

DINÂMICA DA LOCALIZAÇÃO DO FACTOR NF- κ B EM CÉLULAS HELA ESTIMULADAS COM TNF- α

O factor nuclear NF- κ B é um factor de transcrição ubíquo que controla a expressão de genes envolvidos em processos como a resposta imunitária, a apoptose (morte celular programada) e o ciclo celular.

A regulação descoordenada do NF- κ B pode estar na base de patologias relacionadas com a inflamação ou doenças autoimunes, infecções virais ou cancro.

Em mamíferos, são conhecidos 5 membros da família NF- κ B:

- NF- κ B1 (ou p50)
- NF- κ B2 (ou p52)
- RelA (ou p65)
- RelB
- c-Rel

Todos estes elementos possuem um domínio de homologia Rel altamente conservado, responsável pela dimerização e ligação ao DNA e ao factor I κ B (que actua como inibidor do NF- κ B).

O factor NF- κ B só se encontra activo quando dois membros dimerizam. A forma activa mais abundante contém uma subunidade p50 ou p52 e uma subunidade p65.

O factor de transcrição NF- κ B pode ser activado por uma grande variedade de estímulos, que incluem citocinas (como o factor de necrose tumoral TNF- α ou a IL-1), mitogénios das células T e B, proteínas virais ou indutores de *stress* (como as espécies reactivas de oxigénio ou a radiação UV).

No citoplasma, o NF- κ B é inibido pelo I κ B. Um sinal de activação a montante (como por exemplo, a ligação do TNF- α ao seu receptor) pode causar a fosforilação do I κ B α pelo IKK (I κ B cinase). Esta fosforilação desencadeia a ubiquitinação e posterior degradação do I κ B α no proteossoma. O NF- κ B livre migra então para o núcleo onde pode activar a transcrição de genes específicos, um dos quais o próprio gene I κ B α (feedback negativo; vide Figura 1).

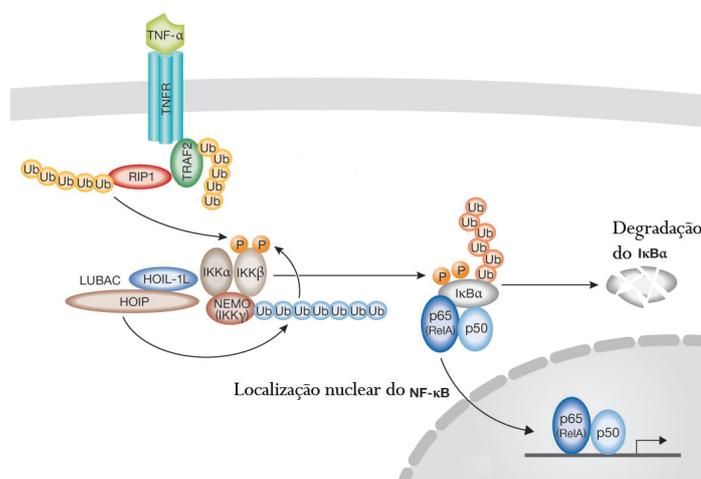


Figura 1 - Via de activação canónica do NF- κ B. Após activação em resposta a vários estímulos, o I κ B α é fosforilado pelo complexo IKK. A poliubiquitinação do I κ B α fosforilado leva à sua degradação. Como consequência, o NF- κ B livre é translocado para o núcleo, promovendo a expressão de genes alvo (HOIL-1L, longer isoform of haem-oxidized iron-regulatory protein ubiquitin ligase 1; HOIP, HOIL-1L interacting protein; I κ B α , inhibitor of κ B; IKK, inhibitor of κ B kinase; LUBAC, linear ubiquitin chain assembly complex; NEMO, NF- κ B essential modulator; NF- κ B, nuclear factor- κ B). Adaptado de Iwai *et al*, 2009.

Se o estímulo com TNF α for constante, ocorrerá uma oscilação amortecida da quantidade de NF- κ B no núcleo (Figura 2).

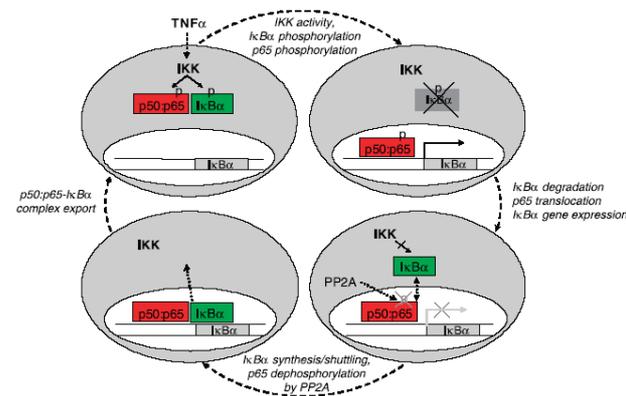


Figura 2 – Esquema representativo do possível mecanismo para as oscilações repetidas na localização núcleo-citosol da subunidade RelA/p65 (NF- κ B) (Nelson *et al*, 2004).

I. Extração diferencial de proteínas do citosol e do núcleo

Reagentes

Solução de lavagem PBS 1x (*Phosphate buffer saline*)

Tampão de Lise - Citosol (50 mM HEPES (pH 7,2); 2 mM EDTA; 10 mM NaCl; 250 mM sacarose. Antes da utilização, adicionar 2 mM DTT; 0,1% IGEPAL CA-630 (v/v) e inibidores de protease segundo instruções do fabricante)

Tampão de Lise - Núcleo (50 mM HEPES (pH 7,2); 2 mM EDTA; 400 mM NaCl; 20% glicerol (v/v). Antes da utilização, adicionar 2 mM DTT e inibidores de protease segundo instruções do fabricante)

Tampão de Aplicação 2x (62,5 mM Tris-HCl pH 6,8, 3% (m/v) SDS, 100 mM DTT, 10% (v/v) glicerol, 0.02% (m/v) Azul de bromofenol)

Inibidores de proteases completos (Roche Applied Sciences)

TNF- α 1 μ g/mL (Sigma)

MG-132 10 mM (Sigma)

Meio de cultura RPMI 1640 (Invitrogen)

Material

Placas de cultura celular p35 (\varnothing ~10 cm²)

Raspadores de células

Procedimento

1. Preparar tubos de microcentrifuga de 1,5 mL marcados com as seguintes indicações:

Grupo 1

A0	A15	A45	A75	A105
Ac0	Ac15	Ac45	Ac75	Ac105
An0	An15	An45	An75	An105
GAc0	GAc15	GAc30	GAc45	GAc60
GAc75	GAc90	GAc105	GAc120	-

Grupo 2

A30	A60	A90	A120	-
Ac30	Ac60	Ac90	Ac120	-
An30	An60	An90	An120	-
GAn0	GAn15	GAn30	GAn45	GAn60
GAn75	GAn90	GAn105	GAn120	-

Grupo 3

B0	B15	B45	B75	B105
Bc0	Bc15	Bc45	Bc75	Bc105
Bn0	Bn15	Bn45	Bn75	Bn105
GBc0	GBc15	GBc30	GBc45	GBc60
GBc75	GBc90	GBc105	GBc120	-

Grupo 4

B30	B60	B90	B120	-
Bc30	Bc60	Bc90	Bc120	-
Bn30	Bn60	Bn90	Bn120	-
GBn0	GBn15	GBn30	GBn45	GBn60
GBn75	GBn90	GBn105	GBn120	-

2. Decantar o meio de cultura das células para um copo graduado com lixívia a 10% (v/v).
3. Retirar o meio remanescente com uma P1000 encostando a ponta ao fundo da placa junto ao bordo lateral.
4. **Conjunto de placas A (Grupo 1 e 2):** adicionar a cada placa de cultura **1 mL** de meio de cultura contendo **TNF- α diluído à concentração final de 10 ng/mL**.
5. **Conjunto de placas B (Grupo 3 e 4):** adicionar a cada placa de cultura **1 mL** de meio de cultura contendo **TNF- α** , diluído à concentração final de **10 ng/mL**, e inibidor do proteassoma **MG-132** diluído à concentração final de **25 μ M**.
6. Incubar a 37°C durante os tempos indicados no ponto seguinte (**estufa**).
7. Retirar uma placa de cultura **A** e outra **B** a cada um dos tempos seguintes: 0, 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105 e 120 minutos.

Tempos	Grupo
15, 45, 75 e 105 min	Grupo 1 (placas A) / Grupo 3 (placas B)
30, 60, 90 e 120 min	Grupo 2 (placas A) / Grupo 4 (placas B)

8. A cada tempo, decantar o meio de cultura das células para o copo graduado com lixívia a 10% (v/v).
9. Retirar o meio remanescente com uma P1000, encostando a ponta ao fundo da placa junto ao bordo lateral.
10. Lavar as células com 1 mL de PBS, agitando suavemente a placa.
11. Decantar e retirar todo o PBS remanescente com uma P1000, encostando a ponta ao fundo da placa junto ao bordo lateral.
12. Colocar a placa no gelo
13. Lisar as células em **300 μ L** de **Tampão de Lise – Citosol**.
14. Raspar e recolher as células para um tubo de microcentrifuga. Incubar **~5 min** em **gelo**.
15. Centrifugar, a 3 000 g, 4°C, 4 min e **recolher o sobrenadante** (proteínas do citosol) para **novo tubo** de microcentrifuga (marcado **Ac** ou **Bc** e respectivo tempo).
CUIDADO: usar uma P200 marcada para 150 μ L e não perturbar o sedimento!
16. Manter os **novos tubos** (proteínas do citosol) em **gelo!**
17. Lavar o sedimento ressuspensando-o gentilmente (“tap, tap”) em **300 μ L** de **Tampão de Lise – Citosol**.

18. Centrifugar nas mesmas condições, remover cuidadosamente o sobrenadante e descartar (mas só este!).

CUIDADO: usar uma P200 marcada para 150 µL e não perturbar o sedimento!

19. Ressuspender em **75 µL** de **Tampão de Lise – Núcleo**.
20. Incubar **em gelo** durante **20 min** agitando ocasionalmente com recurso a um agitador vortex.
21. Centrifugar a 10 000 g, 4°C, 10 min e recolher o **sobrenadante** (proteínas do núcleo) para **novo tubo** de microcentrifuga (marcado **An** ou **Bn** e respectivo tempo).
22. Determinar a concentração total de proteína nas amostras (método de Bradford – **Seguir para itens II e III do protocolo**).
23. Pipetar um volume correspondente a igual massa de proteína (*idealmente ~10µg*) de cada extracto para os tubos marcados **GAc** e **GAn** ou **GBc** e **GBn** respectivos.
24. Adicionar a cada tubo **igual volume** de **Tampão de Aplicação de Amostra 2x**.
25. Congelar todos os tubos a -20°C.

II. Doseamento de proteínas pelo método de Bradford

O método de Bradford consiste num ensaio colorimétrico permite estimar a concentração de proteína total numa determinada amostra. Este baseia-se na mudança da absorvência do corante *Azul Brilhante de Coomassie G-250* o qual, em condições ácidas, é convertido da sua forma catiónica, de cor vermelha, na sua forma aniónica, de cor azul, sendo esta última capaz de se ligar às proteínas em solução. Só a ligação à proteína estabiliza a forma aniónica do corante, sendo, por isso, a quantidade de complexo (azul) formado proporcional à concentração de proteína na amostra. Esta pode então ser estimada através da leitura da absorvência a 595 nm (máximo do espectro de absorção da forma aniónica).

Nota: O ensaio de Bradford é linear apenas num certo intervalo de concentrações de proteína (tipicamente de 0 - 2mg / ml). A fiabilidade deste ensaio é também afetada pela presença de detergentes, se em concentrações superiores a 0,1%.

Reagentes

Solução Padrão de BSA 1,4 mg/mL

Quantidades a utilizar: 1; 2,5; 5; 10; 20; 40 μ L de solução padrão de BSA.

Procedimento

1. Preparar tubos de microcentrifuga de 1,5 mL marcados com as seguintes indicações:

Grupo 1

BSA0	BSA1	BSA2	BSA3	BSA4	BSA5	BSA6		
QAc0	QAc15	QAc30	QAc45	QAc60	QAc75	QAc90	QAc105	QAc120

Grupo 2

BSA0	BSA1	BSA2	BSA3	BSA4	BSA5	BSA6		
QAn0	QAn15	QAn30	QAn45	QAn60	QAn75	QAn90	QAn105	QAn120

Grupo 3

BSA0	BSA1	BSA2	BSA3	BSA4	BSA5	BSA6		
QBc0	QBc15	QBc30	QBc45	QBc60	QBc75	QBc90	QBc105	QBc120

Grupo 4

BSA0	BSA1	BSA2	BSA3	BSA4	BSA5	BSA6		
QBn0	QBn15	QBn30	QBn45	QBn60	QBn75	QBn90	QBn105	QBn120

2. Pipetar 10 μ L de extracto proteico para os tubos Q... correspondentes e juntar 790 μ L H₂O.
3. Preparar os pontos para a curva padrão

Tubo	Padrão de BSA (μ L)	Vol. H ₂ O (μ L)	CCf proteína (μ g/mL)
BSA0	0	800	0
BSA1	1	799	1,4
BSA2	2,5	797	3,5
BSA3	5	795	7
BSA4	10	790	14
BSA5	20	780	28
BSA6	40	760	56

7. Faça uma regressão linear com os valores obtidos para os padrões.
8. Calcule a concentração de proteína total em cada amostra com base na fórmula

$$CC_{(\mu\text{g} / \text{mL})} = \frac{A_{595} - b}{m} * 100, \text{ em que } m = \text{declive}, b = \text{ordenada na origem, e } 100 \text{ o fator de diluição.}$$

9. Calcule também o volume de cada amostra a aplicar no gel (*ideal ~10 μg*).

Amostra	CC	V _{gel}									
Ac0			An0			Bc0			Bn0		
Ac15			An15			Bc15			Bn15		
Ac30			An30			Bc30			Bn30		
Ac45			An45			Bc45			Bn45		
Ac60			An60			Bc60			Bn60		
Ac75			An75			Bc75			Bn75		
Ac90			An90			Bc90			Bn90		
Ac105			An105			Bc105			Bn105		
Ac120			An120			Bc120			Bn120		

III. Electroforese em gel de SDS-poliacrilamida e análise por *immunoblot*

Reagentes

- Isopropanol

- Tampão de Tris-HCl (pH 8,8) 1,5 M - tampão do gel resolvente concentrado

Dissolver 18,2 g de Tris em aproximadamente 80 mL de água destilada, ajustar o pH a 8,8 com HCl e ajustar o volume final da solução para 100 mL. Guardar a 4°C em frasco escuro.

- Tampão de Tris-HCl (pH 6,8) 0,5 M

Dissolver 6,1 g de Tris em aproximadamente 80 mL de água destilada, ajustar o pH em 6,8 com HCl concentrado e perfazer com água destilada para um volume final de 100 mL. Guardar a 4°C em frasco escuro.

- Persulfato de amônio (PSA) 10% (m/v)

Preparar apenas na altura em que for necessário. Dissolver 0,1 g de persulfato de amônio em 1 mL de água destilada, num tubo *Eppendorf*.

- TEMED (N,N,N',N'-tetrametilediamida)

Usar directamente do frasco, na *hotte*

Tampão de electroforese (Tris 0,025 M, glicina 0,192 M, SDS 0,1% (m/v), pH 8,3)

Tris	3,0 g
glicina	14,4 g
SDS 10% (m/v)	10 mL

Para 1 L de tampão. **Não ajustar o pH final da solução**; misturar os reagentes e confirmar que o pH está próximo de 8,3 ($\pm 0,2$).

- Azul de bromofenol 0,1% (m/v)

Dissolver 100 mg de azul de bromofenol em 100 mL de glicerol a 50% (50 mL de glicerol + 50 mL de água destilada).

- Dodecilsulfato de sódio (SDS) 10% (m/v)

Dissolver 10 g de SDS em cerca de 80 mL de água destilada e perfazer para um volume final de 100 mL. Atenção: usar máscara e luvas pois o SDS é irritante para as vias respiratórias.

Tampão de transferência para Western blot (Tris 0,025 M, glicina 0,192 M)

Para 1 L	
Tris	3.0 g
glicina	14.4 g

- PBS (*Phosphate buffered saline*) 10x

Para 1 L:	
Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	28,6 g
KH ₂ PO ₄	2 g
NaCl	80 g
KCl	2 g

Tampão de lavagem para immunoblot (1L / Grupo)

PBS 1X contendo 0,1% (v/v) Tween-20

Proteínas padrão de massa molecular relativa conhecida:

180 KDa, 135 KDa, 100 KDa, 72 KDa, 60 KDa, 45 KDa, 35 KDa, 25 KDa, 20 KDa, 15 KDa, 10 KDa

Anticorpos e condições de utilização

	Especificidade	Referência/Nome	Diluição
Anticorpos primários	NF- κ B p65	Santa Cruz Biotechnology sc-515045 (IgG ratinho)	1/1000
Anticorpo secundário	Anti-IgG de ratinho conjugado com peroxidase de rábano	BioRad 172-1011	1/3000

Procedimento

SDS-PAGE

1. Cada Grupo deve preparar um mini-gel de SDS-PAGE com gel resolvente a 10%T segundo as indicações do quadro abaixo.

Quadro I - Preparação do gel resolvente e gel de concentração

Componente	Gel Resolvente a 10%T	Gel de Concentração a 4%T
	Volume (mL)	Volume (mL)
Acrilamida/Bis (30 % T; 2,7 % C)	3,0	0,8
Tris-HCl (pH 8,8) 1,5 M	2,3	-
Tris-HCl (pH 6,8) 0,5 M	-	1,5
SDS 10% (m/v)	0,09	0,06
H ₂ O	3,5	3,5
Persulfato de amónio (PSA) 10% (m/v)	0,300	0,200
TEMED	0,015	0,010

2. Adicione os agentes polimerizantes, TEMED e PSA, à solução do gel resolvente. Agite e adicione a solução do gel resolvente à “sandwich” de vidros com o auxílio de uma pipeta. Guarde o monómero não usado ao pé da “sandwich”. **Muito devagar**, introduza um pouco de isopropanol sobre a superfície da solução de gel resolvente.

3. Deixe a caixa de polimerização em repouso até que o gel polimerize - nessa altura notar-se-á mais distintamente a linha de interface gel-solvente.

4. Escorra totalmente o isopropanol da superfície do gel. Remova resíduos com um triângulo de papel 3MM mas **SEM TOCAR NO GEL!**

5. Adicione os agentes polimerizantes ao gel de concentração e agite. Adicione a solução do gel de concentração à “sandwich” de vidros, introduza o pente e certifique-se de que não ficam bolhas de ar. Deixe em repouso até polimerizar (30 - 45 min).

6. Quando se tiver certificado de que o gel de concentração já polimerizou, tire o pente com cuidado.

7. Introduza a peça central no reservatório de tampão inferior da câmara de eletroforese e adicione tampão de eletroforese nos reservatórios inferior e superior.

8. Aplique as amostras nos poços do gel com o auxílio de uma micropipeta. Respeite o seguinte esquema de aplicação.

M 0 15 30 45 60 75 90 105 120

Gel 1 – amostras **Ac**

Gel 2 – amostras **An**

Gel 3 – amostras **Bc**

Gel 4 – amostras **Bn**

10. Coloque a tampa da câmara electroforética. Certifique-se de que a orientação da tampa é a correcta.

11. Deixe correr a electroforese a 120 V até o azul de bromofenol atingir o fim do gel resolvente (60 – 90 min).

12. Desligue a fonte de alimentação, desligue os eléctrodos desta, remova a tampa da câmara, despeje a solução de electroforese.

13. Desmonte o gel cuidadosamente.

Immunoblotting

1. Coloque um pedaço de membrana de PVDF (fluoreto de polivinilideno), pré-cortado às dimensões do gel, alguns segundos mergulhado em metanol e depois durante cerca de 10 min em água. Vá agitando para que fique completamente imerso.

2. Corte rectângulos de papel de filtro com dimensões ligeiramente superiores às do gel (4 pedaços por cada gel). Mergulhe-os em tampão de transferência dois a dois.

3. Monte a “sandwich” para a transferência de acordo com as instruções seguintes:

- a. Num tabuleiro de plástico coloque uma cassette aberta assente sobre o lado incolor. Despeje um pouco de tampão de transferência no tabuleiro, só até submergir o plástico da cassette.
- b. Embeba uma das esponjas da tina nesse tampão de transferência e coloque-a na cassette sobre o lado preto.
- c. Sobre esta esponja, coloque 2 folhas de papel de filtro húmido e seguidamente a membrana de PVDF. Remova eventuais bolhas de ar fazendo rolar o tubo plástico transparente sobre o papel.
- d. Abra **cuidadosamente** as placas de vidro com a cunha verde. Remova os géis da placa de vidro através da imersão do gel e da placa no tampão de transferência.
- e. Coloque o gel sobre a membrana de PVDF. Deite um pouco de tampão por cima do gel.
- f. Deite mais um pouco de tampão e, **com muito cuidado**, remova eventuais bolhas de ar fazendo rolar o tubo plástico transparente sobre a membrana.
- g. Coloque outro conjunto de 2 folhas de papel de filtro sobre o gel. **Cuidadosamente**, remova eventuais bolhas de ar fazendo rolar o tubo plástico transparente sobre o papel.
- h. Sobre este conjunto, coloque a segunda esponja humedecida em tampão de transferência e feche a cassette sem perturbar a montagem.

IMPORTANTE: Assegure-se sempre que não ficam bolhas de ar entre as várias camadas.

4. Deite algum tampão na tina, introduza a estrutura de transferência, **insira a cassette correctamente na estrutura (lado preto com lado preto)**, coloque o refrigerador no sítio e preencha a tina com tampão de transferência. Certifique-se de que as polaridades ficam correctas. Coloque a tampa e ligue os cabos à fonte de tensão.

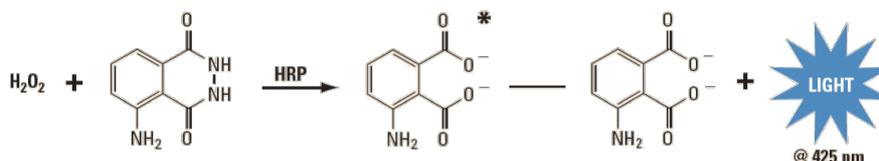
5. Efectue a transferência durante 1h-1h30m a 400 mA.

6. Depois de desmontar a transferência, bloqueie a membrana durante 1h com leite magro em pó 5% (m/v) preparado em tampão de lavagem para Western Blot.
7. Dilua o anticorpo primário em 10 mL de leite magro em pó 5% (m/v) em tampão de lavagem e incube durante a noite a 4°C com agitação.

*****DIA SEGUINTE*****

8. Lave a membrana com tampão de lavagem (3 lavagens de 10 min cada).
9. Dilua o anticorpo secundário [anti-IgG de coelho conjugado com peroxidase (HRP)] em 10 mL de leite magro em pó 5% (m/v) em tampão de lavagem e incube durante 1h com agitação.
10. Lave como acima.
11. Revele a ligação do anticorpo com sistema de quimioluminiscência. O procedimento abaixo deve ser realizado na câmara escura.
12. Para isso, adicione a cada membrana 2 mL de uma mistura 1:1 das soluções de detecção (Luminol/Enhancer e Peróxido de Hidrogénio). Aguarde 5 min.
13. Escorra os reagentes de detecção e cubra a membrana com película transparente.
14. Exponha a membrana a um filme de autorradiografia numa cassete própria e revele. Repita com diferentes tempos de exposição.

O luminol é um substrato para detecção da presença de peroxidase. O luminol é oxidado na presença de peroxidase e H₂O₂ para formar 3-aminofalato no seu estado excitado. O 3-aminofalato emite luz a 425 nm ao decair para o estado fundamental.



Bibliografia básica

Hoffmann A et al (2002) The I κ B-NF- κ B signaling module: temporal control and selective gene activation. *Science* **298**, 1241-1245

Iwai K et al (2009) Linear polyubiquitination: a new regulator of NF- κ B activation. *EMBO Rep* **10**, 706-713.

Nelson DE et al (2004) Oscillations in NF- κ B signaling control the dynamics of gene expression. *Science* **306**, 704-708.

Using Antibodies: A laboratory manual. (1999) Harlow E, Lane D, eds, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.

Wan F et al (2010) The nuclear signaling of NF- κ B: current knowledge, new insights, and future perspectives. *Cell Res* **20**, 24-33.