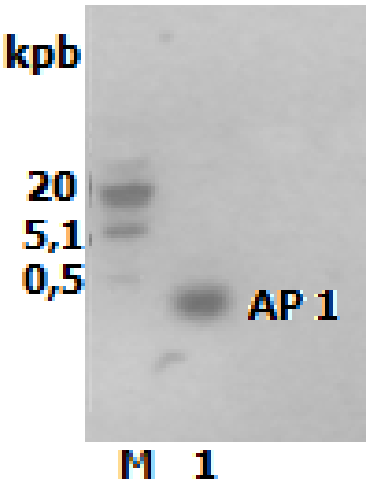


Figura 9: Gel de agarose 1,5% contendo a amostra obtida da reação de PCR para a amplificação da região AP-1: (M), marcador de peso molecular Lambda *EcoRI / HindIII*; (1), amplificação da região AP-1.

4.1.2 Construções dos vetores de expressão bacterianos

Para a expressão da proteína recombinante foram feitas três construções, nas quais foram utilizados os vetores comerciais pET 26b(+), pET 28a-c(+) e o vetor p1813. Estes vetores foram clivados com as mesmas enzimas utilizadas para a clivagem do cDNA, *BamHI* e *HindIII* e em seguida foram desfosforilados. Na Figura 10 pode ser observada a análise em gel de agarose destes vetores, pET 26b(+) e pET 28a-c(+) na forma integra e após clivagem com as enzimas *BamHI* e *HindIII*.

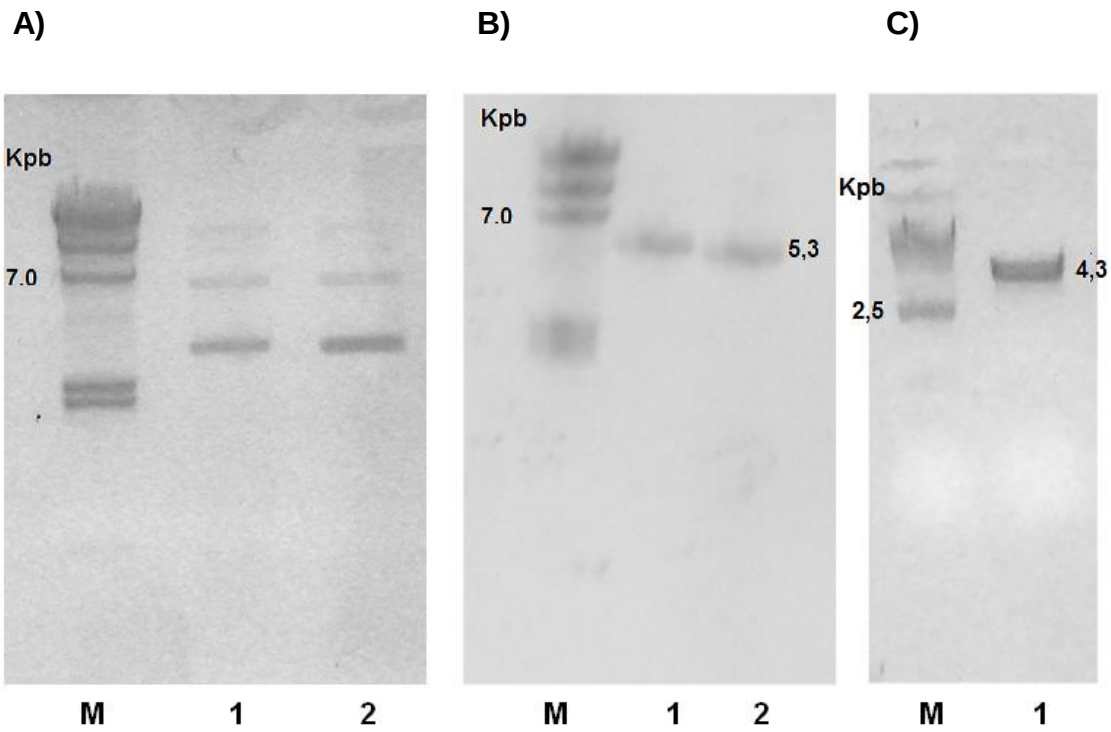


Figura 10: Análise em gel de agarose 1% dos vetores utilizados nas construções para a expressão da proteína AP-1. A) Vetores íntegros: (M) marcador de peso molecular Lambda *EcoRI* / *HindIII,* (1) pET 26b(+), (2) pET 28a-c(+). B) vetores clivados com as enzimas *BamHI* e *HindIII*: (M) marcador de peso molecular lambda *EcoRI* / *HindIII*; (1) pET 26b(+), (2) pET 28a-c(+). C) vetor p1813: (M) marcador de peso molecular; (1) vetor p1813 clivado com as enzimas *BamHI* e *HindIII*.

Após a preparação dos vetores e do cDNA, iniciou-se as reações de ligação do inserto ao vetor de expressão e clonagem em cepa bacteriana. Foram analisadas as colônias resultantes da clonagem com os três vetores utilizando a técnica de extração plasmidial, e com estes plasmídeos foram feitas reações de PCR para os vetores pET 26_AP-1, pET 28_AP-1 e p1813_AP-1.

Os vetores pET 26b(+) e vetor pET 28a-c(+) agora denominados de pET 26_AP-1 e pET 28_AP-1, foram analisados por reações de PCR utilizando os oligonucleotídeos T7 (que hibridizam com o vetor) e posteriormente sequenciados. Na Figura 11 está a análise de 4 colônias, das quais duas foram obtidas do vetor pET 26_AP-1 e duas do pET 28_AP-1. Nesta figura pode-se observar que os cDNAs amplificados com estes oligonucleotídeos produzem um

cDNA de maior número de bases, portanto com uma banda visualizada acima da banda do cDNA de 186 pb da região AP-1 da proteína jun.

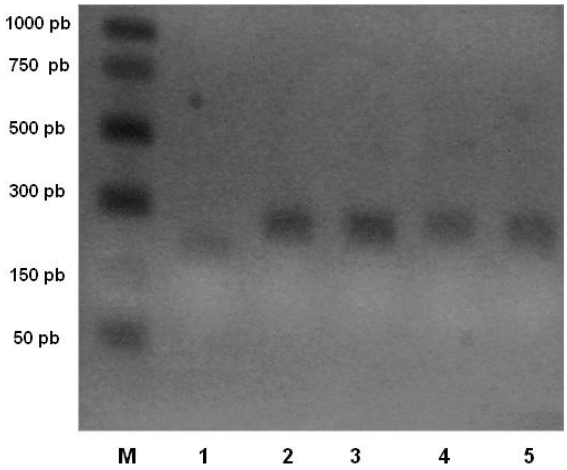


Figura 11: Análise dos clones positivos após reação de PCR utilizando oligonucleotídeos T7: (M) marcador de peso molecular PCR Marker; (1) cDNA para a proteína AP-1 de 186 pb; (2) e (3) amplificação a partir do vetor pET 26_AP-1; (4) e (5) amplificação a partir do vetor pET 28_AP-1.

A análise por reação de PCR dos cDNAs amplificados a partir dos clones transformados com os três vetores, utilizando os oligonucleotídeos Oligo Jun II podem ser visualizados na Figura 12.

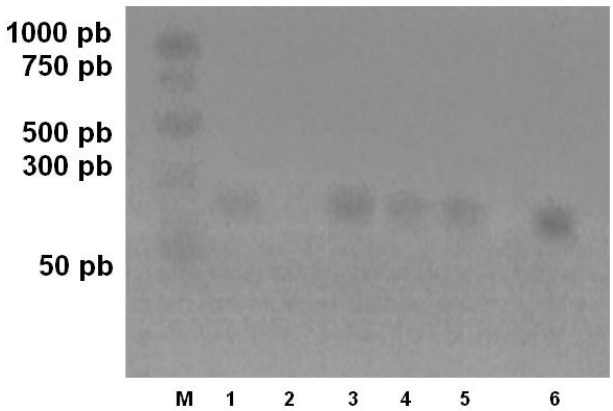
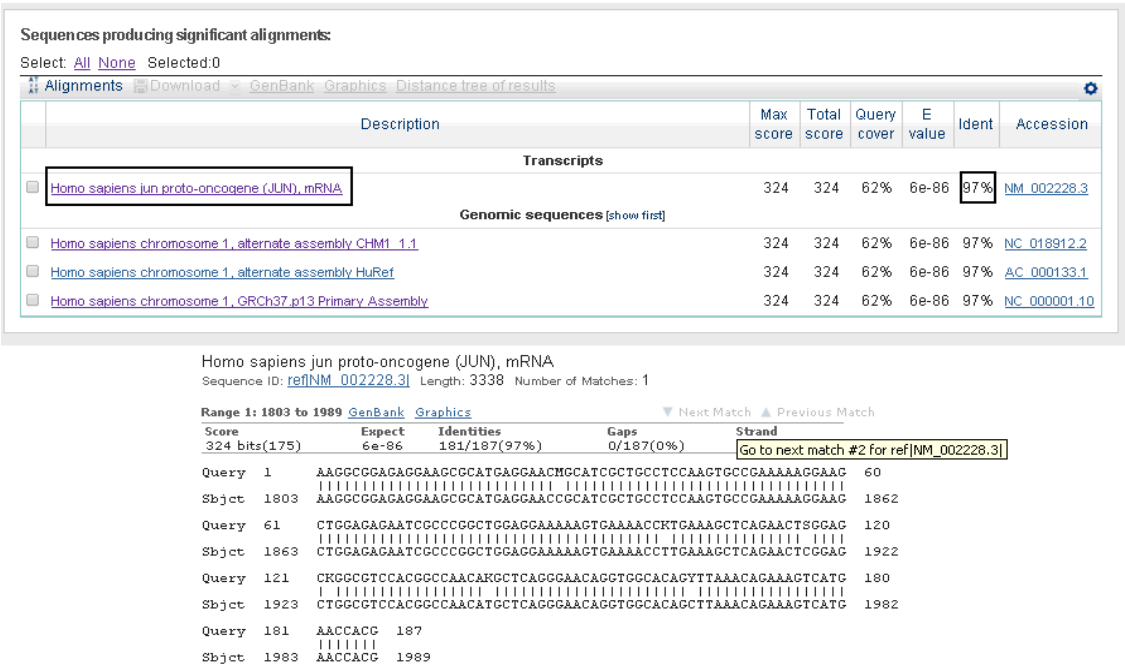


Figura 12: Análise em gel de agarose 1% dos clones obtidos das clonagens com os vetores pET 26_AP-1, pET 28_AP-1 e p1813_AP-1 com *primers* específicos para o cDNA analisado: (M), marcador de peso molecular Lambda *EcoRI/HindIII*; (1), cDNA para a proteína AP-1 de 186 pb controle positivo; (2), controle negativo; (3) e (4), amplificado a partir da clonagem com o vetor pET26_AP-1; (5), amplificado a partir da clonagem com o vetor pET28_AP-1; e (6), amplificado a partir da clonagem com o vetor p1813_AP-1.

Os produtos das PCRs referentes aos clones positivos foram sequenciados e analisados pelo programa *Bioedit*. Foram utilizados Oligonucleotídeos T7 nas construções pET 26_AP-1 e pET 28_AP-1, para análise da correta inserção do inserto no vetor.

As análises dos sequenciamentos obtidos foram realizados pelo programa *GenBank* do *NCBI Blast* (Fig. 13), e foi confirmada uma homologia de 97% com o proto-oncogene c-jun. Nesta figura pode ser observado que algumas bases não foram lidas no sequenciamento com o oligonucleotídeo senso, e para a confirmação correta das bases, foi complementada com o resultado obtido do sequenciamento do anti-senso que confirmou a correta sequência como descritas na literatura.



Sequences producing significant alignments:

Select: All None Selected:0

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Transcripts						
Homo sapiens jun proto-oncogene (JUN), mRNA	324	324	62%	6e-86	97%	NM_002228.3
Genomic sequences [show first]						
Homo sapiens chromosome 1, alternate assembly CHM1_1.1	324	324	62%	6e-86	97%	NC_018912.2
Homo sapiens chromosome 1, alternate assembly HuRef	324	324	62%	6e-86	97%	AC_000133.1
Homo sapiens chromosome 1, GRCh37.p13 Primary Assembly	324	324	62%	6e-86	97%	NC_000001.10

Homo sapiens jun proto-oncogene (JUN), mRNA

Sequence ID: ref|NM_002228.3| Length: 3338 Number of Matches: 1

Range 1: 1803 to 1989 GenBank Graphics ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
324 bits(175)	6e-86	181/187(97%)	0/187(0%)	Go to next match #2 for ref|NM_002228.3|

```
Query  1     AAGGCGGAGAGGAAGCGCATGAGGAACMGCATCGCTGCCTCCAAGTGCCGAAAAAGGAAG  60
             ||||||||||||||||||||||||||| |||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1803  AAGGCGGAGAGGAAGCGCATGAGGAACCGCATCGCTGCCTCCAAGTGCCGAAAAAGGAAG  1862

Query  61    CTGGAGAGAATCGCCCGGCTGGAGGAAAAAGTGAAAACCKTGAAAGCTCAGAACTSGGAG  120
             |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| |||||||||||||||| ||||
Sbjct  1863  CTGGAGAGAATCGCCCGGCTGGAGGAAAAAGTGAAAACCTTGAAAGCTCAGAACTCGGAG  1922

Query  121   CKGGCGTCCACGGCCAACAKGCTCAGGGAACAGGTGGCACAGYTTAAACAGAAAGTCATG  180
             | ||||||||||||||||| |||||||||||||||||||||||| |||||||||||||||||
Sbjct  1923  CTGGCGTCCACGGCCAACATGCTCAGGGAACAGGTGGCACAGCTTAAACAGAAAGTCATG  1982

Query  181   AACCACG  187
             |||||||
Sbjct  1983  AACCACG  1989
```

Figura 13: Análise do sequenciamento do cDNA para a região AP-1 clonada de 186 pb, em comparação com *GenBank* NCBI.

O eletroferograma com os dados de um dos sequenciamentos encontra-se na Figura 14, é possível notar que os picos são agudos e regularmente separados, o que indica alta qualidade do sequenciamento neste trecho.

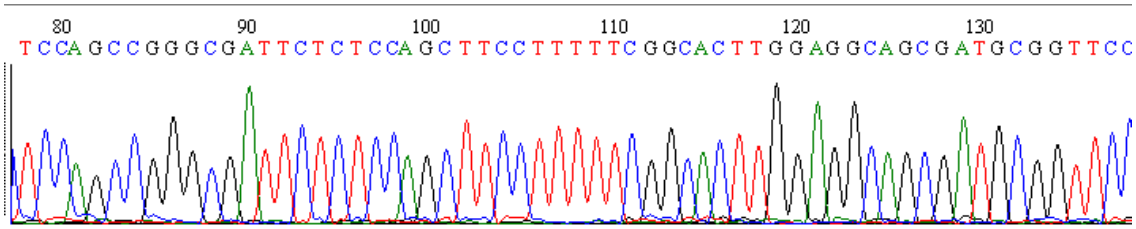


Figura 14: Eletroferograma parcial obtido pelo sequenciamento do cDNA para a região AP-1, utilizando o vetor pET26_AP-1.

Os dados de sequenciamento foram processados com o programa *BioEdit* (Fig. 15), nesta análise as sequências de bases são alinhadas utilizando as ferramentas do software, nas quais foi possível identificar os possíveis aminoácidos correspondentes à sequência e estas foram confirmadas com a sequência fornecida no banco de dados (NCBI: NM_002228.3).

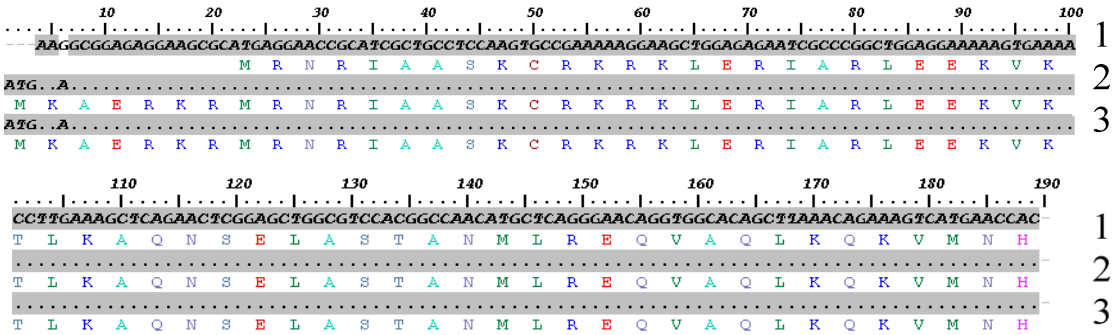


Figura 15: Análise dos resultados obtidos pelo sequenciamento do cDNA amplificado para a proteína AP-1 com o programa *BioEdit* :(1) sequência obtida no NCBI NM_002228.3 ; (2) sequenciamento a partir do oligo jun II *BamHI* ; (3) sequenciamento a partir do oligo jun II *HindIII*.

4.1.3 Expressão da proteína recombinante

A partir da confirmação das construções dos vetores pET-26_AP-1, pET-28_AP-1 e p1813_AP-1, estes foram avaliados quanto à expressão da região AP-1. Para o vetor p1813_AP-1 foram feitos ensaios para avaliar a expressão da proteína recombinante em três clones positivos. Estes ensaios consistiram de dois períodos de ativação: 5h a 37°C e 6h nas temperaturas de 37 ºC, 30 ºC, 25 ºC e 18 ºC; no entanto não foram obtidos resultados promissores.

O outro conjunto de construções para a expressão da proteína de interesse pET-26_AP-1 e pET-28_AP-1, foram avaliados nas mesmas condições de

ativação acima. A condição de 5h de ativação a 37ºC possibilitou uma melhor expressão da proteína.

O vetor pET-26b(+) possibilita a expressão da proteína no periplasma bacteriano devido a incorporação do peptídeo sinal *peIB leader* na extremidade N-terminal da proteína. Foi analisado um clone da construção pET-26_AP-1 quanto à expressão da proteína de interesse, utilizando as condições de ativação citadas anteriormente. Após a expressão a cultura foi centrifugada, o meio removido e o *pellet* ressuspenso, seguido de uma etapa de sonicação e centrifugação.

As amostras de cada uma destas etapas foram analisadas em SDS-PAGE (Fig. 16), nesta figura pode ser visualizada uma banda de aproximadamente 7,5 kDa, tamanho esperado para a proteína de interesse. Também é possível notar que a proteína está em sua forma solúvel uma vez que foi possível visualizar a banda correspondente á proteína na amostra do sobrenadante confirmando assim sua solubilidade.

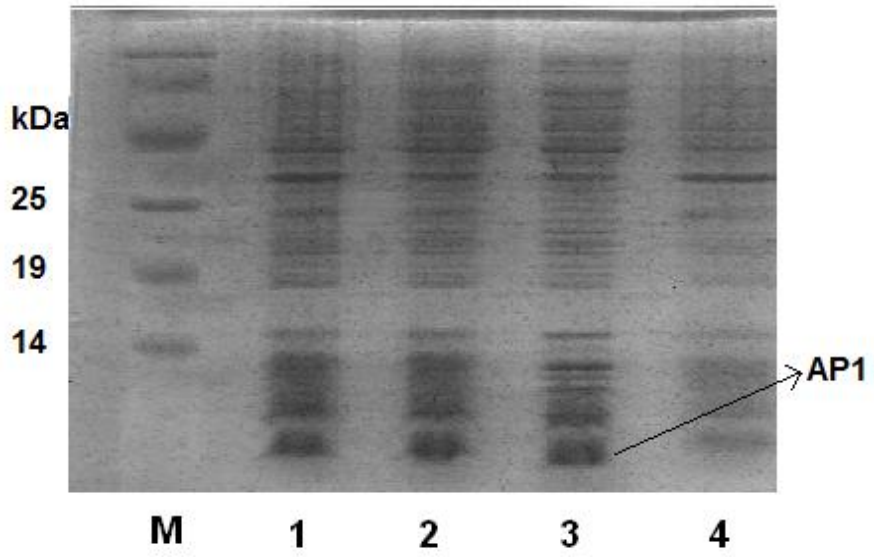


Figura 16: Gel de poliacrilamida 15% com amostras de expressão com vetor pET 26_AP-1: (M) Marcador de peso molecular; (1) clone 1 ativado 5h à 37°C extrato do cru; (2) amostra sonicada; (3) sobrenadante da amostra sonicada; e (4) *pellet* resultante da amostra sonicada e centrifugada.

O vetor pET-28a(+) possui duas sequências de 6 histidinas na região do sítio de policlonagem, uma na extremidade N-terminal e outra na C-terminal. A cauda de poli(histidina) na região C-terminal possui uma sequência que codifica aminoácidos e reconhecido por um anticorpo específico (anti-T7 tag) e uma

sequência de aminoácidos para a enzima trombina, que possibilita a retirada da cauda de poli(histidina). A construção pET-28_AP-1 foi avaliada nas mesmas condições de ativação utilizada para a cultura com o pET-26_AP-1. Na Figura 17 podem ser visualizadas as analise em gel de poliacrilamida das amostras da ativação de três clones ativados com IPTG. As culturas ativadas apresentam um peso molecular um pouco acima do esperado, devido à sequência de poli(histidina) e do sitio de ligação para o anticorpo anti-T7 tag.

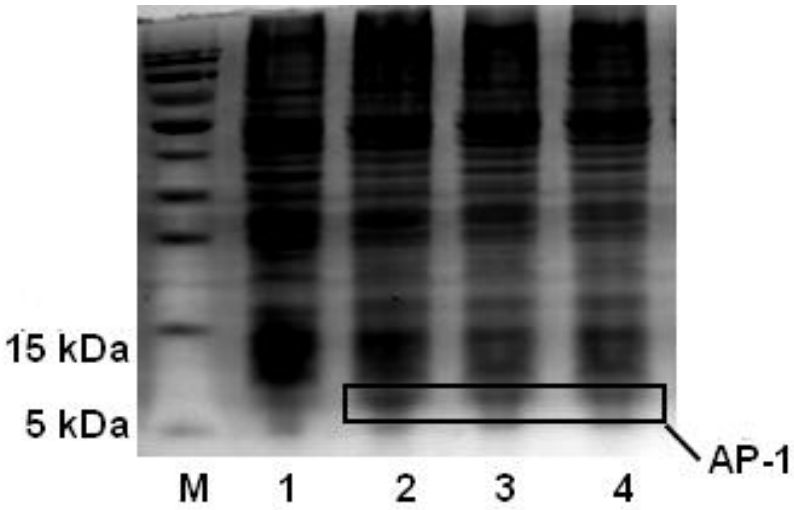


Figura 17: Análise em gel poliacrilamida 15% de amostras da expressão do vetor pET 28_AP-1: (M) Marcador de peso molecular; (1) clone 1 sem ativação com IPTG (controle negativo); (2), (3) e (4) extrato cru dos clones 1, 2 e 3 ativados por 5 h à 37 °C.

A análise da solubilidade da proteína AP-1 obtida a partir da expressão do vetor pET 28_AP-1 e ativado durante 5 h a 37 °C, foi avaliada por SDS-PAGE e está representada na Figura 18. Nesta figura, pode ser observado que a praticamente toda proteína encontra-se no sobrenadante do lisado celular.

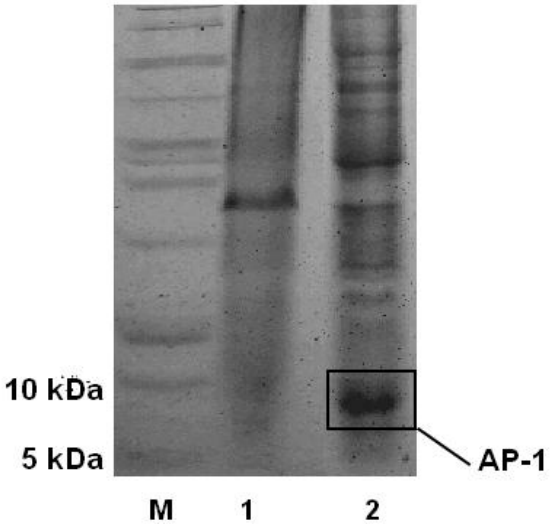


Figura 18: Gel de poliacrilamida 15% com amostras de expressões utilizando o vetor pET 28_AP-1: (M) Marcador de peso molecular; (1) *pellet* resultante da amostra sonicada e centrifugada; (2) sobrenadante da amostra sonicada.

4.1.4 Caracterização imunológica da proteína AP-1

A confirmação da identidade da proteína expressa foi feita por *dot blotting* e *western blotting*. A Figura 19 contém amostras de expressão com o vetor pET28_AP-1 nos clones 1, 2 e 3.

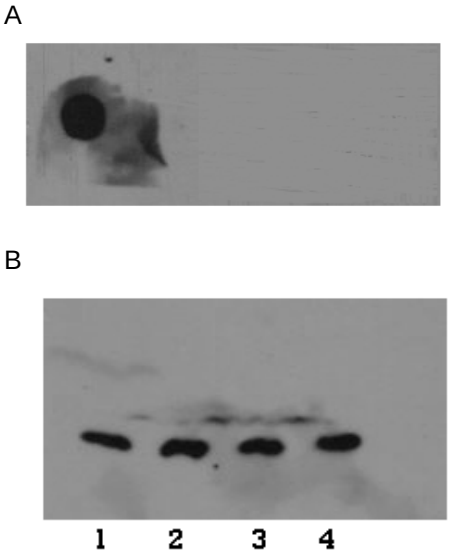


Figura 19: (A) *Dot blotting* contendo amostra da expressão com vetor pET 28 AP_1 clone 3; (B) *western blotting* contendo amostras de expressão com vetor pET 28 AP_1: (1) e (2) extrato cru dos clones 1 e 2; (3) e (4), clone 3.

Quanto à expressão da proteína com o vetor pet26_AP-1, amostras do extrato bacteriano bruto e do sobrenadante da cultura de um dos clones após a

sonicação e centrifugação foram analisadas por *western blotting.* Nesta análise foi confirmada a expressão da proteína neste vetor (Fig. 20).

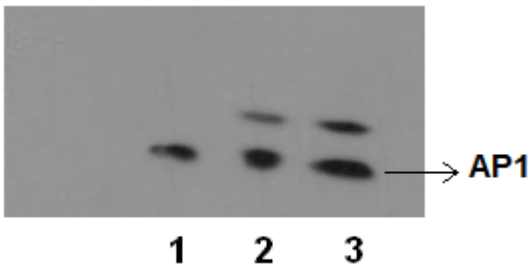


Figura 20: *Western blotting* contendo amostras de expressão com vetor pet26_AP-1: (1) extrato cru de cultura ativada; (2) e (3), sobrenadante da amostra sonicada.

4.1.5 Purificação e Liofilização

Após a confirmação da expressão da proteína AP-1 na forma solúvel em ambos os vetores pETs foram iniciadas as etapas de purificação. A proteína obtida com o vetor pET26_AP-1 no sobrenadante de culturas ativadas (após a sonicação e centrifugação), foi inicialmente aplicada em uma coluna de troca catiônica. Este procedimento não foi eficiente no isolamento da proteína, mesmo após alteração do tampão Fosfato de sódio 0,02 M com pH 7,4 pelos tampões Tri-HCl 0,02 M com pH 7,5 ou Bicine 0,02 M com pH 8,5.

Outra estratégia para purificação da proteína expressa foi a separação em coluna de exclusão molecular (Sephacryl), porém a proteína foi eluída com alguns contaminantes e na forma dimérica. Na tentativa de obter a proteína na forma monomérica, foram feitas purificações com a adição de EDTA (0,01 M pH 8.0) e β-mercaptoetanol (1%) seguido de incubação durante 16 horas, porém não foi obtida a proteína na forma desejada e esta ainda apresentou contaminantes (Fig. 21).

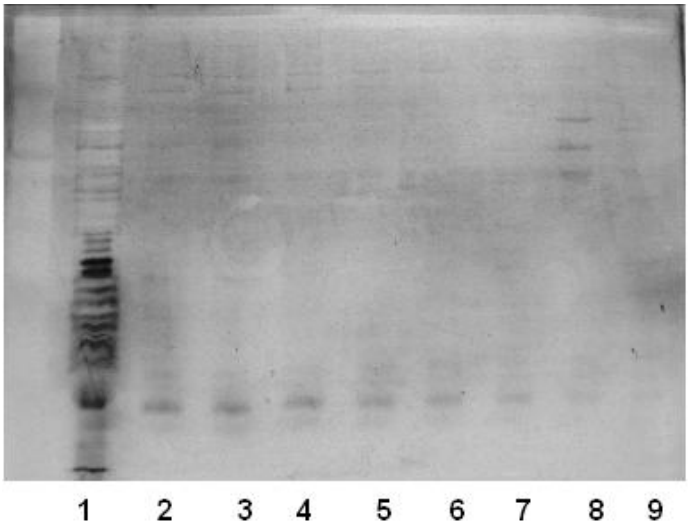


Figura 21: Análise em gel de poliacrilamida 15% com amostras das etapas de purificação em coluna de exclusão molecular: (1) extrato bacteriano; (2) fração 51; (3) fração 52; (4) fração 53; (5) fração 54; (6) fração 55; (7) fração 56; (8) fração 57; (9) fração 58.

Então decidiu-se purificar o produto da ativação de culturas com o vetor pET28_AP-1. Com este vetor a proteína AP-1 é expressa com uma cauda de poli(histidina), o que possibilita a utilização de uma cromatografia por afinidade a íons metálicos. Com esta metodologia a proteína foi eluída com uma porcentagem de imidazol de 23% a 40% e apresentava um pico bem definido, (Fig. 22), (pico 1).

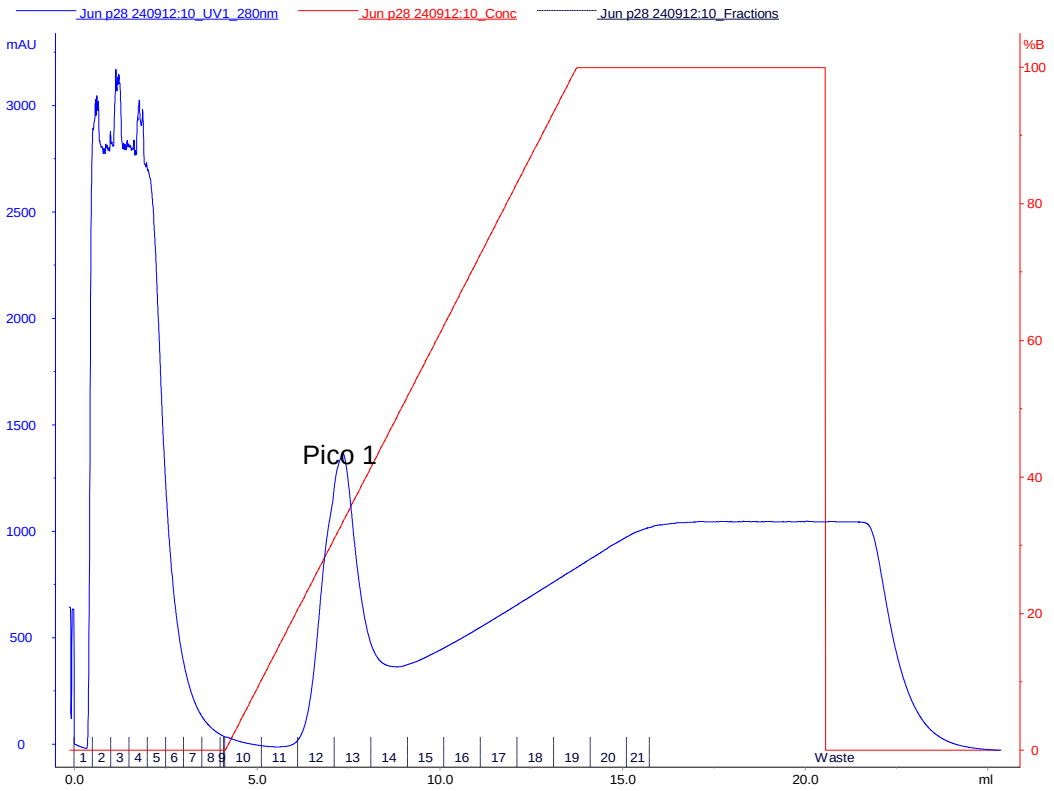


Figura 22: Perfil cromatográfico da amostra expressa a partir do vetor pET28_AP-1 obtido em coluna de afinidade a íons metálico utilizando gradiente de imidazol para eluição da proteína. Leitura em 280 nm representada em azul e em vermelho o gradiente de imidazol de 0% a 100% que corresponde a 1 M.

Embora a eluição da proteína AP-1 tenha produzido um pico bem definido no cromatograma, esta ainda continha algumas proteínas bacterianas. Com o intuito de isolar a proteína de interesse das demais proteínas bacterianas, a fração adsorvida na cromatografia de afinidade foi eluída em uma coluna de exclusão molecular (Superdex 75 10/300, GL), após prévia concentração (Fig. 23).

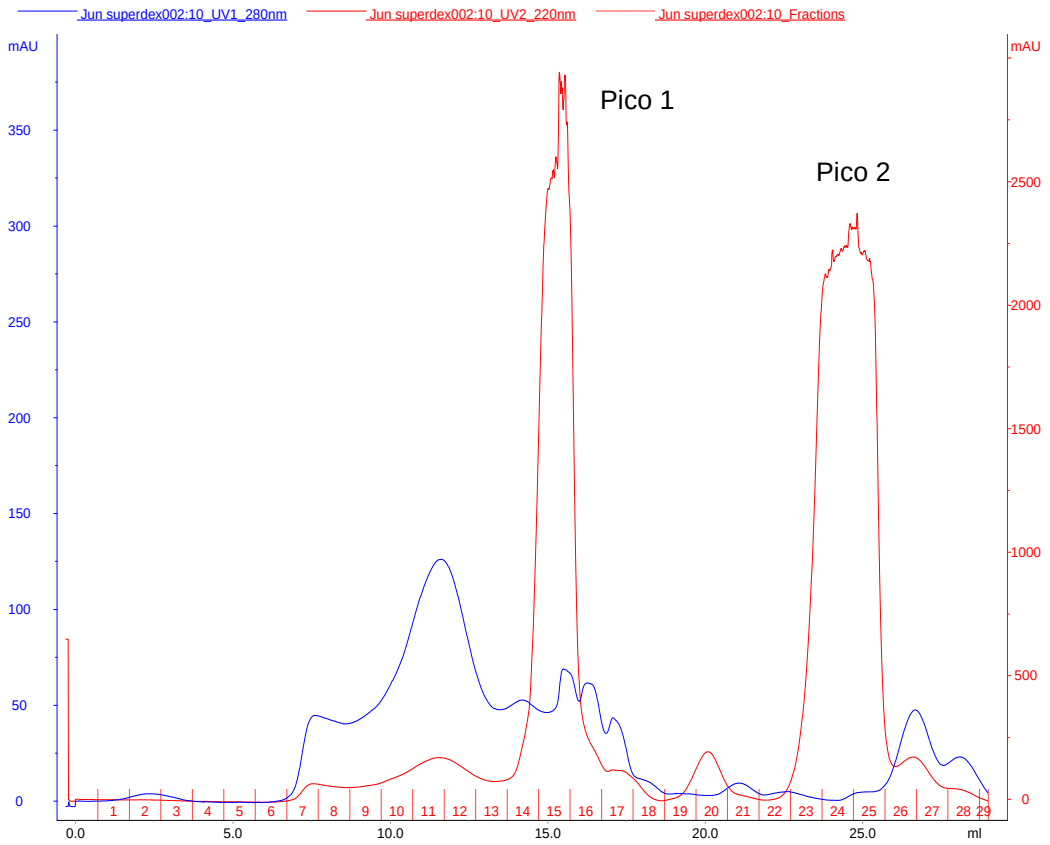


Figura 23: Perfil cromatográfico correspondente à segunda etapa de purificação (cromatografia por exclusão molecular) em tampão carbonato de amônio 0,1 M: Em vermelho representa a leitura de absorbância em 220 nm e em azul a leitura em 280 nm; pico 1 corresponde à proteína jun; pico 2 corresponde ao imidazol.

A cromatografia por exclusão molecular possibilitou a troca do tampão fosfato contendo imidazol pelo tampão carbonato de amônio, uma vez que este composto é extremamente volátil, garantindo assim uma melhor condição da amostra para a etapa de liofilização.

O gel de SDS-PAGE corresponde às amostras do pico 1 (Fig. 22) das frações 12 a 14 em coluna Histrap; as frações 14,15 e 16 da coluna superdex 75 10/300 podem ser visualizadas na Figura 24. Nesta figura também pode ser observada a presença de contaminantes, porém em menor quantidade, quando comparada à fração não adsorvida (*flow-through*), a fração adsorvida perdeu muito dos contaminantes bacterianos e após as etapas de eluição em coluna de exclusão molecular e liofilização; a proteína apresenta-se livre de contaminantes.

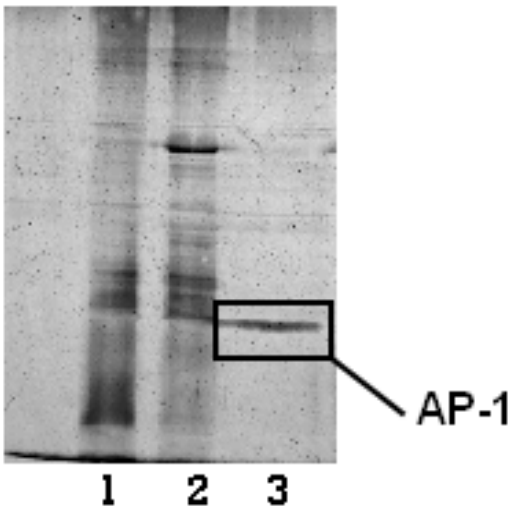


Figura 24: Análise em gel de poliacrilamida 10% com amostras das etapas de purificação da proteína AP-1 em coluna de afinidade por metais: (1) amostra da fração não adsorvida (*flow-through*); (2), amostra do *pool* das frações correspondentes a 12 à 14; (3) amostra eluída e em coluna de exclusão molecular seguida de liofilização.

Para melhor interpretação dos picos 1 e 2 obtidos no cromatograma representado na Figura 23, foi realizada uma cromatografia utilizando imidazol 0,4 M, para observar o perfil cromatográfico deste composto e o tempo de retenção nesta coluna. Após a análise cromatográfica foi observado que o pico 2 da Figura 23 correspondia à eluição do imidazol (Fig. 25).

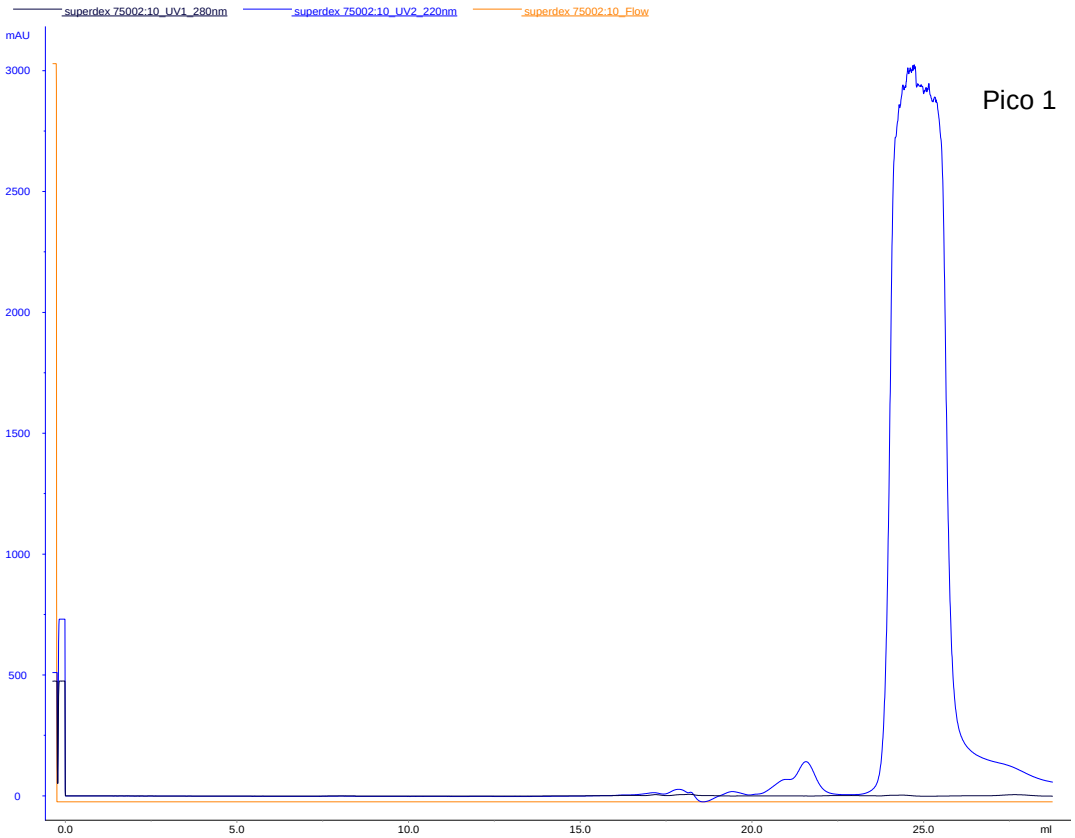


Figura 25: Perfil cromatográfico correspondente à aplicação de imidazol 0,4M em coluna de exclusão molecular Superdex 75 10/30 GL em tampão carbonato de amônio 0,1 M na fase móvel da coluna: pico 1 imidazol 0,4 M, em leitura de absorbância em 220 nm.

Para analisar o tempo de retenção correto da proteína eluída, padrões de pesos molecular aproximados foram analisados nas mesmas condições (tempo e fluxo) utilizadas para a proteína de interesse. Na Figura 26 pode-se observar que a lisozima (pico 2), que possui massa molecular de 14 kDa, encontra-se nas frações 14 à 16, região esperada para a proteína AP-1 de ~10 kDa, quando expressa com a sequência de (poli)histidinas.

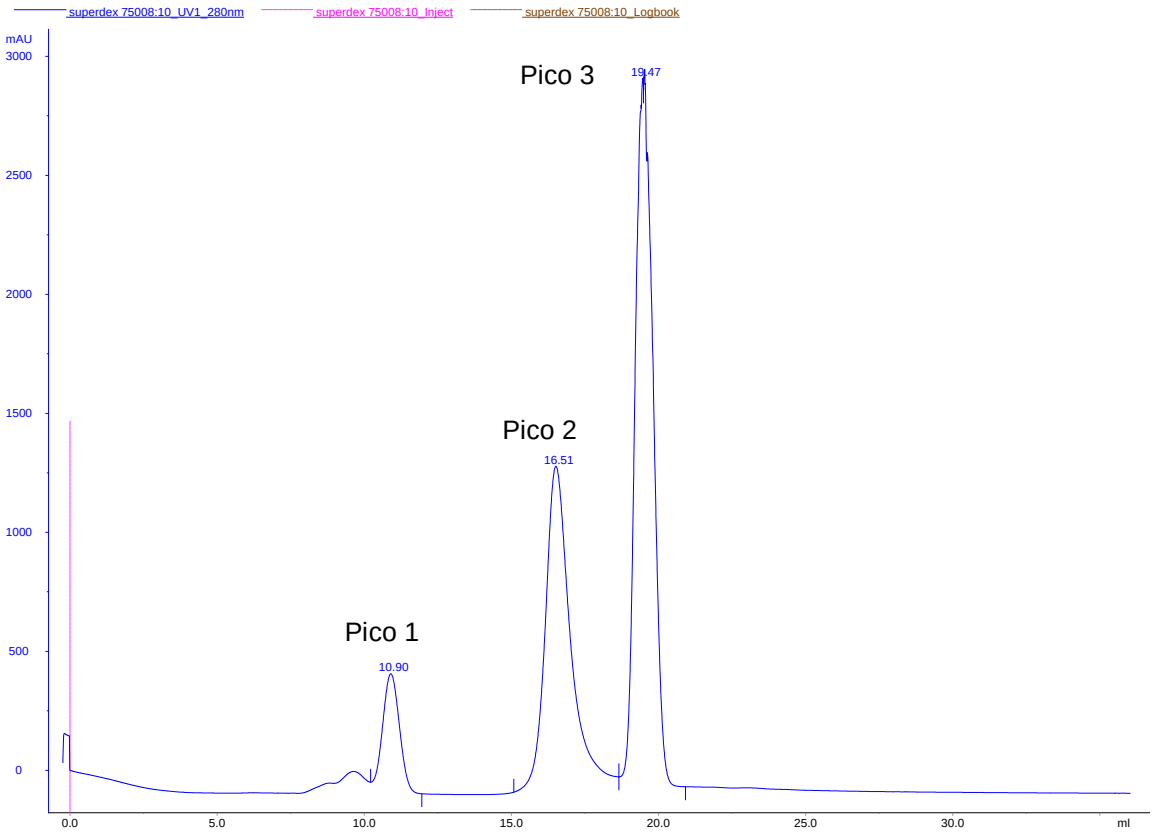


Figura 26: Perfil cromatográfico correspondente a separação de padrões de peso molecular em coluna de exclusão molecular Superdex 75 10/300 Gl e tampão carbonato de amônio 0,1 M. pico 1 corresponde a ovoalbumina (44 kDa); pico 2 corresponde a lisozima (14,3 kDa); pico 3 corresponde acetona.

Como uma segunda caracterização da proteína AP-1 purificada, foi realizada uma análise por espectrometria de massas da amostra e visualizada por SDS-PAGE. A banda correspondente à proteína foi recortada do gel, digerida com a enzima tripsina e analisada quanto à sua massa e composição de aminoácidos (Fig. 27).

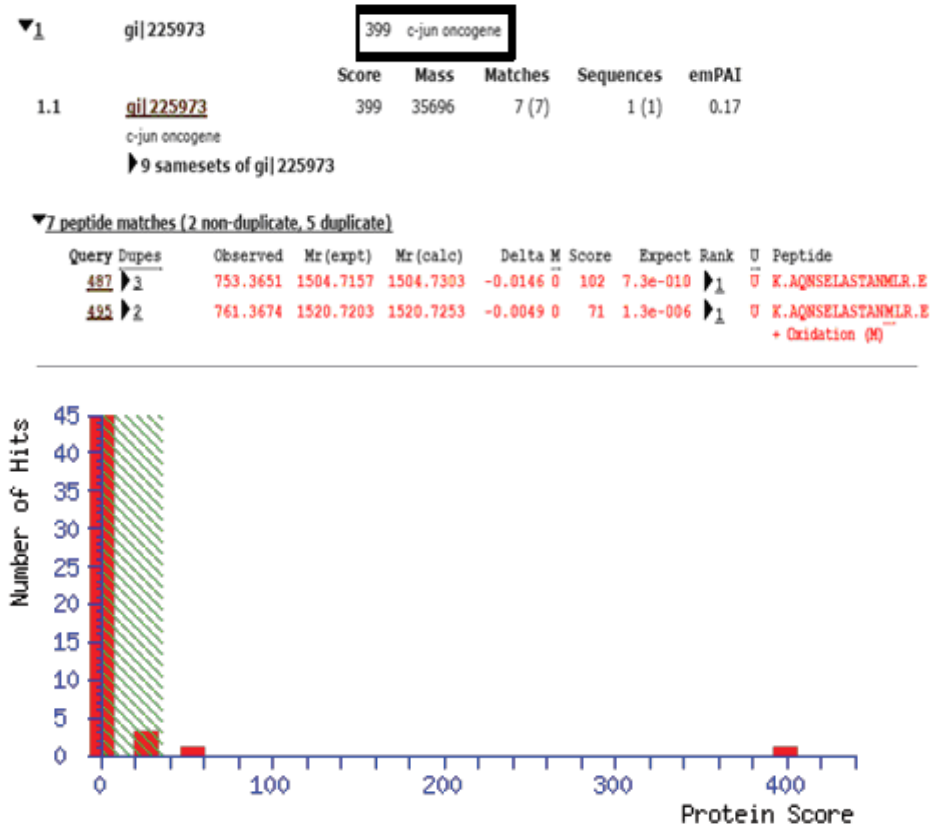


Figura 27: Resultado apresentado pelo programa MASCOT da análise da proteína AP-1, digerida com a enzima tripsina feita por espectrometria de massas.

Na sequência de aminoácidos da proteína são encontrados 15 sítios de clivagem, dos quais 8 possuem 100% de chances de clivagem (Fig. 28), a digestão tríptica da proteína produz uma série de clivagens gerando vários peptídeos. Os dados obtidos após análise por espectrometria de massas foram analisados pelo programa MASCOT, que identificou entre os fragmentos um que possuía homologia com a oncoproteína jun, região AP-1 confirmando sua identidade.

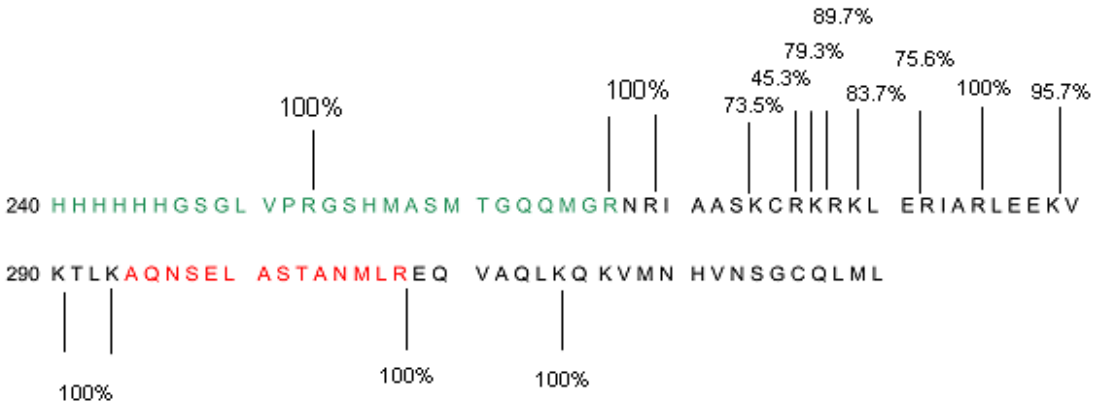


Figura 28: Representação esquemática dos segmentos de peptídeos clivados pela enzima tripsina na proteína AP-1: em verde região contendo a sequência de poli(histidina) e sito de ligação para anti-corpo t7 tag; em preto sequência da região AP-1 da proteína jun; e em vermelho região de grande homologia analisada por espectrometria de massa.

5 DISCUSSÃO

As células respondem a estímulos do meio ambiente como o calor, variações de pH, radiação, osmolaridade e a estímulos químicos como fatores de crescimento, citosinas, hormônios, alterações nas condições nutricionais entre outros, com o objetivo de manter sua sobrevivência. Estes estímulos controlam muito dos complexos processos celulares, incluindo a regulação da expressão gênica, sobrevivência celular, crescimento, diferenciação e morte; por meio de reações em cascatas no interior da célula estimulada. Dentre muitas das proteínas que fazem parte destas cascatas, estão aquelas que em determinadas situações sofrem alterações em sua expressão, determinando um padrão diferenciado do comportamento celular, que pode resultar no crescimento celular desordenado (CUI et al., 2007).

A oncoproteína jun faz parte deste grupo de proteínas, e quando há uma expressão descontrolada, possibilita o surgimento de tumores e metástases. Esta ação oncótica é resultado de sua dimerização com oncoproteínas através de uma sequência de leucinas, que torna esta região da proteína um foco interessante de estudo. A região de leucinas, denominada de zíper de leucinas é comum em muitas proteínas ativadoras de genes importantes no desenvolvimento celular, e é conservada na evolução desde os metazoários (CUI et al., 2007; REINKE et al., 2013).

Estudos da interação desta região de leucinas entre a proteína jun com proteínas de sua própria família ou com a família Fos já foram descritos, porém não há relatos na literatura do estudo de um inibidor que impeça essa dimerização, bloqueando assim sua ação oncótica (HALAZONETIS et al., 1988; JOHN et al., 1996; AMOUTZIAS et al., 2007).

Uma das proteínas estudadas em nosso laboratório tem entre suas ações impedir a dimerização da oncoproteína jun, inibindo assim a progressão da divisão celular em tecidos tumorigênicos. É uma proteína de origem ribossomal denominada L10 (RPL10) e teve adicionada ao seu conjunto de ações a supressão do desenvolvimento de certos tumores de estômago e próstata (MEIRELES et al., 2003; ALTINOK et al., 2006), ou a parada da divisão celular em células do ovário levando a falência ovariana prematura (MASSAD-COSTA et al., 2007).

Um estudo de interação desta região de leucinas da proteína jun com a proteína RPL10 têm uma abordagem interessante para a literatura especializada, visando entender a atividade na ativação e na inibição dos fatores de crescimento celular.

Neste sentido, este trabalho objetivou expressar a região da sequência de leucinas da proteína jun humana, como um primeiro passo, para posteriores estudos de ligação com a proteína RPL10.

A amplificação do cDNA para a região AP-1 a partir do RNA total extraído de células humanas não obteve resultados satisfatórios e pode estar relacionado à grande quantidade de proteínas que possuem esta região em comum, como por exemplo as proteínas Fos e ATF2. Uma vez que o genoma humano possui aproximadamente 53 regiões desta sequência, sua amplificação torna-se inespecífica (GRIGORYAN; KEATING, 2005).

Para garantir a amplificação da sequência AP-1 da oncoproteína jun, foi amplificada a sequência total do cDNA para a proteína jun. Os melhores resultados da amplificação do cDNA foram obtidos de células PC3. Originária de câncer de próstata, esta linhagem celular está relacionada com o desenvolvimento do carcinoma, uma vez que possui grandes quantidades do cDNA para a proteína jun (OUYANG et al., 2008). Com esta metodologia, a amplificação da sequência de bases para a região AP-1 foi obtida e confirmada por sequenciamento.

A clonagem do cDNA para a proteína AP-1 utilizando três vetores de expressão distintos, teve como objetivo aumentar as chances de expressão da proteína de interesse. Embora os vetores construídos para a expressão de proteínas recombinantes sejam otimizados para uma alta expressão, a produção depende de fatores intrínsecos do cDNA e dos aminoácidos que compõem a proteína que será expressa, como exemplo a presença de códons raros (AGG/AGA, AUA, CUA, CGA e CCC) que são encontrados com baixas frequências em *E.coli*, a presença destes códons geralmente leva à redução na expressão da proteína codificada (MAKRIDES, 1996; SORENSEN; MORTENSEN, 2005).

O vetor p1813 possui um promotor forte (*tac*) que possibilita altas expressões da proteína recombinante quando comparada aos vetores da série pETs. (GRAHAM et al., 1995). Este vetor resultou em uma alta expressão de

prolactina humana e hRPL10, porém apesar deste histórico de altas expressões, este fato não se repetiu com a proteína jun. Utilizando a construção, p1813_AP-1, a proteína de interesse não foi expressa em quantidades detectáveis nem com o emprego da coloração por prata e detecção por *western blotting* (AFFONSO, 2000; PEREIRA, 2009).

As outras duas construções utilizaram vetores pET (Novagen), indicados para altas expressões de proteína recombinante. A inserção do cDNA para a proteína AP-1 no vetor pET 26b(+), possibilitou a expressão da proteína AP-1 sem a sequência de (poli)histidinas, porém as tentativas de purificação utilizando a troca catiônica e a cromatografia de exclusão molecular, não foram eficientes na separação desta proteína. Uma possível explicação para este fato, no caso da cromatografia de troca catiônica, seria a alta quantidade de contaminantes em relação ao tamanho e concentração da proteína AP-1 na amostra. Quanto às tentativas de purificação na cromatografia de exclusão molecular, foi observado que foi eluída também proteínas de alto peso molecular, de acordo com a dimerização visualizada em *western blotting* (Fig. 20). A utilização de inibidores de proteases, como EDTA e PMSF, garantiram de certa forma que a proteína de interesse não sofresse degradação, porém a ação do reagente β-mercaptoetanol na dissociação dos dímeros não foi eficiente.

Com o intuito de obter uma amostra mais limpa de contaminantes bacterianos, a proteína AP-1 expressa pelo vetor pET26_AP-1 foi extraída utilizando a técnica de choque osmótico. Esta técnica possui um protocolo simples e é aplicada com sucesso para a extração do hormônio de crescimento (OLIVEIRA, 1999), porém os experimentos de choque osmótico para a proteína AP-1 não produziram resultados satisfatórios. Utilizando esta mesma metodologia, também não foi eficiente a extração da proteína recombinante hRPL10 (25,4 kDa e pI 10,5), que possui ponto isoelétrico semelhante à da AP-1 (PEREIRA, 2009).

O vetor pET 28a-c(+), possibilita a expressão da proteína recombinante com uma sequência de (poli)histidina, a qual pode facilitar a purificação. A proteína AP-1 expressa neste vetor e amostras do extrato cru bacteriano ativado contendo a proteína de interesse expressa, foram analisadas quanto ao peso e à solubilidade (Fig. 17 e Fig. 18). Estas análises dos resultados mostraram que a proteína com peso molecular ~10 kDa estava de acordo com o peso e

solubilidade esperada. Diferentemente da proteína obtida pelo vetor pET26_AP-1, não foram visualizados dímeros nas análise por *western blotting* (Fig. 19).

Após a primeira etapa de purificação utilizando a coluna Histrap, houve uma grande recuperação da proteína AP-1 e baixa quantidade de contaminantes quando visto na Figura 24.

Para a etapa final de isolamento da proteína AP-1, foi utilizada a cromatografia de exclusão molecular, que possibilitou uma eficiente purificação da proteína e também a troca do tampão fosfato de sódio por carbonato de amônio, uma vez que o tampão carbonato de amônio quando liofilizado elimina os resíduos de sais, possibilitando a ressuspensão da proteína em concentrações adequadas para as análises por o dicroísmo circular. (SHARON; THOMAS; NICHOLAS, 2005).

A amostra purificada por esta metodologia apresentou um excelente grau de pureza que pode ser comprovado pela visualização apenas da banda da proteína de interesse na análise por SDS-PAGE (Fig. 24) Este gel foi corado por prata, um método mais sensível para coloração de proteínas.

Foram realizadas leituras dos perfis das cromatografias de exclusão molecular em 220 nm e 280 nm. Quando observados os cromatogramas em 280 nm, são visualizados picos com leituras baixas (Fig. 23), e o mesmo cromatograma em 220 nm, permitiu definir a região de eluição da proteína de interesse, uma vez que podem ser visualizados dois picos em posições distintas (Fig. 23, Pico 1), com uma leitura acima de 2.500 mAU. A leitura em 220 nm foi mais eficiente, e pode ser em razão deste comprimento de onda ser mais adequado à detecção de ligações peptídicas (KELLY; JESS; PRINCE, 2005), e também porque esta região da proteína jun, não possui aminoácidos que emitam fluorescência em 280 nm.

A quantidade de proteína expressa foi estimada visualmente em gel corado por prata. Não foi possível quantificar utilizando a coloração com *Coomassie blue,* uma vez que a proteína não foi detectada algumas vezes em razão das baixas quantidades, e a coloração por prata não ter sido reprodutível. Desta forma não foi possível quantificar com o auxílio do programa *ImageJ*, que necessita de reprodutibilidade das amostras detectadas em géis de SDS-PAGE.

Foi realizada a quantificação por absorbância em 220 nm, e mediante os valores obtidos desta leitura, foi estimada a quantidade de proteína utilizada nas

análises por dicroismo circular. Infelizmente esta forma de quantificação também não foi eficiente, pois a proteína não foi detectada com esta análise.

As análises da proteína por espectrometria de massas geraram valores de *score* que sugerem a possibilidade da proteína encontrada não ser um evento randômico. Na Figura 27, tudo que se encontra além da linha tracejada verde representa alta significância, portanto confirmando sua identidade.

Devido à grande quantidade de sítios de clivagens para a enzima tripsina na sequência de aminoácidos que compõe a região AP-1, muitos peptídeos são formados e a identidade da proteína é confirmada mediante a análise da homologia dos fragmentos pelo banco de dados. Os resultados obtidos pela análise por espectrometria de massas aliada aos ensaios de *western blotting* confirmam a expressão e a purificação da região AP-1 da oncoproteína jun neste trabalho.

6 CONCLUSÕES

A identidade da proteína isolada foi confirmada por análises de *western blotting, dot blotting* e também por análise por espectrometria de massas, mostrando assim que a proteína expressa era realmente a região AP-1 da oncoproteína jun.

Para amplificação da região AP-1, foram necessárias duas etapas, uma vez que a amplificação utilizando somente oligos para a região 186 pb, não possibilitou resultados significativos.

A amplificação do cDNA a partir de células PC3 produziu o melhor resultado, por possuir uma alta concentração deste cDNA.

Foram utilizados três vetores distintos para diferentes tipos de expressão, dos quais apenas os vetores pET 26_AP-1 e o pET 28_AP-1 possibilitaram a expressão da proteína recombinante.

A expressão da região AP-1 fusionada à cauda de poli(histidina) pelo vetor pET 28_AP-1, foi a que possibilitou a obtenção da proteína em sua forma monomérica.

A estratégia de purificação mais eficiente foi a que utilizou primeiramente a coluna por afinidade a íons metálicos e, após concentração da amostra, a coluna de exclusão molecular permitiu o isolamento praticamente total da proteína expressa em vetor pET 28_AP-1.

A purificação da proteína expressa em vetor pET 26_AP-1 utilizando a técnica cromatográfica de troca catiônica e exclusão molecular não se mostrou eficiente, provavelmente pela dimerização da proteína.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFFONSO, R. **Estudo da expressão citoplásmica bacteriana de uma forma de prolactina humana e de sua solubilização e renaturação a partir de corpos de inclusão**. 2000. Tese (Doutorado) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares. São Paulo.

ALTINOK, G.; POWELL, I. J.; CHE, M.; HORMONT, K.; SARKAR, F. H.; SAKR, W. A.; GRIGNON, D.LIAO, D. J. Reduction of qm protein expression correlates with tumor grade in prostatic adenocarcinoma. ***Prostate Cancer Prostatic Dis.*** v. 9, n. 1, p. 77-82, 2006.

AMOUTZIAS, G. D.; VERON, A. S.; WEINER, J., 3RD; ROBINSON-RECHAVI, M.; BORNBERG-BAUER, E.; OLIVER, S. G.ROBERTSON, D. L. One billion years of bzip transcription factor evolution: Conservation and change in dimerization and DNA-binding site specificity. ***Mol. Biol. Evol.*** v. 24, n. 3, p. 827-835, 2007.

ANGEL, P.KARIN, M. The role of jun, fos and the ap-1 complex in cell-proliferation and transformation. ***Biochim Biophys Acta.*** v. 1072, n. 2-3, p. 129-157, 1991.

BOHM, G.; MUHR, R.JAENICKE, R. Quantitative analysis of protein far uv circular dichroism spectra by neural networks. ***Protein Eng.*** v. 5, n. 3, p. 191-195, 1992.

BOHMANN, D.; BOS, T. J.; ADMON, A.; NISHIMURA, T.; VOGT, P. K.TJIAN, R. Human proto-oncogene c-jun encodes a DNA binding protein with structural and functional properties of transcription factor ap-1. ***Science.*** v. 238, n. 4832, p. 1386-1392, 1987.

BROWN, J. R.THORNTON, J. L. Percivall pott (1714-1788) and chimney sweepers' cancer of the scrotum. ***Br. J. Ind. Med.*** v. 14, n. 1, p. 68-70, 1957.

CLARK, E. D. Protein refolding for industrial processes. ***Curr. Opin. Biotechnol.*** v. 12, n. 2, p. 202-207, 2001.

CARVALHO, C. V.; RICCI, G.; AFFONSO, R. **Guia de práticas em biologia molecular**. 1. ed. São Paulo, S.P.: Yendis. 2010.

COOPER, G.M. **The Cell**: molecular approach. 2.ed. Sunderland, MA.: Sinauer associates, 2000.

COOPER, G.M. **Oncogenes**. 2.ed. Sudbury, M.A.: Jones and Bartlett Publishers, 1995.

CUI, J.; ZHANG, M.; ZHANG, Y. Q.XU, Z. H. Jnk pathway: Diseases and therapeutic potential. ***Acta Pharmacol Sin.*** v. 28, n. 5, p. 601-608, 2007.

DOWDY, S. F.; LAI, K. M.; WEISSMAN, B. E.; MATSUI, Y.; HOGAN, B. L.STANBRIDGE, E. J. The isolation and characterization of a novel cdna demonstrating an altered mrna level in nontumorigenic wilms' microcell hybrid cells. ***Nucleic Acids Res.*** v. 19, n. 20, p. 5763-5769, 1991.

FUTREAL, P. A.; COIN, L.; MARSHALL, M.; DOWN, T.; HUBBARD, T.; WOOSTER, R.; RAHMAN, N.STRATTON, M. R. A census of human cancer genes. ***Nat. Rev. Cancer.*** v. 4, n. 3, p. 177-183, 2004.

GLOVER, J. N.HARRISON, S. C. Crystal structure of the heterodimeric bzip transcription factor c-fos-c-jun bound to DNA. ***Nature.*** v. 373, n. 6511, p. 257-261, 1995.

GRAHAM, R. W.; GREENWOOD, J. M.; WARREN, R. A.; KILBURN, D. G.TRIMBUR, D. E. The ptuga and ptugas vectors for high-level expression of cloned genes in escherichia coli. ***Gene.*** v. 158, n. 1, p. 51-54, 1995.

GRIGORYAN, G.KEATING, A. E. Structure-based prediction of bzip partnering specificity. ***J. Mol. Biol.*** v. 355, n. 5, p. 1125-1142, 2006.

HALAZONETIS, T. D.; GEORGOPOULOS, K.; GREENBERG, M. E.LEDER, P. C-jun dimerizes with itself and with c-fos, forming complexes of different DNA binding affinities. ***Cell.*** v. 55, n. 5, p. 917-924, 1988.

IMAFUKU, I.; MASAKI, T.; WARAGAI, M.; TAKEUCHI, S.; KAWABATA, M.; HIRAI, S.; OHNO, S.; NEE, L. E.; LIPPA, C. F.; KANAZAWA, I.; IMAGAWA, M.OKAZAWA, H. Presenilin 1 suppresses the function of c-jun homodimers via interaction with qm/jif-1. ***J. Cell. Biol.*** v. 147, n. 1, p. 121-134, 1999.

JOHN, M.; LEPPIK, R.; BUSCH, S. J.; GRANGER-SCHNARR, M.SCHNARR, M. DNA binding of jun and fos bzip domains: Homodimers and heterodimers induce a DNA conformational change in solution. ***Nucleic Acids Res.*** v. 24, n. 22, p. 4487-4494, 1996.

KELLY, S. M.; JESS, T. J.PRICE, N. C. How to study proteins by circular dichroism. ***Biochim Biophys Acta.*** v. 1751, n. 2, p. 119-139, 2005.

KUMAR, V.; ABBAS, A.K.; ASTER, J.C. **Robbins**: Patologia básica. 9.ed. Rio de Janeiro, R.J.: Elsevier, 2013.

KURIEN, B. T.SCOFIELD, R. H. Western blotting. ***Methods.*** v. 38, n. 4, p. 283-293, 2006.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage t4. ***Nature.*** v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.

LODISH, H.; BERK, A.; ZIPURSKY, S.L. **Molecular Cell Biology**. 2.ed.. New York: N.Y.: W. H. Freeman and Company, 2000.

LUCK, D. N.; GOUT, P. W.; BEER, C. T.SMITH, M. Bioactive recombinant methionyl bovine prolactin: Structure-function studies using site-specific mutagenesis. ***Mol. Endocrinol.*** v. 3, n. 5, p. 822-831, 1989.

MAKRIDES, S. C. Strategies for achieving high-level expression of genes in escherichia coli. ***Microbiol Rev.*** v. 60, n. 3, p. 512-538, 1996.

MALZYNER, A.; CAPONERO, R. **Câncer e Prevenção**. 1 ed. São Paulo, S.P .: MG Editores, 2013.

MASSAD-COSTA, A. M.; DA SILVA, I. D.; AFFONSO, R.; SOARES, J. M., JR.; NUNES, M. G.; DE LIMA, G. R.BARACAT, E. C. Gene analysis in patients with premature ovarian failure or gonadal dysgenesis: A preliminary study. ***Maturitas.*** v. 57, n. 4, p. 399-404, 2007.

MATTHEWS, C. P.; COLBURN, N. H.YOUNG, M. R. Ap-1 a target for cancer prevention. ***Curr. Cancer Drug Targets.*** v. 7, n. 4, p. 317-324, 2007.

MEIRELES, S. I.; CARVALHO, A. F.; HIRATA, R.; MONTAGNINI, A. L.; MARTINS, W. K.; RUNZA, F. B.; STOLF, B. S.; TERMINI, L.; NETO, C. E. M.; SILVA, R. L. A.; SOARES, F. A.; NEVES, E. J.REIS, L. F. L. Differentially expressed genes in gastric tumors identified by cdna array. ***Cancer Letters.*** v. 190, n. 2, p. 199-211, 2003.

MILDE-LANGOSCH, K. The fos family of transcription factors and their role in tumourigenesis. ***Eur. J. Cancer.*** v. 41, n. 16, p. 2449-2461, 2005.

MONTECLARO, F. S.VOGT, P. K. A jun-binding protein related to a putative tumor suppressor. ***Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*** v. 90, n. 14, p. 6726-6730, 1993.

OLIVEIRA, J. E.; SOARES, C. R.; PERONI, C. N.; GIMBO, E.; CAMARGO, I. M.; MORGANTI, L.; BELLINI, M. H.; AFFONSO, R.; ARKATEN, R. R.; BARTOLINI, P.RIBELA, M. T. High-yield purification of biosynthetic human growth hormone secreted in escherichia coli periplasmic space. ***J. Chromatogr A.*** v. 852, n. 2, p. 441-450, 1999.

OUYANG, X.; JESSEN, W. J.; AL-AHMADIE, H.; SERIO, A. M.; LIN, Y.; SHIH, W. J.; REUTER, V. E.; SCARDINO, P. T.; SHEN, M. M.; ARONOW, B. J.; VICKERS, A. J.; GERALD, W. L.ABATE-SHEN, C. Activator protein-1 transcription factors are associated with progression and recurrence of prostate cancer. ***Cancer Research.*** v. 68, n. 7, p. 2132-2144, 2008.

PEDRAZA-FARINA, L. G. Mechanisms of oncogenic cooperation in cancer initiation and metastasis. ***Yale J. Biol. Med.*** v. 79, n. 3-4, p. 95-103, 2006.

PEREIRA, L.M. **Clonagem, expressão, purificação e caracterização estrutural da proteína ribossomal L10 humana recombinante.** 2009 Dissertação (Mestrado) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo.

REINKE, A. W.; BAEK, J.; ASHENBERG, O.KEATING, A. E. Networks of bzip protein-protein interactions diversified over a billion years of evolution. ***Science.*** v. 340, n. 6133, p. 730-734, 2013.

SEFFRIN, J. R.; HILL, D.; BURKART, W.; MAGRATH, I.; BADWE, R. A.; NGOMA, T.; MOHAR, A.GREY, N. It is time to include cancer and other noncommunicable diseases in the millennium development goals. ***CA. Cancer J. Clin.*** v. 59, n. 5, p. 282-284, 2009.

SHAULIAN, E. Ap-1--the jun proteins: Oncogenes or tumor suppressors in disguise? ***Cell Signal.*** v. 22, n. 6, p. 894-899, 2010.

SOEDJAK, H. S. Colorimetric micromethod for protein determination with erythrosin b. ***Anal Biochem.*** v. 220, n. 1, p. 142-148, 1994.

SORENSEN, H. P.MORTENSEN, K. K. Soluble expression of recombinant proteins in the cytoplasm of escherichia coli. ***Microb. Cell Fact.*** v. 4, n. 1, p. 1, 2005.

VAN DAM, H.CASTELLAZZI, M. Distinct roles of jun : Fos and jun : Atf dimers in oncogenesis. ***Oncogene.*** v. 20, n. 19, p. 2453-2464, 2001.

VIDEIRA, R. S.; DEBONI, M. C. Z.; ARAÚJO, C.A.S; AKAMOTO, A.C; MELHADO, R.M . Oncogenes e desenvolvimento do câncer. ***Arq. Ciênc. Saúde Unipar*.** v. 6, n. 1, p. 71-76, 2002.

VOET, D.; VOET, J.G. **Bioquímica**. 4. ed. Porto Alegre, R.S.: Artmed, 2013.

WATSON, J.D.; BAKER, T.A.; BELL, S.P.; GANN, A.; LEVINE, M.; LOSICK, R. **Biologia molecular do gene**. 5. ed. Porto Alegre, RS.: Artmed, 2006.