

Thalita Marcolan Valverde

RasGEF1b: localização celular de seus domínios e papel regulador negativo sobre a ativação de NF-kappaB

Belo Horizonte – MG

Julho de 2011

Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Morfologia
Pós-Graduação em Biologia Celular

Thalita Marcolan Valverde
Orientador: Aristóbolo Mendes da Silva

RasGEF1b: localização celular de seus domínios e papel regulador negativo sobre ativação de NF-kappaB

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biologia Celular

Belo Horizonte – MG
Julho de 2011

*Dedico este trabalho àqueles que
me inspiraram força, coragem e
determinação.*

Agradecimentos

Agradeço a DEUS pela proteção constante e por iluminar meu caminho. À minha família, por ser parte de mim e, especialmente, à minha mãe, pelo amor incondicional e por sempre apoiar as minhas escolhas, mesmo que isso significasse ficar longe. Ao meu orientador, Prof. Aristóbolo, pela orientação e confiança no desenvolvimento deste trabalho, e por ser uma pessoa de grande importância na minha formação profissional.

Obrigada àqueles que me mostraram o caminho da pesquisa com entusiasmo e profissionalismo: Prof. Gregory Kitten, Lorenza Carvalhaes e Elisandra Gava. À amiga Tatiane Almeida, companheira de iniciação científica, obrigada pela força e companheirismo dedicados desde a graduação. Aos meus queridos amigos de Divi, especialmente à Aninha, Roberta e Fernanda, amigas especiais que, mesmo longe, se mostraram presentes.

Agradeço aos meus bons amigos de laboratório, Paula, Solange, Kátia e Filipe por compartilharem comigo a alegria de cada resultado, pelas críticas e discussões dos experimentos e pelo exemplo de trabalho em equipe. Em especial, à Carolina Damas pela ajuda com os experimentos e discussões de vários aspectos deste projeto. Aos ex-alunos de iniciação científica do laboratório, Thaís e Brener, por terem me treinado nas técnicas de biologia molecular, sempre com tranquilidade e disponibilidade.

Aos amigos do departamento de Morfologia, especialmente ao Rodolfo, Luana, Patrícia e Mônica, pelos vários momentos de alegria e por tornarem esse tempo mais leve e divertido. Às meninas de casa, Flávia e Rúbia, minha segunda família, obrigada pela amizade verdadeira e companheirismo sempre disponibilizado. Ao meu namorado, Rodrygo, amor verdadeiro, por tudo que representa na minha vida, pelos vários conselhos e incentivo dedicado nos momentos em que mais precisei.

Agradeço ao Laboratório IMPAR, na pessoa do Prof. Gazinelli, e ao Laboratório de Virologia Comparada, em especial ao Prof. Flávio e Prof^a Edel, pelo auxílio nos experimentos e disponibilidade dos equipamentos. Ao Dr. Geraldo Santana Magalhães, do Instituto Butantã – SP e ao Dr. Daniel Santos Mansur, da Universidade Federal de Santa Catarina, por gentilmente ter nos cedido plasmídeos para este estudo. À Prof. Santuza Teixeira pela alíquota de um anticorpo para a realização das microscopias. À Prof^a Ana Maria de Paula, do Laboratório de Biofotônica do Departamento de Física, pela realização das microscopias deste trabalho. Às agências de fomento, CNPq, Fapemig e INCTV, pelo financiamento deste projeto.

A todos que, de alguma forma, fizeram a diferença ao longo desse ótimo tempo!

Sumário

AGRADECIMENTOS	III
ABREVIATURAS	VI
LISTA DE FIGURAS	VII
LISTA DE TABELAS	IX
RESUMO	X
ABSTRACT	XI
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 SISTEMA IMUNE INATO E RECEPTORES DO TIPO TOLL (TLRs).....	2
1.2 RAS GTPASES	7
1.3 FATORES DE TROCA DE NUCLEOTÍDEOS GUANINA (GEFs).....	12
1.4 NF- κ B	18
1.4.1 Ativação de NF- κ B via os receptores do tipo Toll.....	20
1.4.2 Ativação de NF- κ B via TNF	22
1.4.3 Regulação negativa da atividade transcricional de NF- κ B.....	23
2. OBJETIVOS	24
3. METODOLOGIA	26
3.1 CÉLULAS	27
3.2 PLASMÍDEOS	27
3.3 OLIGONUCLEOTÍDEOS	29
3.4 CLONAGEM.....	30
3.4.1 Amplificação por PCR	30
3.4.3 Digestão com enzimas de restrição e defosforilação em vetores.....	32
3.4.4 Extração e Purificação	33
3.4.5 Ligação de insertos em vetores de expressão eucariótica.....	33
3.4.7 Obtenção em pequena escala (Miniprep) de DNA plasmidiano.....	34
3.4.8 Obtenção em média escala (Midiprep) de DNA plasmidiano.....	35
3.5 SEQUENCIAMENTO.....	36
3.6 TRANSFEÇÃO	36
3.6.1 Método fosfato de cálcio (Chen & Okayama, 1987).....	36
3.6.2 Método polímero catiônico	37
3.6.3 Método lipossomo	37
3.7 MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA.....	38
3.8 WESTERN BLOT.....	39
3.8.1 Obtenção de extratos celulares.....	39
3.8.2 Fracionamento eletroforético e transferência	39
3.8.3 Anticorpos	40
3.8.4 Immunoblot e revelação.....	40
3.9 ENSAIO DE GENE REPÓRTER DE NF- κ B ATRAVÉS DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA LUCIFERASE.....	40
4. RESULTADOS	42
4.1 EFEITO DE RASGEF1B SOBRE A ATIVAÇÃO DE NF- κ B.....	43

4.3 EFEITO DOS DOMÍNIOS AMINO E CARBOXI-TERMINAL DE RASGEF1B SOBRE A ATIVAÇÃO DE NF- κ B.....	54
4.5 EFEITO DE RASGEF1B E RAP2A SOBRE A ATIVAÇÃO DE NF- κ B.....	67
5. DISCUSSÃO	69
6. CONCLUSÕES	75
7. REFERÊNCIAS	77

Abreviaturas

DMEM – do inglês, *Dulbecco modified eagle media*

EDTA – Ácido etilenodiaminotetracético

GEF – do inglês, *Guanine Exchange Factor*

GPI – Glicofosfatidilinositol

LB – Meio de cultura Luria Bertani

PBS – do inglês, *Phosphate-buffered saline*

PCR – do inglês, *Polimerase chain reaction*

PVDF – do inglês, *Polyvinylidene fluoride*

Ras – do inglês, *Rat sarcoma*

SDS-PAGE – Eletroforese em gel de poliacrilamida em tampão dodecil sulfato

TLRs – do inglês, *Toll-like receptors*

TIR – do inglês, *Intracelular Toll-Interleukin1 (IL-1) receptor*

NF- κ B – do inglês, *Nuclear factor kappaB*

TNF – do inglês, *Tumor necrosis factor-alpha*

MyD88 – do inglês, *Myeloid differentiation primary response protein 88*

TIRAP – do inglês, *TIR domain containing adaptor protein*

TRIF – do inglês, *TIR domain containing adaptor protein inducing interferon (IFN- β)*

GTPases - do inglês, *Small GTPase proteins*

GDP – guanosina difosfato

GTP – guanosina trifosfato

GAPs – proteínas ativadoras de GTPase

Lista de figuras

Figura 1: Estruturas comparativas dos receptores IL-1R e TLRs.....	3
Figura 2: Receptores Toll humanos.....	4
Figura 3: Modelo bioquímico da ativação das RasGTPases pelos GEFs.....	8
Figura 4: Efeitores de Ras.....	11
Figura 5: Estrutura computacional de proteínas ligadas a nucleotídeo guanina.....	15
Figura 6: Via de sinalização dos TLRs mediada por MyD88.....	21
Figura 7: Análise do efeito de RasGEF1b sobre a ativação de NF- κ B induzida por Mal/Tirap em células HEK293T.....	45
Figura 8: Análise do efeito de RasGEF1b sobre a ativação de NF- κ B induzida pelo complexo TAK1/TAB1 em células HEK293T.....	46
Figura 9: Análise do aumento da ativação do promotor de PKR humano induzido por Interferon Alfa2 e na presença de RasGEF1b em células HEK293T.....	47
Figura 10: Amplificação da região codificadora dos domínios amino e carboxi-terminal de RasGEF1b.....	50
Figura 11: Subclonagem do inserto RasGEF1b- Δ ₋₁₆₈₋₄₇₄ no vetor pFLAG-CMV4.....	51
Figura 12: Subclonagem do inserto RasGEF1b- Δ ₋₁₋₁₆₇ no vetor pFLAG-CMV4.....	52
Figura 13: Análise por western-blot da expressão transiente de Flag-RasGEF1b e seu domínio carboxi-terminal em células HEK293A.....	53
Figura 14: Análise da ativação de NF- κ B induzida por Mal/Tirap na presença dos domínios amino ou carboxi-terminal de RasGEF1b em células HEK293A.....	56
Figura 15: Análise da ativação de NF- κ B induzida por TAK1/TAB1 na presença dos domínios amino ou carboxi-terminal de RasGEF1b em células HEK293A.....	57
Figura 16: Análise da ativação de NF- κ B induzida por p65/Rel-A na presença dos domínios amino ou carboxi-terminal de RasGEF1b em células HEK293A.....	58
Figura 17: Subclonagem do inserto RasGEF1b- Δ ₋₁₆₈₋₄₇₄ no vetor pEGFP-N1.....	62
Figura 18: Subclonagem do inserto RasGEF1b- Δ ₋₁₋₁₆₇ no vetor pEGFP-N1.....	63

Figura 19: Análise por western-blot da expressão transiente de pEGFP-N1-RasGEF1b- Δ -168-474 e pEGFP-N1-RasGEF1b- Δ -1-167 em células HEK293A.....	64
Figura 20: Análise da localização subcelular dos domínios amino e carboxi-terminal de RasGEF1b por microscopia de fluorescência em células HEK293A.....	65
Figura 21: Seqüência de aminoácidos de RasGEF1b e análise da localização subcelular do seu domínio carboxi-terminal por microscopia de fluorescência em células HEK293A.....	66
Figura 22: Análise do efeito de RAP2A e RasGEF1b sobre a ativação de NF- κ B induzida por TNF em células HEK293T.....	68

Lista de tabelas

Tabela 1: Plasmídeos utilizados neste estudo.....	28
Tabela 2: Seqüências de iniciadores.....	30
Tabela 3: Combinação de iniciadores e vetores utilizados nas clonagens.....	31
Tabela 4: Relação de tampão e enzima de restrição utilizada para cada inserto e ou vetor.....	32

Resumo

O fator de troca de nucleotídeo guanina, RasGEF1b, representa uma proteína fortemente induzida em resposta à estimulação com agonistas inflamatórios dos receptores do tipo Toll (TLR, do inglês *Toll like receptors*). Uma vez que RasGEF1b é uma proteína de localização endossômica e de expressão induzida na resposta imune inata mediada por TLRs, tivemos como objetivo inicial avaliar o efeito do ganho-de-função de RasGEF1b e seus domínios sobre a ativação de NF- κ B induzida na resposta inflamatória, assim como analisar a distribuição celular. Para isso, ensaios de gene repórter foram realizados e demonstraram que RasGEF1b exibe um efeito regulatório negativo sobre a ativação de NF- κ B mediada pelos componentes da via de TLRs, Mal-Tirap e TAK1/TAB1. Para avaliar o efeito dos domínios amino e carboxi-terminal de RasGEF1b sobre a ativação de NF- κ B, foi necessário clonar separadamente as regiões codificadoras referentes aos domínios no vetor de expressão eucariótica pFLAG-CMV4. Ensaios de transfecção transiente foram realizados inicialmente em células epiteliais humanas HEK293A. Análises por ensaios de gene repórter demonstraram que os domínios amino e carboxi-terminal de RasGEF1b exibem um efeito regulatório negativo sobre a ativação de NF- κ B mediada pelos componentes da via de sinalização de TLRs, Mal-Tirap e TAK1/TAB1, mas não por p65. No entanto, não foram visualizadas diferenças significativas entre os domínios sobre a ativação de NF- κ B. Ainda, observamos que RAP2A e/ou a co-transfecção com RasGEF1b exibiram efeito regulatório negativo sobre a ativação de NF- κ B, mediada por TNF- α . Para analisar a distribuição celular dos domínios de RasGEF1b, as regiões codificadoras referentes aos domínios amino e carboxi-terminal desse GEF foram clonadas no vetor de expressão eucariótica pEGFP-N1. Os resultados por microscopia de fluorescência demonstraram que RasGEF1b-amino-terminal possui localização citoplasmática, com marcação um pouco mais intensa em regiões associadas a membranas celulares. Entretanto, RasGEF1b-carboxi-terminal mostrou distribuição organizada preferencial por núcleo celular, mas com expressão também citoplasmática. Nossos resultados indicam que RasGEF1b exibe um importante efeito sobre a regulação de NF- κ B e potencial função na resposta inflamatória.

Abstract

The guanine nucleotide exchange factor RasGEF1b is a protein encoded by a gene whose expression is strongly induced in response to stimuli with Toll-like receptor (TLR) agonists. RasGEF1b is found localized at the early endosomes associated with Ras, but no cellular function has yet been defined. Our goal was to assess the effect of the gain-of-function of this protein and its domains in the activation of NF- κ B transcription factor induced in the inflammatory response, as well as to analyze its cellular distribution. To this end, luciferase reporter gene assays were carried out to investigate whether RasGEF1b displays any regulatory effect on the activation of NF- κ B mediated by the signaling pathway of TLRs, Mal-Tirap, and TAK1/TAB1. In order to assess the effect of the amino and carboxi-terminal domains of RasGEF1b in NF- κ B activation, we cloned the coding regions corresponding to these domains in the eukaryotic expression vector pFLAG-CMV4. Transient transfection assays were initially carried out in HEK293A epithelial cell line. Reporter gene assays demonstrated that the amino and carboxi-terminal domains of RasGEF1b exhibit a negative regulatory effect in the activation of NF- κ B mediated by the signaling pathway components of TLRs, Mal-Tirap, and TAK1/TAB1, but not by p65/Rel-A. However, no significant difference in the activation of NF- κ B was observed between these two domains. Moreover, we observed that the transfection of either RAP2A or RasGEF1b, or both exhibit a negative regulatory effect on the activation of NF- κ B mediated by TNF. To analyze the cellular distribution of the domains of RasGEF1b, the coding regions corresponding to the amino and carboxi-terminal domains of this GEF were cloned in the eukaryotic expression vector pEGFP-N1. The results of the fluorescence microscopy demonstrated that RasGEF1b-amino-terminal is located in the cytoplasm, with a slightly increased fluorescence in regions associated with cell membranes. On the other hand, RasGEF1b-carboxi-terminal showed a distribution organized preferentially in the cell nucleus. Our results suggest that RasGEF1b has an important effect in the regulation of NF- κ B and a potential role in the inflammatory response.

1.1 Sistema imune inato e receptores do tipo Toll (TLRs)

O sistema imune inato é essencial para a sobrevivência dos organismos multicelulares, pois trata-se do primeiro sistema de reconhecimento e resposta à invasão de microorganismos. Esse sistema é encontrado em animais invertebrados e vertebrados, assim como em plantas (Albiger et al., 2007).

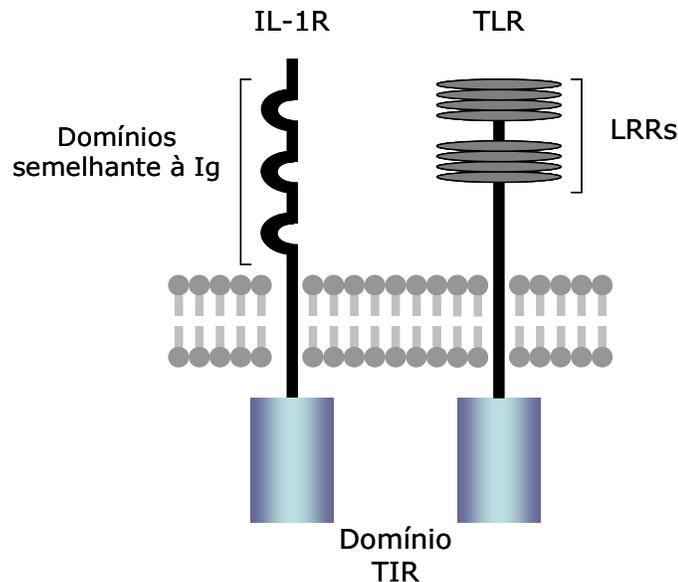
Até recentemente, a imunidade inata era considerada uma resposta imune inespecífica mediada por células fagocíticas, tais como macrófagos e neutrófilos, que englobam e lisam patógenos microbianos (Akira et al., 2006a). No entanto, estudos sobre o reconhecimento imunológico inato mostraram ser esse sistema dependente de um conjunto diversificado de receptores, os receptores de reconhecimento padrões (PRRs, do inglês *Pattern recognition receptors*), os quais reconhecem grandes classes de estruturas moleculares comuns a vários grupos de microorganismos (Akira et al., 2006b, Janeway & Medzhitov, 2002).

A detecção e a classificação de patógenos invasores realizadas por PRRs ocorrem em grande parte em células dendríticas e macrófagos. Esses receptores medeiam uma rápida produção de citocinas e quimiocinas quando sinalizam a presença de um patógeno, e a combinação específica do receptor envolvido pode transmitir informações básicas sobre o tipo de patógeno invasor (Kanzler et al., 2007).

Anderson et al. (1985) identificaram uma proteína receptora em drosófilas que é essencial na regulação da polaridade dorsoventral durante a embriogênese, sendo denominada Toll (TLR, do inglês *Toll like receptors*). Posteriormente, Lemaitre et al. (1996) demonstraram que mutantes de drosófilas que apresentavam a perda da função no receptor Toll eram altamente susceptíveis à infecção fúngica e à indução defeituosa de um peptídeo antifúngico. Essa descoberta forneceu a primeira evidência de que a drosófila expressa um receptor específico, responsável pela detecção da infecção causada por fungo.

Os receptores Toll reconhecem padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs, do inglês *Pathogen-associated molecular pattern*), ativando cascatas de sinalização que induzem a expressão de moléculas efetoras como as citocinas, quimiocinas e moléculas co-estimuladoras (Jones et al., 2001). Assim como os PAMPs, os receptores Toll foram descobertos na última década e são altamente diversificados. Sua família consiste de pelo menos 10 membros em humanos e 13 em camundongos (McGettrick & O'Neill, 2010).

Os TLRs são proteínas transmembrana do tipo I caracterizadas por um domínio extracelular contendo repetições ricas em leucina (LRR, do inglês *Leucine rich repeats*) e um domínio intracelular ou citoplasmático homólogo ao receptor de interleucina-1 (IL-1R, do inglês *Interleukin-1 receptor*) e, portanto, nomeado domínio receptor Toll/IL-1 (TIR, do inglês *Intracelular Toll-Interleukin1 (IL-1) receptor*) (Albiger et al., 2007). A homologia entre TLRs e o receptor IL-1 (IL-1R) está restrita aos seus domínios citoplasmáticos, enquanto que seus domínios extracelulares são notavelmente diferentes. Os receptores de IL-1 possuem domínio extracelular semelhante ao da imunoglobulina, enquanto que os TLRs possuem repetições ricas em leucinas, como apresentado na Figura 1.



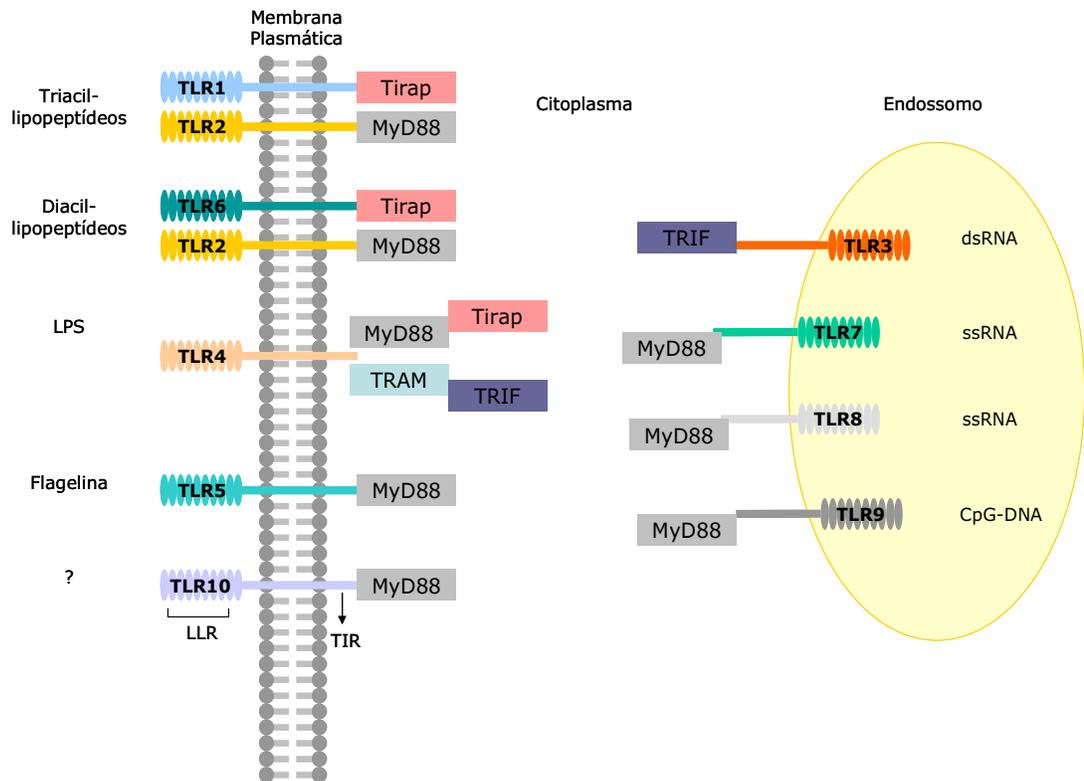
Baseado em: Akira & Takeda (2004).

Figura 1: Estruturas comparativas dos receptores IL-1R e TLRs. Os receptores do tipo Toll e receptores de interleucina 1 (IL-1R) apresentam domínio citoplasmático conservado denominado domínio TIR. No entanto, os domínios extracelulares desses dois receptores apresentam grandes diferenças. Os TLRs possuem repetições ricas em leucina (LRR), enquanto que os receptores de IL-1R possuem três domínios semelhantes à imunoglobulina.

Evidências indicam que a ativação do sistema imune inato é um pré-requisito para a indução do sistema imune adquirido, particularmente para a indução da resposta de células T helper 1 (Th1) (Medzhitov, 2001, Akira et al., 2001). Sabe-se, ainda, que diferentes subgrupos celulares podem expressar diferentes TLRs, que tornam as células capazes de desenvolver

padrões específicos de resposta imune a diferentes patógenos. Por exemplo, células dendríticas plasmacitóides expressam predominantemente TLR7 e TLR9. Células dendríticas mielóides, por sua vez, expressam os demais TLRs, incluindo o TLR4, permitindo que essas células sejam ativadas por diferentes tipos de agonistas, incluindo LPS (do inglês, *Lipopolysaccharide*) (Akira et al., 2001).

Apesar de apresentarem uma conservação entre os domínios ricos em leucina, os receptores do tipo Toll podem reconhecer uma variedade de ligantes não relacionados estruturalmente. Na Figura 2, estão apresentados os diferentes receptores Toll e seus ligantes descritos em humanos.



Baseado em: Kanzler et al. (2007).

Figura 2: Receptores Toll humanos. Diagrama esquemático mostrando os receptores do tipo Toll e proteínas adaptadoras recrutadas, assim como a localização celular e exemplos de ligantes.

A localização celular de TLRs, assim como seus ligantes é bem diversificada, e podem ser divididas em dois grupos. O primeiro desses grupos é composto por TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 e TLR11 (murino), que são expressos em superfícies de células e reconhecem

componentes de membrana microbiana, como lipídeos, lipoproteínas e proteínas. O segundo grupo é composto por TLR3, TLR7, TLR8 e TLR9, que se encontram localizados em vesículas intracelulares, como o retículo endoplasmático, endossomos, lisossomos e endolisossomos, os quais possuem a habilidade de reconhecer ácidos nucleicos microbianos (Kawai & Akira, 2010).

Hoshino et al. (1999) estão entre os pioneiros no estudo de reconhecimento de patógenos pelos TLRs de mamíferos. Após estudos realizados em camundongos que apresentavam mutação que modifica um resíduo conservado do domínio citoplasmático de TLR4, foi possível elucidar o fenótipo hiporresponsivo à endotoxina bacteriana, LPS.

Posteriormente, Jin et al. (2007) & Kang et al. (2009) demonstraram que TLR2 reconhece lipopeptídeos de bactérias, zymosan de fungos e glicosilfosfatidilinositol mucina (GPI, do inglês *Glycosylphosphatidylinositol mucin*) de *Trypanosoma cruzi*. Em particular, o TLR2 forma heterodímeros com TLR1 ou TLR6. Especificamente, o heterodímero TLR2-TLR1 reconhece triacil-lipopeptídeos de bactérias Gram-negativas e micoplasmas, enquanto que o heterodímero TLR2-TLR6 reconhece diacil-lipopeptídeos de bactérias Gram-positivas e micoplasma.

O receptor TLR3 reconhece RNA de dupla-fita (dsRNA, do inglês *double-strand RNA*) produzido por muitos vírus durante a replicação (Alexopoulou et al., 2001). Também foi relatado que TLR5 de mamíferos reconhece flagelina bacteriana de bactérias Gram-Positivas e Gram-Negativas, e que a ativação do receptor mobiliza o fator de transcrição KappaB (NF- κ B, do inglês *Nuclear factor kappaB*) e estimula a produção do fator de necrose tumoral alfa (TNF, *Tumour necrosis factor-alpha*) (Hayashi et al., 2001).

Hemmi et al. (2002) relataram que células do sistema imunológico de camundongos eram ativadas quando em tratamento com imidazoquinolines através de TLR7, R-837, um fármaco que contém propriedades anti-virais e anti-tumorais. TLR7 apresenta alta homologia com TLR8 e também reconhece RNA de fita simples (ssRNA, do inglês *single-stranded RNA*), presente em vários vírus, como o vírus da imunodeficiência humana tipo I (HIV-1, do inglês *Human immunodeficiency virus type I*) (Heil et al., 2004), o vírus da estomatite vesicular (VSV, *Vesicular stomatitis virus*) e o vírus da influenza (Lund et al., 2004).

O receptor TLR9 mostrou-se eficiente na resposta celular mediada por motivos de DNA não metilados (CpG, do inglês *Cytidine-phosphate-guanosine*), e não se observou a

mesma resposta em camundongos deficientes de TLR9, não havendo elevação nos níveis séricos de citocinas pró-inflamatórias (Hemmi et al., 2000).

Estudos sobre a resposta celular desencadeada por TLR10 ainda não são muito claros. Contudo, foi demonstrado que TLR10 forma homodímero com alta afinidade, mas que também pode se associar com TLR1 ou TLR2 (Hasan et al., 2005). Recentemente, Govindaraj et al. (2010) demonstraram, através de modelagem computacional que PamCysPamSK4, um diacil-peptídeo, e Pam3CSK4, um lipopetídeo tripalmitoilado sintético, podem ser possíveis ligantes de TLR10.

A ligação de TLRs aos seus ligantes parece resultar em mudanças conformacionais e, possivelmente, em dimerização, levando ao recrutamento de cruciais proteínas adaptadoras (Wang et al., 2010). O reconhecimento de ligantes pelos TLRs leva ao recrutamento do domínio TIR de moléculas adaptadoras, como a proteína de resposta primária de diferenciação mielóide – 88 (MyD88, do inglês *Myeloid differentiation primary response protein 88*), a proteína adaptadora contendo o domínio TIR (TIRAP, do inglês *TIR domain containing adaptor protein*), a proteína adaptadora contendo um domínio TIR e indutora do IFN- β (TRIF, do inglês *TIR domain containing adaptor protein inducing interferon (IFN- β)*) e a molécula adaptadora relacionada a TRIF (TRAM, do inglês *TRIF-related adaptor molecule*) (Kumar et al., 2009). Por exemplo, o envolvimento de TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8 e TLR9 com seus respectivos ligantes recrutam MyD88.

Além de MyD88, os receptores TLR1, TLR2, TLR4 e TLR6 recrutam TIRAP, que serve como um ligante adaptador entre o domínio TIR de TLRs e MyD88. O envolvimento de TLR3 e TLR4 aos seus ligante recruta TRIF. Além disso, TLR4 recruta TRIF através de TRAM, que se liga entre o domínio TIR de TLR4 e TRIF (Kanzler et al., 2007). Hasan et al. (2005) demonstraram que TLR10, expresso em células B e células dendríticas plasmocitóides, também recruta MyD88. Esse recrutamento de adaptadores dispara a cascata da via de sinalização e, finalmente, leva à ativação de fatores de transcrição, tais como NF- κ B e IRFs (do inglês, *Interferon responsive factor*). Adicionalmente, esse recrutamento também ativa MAPcinases, como p38, JNK e ERK1/2, que ativam o fator de transcrição AP-1. Esses fatores de transcrição induzem a transcrição de citocinas inflamatórias, interferons do tipo I e quimiocinas. Devido à complexidade dessa via, a sinalização de TLR é categorizada em vias MyD88-dependente e TRIF-dependente. A via MyD88-dependente é utilizada por todos os TLRs, exceto TLR3 (Kumar et al., 2009).

1.2 Ras GTPases

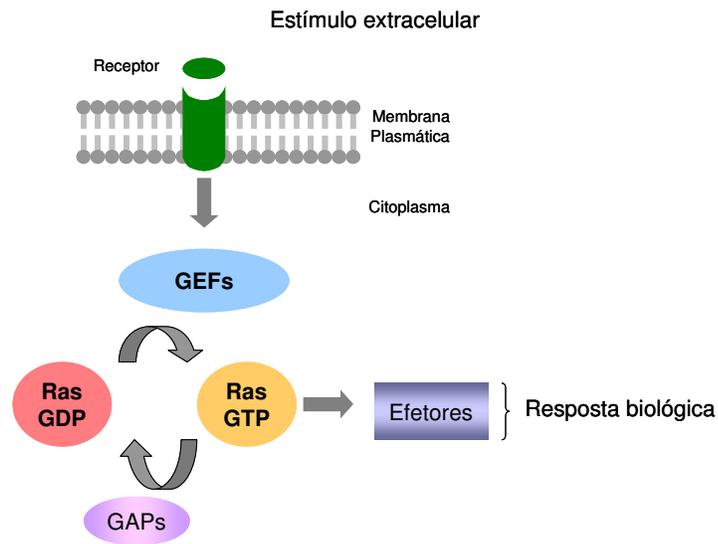
Os proto-oncogenes *ras* (do inglês, *Rat sarcoma*) codificam oncoproteínas da família Ras que são alvo de intensa pesquisa, sobretudo pelo seu papel crítico na oncogênese em humanos (Repasky et al., 2004). As proteínas dessa superfamília desempenham um papel central na expressão gênica e controle de regulação da proliferação, diferenciação e sobrevivência celular (Wennerberg et al., 2005).

A história da família das proteínas Ras data de quase cinco décadas, quando foi observado que vírus poderiam causar a formação de tumores em camundongos e humanos (Harvey, 1964, Kirsten & Mayer, 1967). Os genes *ras* representam versões de genes mutados que codificam enzimas com atividade intrínseca GTPase.

As GTPases (do inglês, *Small GTPase proteins*), assim chamadas devido à sua massa molecular entre ~20-35 kDa, têm sido agrupadas na superfamília Ras. São proteínas evolutivamente conservadas e encontradas entre os vários reinos de organismos. A primeira GTPase de baixo peso molecular a ser isolada foi H-Ras (Ellis et al., 1981).

De acordo com a sua seqüência primária, as GTPases de baixo peso molecular de mamíferos podem ser subdivididas nas subfamílias Ras, Rho, Arf, Rab, Ran e Rad/Gem. A subfamília Ras inclui H-Ras, K-Ras (4A e 4B), N-Ras, E-Ras, R-Ras, TC21/R-Ras2, M-Ras/R-Ras3, Ra1A, Ra1B, Rap1A, Rap1B, Rap2A, Rap2B, Rap2C, Rit1, Rit2, RheB e RhebL1. Os membros da família Ras melhor caracterizados são H-Ras, K-Ras e N-Ras, os quais regulam uma variedade de processos biológicos que contribuem para a progressão do ciclo celular e, em condições fisiopatológicas, o câncer (Coleman et al., 2004).

Assim como as proteínas G heterodiméricas, as GTPases de baixo peso molecular agem como “interruptores moleculares”, alternando entre duas formas: inativa, quando ligadas à guanosina difosfato (GDP), e ativas, ligadas à guanosina trifosfato (GTP). A conversão entre os estados GTP e GDP-ligados é firmemente regulada por dois tipos de proteínas: fatores de troca de nucleotídeos guanina (GEFs) e as proteínas ativadoras de GTPase (GAPs), como demonstrado na Figura 3 (Wolfman & Macara, 1990, Downward et al., 1990). Um terceiro componente, os inibidores da dissociação de guanina (GDI, *guanine nucleotide dissociation inhibitor*), podem inibir ou bloquear as ações das GAPs e dos GEFs (Campbell et al., 1998).



Baseado em: Takai et al. (2001)

Figura 3: Modelo bioquímico da ativação das RasGTPases pelos GEFs. O ciclo entre o estados ativo e inativo das RasGTPases é regulado por GEFs e GAPs. Sinais extracelulares, reconhecidos através de receptores de superfície celulares específicos, modulam a atividade dos GEFs que, por sua vez, regulam as atividades de RasGTPases individuais. As proteínas Ras ativadas são capazes de interagir com vários efetores, desencadeando diversas respostas biológicas como, por exemplo, proliferação celular e rearranjo de citoesqueleto.

As proteínas da subfamília Ras se localizam no folheto citossólico de membranas celulares (Willingham et al., 1980, Choy et al., 1999a) e acredita-se que essa localização seja absolutamente necessária para a sua atividade biológica, como a transmissão do sinal de receptores ativados para a cascata de sinalização citoplasmática (Willumsen et al., 1984).

As proteínas Ras são inicialmente sintetizadas no citossol e rapidamente sofrem dois importantes processamentos pós-traducionais nos motivos contidos em seu domínio carboxi-terminal. O primeiro motivo, que é comum a todas as proteínas Ras, é o tetrapeptídeo CAAX (C: cisteína, A: alifático e X: serina ou metionina) o qual sofre modificações pós-traducionais, como farnesilação sequencial, proteólise e carboxi-metilação (Vigil et al., 2010). O segundo motivo varia entre as isoformas Ras e é composta de um domínio polibásico de seis resíduos de lisina para K-Ras e um ou dois sítios de palmitolação para N-Ras (posição-C181) e H-Ras

(posições C181 e C184). As isoformas H e N-Ras adquirem essas modificações enquanto transitam pela via secretória (Choy et al., 1999b, Apolloni et al., 2000). Dados demonstram que a sinalização de Ras palmitoilada não se limita à membrana plasmática, mas também prossegue em endomembranas, como o retículo endoplasmático e as membranas do Golgi (Chiu et al., 2002, Bivona & Philips, 2003, Rocks et al.). Gomez & Daniotti (2005) observaram que a H-Ras localiza-se principalmente em endossomos de células de ovário de hamster chinês (CHO, do inglês *Chinese hamster ovary*) e que a localização de H-Ras em endossomos é mantida pela via endocítica convencional, auxiliada pelas GTPases Rab5 e Rab11.

Recentemente, foi demonstrado que o tráfego de proteínas H-Ras deficientes de palmitoilação é modificado quando comparado à proteína não mutante, sendo observado que a proteína mutante era encaminhada do complexo de Golgi diretamente para a membrana plasmática, não utilizando, assim, o tráfego vesicular convencional por endossomos. Embora a falta da modificação pós-traducional de H-Ras tenha comprometido o tráfego correto dessa proteína à membrana plasmática, não foram observadas mudanças na ativação de H-Ras mutante (Misaki et al., 2010).

Nesse sentido, dois modelos foram propostos para melhor explicar a ativação de Ras palmitoilada em endomembranas. Quatela & Philips (2006) observaram que Ras torna-se ativada em endomembranas pelos RasGEFs, o qual é recrutado do citossol para endomembranas após estímulos por mitógenos. Adicionalmente, Rocks et al. (2006) demonstraram que Ras é ativada na membrana plasmática e é transportada de maneira retrógrada para endomembranas através do citossol. Assim, apesar das proteínas Ras serem consideradas até recentemente estacionárias, está claro que existe um intenso tráfego entre os compartimentos celulares, o que abre novos questionamentos sobre o desempenho de um papel regulador do tráfego bidirecional na sinalização (Rocks et al., 2005).

A ativação de Ras inicia-se com um estímulo extracelular seguido pelo recrutamento de GEFs junto à membrana plasmática, onde Ras está localizada. Através da ligação dessas proteínas a um conjunto de moléculas adaptadoras, ocorre a indução transitória do complexo Ras-GTP (Boguski & McCormick, 1993). Após Ras se ligar a GTP ocorre uma ativação de vários efetores, e a via de sinalização melhor caracterizada regulada pela proteína Ras é a via Ras-Raf-MEK-ERK1/2. Essa via é ativada quando fatores de crescimento se ligam a seus cognatos receptores tirosino-cinases. A ligação promove a dimerização dos receptores, o que

permite a fosforilação cruzada dos resíduos de tirosina contidos em domínios citossólicos desses receptores, através das cinases intrínsecas a esses domínios. Uma vez ativada, Ras recruta e ativa Raf-1, uma serina-treonina cinase. Raf-1 fosforila e ativa MEK (MAPK/ERK-cinase) que, por sua vez, fosforila e ativa ERK1/2 (Lemmon & Schlessinger, 2010). A Figura 4 representa os efetores de Ras e os processos biológicos desencadeados.

A ativação de ERK é capaz de promover processos celulares diferentes e até opostos. Por exemplo, a alta ativação de ERK pode induzir células a entrarem em apoptose ou diferenciação celular, enquanto que uma baixa ativação pode resultar em proliferação celular. Esse duplo efeito no comportamento celular tem se mostrado dependente, pelo menos em parte, de níveis da proteína inibidora de cinases dependente de ciclinas, p21. A proliferação celular é desencadeada pela via ERK através da indução da expressão de um regulador positivo de proliferação celular, a ciclina D1. Como consequência, deve haver um correto equilíbrio entre a ativação e inibição da via de sinalização Ras-Raf-MEK-ERK (Agell et al., 2002).

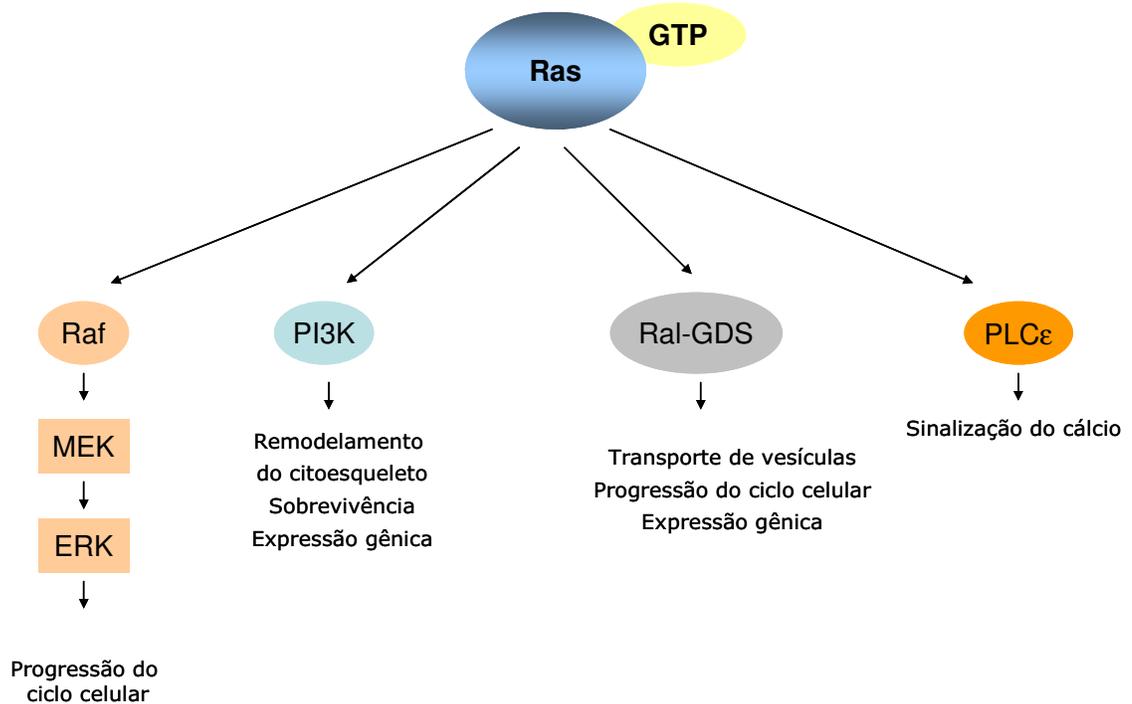
Um segundo efector de Ras é a cinase lipídica fosfatidilinositol-3 (PI3K), que está envolvida na sobrevivência celular, proliferação e metabolismo. A interação Ras-PI3K leva à ativação de cinases lipídicas, como resultado de sua translocação para a membrana e alterações conformacionais (Pacold et al., 2000).

Outros efetores de Ras também foram descritos, como RalGDS, um fator de troca de nucleotídeo guanina de Ral (um membro de Ras) que, ao ser ativado pela via Ras-RalGDS, promove alguns processos celulares, como transporte de vesículas e progressão do ciclo celular. Outros estudos demonstraram que a fosfolipase C ϵ (PLC ϵ) atua como uma molécula efectora de Ras, e a ativação da via Ras-PLC ϵ promove a sinalização de cálcio (Downward, 2003).

Membros da superfamília Rap são considerados próximos homólogos da proteína Ras, e suas regiões de interação-efetor são muito similares (Bos et al., 2001). A superfamília Rap tem a habilidade de interagir com os efetores de Ras, tais como Raf-1, B-Raf, RalGDS, RgI, Rlf, AF6, RasSF1, e PLC ϵ (Nancy et al., 1999, Bunney et al., 2006) e, dependendo do contexto celular e estímulo extracelular, elas podem interferir com a sinalização de Ras.

Assim como as proteínas Ras, a ativação da superfamília Rap é regulada por fatores de troca de nucleotídeo guanina (GEFs), que medeiam a substituição de GDP por GTP. As proteínas Rap estão envolvidas em uma variedade de importantes processos celulares. Em

linfócitos, elas regulam a adesão celular mediada por integrina, rearranjo do citoesqueleto e migração celular, enquanto que, em células neuronais, elas modulam a diferenciação axonal, desenvolvimento dendrítico, morfologia da espinha, e plasticidade sináptica (Spilker et al., 2008, Zhu et al., 2005).



Baseado em: Downward (2003)

Figura 4: Efetores de Ras. Uma vez ativada (ligada a GTP), Ras interage com várias famílias de proteínas efetoras. A via melhor caracterizada é Ras-Raf-MEK-ERK, que sinaliza a progressão do ciclo celular. No entanto, outros efetores também podem mediar diversos processos biológicos, como PI3K, Ral-GDS e PLCε.

Com base na homologia da seqüência, a família Rap é dividida dentro de dois subgrupos, Rap1 e Rap2, com um total de cinco membros: Rap1A, Rap1B, Rap2A, Rap2B, e Rap2C (Paganini et al., 2006). Diferenças não funcionais têm sido relatadas entre os membros de cada grupo. Existe aproximadamente 95% de correspondência entre Rap1A e Rap1B ao nível da seqüência de aminoácidos, e aproximadamente 90% entre Rap2A, Rap2B e Rap2C (McLeod et al., 2004, Huang et al., 2004, Christian et al., 2003).

Estudos recentes demonstraram que Rap2A, em células de mamíferos, possui localização preferencial em endossomos, e o mesmo não foi observado no retículo endoplasmático ou no Golgi, e a localização mostrou ser dependente de palmitoilação (Uechi et al., 2009).

Relevantes trabalhos têm demonstrado que existe uma eficiente participação de Ras no desenvolvimento de células cancerosas. Nesse sentido, Bigler et al. (2007) mostraram que Rap2A está envolvida na expressão de antígeno específico de próstata (PSA, do inglês *Prostate specific antigen*) andrógeno-dependente, assim como no crescimento andrógeno-dependente da progressão do câncer de próstata em linhagens celulares humanas.

1.3 Fatores de troca de nucleotídeos guanina (GEFs)

Os fatores de troca de nucleotídeo guanina podem ser classificados em famílias de acordo com a similaridade da sequência de aminoácidos que apresentam em sua estrutura, e de acordo com o tipo de proteína ligadora de GTP que eles ativam (Zheng & Quilliam, 2003).

Proteínas GEF causam ativação pela catálise de troca de GDP por GTP, enquanto que as GAPs inativam Ras, aumentando a taxa de hidrólise de GTP. O GEF interage primeiramente com a forma GDP-ligada para formar um complexo binário de uma proteína G pequena-GEF. Então, o GEF, nesse complexo, é substituído pelo GTP para originar a forma GTP-ligada (Boguski & McCormick, 1993, Buday & Downward, 1993, Wada et al., 1997).

Nesse sentido, a relevância dos estudos relacionados aos GEFs se deve ao fato de essas proteínas serem capazes de ativar proteínas G, por exemplo Ras, e modular importantes vias de sinalização reguladas por diversos efetores, tais como as cinases. Dessa forma, os GEFs servem como um ponto inicial de controle da regulação da via de sinalização das proteínas G (Vigil et al., 2010).

Todos os RasGEFs (RasGEFs, do inglês *Ras associated GEFs*) têm em comum um domínio catalítico de aproximadamente 250 aminoácidos, denominado CDC25 (também chamado domínio RasGEF), e um domínio adjacente, amino-terminal, de aproximadamente 50 aminoácidos, chamado de domínio RasGEFN (Quilliam et al., 2002). O domínio CDC25 foi identificado primeiramente em levedura (*Saccharomyces cerevisiae*) e os GEFs que contêm esse domínio regulam exclusivamente a superfamília Ras (Broek et al., 1987, Robinson et al., 1987).

Além do domínio catalítico CDC25, alguns RasGEFs possuem ainda outros domínios importantes e funcionais. Por exemplo, o RasGRF1, o Sos1 e o Sos2 possuem os domínios de homologia DH (DH, do inglês *Dbl homology*) e PH (PH, do inglês *Pleckstrin homology*), que estão arranjados em conjunto. O domínio DH parece promover a troca de guaninas em GTPases da subfamília Rho, enquanto o domínio PH participa nas interações proteína-proteína ou proteína-lipídios (Lemmon et al., 1996, Quilliam et al., 1995).

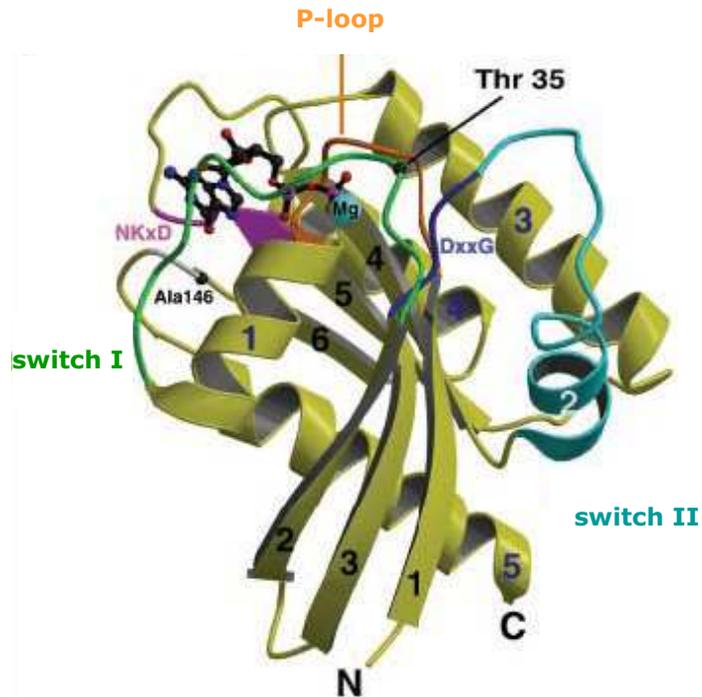
Vários GEFs associados aos membros da subfamília Ras foram isolados e caracterizados em células de mamíferos, como Sos, RasGRF, RasGRF2, RasGRP (RasGRP1), C3Gm, Vav, entre outros (Bowtell et al., 1992, Gulbins et al., 1994). O primeiro RasGEF a ser isolado em células de mamíferos foi designado RasGRF ou Cdc25Mn (Wei et al., 1992, Martegani et al., 1992).

O conjunto de GEFs, GTPases e GAPS em um sistema biológico ocasiona uma versatilidade de vias de sinalização em diversos organismos. A amplificação da sinalização pode ocorrer por diferentes proteínas. Por exemplo, um GEF pode ativar várias GTPases, e as GTPases podem induzir vários efetores. Essa versatilidade permite que a ativação de GTPases por GEFs possa mediar uma variedade de funções biológicas entre diferentes organismos. Nesse sentido, foi demonstrado que a ativação de Ras através RasGEF-CDC25 em *S. cerevisiae* é essencial para a proliferação e germinação de esporos (Broek et al., 1987) enquanto que, em *Drosophila*, o GEF – SOS, ao ativar Ras, estabelece a diferenciação em fotoreceptores (Simon et al., 1991). Adicionalmente, Arigoni et al. (2005) apresentaram evidências de que o desenvolvimento embrionário de *Dictyostelium* (uma espécie amebóide) é regulado por RasGEFM, um GEF caracterizado nessa espécie. Células mutantes do gene *rasGEFM* apresentaram pouca formação de agregados celulares, devido a uma falha na quimiotaxia das células mutantes. Além disso, observou-se que a regulação de RasGEFM na sinalização de Ras é dependente de receptor cAMP.

A via de sinalização de Ras é mediada pela troca GDP/GTP e regulada pelos diferentes GEFs. Para o mecanismo de ação dos GEFs na troca de GDP/GTP, foi estabelecido um cofator essencial para estabelecer a ligação GTP-proteína, o íon Mg^{2+} (Coleman & Sprang, 1998). Esse cofator é necessário para a ligação do nucleotídeo à proteína, assim como para a hidrólise de GTP. Na presença de Mg^{2+} , Ras exibe uma afinidade de ligação extremamente alta com os nucleotídeos guanina, com uma dissociação constante na ordem da concentração subnanomolar (Feuerstein et al., 1987, John et al., 1993, John et al., 1990).

Nesse sentido, Burstein & Macara (1992) observaram que a remoção de Mg^{2+} por tratamento com EDTA na GTPase Rab3A aboliu completamente a capacidade de ligação dessa proteína ao nucleotídeo GTP. Adicionalmente, foi demonstrado que atividade GTPase intrínseca de Rab3A também foi afetada e tornou-se indetectável quando o co-fator Mg^{2+} foi removido (John et al., 1993, Burstein & Macara, 1992). Esses dados indicam que o íon Mg^{2+} é absolutamente necessário nas reações mediadas pelas GTPases, tanto na ligação ao nucleotídeo, assim como na hidrólise.

Estudos bioquímicos demonstraram que, no processo de ligação do nucleotídeo guanina à GTPase, o sítio de ligação existente na proteína Ras para os nucleotídeos associado ao íon Mg^{2+} é constituído de regiões altamente conservadas, incluindo o “loop” de ligação ao fosfato (P-loop) e duas regiões cujas seqüências variam entre as subfamílias de proteínas Ras (Sprang, 1997). Uma vez que as regiões conservadas mantêm a mesma conformação quando GDP ou GTP estão ligados, as regiões variáveis respondem à natureza do nucleotídeo através de mudanças estruturais e são assim chamadas de regiões “Switch I” e “Switch II”. Essas regiões se ligam ao grupo fosfato GTP, mas têm pouca ou nenhuma afinidade de ligação ao GDP (Cherfils & Chardin, 1999). A Figura 5 demonstra uma modelagem computacional de proteína ligada ao nucleotídeo guanina e suas regiões P-loop, “Switch I” e “Switch II”.



Fonte: Vetter & Wittinghofer (2001)

Figura 5: Estrutura computacional de proteínas ligadas a nucleotídeo guanina. O domínio que se liga ao nucleotídeo guanina é chamado de domínio G e tem uma estrutura padrão nas regiões switch I e II. O domínio G consiste em seis folhas beta e cinco hélices localizadas em ambos os lados. O íon Mg^{2+} e o nucleotídeo guanina estão representados na parte superior da estrutura, assim como o “loop” de ligação ao fosfato, P-loop.

Embora os mecanismos de ativação de Ras ocasionada pela troca GDP/GTP sejam semelhantes, a modulação dos diferentes GEFs é regulada por sinais diversificados. Tal sinalização inclui, por exemplo, a fosforilação de proteínas e lipídios, o fluxo de cálcio e a geração de segundos mensageiros, como diacilglicerol (DAG). Um exemplo é o GEF - RasGRF1, um fator de troca de nucleotídeo guanina regulado por cálcio (Farnsworth et al., 1995, Shou et al., 1992), que possui um motivo de ligação à calmodulina (motivo IQ). Tal ligação parece ser crucial para a ativação desse GEF em resposta ao cálcio (Shou et al., 1992).

De maneira semelhante às proteínas Ras, alguns GEFs possuem afinidade por determinadas regiões subcelulares. Por exemplo, RasGRP1 e RasGRP4 têm afinidade pelo complexo de Golgi em células T Jurkat. No entanto, somente a superexpressão de RasGRP1

levou à ativação de Ras no Golgi (Perez de Castro et al., 2004). Adicionalmente, estudos demonstraram que o dominante negativo de RasGRP1 inibe a ativação de Ras nesse compartimento. O silenciamento do gene *rasGRP1* com siRNA abole toda a sinalização via Ras no Golgi, demonstrando que esse GEF é responsável pela ativação de Ras no Golgi de células T (Bivona et al., 2003). Arozarena et al. (2004) observaram que RasGRP1 e RasGRP2 endógenos ou ectopicamente expressos estão presentes no retículo endoplasmático (RE), mas não no complexo de Golgi. Como apresentado, tais GEFs parecem ter uma localização preferencial por endomembranas. No entanto, recentemente, Tisi et al. (2008) demonstraram que o RasGEF CDC25 de leveduras possui localização nuclear, e estudos na sequência dos aminoácidos desse GEF revelaram a presença de quatro sítios para tal localização. Adicionalmente, para confirmação dos resultados, foram geradas proteínas mutantes para várias regiões, e somente a proteína mutante que teve a região N-terminal inteiramente removida não se localizou no núcleo, sugerindo que essa região é necessária para a localização nuclear e que a região C-terminal desse GEF parece não ser funcional.

Nesse sentido, algumas descobertas demonstraram que a localização subcelular de alguns GEFs também regula a atividade da GTPase Rho. Schmidt & Hall (2002) demonstraram que a região N-terminal de Net1, um fator de troca de nucleotídeos guanina da GTPase Rho, exerce a regulação na localização nuclear desse GEF. Após expressar proteínas mutantes para a região N-terminal, foi observado que Net1 conduzia a realocação desse GEF para o citoplasma, seguido por ativação de Rho. Além disso, foi demonstrado que o domínio PH presente nesse GEF exerce duas atividades: a de exportação de Net1 do núcleo e a de ativação de Rho no citoplasma.

A GTPase RhoB, uma isoforma de Rho, é conhecida por ser regulada em resposta a agentes que causam dano ao DNA, como ultra-violeta e cisplatina (Fritz et al., 1995), e estresse celular (Trapp et al., 2001). Recentemente, foi demonstrado que os fatores de troca Ect2 e Net1, os quais possuem localização nuclear, regulam a atividade de RhoB após estresse genotóxico. Adicionalmente, foi demonstrado que o aumento da atividade de RhoB não é associado à atividade dos GEFs citossólicos RhoGEF ou Vav2, sugerindo que Ect2 e Net1 possuem um efeito regulador específico na atividade de RhoB após a célula sofrer danos no DNA (Srougi & Burridge, 2011).

Nos últimos anos demonstrou-se que vários GEFs desempenham a regulação de uma variedade de respostas biológicas. No entanto, ainda são poucos os estudos sobre a

participação desses fatores de troca na resposta inflamatória. Nesse sentido, Ferreira et al. (2002a) caracterizaram inicialmente o RasGEF1b, um GEF cuja expressão é fortemente induzida em macrófagos murinos após estimulação por agonistas TLR2 e TLR4, e em corações de camundongos infectados com *Trypanosoma cruzi*. Inicialmente chamado glicosilfosfatidilinositol gama 4 (GPI) γ 4, RasGEF1b demonstrou ser expresso também em macrófagos humanos após estimulação com GPI-mucina de *T. cruzi* ou lipopolissacarídeo (LPS). Adicionalmente, foram identificados três sítios de localização nuclear no RasGEF1b, o que sugere que esse GEF pode regular a ativação de alguma GTPase no núcleo celular.

A proteína RasGEF1b contém dois domínios, um domínio com uma potencial função estrutural, denominado GEF-N, e um outro domínio carboxi-terminal, que se assemelha ao domínio catalítico CDC-25, codificados pelos aminoácidos 40-138 e 201-455, respectivamente (Ferreira et al., 2002a).

Existem poucos relatos sobre a expressão de RasGEF1a e RasGEF1b na literatura. Korotayev et al. (2008) observaram que o fator de transcrição E2F1 induz a ativação da cinase ERK e regula os níveis de mRNA dos fatores de troca RasGEF1b e RasGRP1 em células U2OS (linhagem celular humana derivada de osteosarcoma), os quais promovem a ativação de Ras. Além disso, a regulação de E2F1 sobre a expressão de RasGEF1b e RasGRP1 foi detectada mesmo na presença de um inibidor de síntese protéica, sugerindo que tais genes são alvos transcricionais de E2F1. Assim como outros GEFs, RasGEF1b demonstrou ser expresso em diferentes organismos. Epting et al. (2007) observaram a expressão de RasGEF1b em zebrafish durante o desenvolvimento embrionário inicial. Em particular, a expressão desse GEF parece ser fortemente regulada pela via de sinalização Nodal e FGF. Já a sua expressão no desenvolvimento embrionário tardio está correlacionada com sítios ativos de sinalização FGF e TGF- β . Recentemente, foi observado que RasGEF1a e RasGEF1c são altamente expressos em cérebro de camundongo. *In vivo*, a expressão de RasGEF1b foi induzida em camundongos infectados com *T. cruzi* ou *Plasmodium chabaudi* e mostrou ser dependente de MyD88, TRIF, assim como do IFN- γ . Além disso, também foi observado que RasGEF1b encontra-se preferencialmente localizado em endossomos primários de células CHO (Andrade et al., 2010a).

Diversas doenças humanas são causadas por perturbações nas funções dos GEFs. Por exemplo, processamentos alternativos do RNAm de RasGRP4 foram identificados em vários pacientes com asma e leucemia (Yang et al., 2002). Outro exemplo é uma mutação no GEF

Tiam1 derivada de tumores e linhagens celulares de carcinoma humano de células renais (Engers et al., 2000). Bonnet et al. (2009) identificaram RasGEF1b e a proteína cinase do tipo II dependente de cGMP (PRKG2, do inglês *cGMP-dependent protein kinase type II*) como as proteínas determinantes para o fenótipo da síndrome do cromossomo 4q21. O fenótipo dessa doença inclui grave retardo mental, ausência de fala, características faciais distintivas e atraso no crescimento.

1.4 NF- κ B

O fator de transcrição nuclear NF- κ B foi descrito por Sen & Baltimore (1986) como um fator de transcrição nuclear que se ligava a uma região reguladora do gene da cadeia leve kappa (sítio κ B) em células B. Desde então, o NF- κ B se tornou um dos mais estudados fatores de transcrição em relação à complexa sinalização das vias de transdução (Ghosh & Karin, 2002), ao seu papel na hematopoese (Grossmann et al., 1999), e regulação na imunidade inata e adaptativa (Vallabhapurapu & Karin, 2009).

NF- κ B é uma proteína dimérica, cujos monômeros pertencem à família das proteínas Rel/ NF- κ B. Essa família é constituída por cinco proteínas, tais como: c-Rel, Rel-A (p65), RelB, NF- κ B1 (p105 que é transformada em p50) e NF- κ B2 (p100 que é transformada em p52). A transformação dessas proteínas ocorre através de proteólise. Todos os dímeros apresentam um comum domínio N-Terminal chamado de domínio de homologia a Rel (RHD, do inglês *Rel-homology domain*) de aproximadamente 300 aminoácidos (Gerondakis et al., 1999), o qual é responsável pela dimerização, ligação ao DNA e interação com a proteína inibitória de NF- κ B (I κ B, do inglês *Inhibitor of kappa B*), assim como pela seqüência de localização nuclear (NLS, do inglês *Nuclear localization sequence*) (Hoffmann et al., 2003). O dímero mais freqüente é formado pelos monômeros p65 e p50. A composição do heterodímero é que confere propriedades particulares ao NF- κ B, como especificidade pela seqüência de DNA e seu potencial na transativação (Hayden & Ghosh, 2004).

Na maioria das células não estimuladas, as subunidades Rel são encontradas predominantemente no citoplasma e ligadas às proteínas inibitórias da família I κ B. Foram descritos em células de mamíferos três principais clássicos I κ Bs, como o I κ B α , I κ B β e I κ B ϵ , que funcionam em parte mascarando a seqüência de localização nuclear que se encontra no

domínio RHD das subunidades de NF- κ B (Hayden & Ghosh, 2004). Além dos I κ Bs clássicos, há um grupo de proteínas atípicas que incluem o BCL3 (do inglês, *B cell CLL/lymphoma 3*), I κ B ζ e I κ BNS que também fazem parte da família dos inibidores de NF- κ B (Vallabhapurapu & Karin, 2009). Ambos os I κ Bs são caracterizados pela presença de cinco à sete motivos de anquirina que medeiam a ligação ao domínio de dimerização de NF- κ B (Hatada et al., 1992). As proteínas I κ B interagem com RHD de NF- κ B mascarando a sua sequência de localização nuclear, inibindo, portanto, o seu transporte ao núcleo e a ligação de NF- κ B ao DNA (Bonizzi & Karin, 2004). Em particular, estruturas cristalográficas de I κ B α e I κ B β ligado aos dímeros p65/p50 ou p65/c-Rel revelou que a proteína I κ B β mascara somente a sequência de localização nuclear de p65, enquanto p50 permanece acessível (Huxford et al., 1998, Jacobs & Harrison, 1998, Malek et al., 2003).

A degradação de I κ B trata-se de um evento estritamente regulado e iniciado através da fosforilação específica realizada por cinases de I κ B (IKK, do inglês *I κ B kinase*). O complexo IKK é composto por um trio de cinases formados pelas subunidades IKK α e IKK β e pela subunidade reguladora IKK γ , também chamada modulador essencial de NF- κ B (NEMO, do inglês *NF- κ B modulador essencial*) (Moynagh, 2005). Durante a resposta inflamatória, a ativação de um receptor específico na superfície celular leva a ativação de IKK que por sua vez fosforila o I κ B α levando à sua ubiquitinação. I κ B α ubiquitinada é degradada pelo proteassomo 26S, induzindo a translocação nuclear do dímero RelA:p50 (Karin & Ben-Neriah, 2000). Esse processo também ocorre pelos complexos associados ao I κ B β e I κ B ϵ .

Na via clássica de sinalização de NF- κ B, o complexo IKK é necessário e suficiente para a fosforilação de I κ B α nos resíduos serina 32 e 36, e I κ B β nos resíduos serina 19 e 23 (Hayden & Ghosh, 2004). Geralmente, os estímulos celulares utilizando LPS e citocinas ativam o IKK β , dita via canônica, comum para os dímeros com Rel-A, c-Rel e p50 (Rothwarf & Karin, 1999). Outra via menos comum, denominada de alternativa, é ativada por alguns membros da família do TNF, como CD40L, LT $\alpha\beta$, RANKL, BAFF, e tem um mecanismo de regulação diferente da via clássica. Tal via está envolvida com a formação dos órgãos linfóides e com o desenvolvimento e sobrevivência das células B (Karin & Ben-Neriah, 2000).

Ativadores do complexo IKK incluem as cinases MAP3Ks (do inglês, *mitogen-activated protein kinase kinase kinases*), tais como MEKK1, MEKK3 e TAK1. Ambas as cinases representam um ponto de convergência para numerosos estímulos, incluindo ligantes

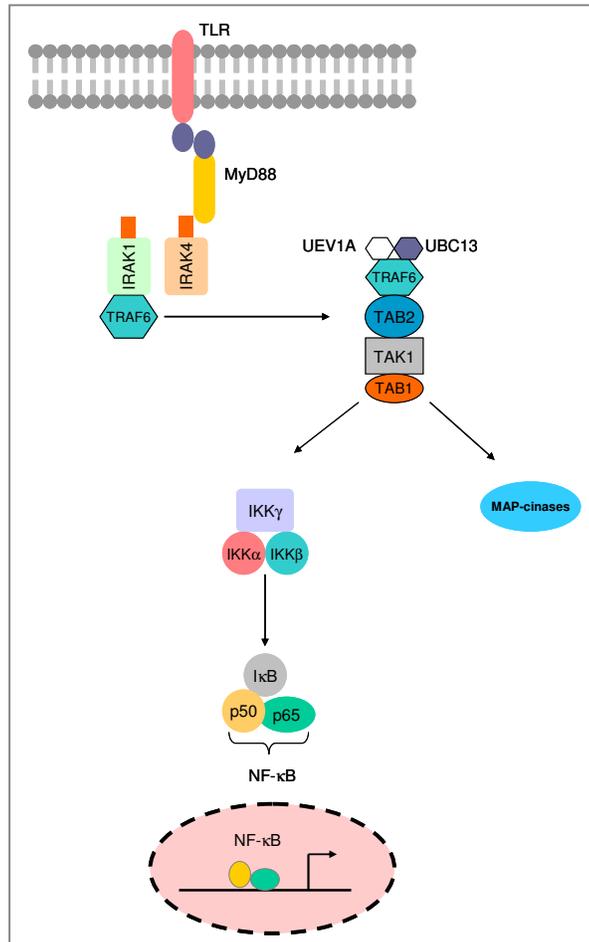
para os receptores Toll, os receptores IL-1/IL-18, a superfamília de receptores TNF e os receptores de células B e T (Moynagh, 2005).

As inúmeras vias de sinalização que medeiam a ativação de NF- κ B procedem através da ativação de IKK, degradação de I κ B, e aumento da atividade de NF- κ B. No entanto, existem particularidades em fundamentais aspectos dessas vias (Hoffmann et al., 2003).

1.4.1 Ativação de NF- κ B via os receptores do tipo Toll

A regulação de respostas transcricionais mediante diferentes estímulos é uma importante propriedade do sistema imune de mamíferos. O NF- κ B regula a expressão de citocinas, fatores de crescimento e enzimas efetoras em resposta à ligação de receptores envolvidos na imunidade, incluindo os receptores de células B (BCRs, do inglês *B-cell receptors*), TNF, CD40, e os receptores do tipo Toll dentre outros. Alguns membros da família dos TLRs sofrem heterodimerização e são capazes de ampliar o reconhecimento de moléculas (Hayden & Ghosh, 2004).

A sinalização de TLRs é iniciada quando ocorre a ligação de um PAMP ao seu respectivo TLR, como já descrito anteriormente. Esse receptor se dimeriza e recruta moléculas adaptadoras citossólicas através do domínio TIR. A primeira proteína adaptadora a ser recrutada é MyD88, a qual contém um domínio TIR que provavelmente se liga ao domínio TIR do TLR. Após a ligação, MyD88 recruta as cinases IRAK4 (do inglês, *IL-1R-associated kinase 4*) e IRAK1 (do inglês, *IL-1R-associated kinase 1*). Após a dissociação com MyD88, IRAK1 é fosforilada por IRAK-4, e induz a ativação do fator 6 associado ao receptor do fator de necrose tumoral – TRAF6 (TRAF6, do inglês *TNF receptor-associated factor 6*). Em seguida TRAF6 ativa um complexo formado pela cinase TAK1 (do inglês, *transforming growth factor- β activated protein Kinase 1*) e pelas proteínas ligadas à TAK1, como TAB1, TAB2, TAB3 (do inglês, *TAK1-binding protein*). Esse complexo, então fosforila IKK β e a MAP cinase cinase 6 (MKK6, do inglês *Mitogen-activated protein kinase kinase 6*), que modulam a ativação do NF- κ B e MAPcinases, respectivamente, o que resulta na indução de genes envolvidos nas respostas inflamatórias (Akira et al., 2006b). A Figura 6 representa a sinalização de TLRs descrita acima.



Baseado em: Kawai & Akira (2007)

Figura 6: Via de sinalização dos TLRs mediada por MyD88. A ativação dos TLRs induz a associação de MyD88, o qual recruta IRAK4 permitindo a associação com IRAK1. Assim, IRAK4 induz a fosforilação de IRAK1 e permite a interação com TRAF6. Posteriormente, IRAK1 que está fosforilada juntamente com TRAF6 se dissociam do receptor e formam um complexo com TAK1, TAB1 e TAB2 na membrana plasmática, o que induz a fosforilação de TAB2 e TAK1. IRAK1 é degradada na membrana plasmática e o complexo se desloca para o citossol, onde se associa com as ubiquitinas ligases UBC13 e UEV1A. Após, TRAF6 é ubiquitinilado gerando a ativação de TAK1, a qual fosforila tanto MAP-kinases quanto o complexo IKK γ . Em seguida, IKK γ fosforila I κ B permitindo sua ubiquitinação e degradação, o que resulta na liberação do NF- κ B para o núcleo e indução da transcrição de genes alvo.

A sinalização celular ativada através do TLR2 ou TLR4 requer um outro adaptador, o MAL/TIRAP, que é importante para o recrutamento de MyD88 ao domínio TIR do receptor.

A ativação dos receptores TLR3 ou TLR4, mas não dos outros TLRs, induz a produção dos interferons do tipo I, especificamente do IFN- β , além de sinais pró-inflamatórios. Essa via independente de MyD88 é iniciada por TRIF, o qual interage com a proteína de interação com receptor-1 (RIP1), responsável pela ativação de NF- κ B (Moynagh, 2005)

O TLR4, além de sinalizar pela via dependente de MyD88, também sinaliza simultaneamente por uma via independente de MyD88. Dessa forma, o TLR4 ao ser reconhecido pelo agonista recruta a proteína TRAM que também contém o domínio TIR, o qual interage com o TIR de TLR4 (Kawai & Akira, 2006). Posteriormente, ocorre a interação de TLR4 com uma outra proteína que também apresenta o domínio TIR, a TRIF. Após, TRIF leva à ativação do complexo TBK1/IKK ϵ , o qual fosforila o fator regulador de interferon 3 (IRF3, do inglês *Interferon regulatory factor 3*). Assim, promovem a ativação de IRF3, conseqüente dimerização e translocação para o núcleo, onde se liga à região promotora do gene de IFN- β (Yamamoto et al., 2003).

A sinalização mediada por TLR3 interage diretamente com TRIF, induzindo à síntese de interferon- β (IFN- β) através do fator de transcrição IRF3 (Hemmi et al., 2004).

1.4.2 Ativação de NF- κ B via TNF

A diversificada superfamília de receptores TNF e seus ligantes medeiam uma variedade de respostas biológicas, regulando a ativação de fatores de transcrição, tais como o NF- κ B e AP-1 (Aggarwal, 2003).

A ligação do TNF ao seu receptor TNF-R1 na superfície da célula dispara a trimerização dos receptores e a liberação de uma proteína inibidora denominada SODD (do inglês, *Silencer of death domain*), a partir do domínio intracelular do receptor de TNF. O domínio intracelular exposto é reconhecido por um domínio de morte (DD, do inglês *Death domain*) presente na proteína adaptadora TRADD (do inglês, *TNFR1-associated death domain protein*). Posteriormente, TRADD recruta FADD (do inglês, *Faz associated death domain*), TRAF2 (do inglês, *TNF-R1 associated factor 2*) e RIP1 (do inglês, *Receptor interacting protein 1*), que interagem com os elementos logo abaixo na via de sinalização. O recrutamento de TRAF2 leva à ativação de TAK1 e suas subunidades reguladoras, como TAB1, TAB2 e TAB3. Esse complexo fosforila IKK α e leva à fosforilação, dissociação e ubiquitinação de I κ B α , seguida da fosforilação de p65 e conseqüente translocação de NF- κ B (heterodímero p65/p50) para o núcleo (Moynagh, 2005).

1.4.3 Regulação negativa da atividade transcrricional de NF- κ B

Os principais reguladores do NF- κ B são os I κ Bs. Por exemplo, I κ B α recém sintetizado entra no núcleo, onde ele associa com o dímero RelA:p50 ligado ao DNA levando à sua inativação e exportação para o citoplasma (Arenzana-Seisdedos et al., 1997). Isso forma uma retro-alimentação negativa que impede a ativação irreversível de NF- κ B. Além disso, já foi demonstrado que depois da ativação inicial induzida por citocinas inflamatórias ou estímulo microbiano, RelA associado à região promotora do DNA é marcado para degradação no proteossoma e assim finaliza a sinalização via NF- κ B (Natoli & Chiocca, 2008). Outros estudos descrevem uma E3 ubiquitina ligase (COMMD1, do inglês *Copper metabolism gene MURR1 domain*), também envolvida na degradação nuclear de RelA (Ganesh et al., 2003). Acrescentando ainda a complexidade dessa regulação negativa, uma proteína com domínio LIM (PDLIM2, do inglês *LIM domain protein*) também promove a degradação de RelA nuclear, via ubiquitinação, em resposta a sinais inflamatórios (Tanaka et al., 2007).

Outras proteínas também exibem um papel regulador negativo sobre a ativação de NF- κ B. Por exemplo, a proteína A20 foi originalmente identificada como uma proteína induzida por TNF que exibe um papel inibidor sobre a ativação de NF- κ B e morte celular (Song et al., 1996, Coornaert et al., 2009). Outros estudos demonstraram que a proteína TRIM30a, a qual regula importantes respostas biológicas, tais como a diferenciação e proliferação, também regula negativamente a ativação de NF- κ B induzida pela sinalização de TLRs. Tal mecanismo de inibição demonstrou estar relacionado com a regulação de TRIM30a na degradação de TAB2 e TAB3 (Shi et al., 2008). Recentemente, Cui et al. (2010) observaram que a proteína NLRC5, um membro da família de proteínas NOD, atua como um potencial regulador negativo da ativação de NF- κ B e IRF-3. Particularmente, NLRC5 inibe a resposta de NF- κ B por interagir e bloquear a fosforilação de IKK α e IKK β .

2. Objetivos

Uma vez que RasGEF1b é uma proteína de localização endossômica e de expressão induzida na resposta imune inata mediada por TLRs, tivemos como objetivo geral avaliar o efeito do ganho-de-função de RasGEF1b e seus domínios sobre a ativação de NF- κ B induzida na resposta inflamatória. Para atingir este objetivo primário, traçamos os seguintes objetivos específicos:

1. Determinar a função de RasGEF1b sobre a ativação de NF- κ B mediada por componentes da sinalização da resposta imune inata de receptores do tipo Toll (TLRs).
2. Clonar os domínios amino e carboxi-terminal do RasGEF1b em fusão ao peptídeo FLAG e examinar o papel sobre a ativação de NF- κ B mediada por componentes da sinalização da resposta imune inata de TLRs.
3. Clonar os domínios amino e carboxi-terminal do RasGEF1b em fusão com a proteína verde fluorescente, e examinar sua distribuição celular.
4. Determinar se RAP2A, o potencial efetor de RasGEF1b, exerce funções similares sobre a ativação de NF- κ B.

3.1 Células

Neste estudo, foram utilizadas células HEK293T e HEK293A. As células HEK293T e HEK293A são linhagens imortalizadas de células epiteliais de rim de embrião humano contendo o antígeno T do vírus simian SV40 ou o antígeno tipo 5 de adenovírus, respectivamente. Essas células são amplamente utilizadas em ensaios de transfecção devido à sua alta permissividade. Para o seu cultivo, essas células eram retiradas do estoque de nitrogênio líquido e, então, descongeladas em banho de água a 37° C. A suspensão celular era plaqueada em uma garrafa estéril de cultura de células (Falcon, 25 cm²), contendo meio DMEM (Meio Eagle Modificado Dulbecco's-Hyclone), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), estreptomicina (100ug/ml)/ penicilina (500U/mL, Invitrogen) e incubada em estufa a 37°C, em atmosfera de 5% CO₂. Após 4 horas, o meio era renovado com a finalidade de desprezar células não viáveis e que não aderiram à superfície do frasco. Ao atingirem 80-90% de confluência nos dias subsequentes, era realizada a passagem para um outro frasco estéril (Falcon, 75 cm²) para a manutenção. Para realizar as passagens, o meio de cultura era desprezado do frasco, e a monocamada de células era então lavada com PBS 1X (NaCl 140mM; Na₂HPO₄ 10mM; KH₂PO₄ 1Mm; KCl 2 mM). Em seguida, eram adicionados 1 a 2 mL de solução de Tripsina (0,25%)-EDTA por frasco, o qual era então incubado a 37°C por 2 minutos. Posteriormente, as células eram ressuspensas em meio completo fresco e transferidas para novos frascos na razão desejada (1:5, 1:10 por exemplo).

Para o congelamento, as células apresentando 90-100% de confluência eram lavadas em PBS e tripsinizadas como descrito acima, sendo posteriormente ressuspensas em meio de congelamento contendo 40% soro fetal bovino em DMEM. Isso resultou numa suspensão à qual foi adicionado DMSO (SIGMA), gota a gota e sob agitação leve e constante, para atingir concentração final 10%. Um mililitro e meio da suspensão foram colocados em tubos de congelamento (Corning), foram transferidos para freezer a -70°C e, posteriormente, foram estocados em botijão de nitrogênio líquido a -196°C.

3.2 Plasmídeos

Estão listados na Tabela 1 os plasmídeos utilizados neste estudo.

Tabela 1: Plasmídeos utilizados neste estudo

Plasmídeos	Informações
pFLAG-RasGEF1b	RasGEF1b clonado em pFLAG-CMV2 em fusão com FLAG na porção amino-terminal
pcDNA3.1-RasGEF1b-YFP	RasGEF1b clonado em pcDNA3-YFP em fusão com YFP na porção carboxi-terminal
pGL3-E-Selectina	Contem o gene da luciferase de vaga-lume (<i>Pluc</i>) sob controle transcricional do promotor do gene E-selectina regulado por NF- κ B
pRL-TK	Contem o gene da luciferase de <i>Renilla</i> (um celenterado) sob o controle do promotor do gene da timidina quinase do virus HSV (neste promotor ligam-se fatores transcricionais eucarióticos)
pGL2-503	Contem o gene <i>Pluc</i> sob controle transcricional do promotor do gene de PKR
pCIneo-Myc-RAP2A	RAP2A clonado em pCI-Neo em fusão com o epitopo Myc na porção amino-terminal
pFLAG-Mal/TIRAP	Mal/TIRAP clonado em pcDNA3.1 em fusão com o epitopo FLAG na porção amino-terminal
pFLAG-TAK1	TAK1 clonado em pcDNA3.1 em fusão com epitopo FLAG na porção amino-terminal
pFLAG-TAB1	TAB1 clonado em pcDNA3.1 em fusão com epitopo FLAG na porção amino-terminal
pFLAG-p65	p65/RelA clonado em pcDNA3.1 em fusão com epitopo FLAG na porção amino-terminal
pFLAG-RasGEF1b- $\Delta_{-168-474}$	Dominio aminoterminal de RasGEF1b clonado em pFLAG-CMV4 em fusão com polipeptideo FLAG na porção amino-terminal
pFLAG-RasGEF1b- Δ_{-1-167}	Dominio carboxiterminal de RasGEF1b clonado em pFLAG-CMV4 em fusão com polipeptideo FLAG na porção amino-terminal
pEGFP-RasGEF1b- $\Delta_{-168-474}$	Dominio aminoterminal de RasGEF1b clonado em pEGFP-N1 em fusão com polipeptideo GFP na porção carboxi-terminal
pEGFP-RasGEF1b- Δ_{-1-167}	Dominio carboxiterminal de RasGEF1b clonado em pEGFP-N1 em fusão com polipeptideo GFP na porção carboxi-terminal
pEF-BOS-FLAG	Contém o promotor do gene humano EF-1 α e apresenta dois epítomos de FLAG para expressão em fusão à região amino-terminal de um polipeptídeo de interesse

3.3 Oligonucleotídeos

Iniciadores específicos foram sintetizados para a amplificação dos domínios amino e carboxi-terminal do RasGEF1b. Os iniciadores RGF-K-ECO1F e RGF-Age-501R foram utilizados para a amplificação do domínio amino-terminal, e o RGF-K-ECO502F e RGF-Age-1422R foram utilizados para a amplificação do domínio carboxi-terminal. Esses domínios foram clonados no plasmídeo pEGFP-N1 (Biosciences Clontech), gentilmente cedido pelo Dr. Geraldo Santana Magalhães, Instituto Butantã, São Paulo, SP. Paralelamente, foi conduzida também a clonagem desses mesmos domínios no plasmídeo pFLAG-CMV4. Para a amplificação do domínio amino-terminal, foram utilizados os iniciadores Kozak-RasGEF1b (HindIII) e Eco501R, ao passo que os iniciadores Eco502F e Xba-RasGEF1b-Stop foram utilizados para a amplificação do domínio carboxi-terminal.

Acima de cada sequência nucleotídica correspondente a RasGEF1b murino dos iniciadores RGF-K-ECO1F, RGF-K-ECO502F e Kozak-RasGEF1b foi incluída a sequência consenso máxima de Kozak (5'CCACCATGG3') (Kozak, 1984) para conferir tradução eficaz do mRNA. Além disso, nas sequências dos iniciadores foram acrescentadas em suas extremidades 5' uma das seguintes sequências de restrição: *EcoRI* - GAATTC, *AgeI* - ACCGGT, *HindIII* - AAGCTT, *Xba* - TCTAGA e *XhoI* - CTCGAG. A sequência de RasGEF1b murino sob o número de acesso BC052726 no GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank) foi utilizada para o desenho dos iniciadores.

As sequências dos iniciadores utilizados nas reações de amplificação das regiões codificadoras do gene *rasgef1b* murino estão representadas na Tabela 2. A sequência dos sítios de restrição estão sublinhadas.

Tabela 2: Sequências de iniciadores

Iniciador	Sequência
RGF-K-ECO1F	5'- <u>GGAATTC</u> CACCATGGCTCAGACGC -3'
RGF-Age-501R	5'- TCCC <u>ACCGGT</u> AGGGCGGCGAGTTTT C -3'
RGF-K-ECO 502F	5'- <u>GGAATTC</u> CACCATGGCTAGCCAGTAT -3'
RGF-Age-1422R	5'- TCCC <u>ACCGGT</u> ACTCTGCCCAAAG -3'
Kozak-RasGEF1b (HindIII)	5'- CCC <u>AAGCTT</u> GGGACCATGGCTCAGACGCC -3'
Eco501R	5'- <u>GGAATTC</u> CAGAGGGCGGCGAGTTTT C -3'
Eco502F	5'- <u>GGAATTC</u> CAGCCAGTATGAGGAAGTC -3'
Xba-RasGEF1b-Stop	5'- GCT <u>CTAGAGCTT</u> AAACTCTGCCC -3'

Observação: As seqüências das enzimas de restrições estão sublinhadas na tabela acima.

3.4 Clonagem

3.4.1 Amplificação por PCR

Para a amplificação dos domínios de RasGEF1b, foi utilizado um nanograma do plasmídeo pFlag-RasGEF1b (Dall'Orto, 2007), clonado no vetor pFLAG-CMV2 (Sigma), que serviu de molde para a reação de PCR. Também foram utilizados 0,125 µL da enzima Taq DNA polimerase (Phoneutria), 2,5 µL de Tampão IO 10X (Phoneutria), 0,75 µL de MgCl₂ 50mM (Phoneutria), 0,5 µL de dNTP 10mM, 1,25 µL de cada um dos iniciadores descritos na Tabela 1. Foram acrescentados também 16,625 µL de H₂O milli-Q autoclavada. O volume final da reação foi de 25 µL. As reações foram realizadas em um termociclador seguindo o programa:

Passo 1: desnaturação (94 °C por 4 minutos)

Passo 2: desnaturação (94 °C por 30 segundos)

Passo 3: anelamento (30 segundos a 60 °C ou 55 °C, dependendo do par de iniciadores)

Passo 4: extensão (72 °C por 1 minuto e 45 segundos)

Passo 5: extensão final (72 °C por 5 minutos)

Os respectivos iniciadores utilizados na amplificação e os vetores nos quais os fragmentos foram clonados e subclonados estão listados na Tabela 3.

Tabela 3: Combinação de iniciadores e vetores utilizados nas clonagens

Iniciadores	Vetores utilizados para clonagem e subclonagem	Finalidade
RGF-K-ECO1F + RGF-Age- 501R <i>Domínio amino-terminal RasGEF1B</i>	pGEM-T / pEGFP-N1	Localização
RGF-K-ECO502F + RGF-Age-1422R <i>Domínio carboxi-terminal RasGEF1B</i>	pGEM-T / pEGFP-N1	Localização
Kozak-RGF1b (HindIII)+ Eco501R <i>Domínio amino-terminal RasGEF1B</i>	pGEM-T / pFLAG-CMV4	Superexpressão
Eco502F+ Xba-RasGEF1b-Stop <i>Domínio carboxi-terminal RasGEF1B</i>	pGEM-T / pFLAG-CMV4	Superexpressão

Os produtos de amplificação foram submetidos ao fracionamento eletroforético em gel de agarose 1%. Após a adição de tampão 1X Loading Buffer, os fragmentos foram fracionados no gel em TAE 1X (0,04 M Tris-acetato, 0,001 M / EDTA) contendo brometo de etídeo (0,5 µg/mL). A eletroforese foi realizada a 85 volts. Os DNAs fracionados em gel foram observados em luz ultravioleta (UV).

3.4.2 Ligação de insertos em vetor com extremidade 3' - T livre

Anteriormente à ligação em vetor de expressão eucariótica, os insertos RasGEF1b (amino e carboxi-terminal) amplificados por PCR, foram ligados no vetor pGEM-T (Promega). Para isso, foi preparado uma solução contendo 1 µL do vetor pGEM-T, 3 µL de inserto RasGEF1b (amino e carboxi-terminal), separadamente, 5 µL de tampão 1X e 1 µL de T4 DNA Ligase (fornecido pelo Kit). A solução era misturada gentilmente e incubada por 60 minutos a temperatura ambiente.

3.4.3 Digestão com enzimas de restrição e defosforilação em vetores

Alíquotas dos plasmídeos e insertos, separadamente, eram adicionadas a uma mistura em água milli-Q contendo BSA1X, tampão específico e enzima de restrição específica para cada inserto e ou vetor correspondente. Estão listados na tabela 4 os insertos e ou vetores com os respectivos tampões e enzimas utilizados nas digestões.

Tabela 4: Relação de tampão e enzima de restrição utilizada para cada inserto e ou vetor

Inserto	Vetor	Tampão	Enzima de restrição
RasGEF1b (amino e carboxi-terminal) digerido a partir de pFLAG-CMV2-RasGEF1b	pEGFP-N1	Tampão I (Biolabs) e Tampão H (Promega)	<i>AgeI</i> (Biolabs) e <i>EcoRI</i> (Promega)
RasGEF1b (amino-terminal) digerido a partir de pFLAG-CMV2-RasGEF1b	pFLAG-CMV4	Tampão H e Tampão E (Promega)	<i>EcoRI</i> e <i>HindIII</i> (Promega)
RasGEF1b (carboxi-terminal) digerido a partir de pFLAG-CMV2-RasGEF1b	pFLAG-CMV4	Tampão H e Tampão D (Promega)	<i>EcoRI</i> e <i>Xba</i> (Promega)

As soluções eram incubadas a 37° C por 90 minutos. Após a primeira digestão, era realizada a inativação da enzima a 65° C por 15 minutos e, então, era adicionada a cada amostra a outra mistura em água milli-Q contendo novamente, BSA 1X, tampão específico e enzima de restrição específica para cada inserto e ou vetor correspondente. As soluções eram incubadas por mais 90 minutos a 37° C. Para os vetores, era realizado também o procedimento de defosforilação que constava em adição da enzima fosfatase alcalina intestinal de novilho (CIAP, do inglês *Calf Intestinal Alkaline Phosphatase*) (Promega), seguido da incubação a 37° por 30 minutos e após era repetido o procedimento de adição da enzima e posterior incubação a 37° C por mais 30 minutos. Em seguida, as amostras eram fracionadas em gel de agarose para análise.

3.4.4 Extração e Purificação

Após a digestão dos plasmídeos e insertos listados na sessão anterior, as amostras eram extraídas do gel de agarose e purificado através do Kit “QIAquick® Gel Extraction Kit” (Qiagen). O fragmento era visualizado através de transiluminômetro de luz ultravioleta, excisado rapidamente do gel, transferido para um tubo de 15 mL e pesado. Em seguida, era adicionada solução tampão QG e a mistura era incubada a 50° C por 10 minutos até a dissolução completa dos fragmentos de gel. A amostra era aplicada à uma minicoluna de purificação (fornecida pelo kit), centrifugada a 17900 x g por 1 minuto e o conteúdo passado através da coluna era descartado. Posteriormente, eram adicionados 750 µL de solução tampão de lavagem PE à coluna e a mesma era incubada durante 5 minutos seguido de centrifugação a 17900 x g por 1 minuto. Novamente, o conteúdo passado através da coluna era descartado e uma centrifugação adicional era realizada. A coluna era transferida para outro tubo novo de microcentrífuga e eram adicionados 50 µL de solução tampão de eluição EB (Tris-Cl 10 mM pH 8,5) no centro da coluna. A amostra era centrifugada a 17.900 x g por 1 minuto, a coluna descartada e o conteúdo passado através desta estocado a -20° C.

3.4.5 Ligação de insertos em vetores de expressão eucariótica

Posteriormente à amplificação, foram realizadas as ligações utilizando o Kit de ligação (Invitrogen). Para isso, utilizou-se de 25 a 40 ng dos insertos e 100 ng de vetor. Em seguida, eram adicionados 4 µL tampão de ligação 1X e 1 µL de T4 DNA Ligase previamente diluídos em água milli-Q. As amostras eram incubadas por 60 minutos a temperatura ambiente.

3.4.6 Transformação bacteriana

A obtenção de bactérias *E.coli* XL1-Blue quimiocompetentes foi realizada de acordo com (Inoue et al., 1990) da seguinte forma: cerca de 260 mL de cultura com OD₆₀₀ igual a 0,52 foi centrifugada a 3500 RPM por 15 minutos a 4°C, e ressuspendido cada pellet em 12 mL de tampão de transformação gelado (10mM Pipes, 55mM MnCl₂, 15mM de CaCl₂, 250mM KCl). As células foram centrifugadas novamente a 3500 RPM e ressuspendido novamente cada pellet em 9,3 mL de tampão de transformação gelado. Juntou-se todo o

conteúdo de ressuspensão e sob agitação foi adicionado às células 1,4 mL de DMSO. As células foram incubadas a 10 minutos em gelo e posteriormente foram feitas alíquotas de 200 µL de cultura, as quais foram estocadas a nitrogênio líquido. Após, era realizada uma transformação dessas bactérias com o plasmídeo pUC19 a título de checagem da eficiência de transformação.

Previamente ao início da transformação, os tubos de bactérias quimiocompetentes eram retirados do nitrogênio líquido e colocados em banho de gelo. Após o descongelamento, cada transformação era realizada incubando 100 µL de bactéria com o plasmídeo de interesse, por 30 minutos em gelo, seguido de choque térmico em banho de água a 37°C por 30 segundos e incubação novamente em gelo por 2 minutos. Em seguida, eram adicionados 1 mL de meio LB (Triptona 10g/L; NaCl 5 g/L; extrato de levedura 5 g/L) sem antibiótico e a solução era incubada sob agitação por 1 hora a 37°C. Após a incubação, as culturas eram centrifugadas a 8000 RPM durante 3 minutos, e então era desprezado o sobrenadante e o sedimento era ressuspensão em 100 µL de meio LB. O volume da ressuspensão era totalmente plaqueado em placas de petri contendo ágar a 1,5% preparado em meio LB e ampicilina a 100 µg/mL. As placas eram incubadas em posição da tampa para baixo e mantidas em estufa a 37°C por 16 horas.

As colônias resultantes do plaqueamento eram escolhidas aleatoriamente e individualmente inoculadas em 4 mL de meio LB contendo ampicilina (100 µg/mL) ou Kanamicina (30 µg/mL). O inóculo era incubado em shaker a 37°C durante 16 horas.

3.4.7 Obtenção em pequena escala (Miniprep) de DNA plasmidiano

Colônias resultantes do plaqueamento eram escolhidas aleatoriamente e individualmente inoculadas em 4 mL de meio LB contendo ampicilina (100 µg/mL) ou Kanamicina (30 µg/mL). O inóculo era incubado em shaker a 37° C durante 16 horas. O procedimento de extração do DNA plasmidiano era realizado utilizando o kit “Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System” (Promega). Para isso, 1,5 mL da cultura eram transferidos para tubos de microcentrífuga e centrifugados a 10.000 x g por 5 minutos à temperatura ambiente. O sobrenadante era desprezado e o sedimento obtido era solubilizado em 250 µL de solução de ressuspensão celular (Tris-HCL 50 mM pH 7,5; EDTA 10 mM; RNase 100 µg/mL). Em seguida, eram adicionados 250 µL de solução de lise celular (NaOH

0,2 M; SDS 1%) seguido de inversão por 4 vezes e incubação a temperatura ambiente por 5 minutos. Posteriormente, eram adicionados 350 µL de solução de neutralização (Guanidina-HCL 4,09 M; acetato de potássio 0,759 M; ácido glacial acético 2,12 M) e imediatamente o conteúdo era invertido 4 vezes. O tubo era centrifugado a 14.000 x g por 10 minutos a temperatura ambiente e o sobrenadante transferido para uma minicoluna de purificação (fornecida pelo Kit). Após centrifugação a 14.000 x g por 1 minuto a temperatura ambiente, o conteúdo passado através da coluna era descartado e à coluna eram adicionados 750 µL de solução de lavagem (acetato de potássio 162,8 mM; Tris-HCl 22,6 mM pH 7,5; EDTA 0,109 M pH 8,0 – preparado em solução de etanol). O conteúdo era centrifugado a 14.000 x g durante 1 minuto a temperatura ambiente e uma lavagem adicional com 250 µL da mesma solução era realizada a 14.000 x g por 2 minutos. A coluna era transferida para outro tubo novo de microcentrífuga e o DNA eluído através de adição de 100 µL de tampão TE (Tris-HCl 10 mM pH 7,5; EDTA 1 mM) no centro da coluna. Após 2 minutos era realizada centrifugação a 14.000 x g por 1 minuto a temperatura ambiente, a coluna era descartada e o DNA acondicionado a -20° C.

3.4.8 Obtenção em média escala (Midiprep) de DNA plasmidiano

Para realizar esse procedimento, cinquenta microlitros da suspensão bacteriana eram inoculados em 50 mL de meio LB com ampicilina (50 µg/mL) ou kanamicina (30 µg/mL) e eram cultivadas por 16 horas a 37°C sob agitação. O DNA plasmidiano era extraído através do Kit “GenElute™ HP Plasmid Midiprep” (Sigma). O inóculo era transferido para tubos de 50 mL e eram centrifugados a 5.000 x g durante 10 minutos, e os sobrenadantes foram desprezados. Em seguida, era adicionado ao sedimento 4 mL da solução de ressuspensão celular, e foi completamente ressuspendido. Posteriormente, foi adicionado ao conteúdo 4 mL de solução de lise e o mesmo era invertido por 6 a 8 vezes, e era incubado à temperatura ambiente de 3 a 5 minutos até ficar claro e viscoso. Em seguida, era adicionado 4 mL de solução de neutralização resfriada e misturado gentilmente, invertendo o tubo de 4 a 6 vezes. Após formar um agregado branco, eram adicionados 3 mL da solução de ligação e o tubo era invertido de 1 a 2 vezes. A solução era colocada no barril de uma seringa e ficou incubada durante 5 minutos. Posteriormente, era adicionado 4 mL de solução de preparação da coluna e centrifugado a 2739 x g por 2 minutos e após era descartado o eluato. Após, era despejada a

solução contida na seringa à coluna e centrifugada a 2739 x g por 3 minutos. Assim que escozreu a solução, a coluna era lavada com 4 mL da solução de lavagem 1 e, posteriormente, com a solução de lavagem 2, e era deixado escozrer. Após as lavagens, era adicionada à coluna 1 mL de solução de eluição e após centrifugado a 2739 x g por 7 minutos. As amostras eram estocadas em freezer -20°C. Era utilizado o nanodrop para a quantificação do DNA, e a quantidade era calculada em µg/µL.

3.5 Sequenciamento

Duzentos e cinquenta nanogramas dos plasmídeos que foram construídos neste estudo foram utilizados para sequenciamento com os seus respectivos iniciadores no sequenciador automático Mega BACE 1000 DNA Analysis System no Núcleo de Análise de Genoma e Expressão Gênica (NAGE, ICB-UFMG). As sequências nucleotídicas foram comparadas à sequências existentes no banco de dados GenBank através do programa “Basic Local Alignment Search Tool” (BLAST) contido no “National Center of Biotechnology Information” (NCBI) (www.ncbi.nlm.nih.gov/).

3.6 Transfecção

3.6.1 Método fosfato de cálcio (Chen & Okayama, 1987)

No dia anterior à transfecção, células HEK293T, apresentando 90 a 100% de confluência, crescendo em placas de cultura de 10 cm² de área, eram lavadas em PBS 1X, tripsinizadas e repicadas na proporção 1:12, de modo a obter confluência em torno de 8-12% no dia da transfecção. Quatro horas antes da transfecção o meio das células era retirado e substituído por meio DMEM completo fresco. Para cada placa de 60 cm² o protocolo era realizado da seguinte forma: em um tubo de microcentrífuga, a quantidade desejada de DNA (variando de 5 a 10 µg) era misturada à 450 µL de água milli-Q autoclavada e estéril. Em seguida, eram adicionados 50 µL de CaCl₂ 2,5 M seguido de nova homogeneização. Em um tubo de 14 mL eram adicionados 500 µL de HeBS 2X (NaCl 0,28 M; Hepes 0,05 M; NaH₂PO₄ 1,5 mM) e sobre vortex baixo (30% da força máxima) e constante a solução de

DNA/CaCl₂ era gotejada ao tubo seguido de um vortex máximo por 2 segundos. Após incubação à temperatura ambiente por 20 minutos, a solução era gotejada por toda a placa, sendo finalmente inclinada por algumas vezes para distribuição homogênea da solução transfectante. As placas eram então incubadas em estufa a 37° C, 5% CO₂ por 24 horas. No dia seguinte, o meio era removido, e a monocamada lavada com monocamada lavada com PBS 1X a 37° C por 2 vezes. Meio DMEM completo e fresco era então adicionado às placas e as mesmas incubadas em estufa a 37° C, 5% CO₂, por mais 24 horas.

3.6.2 Método polímero catiônico

No dia anterior à transfecção, células HEK293T e ou HEK293A, apresentando 90 a 100% de confluência, crescendo em garrafas de cultura de 75 cm² de área, eram lavadas em PBS 1X, tripsinizadas e repicadas na proporção 1:5, de modo a obter confluência em torno de 85-90% no momento da transfecção. Para placa de 12 poços, o protocolo era realizado da seguinte maneira: em um tubo de microcentrífuga de 1,5 mL a quantidade desejada de DNA era misturada a 100 µL de meio livre de soro (SFM) DMEM. Em seguida, era adicionado à mistura o reagente de transfecção PEI ((5:1) cinco microlitros de PEI para cada micrograma de DNA) seguido de vigoroso vortex durante 10 segundos. A mistura era incubada à temperatura ambiente por 10 minutos. Posteriormente, eram adicionados à mistura 200 µL de meio completo (10% SFB-DMEM). A solução era misturada gentilmente seguida de breve centrifugação. Em seguida, era desprezado o meio da placa de 12 poços e o mesmo era substituído por 500 µL por well de meio completo fresco (10% SFB-DMEM). Após, era adicionada a mistura de transfecção às células, gotejando por toda a extensão do well, sendo inclinada a placa por algumas vezes para distribuição homogênea da solução transfectante. A placa era então incubada em estufa a 37°C, 5% CO₂, e era guardado o tempo mínimo de 24 horas para obtenção de extrato celular.

3.6.3 Método lipossomo

Para a transfecção mediada por lipossomo, os procedimentos eram realizados de acordo com as especificações do fabricante (LipofectaminaTM 2000, Invitrogen). No dia

anterior, as células HEK293A eram plaqueadas em placas de 24 wells de modo a obter no dia da transfecção confluência em torno de 90 a 95%. As transfecções eram realizadas utilizando o meio DMEM sem soro acrescentado dos plasmídeos específicos e a Lipofectamina. Para cada 1 µg de DNA eram utilizados 2 µl de Lipofectamina. O DNA era diluído em 50 µL de meio DMEM e a solução era misturada gentilmente. Em seguida prosseguia com a diluição da Lipofectamina em 50 µL de meio DMEM e incubava-se por 5 minutos a temperatura ambiente. Após o tempo de incubação, combinava-se as misturas de DNA e Lipofectamina (totalizando 100 µL), seguido por incubação por 20 minutos à temperatura ambiente. Após a incubação, o volume de 100 µL do complexo DNA/Lipofectamina era distribuído por toda a extensão do well, sendo inclinada a placa por algumas vezes para distribuição homogênea da solução transfectante. As células eram incubadas com o meio de transfecção por 22 horas à 37°C. Após a transfecção prosseguia-se com o experimento.

3.7 Microscopia de fluorescência

A microscopia de fluorescência foi realizada em células HEK293A vivas e, para isso, a cultura foi crescida em placas de 24 wells sob lamínulas de vidro circulares de 13mm de espessura previamente tratadas com Poli-L lisina 0,01% (Sigma). Após 24 horas de plaqueamento e alcançada confluência da monocamada de células em torno de 80%, foi prosseguida a transfecção com 2µg dos plasmídeos pEGFP-N1, pEGFP-N1-RasGEF1b-Δ₁₆₈₋₄₇₄ e pEGFP-N1-RasGEF1b-Δ₁₋₁₆₇ utilizando o reagente de transfecção Lipofectamina® (Invitrogen). A transfecção ocorreu por vinte e duas horas, e em torno de 30 minutos antes da realização da microscopia foi acrescentado à cultura celular 5µg/mL do corante nuclear Hoechst 33342 (Sigma), largamente utilizado em experimentos de microscopia com células vivas. Após, as lamínulas eram retiradas da placa com auxílio de uma pinça e colocadas sobre uma lâmina para realização da microscopia. As imagens foram adquiridas pelo microscópio confocal Olympus (modelo BX61) do Laboratório de Biofotônica / Departamento de Física - ICEX - UFMG. Esse microscópio é adaptado para entrada de laser femtosegundo o que possibilita a microscopia multi-fóton. Os laser utilizados foram: Argônio em 488nm e para o multi-fóton utilizamos o laser Ti:safira femtosegundos (largura do pulso 140 fs), com comprimento de onda na região de 680-1080 nm, taxa de repetição de 80 MHz e potência média de 4W em 800 nm (fabricante Coherent, modelo Chameleon). Para excitar o Dapi

utilizamos o comprimento de onda em 780nm (potência na amostra de 15mW) e objetiva de 60X.

3.8 Western Blot

3.8.1 Obtenção de extratos celulares

O sobrenadante das células era descartado e a monocamada era lavada 2 vezes com PBS 1X gelado. Em seguida as células eram ressuspensas em tampão de lise de proteínas (Tris HCl 50 mM pH 7,4; NaCl 150 mM; NaF 50mM; b-Glicerofosfato 10mM; EDTA 0,1 mM pH 8,0; Glicerol 10%; Triton X-100 1%) contendo inibidores de proteases (PMSF 1 mM; Ortovanadato de sódio 2 mM; Pepstatina 1µg/ml; Aprotinina 2 mg/mL; Leupeptina 1µg/ml) e, posteriormente, eram centrifugadas a temperatura ambiente por 10 minutos. Todas as amostras eram quantificadas pelo ensaio de Bradford.

3.8.2 Fracionamento eletroforético e transferência

O tampão de amostra (Tris-HCl 0,5 M pH 6,8 contendo SDS 0,4%; Glicerol 30%; SDS 10%; β-Mercaptoetanol 6%; Azul de bromofenol 1,2%) era misturado à aproximadamente 30 µg dos extratos celulares. Após fervura por 3 minutos, os extratos eram aplicados em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 12% e submetidos à eletroforese a uma tensão de 150 V, com a duração média de 1 hora e 30 minutos em tampão Tris-Glicina (Tris base 25mM pH 8.3; Glicina 250mM; SDS 0,1%). Ao final da corrida, o gel era lavado brevemente em tampão de transferência (Tris base 25mM pH 8.0; Glicina 250mM; Metanol 20%) e era colocado entre um papel Whatmann 3M e a membrana PVDF, previamente equilibrada em tampão de transferência. A montagem era então transferida para uma cuba, sendo completamente imersa em tampão de transferência gelado, e era aplicada uma tensão de 100 V por uma hora. Ao final da transferência, a membrana era acondicionada a 4°C.

3.8.3 Anticorpos

Os anticorpos primários e secundários foram diluídos em solução de bloqueio [TBS-T (do inglês, *Tris-buffered saline-Tween*) (Tris-HCl 20mM pH 7.6; NaCl 137mM; Tween 0,1%) contendo 5% (p/v) de leite em pó desnatado].

Foram utilizados os seguintes anticorpos primários: 1- Monoclonal de camundongo anti-GFP (Santa Cruz) 1:1000, 2- Monoclonal de camundongo anti-FLAG, clone M2, 1:7000 (Sigma). Como anticorpo secundário, foi utilizado o Anti IgG2a de camundongo conjugado a peroxidase (Sigma) (Southern Biotechnology Associates) 1:2.000 e 1:40.000.

3.8.4 Immunoblot e revelação

Após rinsagem por 3 vezes de 5 minutos de duração cada TBS-T, a membrana foi incubada à temperatura ambiente e sob agitação por 1 hora em solução de bloqueio. Após o bloqueio, a membrana foi lavada por 3 vezes de 10 minutos em TBS-T, seguido de incubação à 4°C por 16 horas com o anticorpo primário diluído em solução de bloqueio. Em seguida, a membrana foi lavada conforme acima. Posteriormente, foi incubada à temperatura ambiente, sob agitação por mais 1 hora com o anticorpo secundário correspondente, diluído em solução de bloqueio. Novamente, foram realizadas 3 lavagens, como descrito acima. Para a detecção do anticorpo secundário, a membrana foi transferida para uma placa cassete de raio-X e sobre a membrana foi gotejado 1 mL de solução substrato “ECL Plus Western Blot Detection System” (Amersham Biosciences). Após incubação à temperatura ambiente durante 1 minuto, o excesso da solução será retirado e o cassete fechado. Em câmara escura, o cassete foi aberto, um filme de radiograma (Kodak) foi colocado sobre a membrana e, após o fechamento do cassete, a membrana foi exposta em tempos que foram variados de 30 segundos a 5 minutos. Após a incubação, o filme foi revelado utilizando as soluções correspondentes.

3.9 Ensaio de gene repórter de NF- κ B através determinação da atividade da luciferase

O ensaio de gene repórter é muito utilizado em estudos da ativação gênica dependente de diferentes fatores de transcrição. Por meio desse método é possível avaliar atividades específicas de elementos e fatores regulatórios com vista à regulação mediante fatores de

transcrição, e são codificadas proteínas nesse ensaio que são facilmente detectadas, quantificadas e diferenciadas das proteínas endógenas. Normalmente emprega-se uma enzima repórter para estudo do promotor, ou seja, se clona o promotor ligado ao gene de uma proteína, que é facilmente detectada e que não causa alterações na célula. A quantidade de proteína expressa, assim como sua atividade enzimática, mostra quão ativo é o promotor. Dentre os genes repórter mais estudado está a luciferase.

Neste trabalho a análise do gene repórter da luciferase sob o controle do promotor do gene E-selectina que é responsivo ao NF- κ B (Schindler & Baichwal, 1994), permitiu avaliar a ativação de NF- κ B induzida por TNF ou componentes da via de sinalização dos TLRs. As células foram transfectadas com o pGL3-E-Sel. Esse promotor apresenta sítios de ligação para o fator de transcrição NF- κ B, dessa forma sempre que essa via de sinalização é ativada este fator de transcrição se transloca para o núcleo e a transcrição do mRNA da luciferase é induzida. Alternativamente, as células foram transfectadas com o pGL2-503 que contém o promotor do gene EIF2AK2 (PKR) que é responsivo à estimulação por Interferons do tipo I. Para a normalização dos resultados, as células eram co-transfectadas com o plasmídeo pRL-TK que contém o gene da luciferase de *Renilla* sob o controle do promotor da timidina cinase do vírus HSV-1. A razão entre a atividade da luciferase de vagalume sobre a de *Renilla* fornece a atividade relativa da luciferase nas células transfectadas e estimuladas. Esse sistema permite analisar a ativação celular mediada por receptores tipo Toll ou por estímulo com TNF, além do envolvimento do RasGEF1b nessa via de sinalização. Os extratos das células HEK293T e HEK293A transfectadas e estimuladas eram coletados e realizado o ensaio de atividade da luciferase conforme recomendações do fabricante (Sistema Dual Luciferase Assay da Promega), com algumas modificações. Primeiramente, o meio DMEM era retirado do poço e as células eram lisadas com 100 μ l de Tampão de Lise Passivo 1X fornecido pelo Kit. O lisado era homogeneizado com auxílio de uma pipeta e centrifugado a 12.000g por 20 minutos a 4°C, o sobrenadante, que corresponde ao extrato celular, era coletado e mantido a -20°C até o momento da leitura. Para medir a atividade da luciferase era adicionado 40 μ l do reagente Luciferase Assay Reagent II – substrato da luciferase de vaga-lume - (LAR II) a 5 μ l de extrato celular e fazia a leitura utilizando um luminômetro. Para finalizar era adicionado 50 μ l do reagente Stop & Glo Reagent – substrato da luciferase de *Renilla* e realizava-se a segunda leitura. A razão entre a primeira e a segunda leitura fornece a atividade relativa da luciferase.