



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR

LABORATÓRIO DE BIOLOGIA MOLECULAR

**Caracterização de elementos moduladores da
expressão gênica em células de mamífero: estudo do
Intron A do gene Precoce Imediato de Citomegalovírus**

Luana Salgado Quilici

Orientadora: Prof^ª. Dra. Andréa Queiroz Maranhão

Co-orientador: Prof. Dr. Marcelo de Macedo Brígido

Tese apresentada ao
Departamento de Biologia Celular do
Instituto de Ciências Biológicas como
requisito parcial à obtenção do grau de
Doutor em Biologia Molecular

Brasília – DF

2012

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR
LABORATÓRIO DE BIOLOGIA MOLECULAR

**Caracterização de elementos moduladores da
expressão gênica em células de mamífero: estudo de
elementos não-codificadores e moduladores da
cromatina**

Luana Salgado Quilici

Orientadora: Prof^a. Dra. Andréa Queiroz Maranhão

Co-orientador: Prof. Dr. Marcelo de Macedo Brígido

Tese apresentada ao
Departamento de Biologia Celular do
Instituto de Ciências Biológicas como
requisito parcial à obtenção do grau de
Doutor em Biologia Molecular

Brasília – DF

2012

Banca Examinadora:

Prof^ª. Dra. Leda dos Reis Castilho (UFRJ – Membro Externo)

Prof. Dr. Spartaco Astolfi Filho (UFAM – Membro Externo)

Prof^ª. Dra. Leila Maria Gomes Barros (EMBRAPA – Membro Interno)

Prof. Dr. Bergman Moraes Ribeiro (UnB – Membro Interno)

Prof^ª. Dra. Andréa Queiroz Maranhão (UnB – orientadora)

Prof. Dr. Marcelo de Macedo Brígido (UnB – co-orientador)

Prof^ª. Dra. Tainá Raiol Alencar (UnB – Suplente)

Trabalho desenvolvido no Laboratório de
Biologia Molecular da Universidade de
Brasília, sob a orientação da Prof^ª. Dra.
Andréa Queiroz Maranhão

Dedico este trabalho aos meus
pais, Eva e Gedson, por sempre
me incentivarem a estudar e a
seguir meus sonhos...

Agradeço a Deus pela força e
paciência...

... agradeço à Andréa e ao
Marcelo, por acreditarem que
eu chegaria até aqui...

... agradeço também ao Renato, meu
marido, que me entendeu em meus
momentos de desespero, e ainda me
deu meu bem mais precioso, meu
bebê Lucas

AGRADECIMENTOS EXTRAS

Aos professores da banca, pelo tempo dispensado à leitura deste trabalho!

Aos professores da BioMol: Ildinete, Márcio, Lídia, Élide, Sueli, Fernando e Cyntia, pelas dicas e matérias super-proveitosas.

Ao professor Bergman e ao pessoal do seu laboratório, por permitirem o uso do Luminômetro!

Ao pessoal do Lab1, meus velhos amigos, em especial Barbarela, Maryani, Flávia, Yuri, Fernanda, Kelly, Rafa, e os novos alunos que eu não conheço, mas obrigada assim mesmo. E a todos os colegas da BioMol, obrigada, e desculpem por não estar mais presente. À Isabella, meu agradecimento especial, mimimimi.

À Fátima e Ivanildes, por cuidarem do laboratório, dos nossos reagentes, materiais e por serem tão legais comigo!!

À Fernanda, por sempre manter o laboratório limpo, apesar de dois minutos depois todo mundo sujar!

A todo o pessoal da sala de cultura, obrigada por aturarem os meus momentos de estresse quando a sala estava uma bagunça!

A toda minha família (vós, tios, primos), obrigada por me apoiarem!

À família do Renato, que sempre me acolheu de braços abertos e sempre me admirou, mesmo sem saber direito o que eu estava fazendo!

Aos meus amigos queridos do Colégio Militar, que me acompanharam em TODA a minha jornada de futura cientista! Vocês sempre torceram por mim, e acho que me entenderam nos momentos em que tive que estar ausente! Obrigada Beatriz, Beliza, Carol, Jaque (minha madrinha ☺), Mairão, Thamara e Well!!! Vocês moram no meu coração!!!

Às minhas amigas virtuais e mães, que estiveram comigo nesse momento tão único e especial de minha vida!

Aos meus colegas da CAPES, por todo apoio e suporte ao desenvolvimento deste trabalho.

À Ana e Sandra da Secretaria, obrigada por sempre estarem à nossa disposição!

E obrigada a todos que porventura eu tenha deixado de mencionar, mas que de alguma forma me ajudaram na realização deste trabalho!

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas	vii
Resumo	xi
<i>Abstract</i>	xii
1 – INTRODUÇÃO	1
1.1 – Estrutura dos promotores eucarióticos.....	1
1.1.1 – Engenharia de promotores para melhoramento da atividade transcricional em eucariotos.....	5
1.2 – Elementos estruturais e funcionais na modulação da expressão gênica em eucariotos	6
1.2.1 – Intron	6
1.2.1.1 – Efeito dos introns em nível de DNA	7
1.2.1.2 – Interação do <i>splicing</i> com eventos de processamento de pré-mRNAs	9
1.2.1.3 – Efeito dos introns nos processos tardios do metabolismo de mRNA (transporte núcleo-citoplasma e nonsense-mediated decay – NMD)	10
1.3 – Principais promotores utilizados em vetores para expressão de proteínas heterólogas em células de mamífero: o promotor de Citomegalovírus e o intron A	14
1.4 – A produção de proteínas recombinantes em células de mamífero	16
1.4.1 – Produção de anticorpos em células de mamífero	20
1.5 – Modelo Experimental	21
1.6 – O anticorpo recombinante humanizado Anti-CD3	21
2 – OBJETIVOS	24
3 – MATERIAIS E MÉTODOS	26

3.1 – Materiais	26
3.1.1 – Linhagens bacterianas	26
3.1.2 – Linhagens de células de mamífero	26
3.1.3 – Plasmídios utilizados nas clonagens e transfecções	27
3.1.4 – Meios de Cultura	30
3.1.5 – Soluções	31
3.1.6 – Antibióticos	37
3.1.7 – Materiais e soluções para a mensuração da atividade da luciferase	38
3.1.8 – Materiais e soluções para preparo de extrato nuclear de CHO-K1 e HEK293 e EMSA	39
3.1.9 - Materiais e soluções para extração de RNA total de CHO-K1.....	40
3.1.10 – Tampões de Reação	42
3.1.11 – Enzimas	44
3.1.12 – Marcadores de massa molecular de DNA	45
3.1.13 – Marcadores de massa molecular de Proteína.....	46
3.1.14 – Anticorpos.....	46
3.1.15 – Oligonucleotídeos utilizados para seqüenciamento, clonagens e reações de PCR	46
3.2 – Métodos	48
3.2.1 – Preparo e transformação de células competentes de <i>Escherichia coli</i>	48
3.2.2 – Preparação de DNA plasmidial	51
3.2.3 – Extração e purificação de DNA de gel de agarose	55
3.2.4 – Digestão de DNA plasmidial com enzimas de restrição	57
3.2.5 – Reação de defosforilação com a enzima SAP (fosfatase alcalina de camarão) ..	57
3.2.6 – Reação de polimerização de extremidades de DNA utilizando o fragmento Klenow da DNA polimerase I	57
3.2.7 – Análise de DNA em gel de agarose	57
3.2.8 – Ligação de fragmentos de DNA	58
3.2.9 – Seqüenciamento de DNA com o kit <i>DYEnamic ET DYE Terminator Cycle Sequencing kit for MegaBACE</i>	58
3.2.10 – Precipitação de DNA utilizando glicogênio como carreador	59
3.2.11 – Cultura de células	59

3.2.12 – Ensaio de atividade da luciferase utilizando o <i>Kit Dual Luciferase Assay System</i>	63
3.2.13 – Ensaio de ELISA “sanduíche” para a detecção dos níveis de produção do anticorpo recombinante anti-CD3 humanizado.....	65
3.2.14 – Análise estatística dos valores de atividade da luciferase e dos experimentos de PCR em tempo real	66
3.2.15 – Extração de RNA total de células de mamífero (CHO-K1) com o reagente Trizol	66
3.2.16 – Tratamento do RNA total extraído de CHO-K1 com DNase RNase free	67
3.2.17 – Síntese do DNA complementar (cDNA) por meio de transcrição reversa (RT) com a enzima transcriptase reversa Superscript III	68
3.2.18 – Reação de qPCR (PCR quantitativa) utilizando os cDNAs preparados a partir de amostras de RNA de CHO-K1 tratadas com DNase I RNase free	68
3.2.19 – Preparo de extratos nucleares de CHO-K1 e HEK293.....	71
3.2.20 – Ensaio de Mudança de Mobilidade Eletroforética (do inglês <u>Eletrophoretic Mobility Shift Assay</u> – EMSA)	71
4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO	75
4.1 – Promotor de CMV e intron sintético influenciam a atividade do gene repórter da luciferase	75
4.2 – Expressão do anticorpo anti-CD3, fragmento FvFc, contendo os promotores com deleções no intron A sintético de CMV.....	84
4.3 – Estudo de possíveis fatores transcricionais ligados ao intron A do promotor de CMV	94
5 – CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	97
6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	99
ANEXO	110

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Localização dos componentes básicos de um promotor eucariótico.....	2
Figura 2. Ligação funcional entre o <i>splicing</i> , o transporte do mRNA núcleo-citoplasmático e o NMD, com a participação das proteínas do EJC.....	13
Figura 3. Esquema do promotor completo de CMV.....	16
Figura 4. Metabolismo central de carbono em células CHO e a interação com o meio extracelular.....	18
Figura 5. Representação de uma molécula de imunoglobulina em comparação com fragmentos gerados por técnicas do DNA recombinante.....	22
Figura 6. Mapas dos vetores utilizados para as clonagens do promotor de CMV otimizado.....	27
Figura 7. Deleções realizadas no intron A de CMV.....	24
Figura 8. Efeito das deleções do intron A na atividade da luciferase em diferentes linhagens celulares.....	29
Figura 9. Mapa do vetor pGL4.73 (Promega).....	30
Figura 10. Estratégia de construção do vetor pCO anti-CD3 FvFc humanizado.....	31
Figura 11. Construção do vetor pGLCMV sintético.....	76
Figura 12. Ensaio de atividade da luciferase em CHO-K1 com as construções originais e sintéticas do promotor de CMV com intron A.....	78
Figura 13. Medida dos níveis de mRNA de luciferase nas construções originais e sintéticas do promotor de CMV com intron A.....	79
Figura 14. Esquema da região de reconhecimento dos iniciadores de qPCR para quantificação dos níveis de transcrito não processado do exon A de CMV.....	80
Figura 15. Medida dos níveis de transcrito não-processado do exon A de CMV, nas construções originais e sintéticas.....	81
Figura 16. Produção do anticorpo anti-CD3 em CHO-K1.....	83
Figura 17. Curvas de dissociação dos iniciadores para qPCR do anticorpo humanizado anti-CD3.....	86

Figura 18. Validação da reação de qPCR para a quantificação relativa da expressão gênica do anticorpo humanizado anti-CD3.....	87
Figura 19. Gel de agarose para análise das amostras de RNA total de CHO-K1.....	88
Figura 20. Níveis de expressão do mRNA do gene que codifica o anticorpo recombinante anti-CD3 em CHO-K1.....	89
Figura 21. Análise do extrato nuclear de HEK-293 e CHO-K1.....	93
Figura 22. Esquema do desenho das sondas fluorescentes para os experimentos de EMSA.....	94
Figura 23. Análise do anelamento dos oligonucleotídeos complementares para obtenção de sondas.....	95
Figura 24. Ensaios de mobilidade eletroforética com as sondas purificadas e extratos nucleares de CHO-K1 e HEK 293.....	96
Figura 25. Ensaio de mobilidade eletroforética com as sondas purificadas e competidores específicos.....	97

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Relação de proteínas terapêuticas produzidas em CHO.....	17
Tabela 2. Sequências dos oligonucleotídeos utilizados nas diversas etapas deste trabalho (os oligonucleotídeos citados foram sintetizados pela IDT, Integrated DNA Technologies, Inc.).....	46

LISTA DE ABREVIATURAS

Ab – anticorpo

ATP – nucleotídeo trifosfato de adenosina

APB – tampão fosfato alcalino

BSA – albumina bovina sérica

°C – grau Celsius

cDNA – DNA complementar

CMV – citomegalovírus

DEPC – dietil pirocarbonato

DNA – ácido desoxirribonucléico

dNTPs – mistura dos desoxirribonucleotídeos trifosfatados adenosina, citidina, guanosina e timidina.

dsDNA – DNA de fita dupla

DTT – ditioneitol

EDTA – ácido etilendiaminoacético

EGTA – ácido tetraacético etileno glicol (mais afinidade por cálcio do que por íons de magnésio)

F – Faraday

g – força gravitacional

g – grama

IPTG – isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo

kb – quilobases

L – litro

m – metro

M – molar

mA – miliamperes

mg - miligrama

mL – mililitro

mM - milimolar

mRNA – RNA mensageiro

OD – densidade óptica

PEG – polietileno glicol

pb – pares de base

PBS – tampão fosfato

PCR – reação de polimerase em cadeia (do inglês *Polymerase Chain Reaction*)

pH – potencial hidrogeniônico

p/v – razão peso/volume

qPCR – PCR quantitativa

RNA – ácido ribonucléico

RT – PCR – transcrição reversa seguida de PCR

RT – qPCR – transcrição reversa seguida de PCR quantitativa

scFv – fragmento variável de cadeia única

SFB – soro fetal bovino

TE – tampão Tris/EDTA

Tris – tri(hidroximetil)aminometano

U – unidades de reação da enzima

V – volts

v – volume

v/v – razão volume/volume

X-gal – 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosídeo

ng - nanograma

nmol - nanomol

μmol - picomol

t – tempo de passagem da corrente elétrica

O – unidade de medida da resistência elétrica (ohm)

1X – concentração para uso normal

5X – cinco vezes concentrado

10X – dez vezes concentrado

50X – cinquenta vezes concentrado

RESUMO

Visando a continuidade dos estudos referentes à modulação da expressão gênica em células de mamífero, no presente trabalho foram construídos promotores sintéticos contendo intron A completo (IAs) e deletado em 200 (?200s) e em 600 pb (?600s), dirigindo a expressão do gene repórter da luciferase e do anticorpo (Ab) recombinante, fragmento FvFc, anti-CD3 (pCO). O intron sintético teve sítios de restrição alterados a fim de facilitar processos de clonagem e promover a manutenção do sítio acceptor de *splicing* na construção ?600s. Estas construções foram transfectadas de forma transiente em células CHO-K1, e a expressão do Ab também foi analisada em população mista estável. Verificou-se que as construções sintéticas mostraram resultados similares para a expressão do gene repórter da luciferase, exceto para a construção ?600. Para esta construção específica, a versão sintética teve rearranjos de sítios de restrição que preservaram o sítio acceptor de *splicing*. Dessa forma, na comparação dos resultados de expressão das construções de luciferase com promotores contendo IA original e sintético, a atividade da luciferase na versão sintética teve aumento significativo de quase 4 vezes, levando à hipótese de que o *splicing* do IA está diretamente relacionado ao efeito de melhoramento da expressão do gene repórter. Ao analisar a expressão do Ab anti-CD3, ao contrário, não se observou o aumento esperado nas construções com intron, sendo a construção contendo o promotor sem intron a que apresentou maior detecção de Ab secretado. Testou-se também os níveis de expressão do mRNA do Ab anti-CD3 por qPCR, onde se verificou que, para as construções com intron, apesar da baixa detecção do Ab secretado, havia alta expressão do mRNA correspondente. Esse resultado indica que a grande quantidade de mRNA produzida pode não estar sendo devidamente processada e traduzida, levando à retenção da proteína na célula. Com isso, foi mostrado que o IA e suas deleções inovadoras podem melhorar a expressão gênica, sendo ferramentas importantes para a otimização da expressão de proteínas de interesse comercial em células de mamífero.

ABSTRACT

In this study we have designed different synthetic promoters containing the full intron A (IAs), and the deletions of 200 (? 200s) and 600 bp (? 600s), directing the luciferase and recombinant anti-CD3 antibody (Ab) expression (pCO). These constructs were transiently transfected on CHO-K1 cells, and the Ab expression was analysed also by stable production on a mixed population. The synthetic constructs showed similar luciferase activity results compared to the wild-type construct, except by the ?600 construct. Regarding this specific construct, the synthetic version has restriction sites rearrangements to preserve the acceptor *splicing* site. Thus, comparing the luciferase expression among the wild-type and synthetic ?600 construct, the luciferase activity has increased significantly, leading to a hypothesis that the improvement of gene reporter expression is directly correlated to the IA *splicing*. On the contrary, when we analysed the anti-CD3 Ab expression, we did not observe the increment of protein expression, with the intronless construct being the more productive one. The anti-CD3 Ab mRNA levels were detected by qPCR. For the intron-containing constructs, despite the low levels of secreted Ab, there was high expression of corresponding mRNA. This result indicates that the great amount of mRNA produced was not correctly processed and translated, leading to protein retention inside the cell. Overall, we demonstrated that the IA and its innovative deletions can improve gene expression, being important tools for protein expression in mammalian cells.

1. Introdução

1.1. Estrutura dos promotores eucarióticos

Não há um consenso na Biologia sobre a definição de promotor, mas pode-se dizer que é uma região do DNA que direciona a iniciação acurada do processo transcricional pela RNA polimerase (Juven-Gerson e Kadonaga, 2010). Em procariotos, o promotor possui regiões bem definidas e conservadas para a ligação da RNA polimerase, denominadas regiões -10 e -35 (Harley e Reynolds, 1987). São nestes sítios, antes do início da fase aberta de leitura (ORF), que a enzima se ancora para iniciar o processo transcricional. Para maior especificidade de seleção do promotor, a enzima ainda se liga a uma proteína denominada fator sigma (σ). Ela possui vários subtipos, que são recrutados pela RNA polimerase II dependendo do gene a ser transcrito. Desse modo, de acordo com o tipo de condição ambiental a qual o organismo é submetido, é acionado um determinado tipo de fator σ para ativar a transcrição de genes necessários para a resposta do organismo ao ambiente.

No caso de organismos eucarióticos, o conceito de promotor é mais complexo, visto que as regiões de ligação da RNA polimerase II e outros fatores necessários para o reconhecimento do DNA a ser transcrito não são tão bem definidos quanto em procariotos. Além disso, em organismos multicelulares, a regulação da expressão gênica temporal, espacial e tecido-específica são também fatores que dificultam a caracterização minuciosa dos promotores eucarióticos. Entretanto, apesar de sua complexidade, pode-se identificar nestes promotores algumas regiões importantes para o processo transcricional, dentre elas o TATA box, o Iniciador (Inr), o Elemento promotor a jusante (DPE – do inglês *downstream promoter element*), o Elemento de reconhecimento a TFIIB (BRE), o Elemento “Motivo-Dez” (MTE – do inglês *motif ten element*), o Elemento Principal a jusante (DCE – do inglês *downstream core element*), e o Elemento 1 do promotor principal (XCPE1 – do inglês *X core promoter element 1*) (Juven-Gershon *et al*, 2008). A localização destes elementos no promotor pode ser visualizada no esquema da figura 1. É importante ressaltar que alguns desses elementos podem não estar presentes em todos os promotores eucarióticos conhecidos, o que é mais uma evidência da variedade de mecanismos e elementos que geram a complexidade desse sistema.

Com relação ao padrão de iniciação da transcrição, os promotores eucarióticos podem ser classificados como focados (focused) ou dispersos (dispersed) (Juven-Gerson e Kadonaga, 2010). No caso da iniciação em promotores focados, a transcrição ocorre em um sítio único, e na iniciação em promotores dispersos, a transcrição ocorre por meio de múltiplos sítios ao longo do promotor. Os promotores focados são mais comuns em organismos simples, sendo em sua maioria regulados. Os promotores dispersos, ao contrário, são principalmente encontrados nos genes constitutivos de eucariotos superiores.

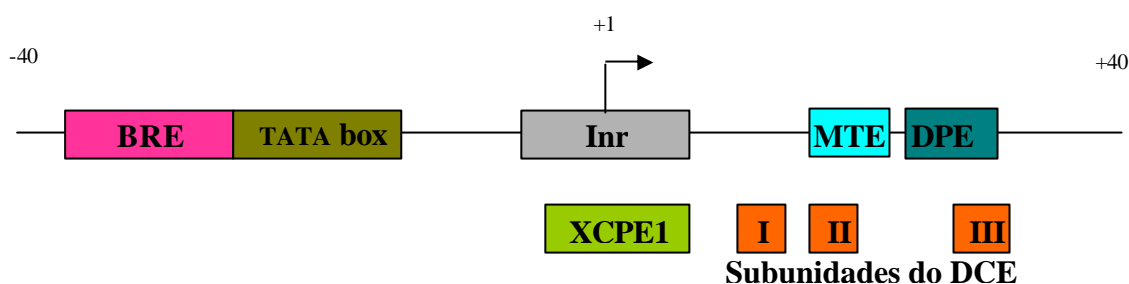


Figura 1. Localização dos componentes básicos de um promotor eucariótico. Esse esquema mostra alguns dos elementos que podem contribuir para a transcrição basal a partir do promotor. Acima dos retângulos coloridos são mostradas as possíveis regiões de ocorrência dessas seqüências dentro do promotor. Esquema adaptado de Juven-Gershon *et al* (2008).

- TATA box

Esse elemento foi o primeiro motivo de promotores eucarióticos a ser caracterizado (Goldberg, 1979), apresentando a seqüência consenso “TATAAA”. Entretanto, outras seqüências podem funcionar *in vivo* (testes realizados com leveduras) como o consenso, inclusive aquelas contendo repetições de bases C e G (Singer *et al*, 1990). Este motivo está presente na maioria dos eucariotos (que possuem promotores focados, com sítio de início da transcrição único), sendo menos comum nos vertebrados (que possuem promotores dispersos, com múltiplos sítios fracos de início da transcrição) (Juven-Gershon *et al*, 2008).

O primeiro passo para a formação do complexo de iniciação da transcrição em promotores que contêm este elemento é a ligação do fator acessório TFIID a uma região próxima ao TATA box. Este fator transcricional essencial para o mecanismo de início da transcrição em promotores que contêm o TATA *box* é uma associação de uma

proteína denominada proteína ligante a TATA (TBP, do inglês *TATA binding protein*) com uma proteína denominada TAF_{IID}. As proteínas TAF (do inglês *TBP associated factors*) são fatores que se ligam à TBP para o posterior reconhecimento do elemento TATA. Em outras palavras, TFIID é um complexo de proteínas associadas que se ligam ao TATA *box*, mediando o recrutamento dos demais fatores transcripcionais necessários para a continuidade do processo da transcrição (Lewin, 2001).

Uma característica interessante de TBP é que esta proteína se liga ao DNA de uma forma diferenciada, posicionando-se sobre a cavidade menor da fita e curvando DNA em torno de 80°. Essas modificações estruturais na molécula de DNA favorecem uma associação mais íntima dos fatores transcripcionais com o promotor (melhoram a acessibilidade ao promotor), potencializando a atividade transcripcional (Lewin, 2001). Outra característica desta proteína é a sua incompatibilidade com a presença de nucleossomos, visto que a formação destes ocorre em regiões ricas em A e T com as cavidades voltadas para a parte interna. Desse modo, pode-se explicar porque a presença de nucleossomos impede o início da transcrição gênica (Lewin, 2001).

- Iniciador (Inr)

A região do promotor denominada Inr engloba o sítio de iniciação da transcrição, sendo que este elemento está presente em diversos eucariotos (Burke e Kadonaga, 2002). O iniciador é encontrado tanto em promotores com TATA box como naqueles sem esta seqüência, indicando ser uma região importante para o processo transcripcional. A seqüência consenso deste elemento em células de mamífero é: “Pyr-Pyr(C)-A₊₁ (geralmente o início da transcrição)-N-T/A-Pyr-Pyr” (Corden *et al*, 1980; Bucher, 1990; Javahery *et al*, 1994). Há evidências que o fator de transcrição basal TFIID se liga a Inr de uma forma seqüência-específica (Kaufmann e Smale, 1994). Além disso, outros fatores como TFII-I (Roy *et al*, 1991; Cheriya *et al*, 1998) e YY1 (Weis e Reinberg, 1997) parecem se associar a essa região. Desse modo, a interação seqüência-específica destas proteínas com o elemento Inr de promotores eucarióticos leva a crer que elas participam ativamente do processo transcripcional.

- DPE

Esse elemento foi inicialmente identificado em *Drosophila* por Burke e Kadonaga (1996), sendo um sítio de ligação para o fator de transcrição basal TFIID. Este se liga cooperativamente a motivos DPE e também Inr, sendo que a mutação em

algum dos sítios resulta em uma diminuição significativa da transcrição. Este motivo é encontrado principalmente em promotores sem o elemento TATA box. Apesar dos estudos avançados da importância desta sequência em promotores de *Drosophila*, ele também foi estudado e identificado em humanos (Burke e Kadonaga, 1997; Zhou e Chiang, 2001). Estima-se que a sequência consenso de DPE seja “A/G₊₂₈-G-A/T-C/T-G/A/C” (Kutach e Kadonaga, 2000). Entretanto, apesar de um pouco degenerada, a localização dela (entre a região +28 e +32, logo após Inr) é fundamental para a sua funcionalidade. Isso porque, como há uma ligação de TFIID tanto a Inr quanto a DPE, essa distância entre esses elementos deve ser invariável, possibilitando a interação entre esses dois motivos (Burke e Kadonaga, 1997; Kutach e Kadonaga, 2000).

- BRE

Esse elemento é um sítio de ligação ao fator TFIIB, localizado imediatamente a montante do TATA box (Langrange *et al*, 1998). Sua sequência consenso é G/C-G/C-G/A-C-G-C-C, sendo que logo após o último nucleotídeo do BRE já se observa o TATA box. Para a identificação deste sítio, foram realizados experimentos de transcrição *in vitro* contendo diversos fatores de transcrição purificados. O resultado dessas análises revelou que a sequência BRE facilita a incorporação de TFIIB aos complexos de iniciação da transcrição que são produtivos (Langrange *et al*, 1998). Com isso, além do TFIID, outro fator de transcrição basal possui a característica de ser sequência-específico, o que favorece a regulação do processo da transcrição em eucariotos.

- MTE

O motivo MTE foi descoberto por uma combinação de estudos bioquímicos e computacionais, estando localizado entre a região +18 a +27 relativa ao sítio de iniciação da transcrição. Como DPE, o motivo MTE funciona cooperativamente com o Inr, funcionando ainda como um sítio de ligação para TFIID. Ainda, observa-se um efeito sinérgico entre MTE, TATA-box e DPE, melhorando significativamente a transcrição de genes de interesse (Juven-Gershon *et al*, 2008).

- DCE

O elemento DCE foi inicialmente caracterizado no promotor de beta-globina humana (Lewis *et al*, 2000), ocorrendo frequentemente próximo ao TATA-box. O

motivo DCE consiste em 3 subelementos (SI, SII e SIII). Este sítio reconhece principalmente o fator de ativação da transcrição (TAF, do inglês *transcription activation factor*) do complexo TFIID.

- XCPE1

Esse elemento é localizado na região -8 a +2 relativa ao sítio de início da transcrição, estando presente em aproximadamente 1% dos promotores principais humanos, em sua maioria o que não possuem o elemento TATA-box (*TATA-less promoters*). XCPE1 exibe pouca atividade sozinho, mas em conjunto com outros fatores transcripcionais, como NRF1, NF-1 e Sp1, funciona como co-ativador da transcrição (Juven-Gershon *et al*, 2008)

1.1.1. Engenharia de promotores para melhoramento da atividade transcricional em eucariotos

Como pôde ser acima observado, os promotores eucarióticos são ao mesmo tempo complexos e bem estruturados no que se refere à sua regulação e atividade. Entretanto, há ainda outros estudos que buscam o melhoramento da atividade dos diversos promotores conhecidos por meio da adição ou remoção de elementos ou motivos no promotor, ou seja, por meio da engenharia de promotores.

A adição de elementos em *cis* em promotores como o de Citomegalovírus (CMV) e o de SV 40 (do inglês *Simian Virus*) foi uma técnica de melhoramento de promotores realizada por Ogawa e colaboradores, em 2007. Em suas construções, foram utilizados diversos oligonucleotídeos cuja seqüência correspondia a um sítio de ligação a fatores transcripcionais (neste trabalho foram utilizadas seqüências reconhecidas pelos fatores AP-1, CArG, NF- κ B e NF-Y). Estas seqüências foram clonadas aleatoriamente nas regiões adjacentes aos promotores estudados, resultando em diversas construções de plasmídios com promotores quiméricos que foram testados em diversas linhagens de células de mamíferos.

Esta técnica de adição de elementos em *cis* de forma randômica também foi realizada em procariotos (Cox III *et al*, 2007). Neste trabalho, construiu-se uma biblioteca de promotores para *Escherichia coli* para a análise das melhores construções que expressavam o gene *Lux*.

Outro elemento em *cis* que pode ser adicionado nas regiões próximas a promotores para a modulação da expressão gênica em eucariotos é o intron. Este elemento será mais bem detalhado no tópico a seguir.

1.2. Elementos estruturais e funcionais na modulação da expressão gênica em eucariotos

1.2.1. Intron

Desde 1978, quando se definiu o conceito de intron por Walter Gilbert, o surgimento de questões que buscavam o entendimento da função biológica dos introns foi o primeiro passo para que se relacionassem estes elementos em *cis* com a transcrição gênica. Nesta época, postulou-se que introns eram seqüências genômicas presentes em eucariotos e que eram removidas do transcrito de RNA correspondente por meio de um processo denominado *splicing*. Mais tarde, verificou-se que este evento era mediado por um complexo composto por ribonucleoproteínas e pequenos RNAs (snRNAs, do inglês *small RNAs*), conhecido como *spliceossomo*. Este complexo é responsável por clivar as junções intron-exon, remover os introns, e por fim unir as extremidades dos exons, que são as regiões do genoma que codificam para uma proteína, formando um RNA mensageiro (mRNA) maduro. Vale ressaltar que, de acordo com o pensamento desta época, as seqüências intrônicas eram imediatamente degradadas sem que realizassem qualquer outra função celular, sendo consideradas apenas um apêndice evolutivo.

Logo após os estudos iniciais do evento do *splicing*, em 1979, Gruss e colaboradores lançaram a idéia de que os introns teriam uma importância fundamental para a biogênese dos mRNAs e para o processo transcricional. Consequentemente, a partir da quebra do paradigma de que as seqüências intrônicas eram um material sem função na célula, diversos trabalhos corroboraram esta idéia lançada no final da década de 70, indicando que a adição de introns em seqüências gênicas recombinantes era capaz de aumentar o nível do produto protéico esperado.

O grau de abrangência do efeito de otimização da expressão gênica inclui diversas classes de eucariotos. Em 1988, Buchman e Berg mostraram o aumento da expressão do gene da β -globina com íntron em células de mamífero em cultura, além de estudarem o efeito deletério da remoção dos introns do gene *DYN2* de *Saccharomyces*

cerevisiae. Chang e colaboradores (2006), Chapman e colaboradores (1991) e Campos-da-Paz e colaboradores (2008) melhoraram a expressão dos Fatores Plasmáticos IX e VIII humanos em células de mamífero. Estudos da função dos introns também foram realizados em plantas. Bourdon e colaboradores (2001) verificaram o efeito da inserção do intron de um gene específico de milho na expressão do gene repórter da luciferase. Por fim, Hasania e colaboradores (2006) verificaram o aumento da expressão do gene recombinante da a-1 antitripsina humana em *Pichia pastoris*, indicando que o efeito dos introns também pode ser observado em leveduras. Desse modo, a inserção de introns nas construções gênicas parece ser de grande relevância para a otimização da produção de proteínas recombinantes em culturas de células.

A partir daí, percebeu-se que o *splicing* não era um evento estático, correlacionando-se com a seqüência de DNA associada e com outros processos do metabolismo do RNA, como a poliadenilação do pré-mRNA e seu transporte pelo núcleo, a tradução e o decaimento. Adicionalmente, o *splicing* pode ocorrer concomitantemente à transcrição, sendo denominado *splicing* co-transcricional, ou após a transcrição, denominando-se *splicing* pós-transcricional. O primeiro tipo é o mais comum, e os estudos indicam que ele promove a regulação da transcrição. Já o *splicing* pós-transcricional é menos comum nos estudos levantados, tendo efeitos na regulação do transporte de mRNAs maduros do núcleo para o citoplasma (Han *et al*, 2011).

Em outras palavras, muitas proteínas que compõem a maquinaria de um determinado processo podem também fazer parte de outros, sendo que o efeito final desta interação é o aumento da produção de uma proteína recombinante (Le Hir *et al*, 2003). Porém, como o *splicing* pode aumentar as taxas de transcrição de um gene recombinante?

1.2.1.1. Efeito dos introns em nível de DNA

O efeito dos introns no melhoramento da expressão gênica pode ser verificado primeiramente no nível do DNA, podendo funcionar como seqüências às quais diversos elementos reguladores da transcrição se ligam. Os introns podem controlar a acessibilidade ao DNA por meio da modulação da posição dos nucleossomos. Sleckman e colaboradores, em 1996, verificaram que os *enhancers* intrônicos de imunoglobulinas continham regiões de ligação a fatores regulatórios da transcrição importantes. Estes sítios localizavam-se na região a montante do primeiro exon da cadeia constante. Com o

rearranjo V(D)J que permitia a variabilidade dos anticorpos existentes, esses sítios eram trazidos mais próximos do promotor, permitindo a regulação da transcrição por tais elementos.

Sabe-se também que os introns podem modificar o nível de remodelamento da cromatina, fazendo com que o DNA esteja mais acessível para a ligação da RNA polimerase II e dos fatores de transcrição associados, conseqüentemente aumentando o nível de transcrição do gene estudado. Corroborando tal hipótese, foi constatado que, tanto *in vitro* quanto em camundongos transgênicos, os introns do gene do hormônio de crescimento de ratos promovem um alinhamento dos nucleossomos, permitindo um aumento de até quinze vezes da produção da proteína comparando-se com a versão sem intron (Liu *et al*, 1995). Este alinhamento dos nucleossomos se refere ao posicionamento ordenado destas estruturas na molécula de DNA, visto que as versões sem intron das construções analisadas possuíam os nucleossomos com espaçamentos irregulares ou então altamente empacotados, o que impede o acesso da RNA polimerase ao promotores para que ocorra a transcrição do gene. O remodelamento da cromatina devido à utilização de introns em construções gênicas recombinantes também foi verificado por Lauderdale e Stein, em 1992. Os autores utilizaram introns do gene da ovoalbumina de galinha e estudaram seus efeitos apenas *in vitro*. Curiosamente, a versão sem introns deste gene (o cDNA) não foi capaz de induzir o alinhamento da cromatina, indicando realmente que o efeito positivo dos introns nesta construção se devia à acessibilidade do DNA.

Sabe-se também que, depois de transcritos, os sinais de *splicing* de introns podem melhorar a atividade e processividade da RNA polimerase II. Estudos demonstraram que um dos principais componentes do *spliceossomo*, o snRNA U1, interage com o fator de transcrição geral TFIIH no estágio inicial da transcrição, estimulando a taxa de formação da primeira ligação fosfodiéster pela RNA polimerase II (Kwek *et al*, 2002). A interação entre TFIIH com U1 foi verificada com experimentos *in vitro*, incubando-se diversos fatores de transcrição com RNAs randômicos. Foi identificado um produto de aproximadamente 160 pb ligado ao fator TFIIH, denominado snRNA U1. Com isso, há grandes indícios de que o snRNA U1 funcione como um regulador da transcrição por meio da RNA polimerase II, além do seu papel no processamento do RNA.

A determinação da posição do intron também é importante para que a sua função de potencializador da expressão gênica seja alcançada. Um estudo indicou que a posição

do sítio de *splicing* 5' em relação ao promotor afeta a transcrição gênica, sendo que quanto maior a distância entre eles, menor é taxa de transcrição (Furger *et al*, 2002). Neste caso, os autores clonaram espaçadores entre o promotor de CMV e o primeiro intron de uma construção de um minigene de HIV, sendo que esse procedimento reduziu significativamente a produção do mRNA. Ainda neste trabalho avaliou-se o efeito da redução de dois introns do gene *DYN2* de *Saccharomyces cerevisiae*. A remoção do intron proximal, bem como a do intron distal, teve efeitos de redução da produção do transcrito. Entretanto, essa redução foi maior quando se removeu o intron próximo ao promotor. O efeito de diminuição dos níveis de mRNA na construção sem o intron distal pode ser explicado pela menor estabilidade do mRNA devido à menor taxa de poliadenilação do transcrito (Furger *et al*, 2002). Quanto à levedura *S. cerevisiae*, sabe-se que é um eucarioto bastante simples que possui apenas 3,8% dos seus genes com introns, sendo que a maioria destes se localiza próximo a promotores (Spingola *et al*, 1999). É possível então deduzir que a posição do intron pode afetar a intensidade de produção de um transcrito. Outro trabalho que também analisou a questão do efeito do posicionamento dos introns nos níveis de transcrição foi o de Nott e colaboradores (2003). Eles testaram a atividade do intron da triose-fostato isomerase humana no sistema de expressão do gene repórter da luciferase. Verificou-se que quando aquele era colocado mais distante do promotor, a atividade era menor do que a apresentada pela construção onde o intron foi colocado mais próximo ao promotor. Mesmo assim, com o intron distal, observou-se o aumento da transcrição.

Entretanto, ainda não é possível afirmar que há um padrão para o posicionamento dos introns e o seu efeito na transcrição gênica, visto que os mecanismos que estão envolvidos neste processo são muito complexos. Com isso, há apenas indícios que mostram que a atividade potencializadora dos introns é melhor quando estes são posicionados próximos ao promotor de estudo.

1.2.1.2. Interação do *splicing* com eventos de processamento de pré-mRNAs

Os dois principais processos de maturação do mRNA de eucariotos antes de sua tradução, além do *splicing*, são a adição da 7-metil-guanosina (CAP) na região 5' do mRNA, e a clivagem e poliadenilação de sua região 3'. Sabe-se que o primeiro processo ocorre no início do processamento do mRNA, não sendo então dependente do *splicing* ou de proteínas componentes do *spliceossomo*.

Entretanto, a formação da região 3' do mRNA maduro é um evento dependente do *splicing*, sendo que proteínas pertencentes ao *spliceossomo* e ao complexo de poliadenilação interagem entre si e participam dos dois processos. Isso foi demonstrado com experimentos de co-imunoprecipitação e *western blotting* que indicaram que snRNP U1 se ligava diretamente com a subunidade de uma proteína que participava da clivagem e poliadenilação do RNA (Lutz *et al*, 1996). Estes experimentos *in vitro* indicam que a presença dos introns em uma construção gênica pode ser importante também para a completa formação e estabilidade do mRNA (por meio da poliadenilação), visto que os processos de maturação de mRNA (*splicing* e poliadenilação) estão interligados.

1.2.1.3. Efeito dos introns nos processos tardios do metabolismo do mRNA (transporte núcleo-citoplasma e nonsense-mediated decay – NMD)

Após o processamento, os mRNAs são transportados através do Complexo do Poro Nuclear (*Nuclear Pore Complex - NPC*) para o citoplasma, onde serão traduzidos. O NPC é constituído por proteínas que, em conjunto, atuam interagindo com outras proteínas do *spliceossomo*, do complexo de poliadenilação e do complexo de ligação a CAP (*CAP-binding complex - CBP*). Se um mRNA está pronto para ser transportado para o citoplasma, ou seja, sofreu todas as etapas de processamento corretamente, este evento ocorrerá normalmente. O mecanismo pelo qual os introns aperfeiçoam a exportação de mRNAs maduros para o citoplasma é o recrutamento de fatores específicos de transporte ligando-se aos RNAs processados, sendo que estes fatores fazem parte do Complexo da Junção Exon-Exon (*Exon Junction Complex - EJC*).

O EJC consiste em quatro proteínas principais denominadas eIF4A3 (Chan *et al*, 2004), Y14 (Kataoka *et al*, 2000), Magoh (Le Hir *et al*, 2001a) e MLN51 (Degot *et al*, 2004), além de outras proteínas auxiliares, como Aly/REF (Le Hir *et al*, 2000), RNPS1 (Mayeda *et al*, 1999), SRm160 (Blencowe *et al*, 1998), e hUpf3 (Le Hir *et al*, 2001b). O complexo EJC se deposita a -20 nucleotídeos das junções exon-exon, sendo que, após o transporte através dos poros nucleares, o complexo Aly/REF rapidamente se dissocia, enquanto Y14 permanece ligado ao mRNA no citoplasma. Entretanto, segundo Gatfield e Izaurralde (2002), apesar do *splicing* aumentar o transporte de mRNAs, do núcleo para o citoplasma, algumas proteínas responsáveis pelo transporte do transcrito, como

Aly/REF, interagem com o RNA independentemente do *splicing*. Os autores verificaram esse fenômeno em *Drosophila*.

Se o mRNA não for corretamente processado, ele poderá ser retido no núcleo. Neste último caso, Legrain e Rosbach (1989) demonstraram que alguns fatores de *splicing* agem de modo a impedir o transporte de transcritos que ainda não tenham sido processados. Foi observado que fatores de *splicing* como U1 snRNA, RNA 6 e RNA 9 interagem *in vivo* com a junção de *splicing* 5', fazendo com que este pré-mRNA siga o caminho do *splicing*, e não seja portanto transportado sem ser processado. Este mecanismo impede que porventura mRNAs mal-formados possam ser traduzidos, produzindo-se proteínas aberrantes na célula. Em outro modelo de estudo, os retrovírus como o HIV, a produção da proteína *rev* é necessária para o transporte do mRNA do gene *env* (Hammariskjold *et al*, 1989). Isso foi demonstrado por meio da deleção do gene que expressava *rev* de um vetor que também co-expressava *env*. Observou-se que os níveis de mRNA de *env* caíram bastante quando a proteína *rev* parou de ser expressa, mas que, paralelamente, a quantidade de RNA total de *env* não foi alterada, indicando que havia um acúmulo de RNA no núcleo da célula hospedeira que não foi processado e transportado (Hammariskjold *et al*, 1989). Desse modo, fatores em *trans* do próprio vírus regulam o transporte do RNA processado, não-processado e parcialmente processado. Ainda neste trabalho, foi descoberto um elemento em *cis* da região codificadora do envelope que regula o transporte do transcrito de *env* (Hammariskjold *et al*, 1989).

No caso de genes naturalmente sem introns, o mRNA correspondente é transportado normalmente também com o auxílio das proteínas do complexo EJC. Porém, diferentemente do processo que ocorre nos genes com introns, as proteínas do complexo interagem com proteínas do CBP, e não do *spliceossomo* (Nojima *et al*, 2007).

Por fim, um importante mecanismo de qualidade do RNA, denominado *non sense mediate decay* (NMD), também pode ser influenciado pela presença de introns no gene recombinante. O NMD é um mecanismo presente no citoplasma de células eucarióticas pelo qual mRNAs com códons de terminação prematuros são degradados. O NMD evita a tradução destes mRNAs aberrantes, o que pode gerar proteínas truncadas danosas para a célula (Le Hir *et al*, 2003). Em genes de mamíferos, considera-se um códon de terminação prematuro quando este se localiza a mais de 50 nucleotídeos a montante de uma junção exon-exon. O depósito de uma série de proteínas do

Complexo *Exon-Junction* (EJC) e do *spliceossomo* nas junções exon-exon cria “marcas” no mRNA que são reconhecidas pela maquinaria do NMD, destinando ou não o mRNA para a degradação (Le Hir *et al*, 2003). Estas “marcas” são na verdade uma série de proteínas que não se deslocaram das junções do complexo EJC no transporte núcleo-citoplasma do mRNA. Com isso, conclui-se que em mamíferos, o reconhecimento de códons prematuros de terminação relaciona-se com o *splicing*. Já em outros organismos, como *Drosophila* ou *Saccharoyces cerevisiae*, esse reconhecimento independe de proteínas do EJC e do *splicing* (Conti e Izaurralde, 2005).

A iniciação do mecanismo de NMD depende da proteína efetora chave, hUpf1. Ela forma um complexo com as proteínas hUpf2 e hUpf3, e em seguida é fosforilada (Ansmant e Izaurralde, 2006). Este complexo trimérico é a base da maquinaria de NMD. Após a interação com hUpf2 e hUpf3 e fatores do complexo EJC, a proteína hUpf1 é recrutada para o mRNA com códon de terminação prematura (CTP) por meio de interações com fatores de liberação (*release factors*) da tradução (eRF1 e eRF3) (Ansmant e Izaurralde, 2006). A montagem desse complexo multiprotéico promove a remoção do CAP 5' do mRNA, e ele é degradado. Porém, apesar dos avanços no estudo do processo de NMD, há ainda muito a ser esclarecido sobre a influência real destas interações para que o mecanismo de NMD seja disparado, principalmente em eucariotos superiores (Ansmant e Izaurralde, 2006).

A figura 2 mostra um esquema da interação das proteínas do EJC durante o *splicing*, o transporte nuclear do mRNA maduro e também durante o mecanismo de NMD.

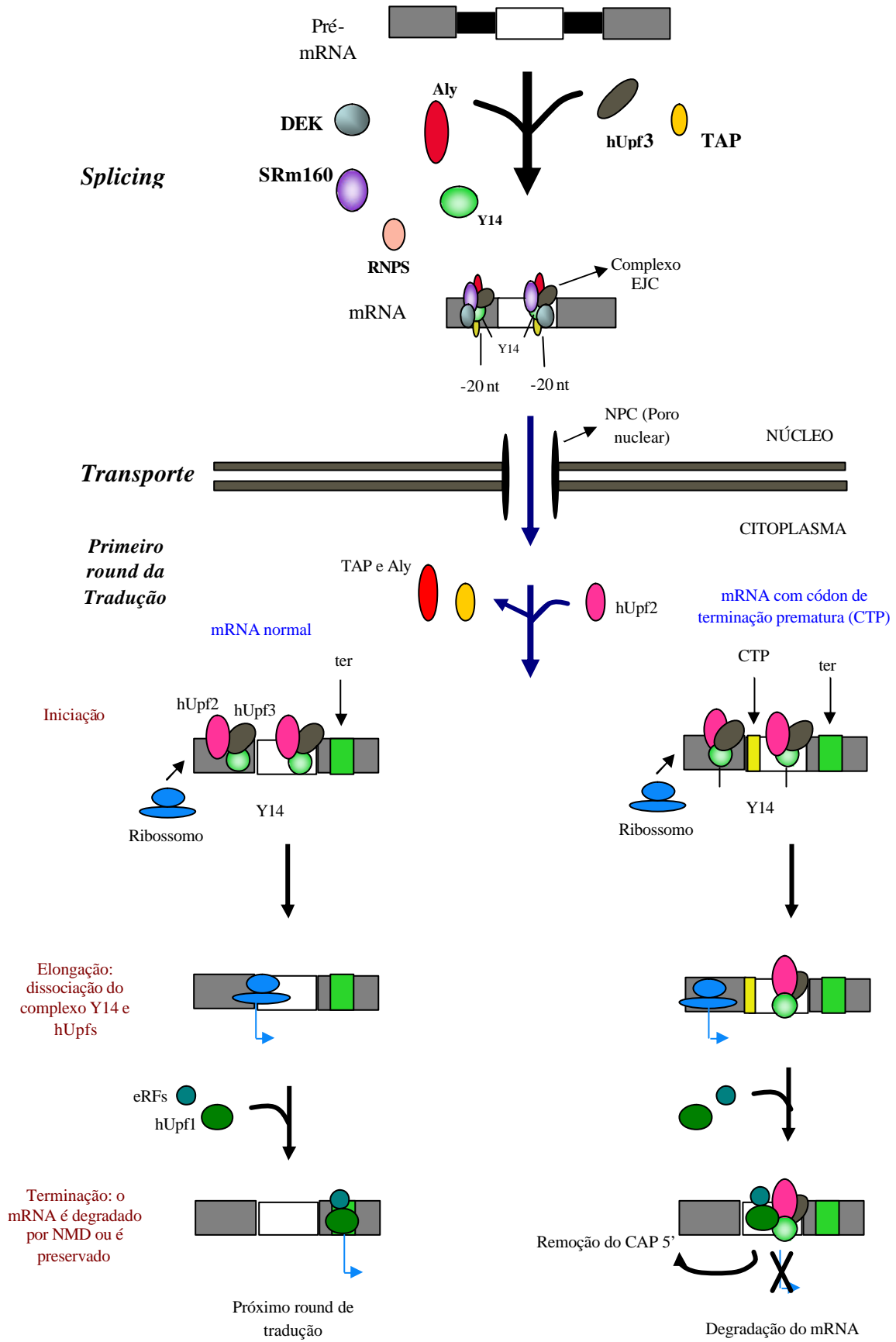


Figura 2. Ligação funcional entre o *splicing*, o transporte do mRNA núcleo-citoplasma e o NMD, com a participação das proteínas do EJC. O EJC consiste de proteínas que se ligam ao mRNA produzido no núcleo por *splicing*. Após o transporte, algumas proteínas do EJC permanecem ligadas ao mRNA já no citoplasma, formando “marcas” de *splicing* no mRNA. Após o transporte, o mRNA pode ser reconhecido pela maquinaria de NMD se possuir um CTP (códon de terminação prematura), e ser posteriormente degradado. Neste caso, não há o desligamento das proteínas do EJC quando o ribossomo percorre o mRNA para traduzí-lo. No caso de mRNAs normais, as proteínas do EJC que permaneceram ligadas ao mRNA após o seu transporte para o citoplasma serão removidas após a passagem do ribossomo para a síntese da proteína, sendo que posteriormente haverá a ligação de fatores de terminação (eRFs) e da proteína hUpf1, um importante efetor do NMD. Esta última proteína, se interagir com hUpf2 e 3, como ocorre em mRNAs com CTP, disparará o mecanismo de NMD. Esquema adaptado de Kim e Dreifuss (2001).

Foram mostrados diversos aspectos funcionais dos efeitos dos introns e do *splicing* em diversas etapas do processo transcricional, desde a formação do pré-mRNA até a degradação do mRNA maduro. Desse modo, pode-se inferir que os introns funcionam como elementos moduladores da transcrição e são importantes ferramentas na engenharia de promotores para a construção de novos vetores para expressão em eucariotos com alta eficiência.

1.3. Principais promotores utilizados em vetores para expressão de proteínas heterólogas em células de mamífero: o promotor de Citomegalovírus e o intron A

Como descrito anteriormente, uma das alternativas para o controle da expressão gênica é a manipulação de promotores, ou seja, a construção de promotores recombinantes e que possuem diversos elementos moduladores como os descritos neste trabalho. Desse modo, uma forma de se melhorar a expressão de proteínas heterólogas em eucariotos, como por exemplo, em células de mamíferos, é construir vetores plasmidiais que contêm os promotores modificados.

Dentre os principais promotores utilizados na construção de vetores para expressão em células de mamífero, destacam-se o promotor de vírus símio 40 (SV40), do vírus do Sarcoma de Rous (RSV), do hormônio de crescimento bovino (BGH) e o de Citomegalovírus (CMV) (Xu *et al*, 2001). Neste trabalho, os autores testaram diversas

combinações destes promotores com *enhancers* de CMV e de SV40, e sinais de poliadenilação de BGH e SV40 em três linhagens de células de mamífero distintas. Dentre as combinações de elementos usadas, as melhores em praticamente todas as células estudadas foram aquelas com o promotor e *enhancer* de CMV (Xu *et al*, 2001).

Um dos promotores mais comumente utilizados em construções de vetores de expressão em células de mamífero é o promotor constitutivo do citomegalovírus humano (CMV). Paradoxalmente, apesar da lenta replicação em culturas celulares e no próprio hospedeiro, estes vírus possuem um dos promotores mais fortes, justificando-se a sua utilização ubíqua nos vetores de expressão de células de mamífero (Stinski, 1999). Este promotor contém ainda, na região 5', um elemento *enhancer*, contendo diversas regiões regulatórias em *cis*, como por exemplo, quatro sítios de ligação ao fator nuclear 1 (NF1) *em tandem* (Chapman *et al*, 1991), além de sítios para AP1, CREB/ATF e NF- κ B (Stinski, M.F.; 1999).

O promotor de CMV e seu *enhancer* dirigem a expressão do gene Imediatamente Precoce de CMV (IE), que codifica proteínas que participam das vias de replicação do vírus. O gene sofre *splicing* alternativo, originando diversas proteínas que fazem parte do ciclo de replicação viral. Ele é constituído por 4 exons e 3 introns, sendo que o maior dos introns, o intron A (IA), possui um sítio de ligação a NF1, mais forte que os 4 presentes no promotor (Chapman *et al*, 1991; Hennighausen e Fleckenstein, 1986). Nesse estudo, Chapman e colaboradores observaram que o IA possui ainda um sítio homólogo ao elemento regulador interno do gene da troponina I, um elemento similar a um *enhancer*. Além disso, este intron pode também funcionar como sítio para a ligação de outros fatores de transcrição (Chapman *et al*, 1991). Desde então, não foram mapeadas no intron A novas regiões de ligação a outros fatores de transcrição, sendo que apenas o estudo de Ghazal e Nelson (1991) indicou que há a ligação de proteínas não-identificadas no exon 1 do gene. Na figura 3 observa-se a representação esquemática do promotor do CMV, o *enhancer* a montante do promotor e o IA flanqueado pelos dois exons do gene. Os sítios de restrição mais importantes para este trabalho também foram evidenciados na figura, além das regiões dos sítios de ligação a NF1, tanto no *enhancer* quanto no IA. Nesta construção, o exon 1 corresponde à região 5'UTR do mRNA correspondente ao gene IE1. Há ainda apenas parte do exon 2 (que contém o AUG correspondente ao início da tradução), que possui originalmente aproximadamente 200 pb.

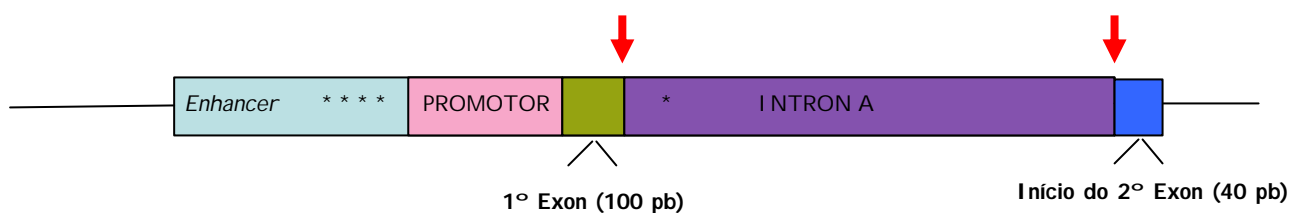


Figura 3. Esquema do promotor completo de CMV. O *enhancer* com os 4 sítios de NF1 (*), o primeiro e o segundo exon e o intron A, o maior intron deste gene, com aproximadamente 800 pb, podem ser observados na figura. O intron A possui ainda o sítio mais forte de ligação a NF1, representado por (*). As setas vermelhas indicam os sítios de *splicing*, sendo que a primeira seta evidencia o sítio doador e a segunda o sítio aceptor de *splicing*. Esquema adaptado de Quilici (2008).

Diversos estudos mostraram a eficiência do IA nas construções elaboradas para o aumento da expressão dos genes-alvo, comparando níveis de produção de diversas proteínas na presença e ausência do intron. Desse modo, alguns dos estudos realizados foram a análise da expressão de anticorpos (Xia *et al*, 2006), do fator VIII humano de coagulação (Campos-da-Paz *et al*, 2008) e da gp120 de HIV (Champman *et al*, 1991), além de proteínas repórteres, como a luciferase (Xu *et al*, 2001 e Mariati *et al*, 2010). Estudos determinando o potencial de modulação da expressão gênica utilizando formas truncadas do intron A ainda são bastante restritos, havendo apenas pedidos de patentes das novas construções (Missha e Shupisu, 2007). Como o grupo de Imunologia Molecular da Universidade de Brasília já utiliza o promotor de CMV nos vetores para expressão em células de mamífero (Ruggiero, 2002; Campos-da-Paz *et al*, 2008), o intron A foi escolhido como objeto de estudo deste trabalho.

1.4. A produção de proteínas recombinantes em células de mamífero

Em 1986 foi aprovada para uso humano a primeira proteína recombinante com fins terapêuticos produzida em células de mamífero, a proteína ativadora de plasminogênio tissular humana (*human tissue plasminogen activator*) (revisado em Wurm, 2004). Atualmente, 60 a 70% de biofármacos e proteínas com interesse comercial são produzidos em células de mamífero. Isso porque as células de mamífero têm características fisiológicas mais similares aos humanos do que células de leveduras ou

de *E. coli*. Desse modo, a existência de processos como glicosilação de proteínas, fosforilação, formação de pontes-dissulfeto e outras modificações pós-traducionais tornam a produção de proteínas com interesse comercial mais viável em células de mamífero do que em outros tipos celulares (Wurm, 2004; Costa *et al*, 2009).

A linhagem celular mais utilizada até hoje para tais fins é a linhagem parental imortalizada de células de ovário de *hamster* chinês (*Cricetulus griseus*) (CHO), sendo que a proteína ativadora de plasminogênio tissular humana foi produzida nesta linhagem. Essas células são epiteliais, têm a morfologia fibroblastóide e aderem às superfícies onde são cultivadas. Um subclone da linhagem parental de CHO foi estabelecido por Puck e colaboradores em 1958. Esta população celular deu origem à sublinhagem CHO-K1. Uma das características desta linhagem é a ausência do gene para a síntese de prolina, sendo necessária sua adição no meio de cultura. Já se produziu neste tipo celular diversas proteínas visando aplicações farmacológicas e industriais, como pode ser observado na tabela 1.

Tabela 1. Relação de proteínas terapêuticas produzidas em CHO.

<i>Proteínas terapêuticas produzidas em CHO</i>	<i>Ano de Aprovação</i>
Fator VIII (Advate)	2003 (EUA), 2004 (Europa)
rtPA (Tenecteplase)	2001 (Europa)
rtPA modificada (TNKase)	2000 (EUA)
rhFSH (Puregon)	1996 (Europa)
rhFSH (Gonal)	1995 (Europa), 1996 (EUA)
Anti-CD3 (Orthoclone)	1986 (EUA)
Anti-CD20 (Rituxan)	1987 (EUA)

Fonte: tabela adaptada de Walsh (2006).

Em seu estudo recente, Sellik e colaboradores (2011), mapearam o metabolismo central de carbono de CHO durante a produção de IgG4 em biorreatores. A figura 4 mostra o papel dos principais metabólitos durante a produção de proteínas recombinantes.

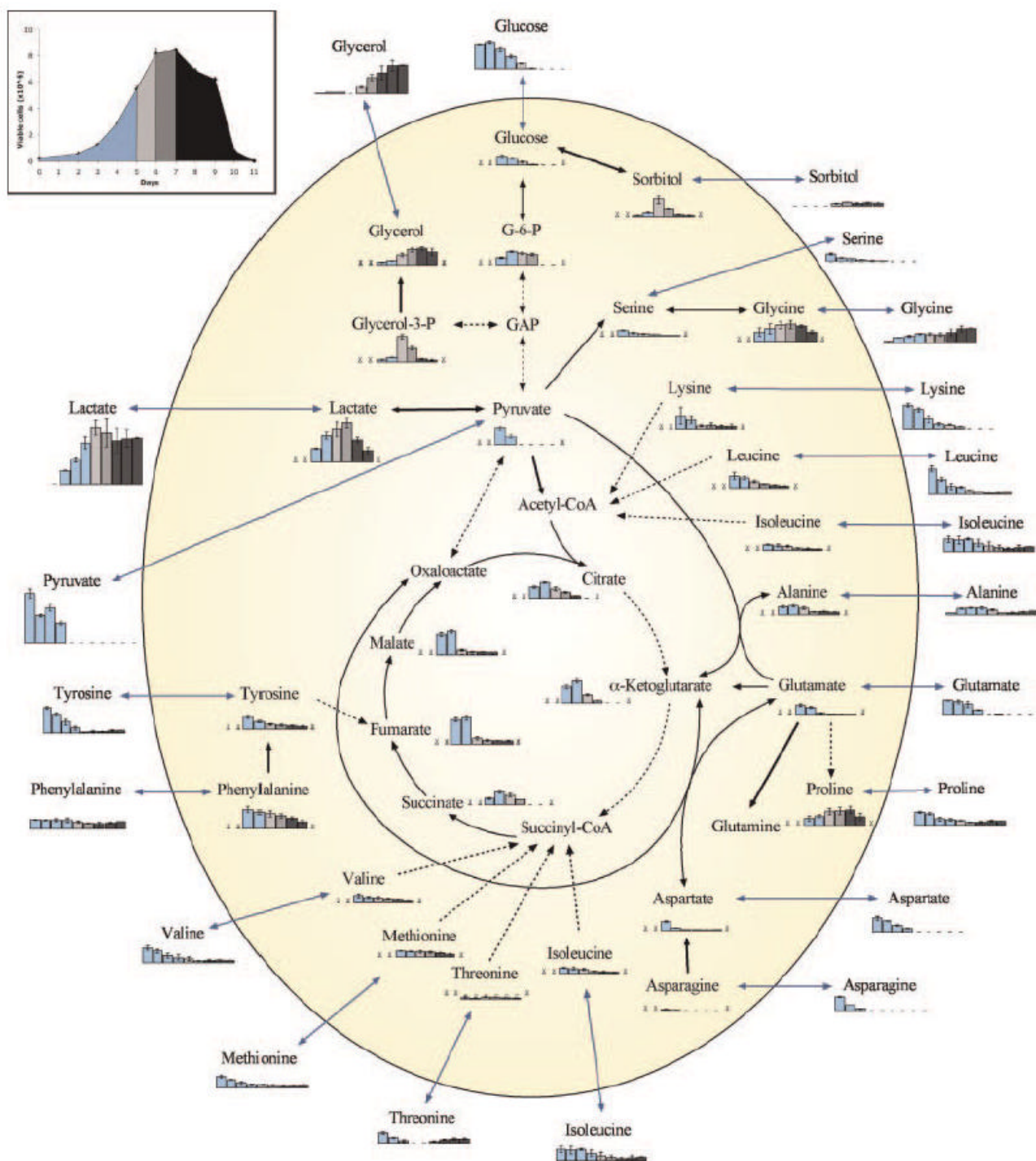


Figura 4. Metabolismo central de carbono em células CHO e a interação com o meio extracelular. As barras mostram a quantidade de metabólitos nos dias 0,3,4,5,6,7,8,9 e 11. As cores das barras indicam o estágio de crescimento celular (azul=crescimento exponencial; cinza claro=fase estacionária; cinza escuro=declínio). As setas indicam a direção das reações ou do transporte do metabólito. As linhas pretas em negrito indicam reações de único passo, e as setas pontilhadas, reações de múltiplos passos (figura reproduzida de Sellick *et al*, 2011).

Atualmente, utilizam-se também outros tipos celulares para a expressão de proteínas heterólogas. Dentre eles, destaca-se a linhagem HEK293, derivada de células embrionárias de rim humano transformada com o DNA de adenovírus tipo 5 (Graham *et al*, 1977). Esta linhagem é utilizada principalmente para a expressão transiente de proteínas de interesse, como a glicoproteína de membrana do retrovírus HTLV-1 (Penteado *et al*, 2006). Outro tipo celular utilizado para transfecção de plasmídios contendo proteínas de interesse é a linhagem HepG2, um carcinoma hepatocelular humano que não contém o genoma do vírus da hepatite B (Knowles *et al*, 1980). Estas células podem ser utilizadas para a expressão de FVIII recombinante, visto que há indícios da melhora de sua produção quando são utilizadas linhagens celulares hepáticas (Picanço *et al*, 2007). Por fim, a linhagem celular denominada COS-7 é também uma hospedeira de transfecção largamente utilizada. Esta linhagem celular fibroblastóide, oriunda do rim do “macaco verde” africano (*Cercopithecus aethiops*), é derivada da linhagem CV-1 que foi transformada com um mutante de SV40 que codifica o antígeno T (Gluzman, 1981). As células COS-7 são geralmente escolhidas para a transfecção de vetores que requeiram a expressão do antígeno T ou que contenham o promotor de SV40.

Desse modo, há no mercado várias opções de linhagens celulares para a melhor produção das diversas proteínas com interesse comercial. Estudos massivos visando ao aumento da expressão gênica nestes tipos celulares foram feitos desde a década de 80, culminando em produções de quantidades significativas de proteínas comerciais. Um exemplo é a produção na década de 80, que tinha um rendimento típico em torno de 50 mg/L de anticorpo recombinante, em linhagem celular não citada. Quatorze anos depois, já se conseguia um rendimento típico de 5g/L de anticorpo recombinante em linhagens celulares de mieloma (Wurm, 2004), um avanço significativo que tornou a produção em células de mamífero um negócio mais viável. Entretanto, um dos principais obstáculos para a utilização das células de mamífero em cultura como hospedeiros de produção ainda é o alto custo para produção em larga escala quando se compara com custo da produção em leveduras e em *E. coli*. Para isso, estão sendo realizadas pesquisas buscando o desenvolvimento de novos métodos para melhorar os níveis de produção de biofármacos tentar otimizar essa relação de custo-benefício. Alguns já descritos são: a mudança da temperatura de cultivo das células (Shi *et al*, 2005), adição de compostos químicos no meio de cultura, como o butirato de sódio (Sung *et al*, 2005) e derivados de aminoácidos (Chang *et al*, 2006), a variação nas quantidades de DNA transfectado

(Rajendra *et al*, 2001), e a engenharia dos vetores de expressão para células de mamíferos. Dentro da engenharia de vetores de expressão, a principal metodologia para a otimização da expressão de transgenes em células de mamífero é justamente o melhoramento de promotores por meio da inserção de elementos como os mostrados neste trabalho, como os introns.

1.4.1. Produção de anticorpos em células de mamífero

Os anticorpos monoclonais representam mais de 30% dos biofármacos em testes clínicos (Li *et al*, 2007) e aproximadamente 70% de todas as proteínas recombinantes produzidas em células de mamífero (Wurm, 2004). O principal isotipo de imunoglobulina produzido, a imunoglobulina G (IgG), consiste em duas cadeias pesadas idênticas (H) e duas cadeias leves (L) idênticas.

Durante a produção desta molécula em células eucarióticas, as cadeias são sintetizadas separadamente no retículo endoplasmático, onde são posteriormente modificadas e montadas em sua conformação final para posterior exportação. As cadeias pesadas livres não são exportadas sozinhas (Morrison e Scharff, 1975), a não ser que estejam ligadas às cadeias leves formando a molécula de anticorpo completa (Leitzgen *et al*, 1997). As cadeias leves, por outro lado, podem ser exportadas como monômeros livres ou homodímeros (Shapiro *et al*, 1996). Dessa forma, é necessária a expressão regulada das duas cadeias para a produção da molécula completa em células de mamífero.

Tem sido descrito que a transfecção separada de duas construções distintas, cada uma expressando uma cadeia de anticorpo, é o método menos eficiente para a obtenção do anticorpo inteiro. Com isso, a maioria dos vetores utilizados para este fim possui o sítio interno de entrada ribossomal (IRES – do inglês *internal ribosome entry sites*) (Silva *et al*, 2009), apesar de não ser bem estabelecido qual é o melhor tipo de construção para a produção correta de anticorpos com as cadeias leve e pesada. Em outras palavras, vários estudos tentam desenvolver o melhor modelo para a produção de anticorpos inteiros, dependendo do tipo de anticorpo e da linhagem celular utilizada.

1.5. Modelo Experimental

O grupo de Imunologia Molecular trabalha com a produção de proteínas heterólogas em células de mamífero desde 2001, sendo que já foram produzidos anticorpos humanizados de interesse comercial como o anti-CD18, anti-Z22 (Ruggiero, 2002) e anti-CD3 (Silva *et al*, 2009), e também fatores plasmáticos humanos, como o fator VIII e IX (Campos-da-Paz *et al*, 2008). Todos os vetores que albergam estes genes contêm o promotor de CMV, sendo este o modelo de estudo do presente trabalho. Desse modo, são necessários estudos para buscar elementos que, ao modificar este promotor, possam otimizar a expressão das proteínas expressas pelo grupo, para que elas possam futuramente ser produzidas em larga escala para comercialização. Para verificar a funcionalidade das construções obtidas, a proteína recombinante a ser utilizada no estudo é o anticorpo humanizado recombinante anti-CD3.

1.6. O anticorpo recombinante humanizado Anti-CD3

Desde 1986, quando o primeiro anticorpo para uso clínico (anti-CD3 OKT3 Orthoclone) foi aprovado para tratamento de rejeições agudas a transplantes, o mercado de anticorpos monoclonais cresce a passos largos. Até o momento, mais de 20 anticorpos, sendo versões murinas (sequência proveniente de camundongos), quiméricas (cadeias variáveis leve e pesada murinas e domínios constantes humanos) e versões humanizadas (arcabouço variável humano com transplante de CDRs murinos) foram aprovados e estão sendo comercializados (Reichert, 2004; Kim *et al*, 2005).

Um dos anticorpos mais estudados desde então é o anticorpo anti-CD3. O CD3 é uma molécula presente na superfície de linfócitos T, que está relacionada à ativação desse tipo celular, levando a um aumento da resposta imune do hospedeiro. Em determinados casos, como em transplantes ou em doenças autoimunes, é necessário que a ativação desses linfócitos esteja reduzida, prevenindo o agravamento do quadro clínico. Desse modo, o anticorpo anti-CD3 interage com a superfície dos linfócitos reduzindo sua ativação, e conseqüentemente atenuando efeitos como rejeição a órgãos transplantados ou reações advindas de doenças autoimunes.

Seguindo esses estudos, o laboratório de Imunologia Molecular da Universidade de Brasília trabalha há mais de 10 anos com a humanização do anticorpo anti-CD3,

tanto nas versões scFv (fragmento variável de cadeia única) quanto FvFc (junção do scFv com a porção constante Fc). A figura 5 mostra um esquema dos fragmentos de anticorpos mencionados acima.

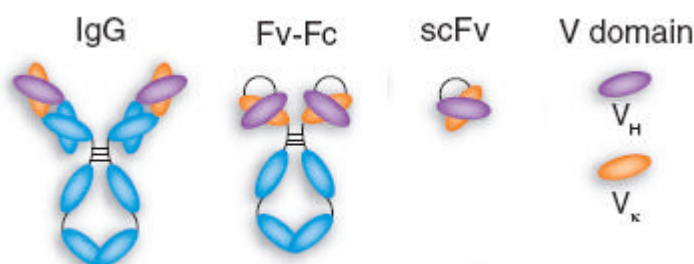


Figura 5. Representação de uma molécula de imunoglobulina em comparação com fragmentos gerados por técnicas do DNA recombinante. Representação esquemática de fragmentos de anticorpos expressados em células de mamífero. A primeira representação indica a molécula de anticorpo inteiro (IgG), seguida do Fragmento Variável de cadeia única (FvFc), que não possui apenas as porções variáveis ligadas à porção constante (Fc). O fragmento scFv (do inglês *single chain variable fragment*) é composto pelos domínios variáveis leve e pesado (VL e VH, respectivamente) (Holliger e Hudson, 2005).

Em 2009, Silva e colaboradores construíram versões FvFc humanizadas, que apresentavam o resíduo 86 da cadeia variável pesada treonina (murino) ou arginina (humano). Essa posição é importante para a estrutura tridimensional da molécula. Os genes construídos foram clonados em vetores dicistrônicos e expressos em células CHO, de forma transiente e estável. Após purificação e ensaios para análise da função dos anticorpos produzidos, verificou-se que ambas as versões se ligam à molécula CD3 na superfície dos linfócitos. Entretanto, em ensaios de competição com o OKT3, não houve um bloqueio efetivo da sua ligação com os linfócitos, o que levou à proposição de novas formas de humanização do anti-CD3 por meio de mutações sítio-dirigidas (tese de doutorado de Janaína Lima de Paula, em andamento).

Visando a melhoria dos níveis de expressão do anticorpo construído por Silva (2008) e também a produção em longo prazo (transfecção estável), Alcântara (2010) construiu um vetor de expressão contendo os mesmos genes do anti-CD3, porém com modificações que incluíam a inserção de elementos anti-repressores. Essas alterações tem por objetivo a otimização da produção dos anticorpos em células de mamífero.

Em Quilici (2008), foram realizados estudos do efeito de diferentes construções de promotores contendo intron A em versões inteira e deletadas, utilizando o gene repórter da luciferase. No presente trabalho, as construções obtidas foram avaliadas quanto à capacidade de melhorar a produção do FvFc do anticorpo anti-CD3

humanizado. Ainda, foram testados os níveis de produção do mRNA do anticorpo, bem como foram avaliados alguns mecanismos de ação dos introns como potencializadores da expressão dos genes estudados.

Em trabalho anterior (Quilici, 2008), foram obtidas 3 novas construções a partir de deleções no Intron A do promotor de CMV, sendo as deleções de 200, 400 e 600 pb, conforme esquema apresentado na figura 6. As novas construções foram obtidas por meio de clivagem com as enzimas de restrição indicadas na figura 6 que apresentavam sítios únicos no vetor, e foram clonadas a montante do gene repórter da luciferase. A análise dos níveis de expressão do gene repórter obtidos a partir de cada construção indica que as modificações no intron A do gene imediatamente precoce do promotor de CMV influenciam os níveis de expressão do gene repórter da luciferase, podendo, inclusive, melhorá-la.

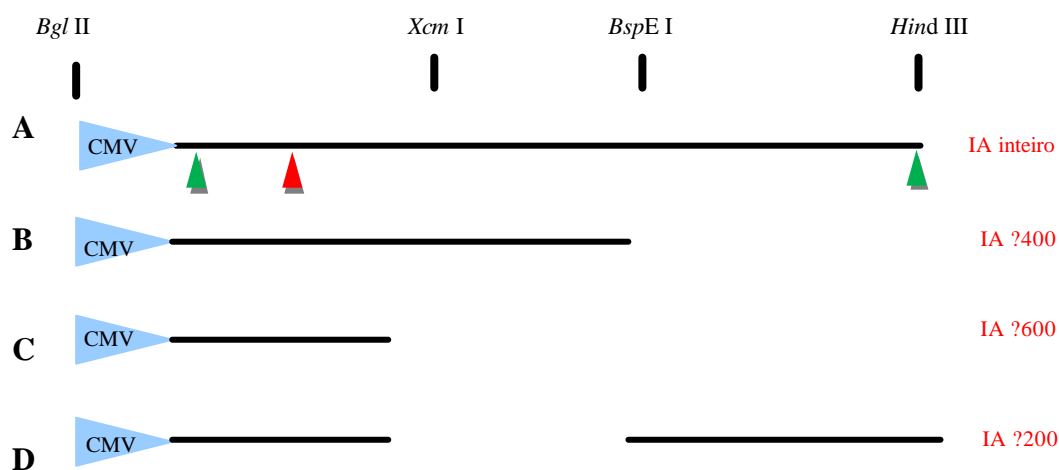


Figura 6. Deleções realizadas no intron A de CMV. Os quatro painéis mostram construções com o intron A deletado (B, C e D) comparadas com a construção contendo o intron A selvagem (A). Os triângulos azuis representam o promotor e *enhancer* de CMV, e os traços pretos o intron A, inteiro ou deletado. Estão evidenciados os sítios de restrição utilizados para a realização das deleções, os potenciais sítios doador e aceptor de *splicing* (▲), e o ATG predito (▲). O promotor e intron não estão em escala.

Na figura 7, observa-se o efeito das deleções do IA do promotor de CMV na atividade da luciferase (Quilici, 2008). As diferentes construções foram testadas por

meio de transfecção transiente e mensuração da atividade da luciferase, 24 e 48 horas pós-transfecção.

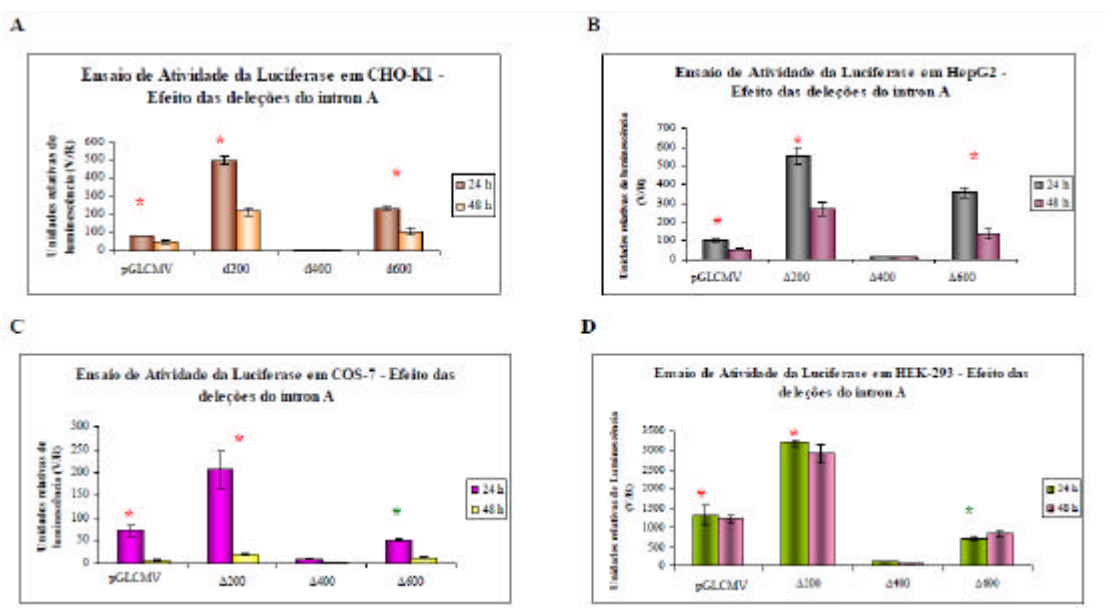


Figura 7. Efeito das deleções do intron A na atividade da luciferase em diferentes linhagens celulares. As construções referentes aos plasmídios com o gene repórter da luciferase de vaga-lume e promotor de CMV com intron A (pGLCMV), intron A deletado em 200 pb ($\Delta 200$), intron A deletado em 400 pb ($\Delta 400$) e intron A deletado em 600 pb ($\Delta 600$) foram transfectadas em quatro linhagens de células de mamíferos: **CHO-K1, HepG2, COS-7 e HEKek-293**. Posteriormente mediu-se a atividade da luciferase 24 e 48 horas pós-transfecção. Os asteriscos vermelhos indicam diferença estatisticamente significativa da atividade da luciferase entre as construções ($P > 0,05$). Os asteriscos verdes indicam diferenças não significativas entre os valores. Figura reproduzida da dissertação de mestrado de Quilici (2008).

A deleção de 200 pb no intron A aumentou de 3 a 5 vezes a atividade da luciferase comparada à construção com intron A inteiro (dependendo da linhagem celular), enquanto a deleção de 600 pb aumentou em 2 vezes a atividade da luciferase. A construção com intron A deletado em 400 pb, ao contrário das demais, diminuiu a atividade da luciferase quando comparada com a construção que contém o intron A inteiro, sendo similar à encontrada quando se utilizou o mesmo vetor apenas cós com pCMV, sem intron A.

Na construção contendo a deleção de 600 pb, removeu-se o sítio acceptor de *splicing* localizado a jusante do sítio de *Hind III*. Alguns estudos já evidenciaram a

importância do sítio acceptor de *splicing* no intron A para a sua efetividade em vetores de expressão heteróloga, tendo em vista o recrutamento de proteínas efetoras do *splicing* e de transporte de mRNA para tradução (Awasti *et al*, 2005; Ghazal e Nelson, 1991). Desse modo, o aumento menos significativo da atividade da luciferase observado na construção ?600 pode ser resultado da perda deste importante sítio do promotor. A medida dos níveis de mRNA de luciferase nas construções mencionadas, obtida por Quilici (2008), reforça essa hipótese. Foi observado que em 24h pós-transfecção os níveis de mRNA eram maiores do que 48h pós-transfecção. Essa diminuição da produção pode ser resultado da perda desse sítio acceptor de *splicing* na construção ?600, que desestabiliza o mRNA, podendo levar ao seu decaimento por NMD, por exemplo (revisado por Lewin *et al*, 2003).

2. Objetivos

O presente trabalho teve como objetivo a caracterização do intron A de CMV, tanto na sua versão original, quanto na sintética, no contexto do promotor do gene IE de CMV. A função do IA, original e sintético, foi determinada por meio da análise da expressão do gene repórter da luciferase e de uma proteína recombinante de interesse biotecnológico, o anticorpo recombinante humanizado anti-CD3.

2.1) Abordagem experimental

Para que o objetivo central fosse alcançado, realizaram-se as seguintes etapas experimentais:

- 1 – Clonagem do promotor de CMV sintético com o intron A, no vetor pGL4.14, que contém o gene repórter da luciferase.
- 2 – Geração de formas variantes e inovadoras do intron A por meio de deleções em determinadas regiões do elemento.
- 3 – Clonagem do promotor de CMV sintético com o intron A no vetor pCO, que contém o gene do anticorpo recombinante humanizado anti-CD3, FvFc.
- 4 – Transfecção transiente das construções citadas acima em CHO-K1 para a mensuração da atividade da luciferase e quantificação do anticorpo secretado no sobrenadante de cultura.
- 5 – Mensuração dos níveis de produção de mRNA da luciferase de vagalume e do anticorpo recombinante das diversas construções por meio de qPCR.
- 6 – Análise da eficiência do *splicing* das variantes deletadas do intron A de CMV, em comparação com as versões sintéticas, por meio de qPCR.

7 – Verificação da existência de sítios de ligação a proteínas (possíveis fatores transcripcionais), na região da deleção de 200 pb do intron A de CMV, por meio de Ensaio de Mobilidade Eletroforética (EMSA).

3. Materiais e Métodos

3.1) MATERIAIS

3.1.1) Linhagens bacterianas

As linhagens da bactéria *Escherichia coli* utilizadas para os procedimentos de clonagem neste trabalho são destacadas a seguir, juntamente com o seu genótipo:

- XL1-blue (Stratagene): *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [F' *proAB lacIqZ? M15 Tn10* (Tetr)]. Os genes listados indicam alelos mutantes.
- DH5a: F'/*endA1 hsdR17*(r_K⁻m_K⁺) *supE44 thi¹ recA1 gyrA* (Nal^r) *relA1 D(lacIZYA-argF)U169 deoR* (F80*dlacD(lacZ)M15*). Os genes listados indicam alelos mutantes.

3.1.2) Linhagens de células de mamífero

Para a transfecção das construções de DNA plasmidial obtidas neste trabalho e para obtenção de extratos nucleares para ensaios de mobilidade eletroforética (EMSA), foram utilizadas as seguintes linhagens de células de mamífero:

- CHO-K1 (ATCC n°CCL-61): linhagem celular derivada de células epiteliais de ovário de *hamster* chinês (*Cricetulus griseus*). As células foram cultivadas em meio HAM-F12 (Hyclone) contendo soro fetal bovino (SFB) a uma concentração de 10% (v/v).
- HEK-293 (ATCC n°CRL-1573): é uma linhagem derivada de células de rim embrionário humano que contêm o genoma do adenovírus tipo 5. As células foram cultivadas em meio DMEM (GIBCO) contendo SFB a uma concentração de 10% (v/v).

Todas as linhagens celulares utilizadas neste trabalho são linhagens aderentes.

3.1.3) Plasmídios utilizados nas clonagens e transfecções

- **pGL4.14 (Promega) (figura 8a):** este vetor comercial possui o tamanho de 5,8 kb, e foi utilizado como arcabouço para a clonagem de todos os promotores construídos neste trabalho. Ele apresenta o gene repórter da luciferase de vaga-lume (*luc2*), controlado pelos promotores desenvolvidos neste trabalho, um sinal de poliadenilação sintético, e a marca de resistência à higromicina B, sendo que este gene tem a expressão controlada pelo promotor de SV40.

- **pUC57 promotor CMV com intron A modificado (figura 8b):** este vetor de 4,5 kb foi utilizado nos procedimentos de clonagem do promotor de CMV com intron A modificado no vetor pGL4.14. Ele possui o promotor completo de CMV (com *enhancer* e intron A) e modificações. O promotor de CMV com intron A modificado foi elaborado pelo grupo e sintetizado comercialmente pela empresa GenScript.

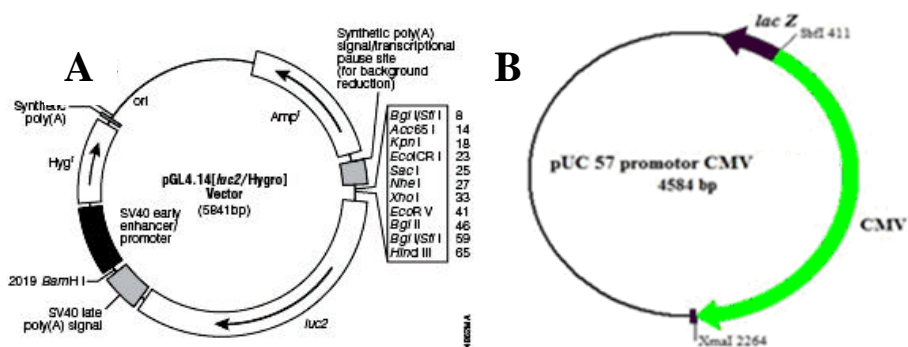


Figura 8. Mapas dos vetores utilizados para as clonagens do promotor de CMV otimizado. No painel “A” está representado o esquema do vetor pGL 4.14 (Promega, figura retirada do site www.promega.com), utilizado como arcabouço das novas construções de promotores sintéticos de CMV para a análise da atividade do gene repórter da luciferase. Em “B” observa-se o vetor pUC57 com promotor de CMV otimizado, sintetizado artificialmente.

- **pGL4.73 (Promega) (figura 9):** este vetor comercial tem o tamanho de 3,9 kb, e foi utilizado neste trabalho para co-transfecções com o vetor contendo o gene da luciferase de vaga-lume. Ele possui o gene repórter da luciferase de *Renilla* (*hluc*) controlado pelo promotor de SV40 e o sinal de poliadenilação também de SV40.

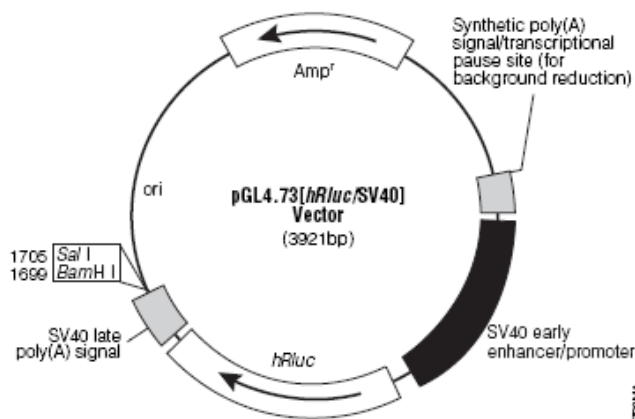


Figura 9. Mapa do vetor pGL4.73 (Promega). Este vetor foi utilizado para a co-transfecção com as demais construções feitas neste trabalho, para que desta forma a atividade da luciferase seja aferida como uma relação entre as atividades da luciferase de vaga-lume (construções testadas) e de *Renilla* (vetor pGL4.73). Esta figura foi retirada do site da Promega (www.promega.com)

- **pCO anti-CD3 FVFC humanizado:** este vetor de aproximadamente 8,5 kb foi construído por Alcântara (2010). A estratégia de clonagem para obtenção do referido vetor pode ser observada na figura 10.

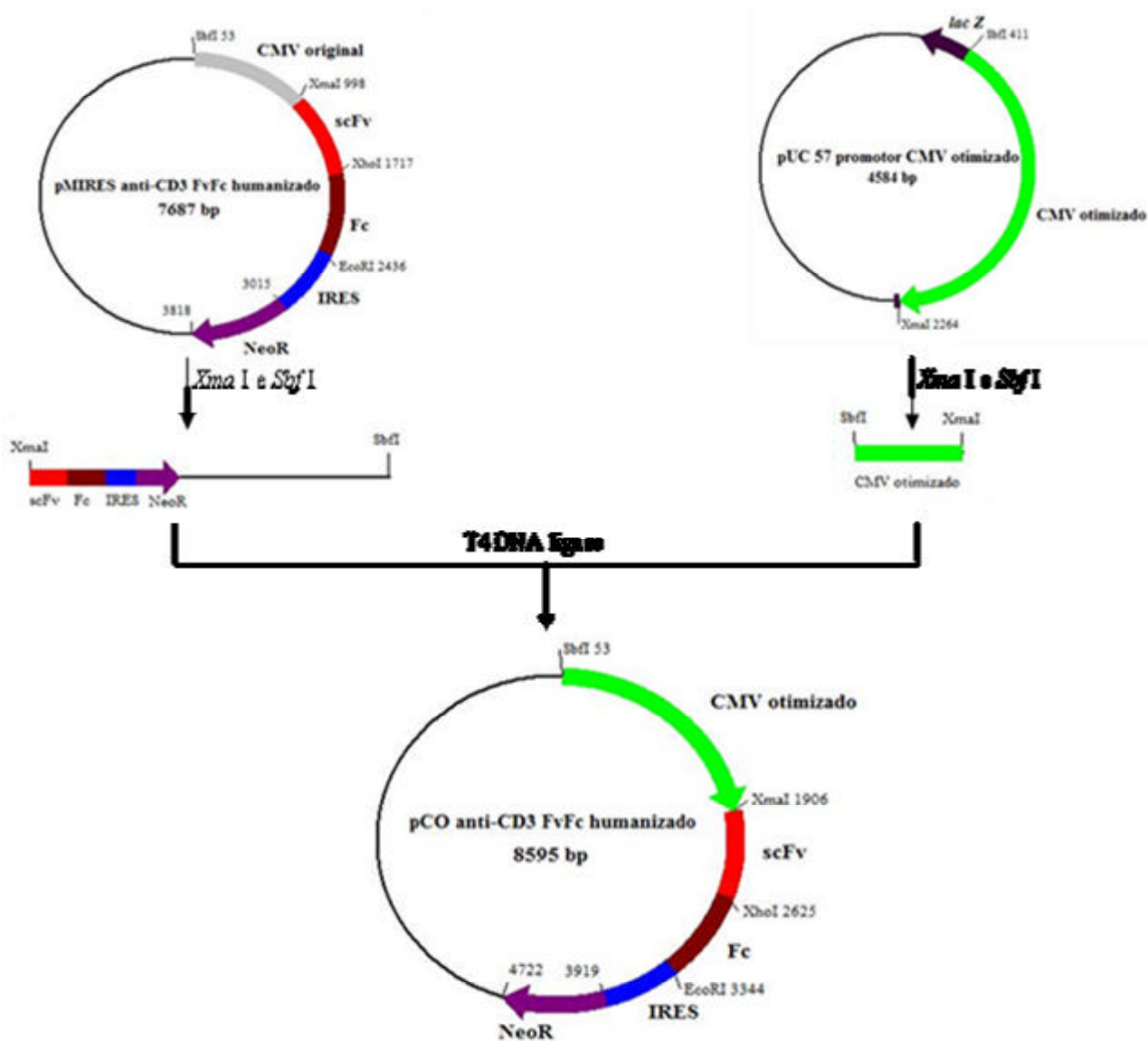


Figura 10. Estratégia de construção do vetor pCO anti-CD3 FvFc humanizado. A região do promotor CMV original do vetor pMIREs anti-CD3 FvFc humanizado foi retirada pela digestão com as enzimas *Xma*I e *Sbf*I. Com essas mesmas enzimas, retirou-se o promotor CMV otimizado, o qual havia sido previamente sintetizado quimicamente e clonado no vetor comercial pUC57. A ligação do vetor pMIREs anti-CD3 FvFc humanizado sem promotor ao fragmento de P_{CMV} otimizado deu origem ao vetor pCO anti-CD3 FvFc humanizado. Siglas – CMV: promotor de citomegalovírus. scFv: fragmento variável cadeia simples. Fc: fragmento cristalizável. IRES: sítio de entrada ribossomal interno. NeoR: gene de resistência ao antibiótico G418. *lac* Z: operon *lac*. (reproduzido de Alcântara, 2010).

3.1.4) Meios de cultura

- Cultura de bactérias

LB (Luria-Broth)

Peptona de Caseína	10 g
Extrato de Levedura	5 g
NaCl	10g
pH 7,2	
H ₂ O q.s.p	1 L

LB-ágar

Adicionar ágar bacteriológico a uma concentração final de 1,4% (p/v).

SB (Super-Broth)

Peptona de Caseína	30 g
Extrato de Levedura	20 g
MOPS	10 g
pH 7,0	
H ₂ O q.s.p	1 L

SOB

Peptona de Caseína	20g
Extrato de Levedura	5g
NaCl	0,584g
KCl	0,186g
H ₂ O qsp	1L
pH 7,0	

SOC (100 mL)

Solução estoque de Mg ²⁺ 2M	1mL
Solução estoque de glicose 2M	1mL
Meio SOB	98mL

Estoque de Magnésio 2M

MgCl ₂ .6H ₂ O	20,33g
MgSO ₄ .7H ₂ O	24,65g
H ₂ O qsp	100mL

Estoque de Glicose 2M

Glicose	26,04g
H ₂ O qsp	100mL

Os meios de cultura para bactéria foram autoclavados por 15 minutos a 120°C.

Para a cultura das linhagens de células de mamífero utilizadas neste estudo, foram utilizados os meios de cultura HAM-F12, DMEM e RPMI-1640. Todos esses meios de cultura apresentam uma composição química bastante complexa, contendo sais inorgânicos diversos, vitaminas, aminoácidos e outros compostos, como piruvato de sódio. Todos os meios para cultura de células de mamíferos foram adquiridos prontos (em pó) para serem posteriormente dissolvidos em água, sendo necessária apenas a adição de determinada quantidade de bicarbonato de sódio (agente tamponante) dependendo do tipo de meio.

Meio de Congelamento de Células

DMEM (Hyclone)	
Soro Fetal Bovino	20% (v/v)
DMSO	5% (v/v)

*3.1.5) Soluções***- Soluções utilizadas para cultura de células****BSS (Solução Salina Balanceada) – GIBCO**

NaCl	8g
KCl	0,4g
CaCl ₂	0,014g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,098g
Na ₂ HPO ₄	0,048g

KH ₂ PO ₄	0,06g
Glicose	1g
Vermelho de fenol	0,01g
H ₂ O qsp	1L
pH 7,3	

BSS.CMF (Solução Salina Balanceada sem Cálcio e Magnésio) – GIBCO

NaCl	8g
KCl	0,4g
Na ₂ HPO ₄	0,048g
KH ₂ PO ₄	0,06g
Glicose	1g
Vermelho de fenol	0,01g
H ₂ O qsp	1L
pH 7,3	

Soro Fetal Bovino (GIBCO)

Foi adicionado aos meios de cultura na concentração de 10% (v/v).

Tripsina-EDTA (GIBCO)

Tripsina	2,5g
EDTA	0,38g
BSS.CMF qsp	1L
pH 8,0	

Azul de Tripán

Corante Azul de Tripán	400mg
PBS pH 7,2 qsp	100mL

Reagente de transfecção Lipofectamine 2000

É um lípido catiónico cuja formulação específica permite a transfecção de diversas linhagens de células de mamífero, como se pode observar neste trabalho.

- Soluções utilizadas para extração de DNA**Solução I**

Tris-HCl pH 8,0	25mM
EDTA pH 8,0	10mM
Glicose	50mM

Quando necessário, adicionou-se a esta solução RNase A em uma concentração final de 200µg/mL.

RNase A

RNase A	10mg/mL
---------	---------

A enzima é dissolvida em 10mM Tris-HCl pH 7,5 e 15mM de NaCl. Esta solução foi fervida por 15 minutos para a inativação de DNases contaminantes e em seguida resfriada lentamente até que fosse atingida a temperatura ambiente. Depois, foram feitas alíquotas estocadas a -20°C.

Solução II

NaOH	0,2M
SDS	1,0% (p/v)

Solução III

Acetato de Sódio	3 M
Ácido Acético Glacial	2 M

Etanol 100%

Etanol 100% (v/v)

Etanol 70%

Etanol 70% (v/v)

Acetato de Amônio

Acetato de Amônio	7,5M
-------------------	------

Acetato de Sódio

Acetato de Sódio	3M
------------------	----

pH 5,2

Clorofane

Fenol (equilibrado em pH 7,6)	1v
Clorofórmio	1v
? -Mercaptoetanol	0,02%
Hidroxiquinolina	0,1%

Equilibrado com igual volume de Tris-HCl 0,01M em pH 8,0.

Clorofil

Clorofórmio	24v
Álcool Isoamílico	1v

Equilibrado com 0,25v de tampão TE

Tampão TE

Tris-HCl pH 8,0	10mM
EDTA pH 8,0	1mM

Tampão Tris

Tris-HCl pH 8,0	10mM
-----------------	------

Glicogênio

Glicogênio	20mg/mL
------------	---------

- Soluções para preparo de células competentes e transformação**CaCl₂**

CaCl₂ a uma concentração de 50mM, dissolvido em água destilada e filtrado com filtro Millipore de 0,22µm

CaCl₂/glicerol

CaCl₂ a uma concentração de 50 mM contendo 15% de glicerol (v/v) para o congelamento de células competentes para choque térmico. A solução foi filtrada com filtro Millipore de 0,22 µm.

Solução de Glicerol

Glicerol	10% (v/v)
----------	-----------

Solução de X-Gal

Solução de 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactosídeo (X-Gal) dissolvido em N,N-dimetilformamida em solução estoque de 2,5% (m/v). Solução armazenada a -20°C e protegida da luz. Usada no meio de cultura na proporção de 1:100.

Solução de IPTG

Solução de isopropil-tio-β-D-galactosídeo (IPTG) dissolvido em água em solução estoque de 100 mM e esterilizado por filtração em membrana Millipore de 0,22 µm. Usada no meio de cultura na proporção de 1:1000.

- Soluções para preparo de gel de agarose**Tampão de corrida para gel de agarose (TEB) 10X**

Trizima-base	0,89M
Ácido Bórico	0,89M
EDTA	0,02M
pH 8,0 a 8,4	

Tampão de corrida para gel de agarose (TAE) 50X

Tampão Tris-acetato	2M
Trizima-base	242g
Ácido Acético Glacial	57,1mL
EDTA pH 8,0	0,05M

Tampão de Amostra para gel de agarose

Tampão de corrida TEB 10X	50% (v/v)
---------------------------	-----------

Glicerol	50% (v/v)
Azul de Bromofenol	0,1% (p/v)
Xileno Cianol	0,1% (p/v)

Brometo de Etídeo

10mg/mL dissolvidos em água e protegidos da luz.

- Soluções para preparo de gel de acrilamida para EMSA (ensaio de mobilidade eletroforética)

Poliacrilamida (acrilamida 30%, bisacrilamida 0,36%)	15 mL
Glicerina 50%	15 mL
TBE 10X	2,25 mL
Água bidestilada	45 mL
A essa solução, adicionar, no momento do uso:	
Persulfato de amônio 25%	200 µL
TEMED	50 µL

- Soluções para ensaios de ELISA (do inglês *enzyme-linked immunosorbent assay*)

NaCl 5M

8,8 g para um volume final de 30 mL

Tris-HCl 2M pH 9,5

7,3 g para um volume final de 30 mL

MgCl₂ 1M

6,1 g para um volume final de 30 mL

PBST

PBS 1X adicionado de Tween 20 0,1% (v/v)

APB

Tris-HCl 2M pH 9,5	100mM
NaCl 5M	100mM
MgCl ₂ 1M	5mM

Leite Desnatado em pó (MOLICO)

Dissolvido em PBST 1X na concentração final 5% (p/v)

3.1.6) Antibióticos**Ampicilina**

A ampicilina liofilizada foi ressuspensa em água destilada na concentração de 20 a 50 mg/mL. Após a ressuspensão, ela foi esterilizada por filtração em membrana Millipore de 0,22 µm. Após a filtração, ela foi estocada a -20°C e protegida da luz. Este antibiótico foi utilizado como marca de seleção para plasmídios transformados em células de *E. coli*.

Tetraciclina

A tetraciclina liofilizada foi ressuspensa em água destilada na concentração de 50 mg/mL e esterilizada por filtração em membrana Millipore de 0,22 µm. Após a filtração, ela foi estocada a -20°C e protegida da luz. Este antibiótico foi utilizado para a semeadura e manutenção de células *E. coli* das linhagens XL1-blue e XL10-gold, que possuem o gene de resistência a esse antibiótico.

Cloranfenicol

O cloranfenicol liofilizado foi ressuspensa em etanol 100% na concentração de 50 mg/mL. Após a filtração, ele foi estocado a -20°C e protegido da luz. Este antibiótico foi utilizado para a semeadura e manutenção de células *E. coli* da linhagem XL10-gold, que possui o gene de resistência a esse antibiótico.

Geneticina (G418)

A geneticina liofilizada foi ressuspensa em água destilada na concentração de 50 mg/mL e esterilizada por filtração em membrana Millipore de 0,22 µm. Após a

filtração, ela foi estocada a -20°C e protegida da luz. A geneticina foi utilizada para a transfecção estável das construções com o anticorpo anti-CD3 na linhagem CHO-K1.

Antibiótico/Antimicótico 100X (GIBCO)

Penicilina	10.000U/mL
Estreptomicina	10.000 $\mu\text{g}/\text{mL}$
Anfotericina B	25 $\mu\text{g}/\text{mL}$

Preparada em 0,85% de salina

Solução utilizada como antibacteriano e antimicótico que foi adicionada aos meios de cultura das células de mamífero, na concentração final 1X.

3.1.7) Materiais e soluções para a mensuração da atividade da luciferase

Para os ensaios de atividade da luciferase realizados utilizou-se o kit comercial da Promega **Dual-Luciferase Reporter Assay System** (nº de catálogo E1910). Ele contém os seguintes componentes:

- Luciferase Assay Buffer (tampão de ensaio da luciferase)
- Luciferase Assay Substrate (produto liofilizado) (substrato de ensaio da luciferase)
- Stop and Glo Buffer (tampão Stop and Glo)
- Stop and Glo Substrate 50X (substrato Stop and Glo)
- Passive Lysis Buffer 5X (tampão de lise passiva)

Além dos reagentes fornecidos pelo fabricante, foi utilizado PBS na concentração final 1X. Para isso, foi preparado um estoque 10X, que foi em seguida autoclavado, com a seguinte formulação:

PBS 10X

Na_2PO_4	11,5g
KH_2PO_4	2g
NaCl	80g
KCl	2g
pH 7,4	

3.1.8) *Materiais e soluções para preparo de extrato nuclear de CHO-K1 e HEK293 e EMSA*

TBS (Tris-Buffered Saline – 25 mM Tris)

NaCl	8g
KCl	0,2g
Tris-Base	3g
Água destilada	800 mL

Acertar o pH para 7,4 com HCl e completar o volume final para 1L.

Tampão A

[Final]	Solução Estoque	Volume adicionado (µL)
	Água	310,7
10%	Glicerol 70%	57,14
10mM	HEPES 1M, pH 7,9	4
10mM	KCl 1M	4
0,1mM	EDTA 0,5M	0,08
0,1mM	EGTA 0,5M	0,08
1mM	DTT 50mM	8
0,5mM	PMSF 50mM	4
1µg/mL	Leupeptina 50µg/mL	4
2µg/mL	Pepstatina 100µg/mL	8

O volume final da solução é 400 µL. O glicerol, a leupeptina e a pepstatina são opcionais.

Tampão C

[Final]	Solução Estoque	Volume adicionado (μL)
	Água	32,7
10%	Glicerol 70%	10
20mM	HEPES 1M, pH 7,9	1
0,4M	NaCl 4M	5
1mM	EDTA 0,5M	0,1
1mM	EGTA 0,5M	0,1
1mM	DTT 50mM	1
1mM	PMSF 50mM	1
1 $\mu\text{g}/\text{mL}$	Leupeptina 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$	1
2 $\mu\text{g}/\text{mL}$	Pepstatina 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$	1

O volume final da solução é 50 μL . O glicerol, a leupeptina e a pepstatina são opcionais.

NP-40 (IGEPAL) 10%

Tampão de Anelamento 5X (para anelamento da sonda ao oligonucleotídeo complementar)

Tris-HCl 1M pH 7,7

Solução de alto sal (para eluição das sondas do gel)

Tris	0,06g
EDTA	0,02g
NaCl	4,3g
Água qsp	50 mL

3.1.9) Materiais e soluções para extração de RNA total de CHO-K1

Todos os reagentes e materiais foram manipulados em condições *RNAse free*.

- DEPC (dietil pirocarbonato)

Preparar solução estoque a 1% (p/v).

- Clorofórmio

Foi alíquotado no momento da extração em tubos do tipo Falcon, devido à sua volatilidade.

- Isopropanol

Este reagente foi estocado em um tubo Falcon, sendo manipulado com luvas para que não fosse contaminado com RNAses.

- Etanol 100%

Etanol 100% manuseado com luvas e estocado em tubo tipo Falcon.

- Etanol 75% (v/v)

Etanol 100%	75mL
Água destilada <i>RNAse free</i>	25mL

- Acetato de Sódio

Acetato de Sódio	3M
pH 5,2	

Este reagente foi manuseado com luvas e dissolvido em água MiliQ *RNAse free*.

- Plásticos e vidrarias *RNAse free*

As vidrarias foram incubadas a uma temperatura de 180°C durante a noite para que ficassem livres de RNAses. As caixas das ponteiros e outros materiais plásticos foram incubados com DEPC a 0,01% a 4°C durante a noite, e posteriormente autoclavados para a remoção do reagente residual.

- Água *RNAse free*

Água destilada	
DEPC	0,01% (v/v)

Após a mistura, autoclavar a 120°C por 15 minutos.

- Materiais para preparo de gel de agarose *RNAse free*

A cuba de eletroforese, os pentes e a fôrma do gel foram tratados com DEPC a 0,1% (v/v) durante 1 hora (temperatura ambiente), ou a 4°C durante a noite. Após este período, os materiais foram lavados exaustivamente com água MiliQ para a remoção do DEPC. O tampão TEB foi preparado com a mesma fórmula citada anteriormente, sendo que foi preparado com água *RNAse free*. Toda a vidraria e espátulas necessárias para a pesagem da agarose foram incubadas a 180°C durante a noite. O tampão de amostra para a corrida do gel e o brometo de etídeo também foram preparados com a mesma formulação já descrita, sendo que a água utilizada era *RNAse free*.

3.1.10) Componentes de Reação

Mistura dNTP: com dGTP, dATP, dCTP e dTTP na concentração de 10 mM cada.

Albumina Sérica Bovina (BSA): 10 mg/mL (100X)

MgCl₂: 50 mM, utilizado nas reações de PCR (concentração final de 1 mM)

DTT: 0,1 M, utilizado nas reações de transcrição reversa na concentração final de 0,01M.

RNase OUT (40 U/ µL): um inibidor de RNase para as reações de síntese de cDNA.

3.1.11) Enzimas

Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG (2X) (Invitrogen – número de catálogo 11733046)

Este mix contém a enzima *Taq Platinum*, além do corante SYBR Green, MgCl₂ 6 mM, 400 µM de dATP, 400 µM de dCTP, 400 µM de dGTP, 800 µM de dUTP, *uracil DNA glicosilase* (UDG), estabilizadores e outros reagentes não-especificados. A presença da enzima UDG previne a reamplificação de produtos de PCR entre os passos da reação, permitindo apenas a amplificação de sequências-alvo genuínas. Esta enzima é inativada pelas altas temperaturas durante a ciclagem da PCR.

3.1.12) Marcadores de massa molecular de DNA

1 kb plus DNA LADDER (Invitrogen – número de catálogo 10787018)

Fragmentos de DNA em pb: 100, 200, 300, 400, 500, 650, 850, 1000, 1650, 2000, 3.000, 4000, 5.000, 6.000, 7000, 8000, 9000, 10.000, 11000, 12.000.

High DNA Mass LADDER (Invitrogen – número de catálogo 10496016)

Mistura equimolar de fragmentos de DNA em pb de 10.000, 6.000, 4000, 3.000, 2000 e 1000. Quando se utiliza 4 µL do marcador, correlaciona-se as bandas já citadas com as seguintes massas: 200, 120, 80, 60, 40 e 20 ng, respectivamente.

Low DNA Mass LADDER (Invitrogen – número de catálogo 10068013)

Mistura equimolar de fragmentos de DNA em pb de 2000, 1200, 800, 400, 200 e 100. Quando se utiliza 4 µL do marcador, correlaciona-se as bandas já citadas com as seguintes massas: 200, 120, 80, 60, 40 e 20 ng, respectivamente.

*3.1.13) Marcadores de massa molar de Proteína***Marcador de Massa Molar See Blue (Invitrogen – número de catálogo LC5625)**

Bandas de proteínas com os tamanhos, em kDa: 148, 98, 64, 50, 36, 22 e 16

*3.1.14) Anticorpos***Anticorpo Primário**

Goat Anti-human IgG (H+L) unconjugated (Thermo Scientific-Pierce)

Concentração de uso: diluição 1:1000

Anticorpo secundário

Anti-human IgG – conjugada a fosfatase alcalina (Sigma)

3.1.15) Oligonucleotídeos utilizados para seqüenciamento, clonagens e reações de PCR

Tabela 2. Seqüências dos oligonucleotídeos utilizados nas diversas etapas deste trabalho (os oligonucleotídeos citados foram sintetizados pela IDT, Integrated DNA Technologies, Inc.).

OLIGONUCLEOTÍDEO	SEQUÊNCIA	UTILIZAÇÃO
ChGAPDH Foward *	5' CCATGTTCCAGGAGGGAGATC 3'	Utilizado na

		reação de qPCR para a amplificação do gene constitutivo de CHO GAPDH
ChGAPDH Reverse *	5' GCCTTCTCCATGGTGGTGAA 3'	Utilizado na reação de qPCR para a amplificação do gene constitutivo de CHO GAPDH
VHCd3humanizadoRealtime Foward	5' CCTGACGAACCCAGTGCATA 3'	Utilizado na reação de qPCR para a amplificação da região do VH do anticorpo anti- CD3 humanizado
VHCd3humanizadoRealtime Reverse	5' GTTCAATCCGGTGCTGAGGT 3'	Utilizado na reação de qPCR para a amplificação da região do VH do anticorpo anti- CD3 humanizado
VLCd3humanizadoRealtime Foward	5' TCGGTACCAGAGCCAGAACC 3'	Utilizado na reação de qPCR para a amplificação da região do VL do anticorpo anti- CD3 humanizado
VLCd3humanizadoRealtime Reverse	5' AGGTCAAGTCCTCGTCTGC 3'	Utilizado na reação de qPCR para a amplificação da região do VL do anticorpo anti- CD3 humanizado
Fc(Ch2Ch3IgG1)Realtime	5' CTGCTCTTGTCAGCGTGAG 3'	Utilizado na

Foward		reação de qPCR para a amplificação da região do Fc do anticorpo anti- CD3 humanizado
Fc(Ch2Ch3IgG1)Realtime Reverse	5' GGCAGCCGGAGAACAACACTAC 3'	Utilizado na reação de qPCR para a amplificação da região do Fc do anticorpo anti- CD3 humanizado
Primer Não Splice Foward qPCR	5' GATTCCCCGTGCCAAGAGT 3'	Utilizado na reação de qPCR para amplificação do transcrito não- processado referente ao exon A de CMV
Primer Não Splice Reverse qPCR	5' GCCCAAAGCCAAAAACAGTA 3'	Utilizado na reação de qPCR para amplificação do transcrito não- processado referente ao exon A de CMV

* Os iniciadores destacados foram desenhados com o programa Primer Express Program for Real-Time PCR, versão 3.0. Eles foram sintetizados pela Sigma, no CIRAD Institute (França), em colaboração com o professor Alan Andrade, da Embrapa Cenargen de Brasília – DF.

3.2) MÉTODOS

3.2.1) Preparo e transformação de células competentes de *Escherichia coli*.

- Células competentes preparadas com CaCl₂ para choque térmico (adaptado de Sambrook e Russel, 2001)

- 1 – Inoculou-se 50mL de meio LB com 500 μ L de um pré-inóculo de *E. coli* crescido durante a noite.
- 2 – Incubou-se este inóculo a 37°C sob agitação de 250 rpm, até que fosse atingida uma A_{600} de 0,1 a 0,3 (início da fase exponencial de crescimento).
- 3 – Depois de crescida, a cultura foi centrifugada a 3.000 x g a 4°C por 15 minutos.
- 4 – O sedimento foi ressuscitado em 10mL de solução de CaCl₂ 50mM gelada por meio de suave agitação. A partir deste momento, a suspensão de células foi mantida sempre no gelo.
- 5 – Centifugou-se a amostra a 3.000 x g por 15 minutos a 4°C.
- 6 – Em seguida, descartou-se o sobrenadante e o sedimento foi ressuscitado em 1mL de solução de CaCl₂ 50mM gelada. Alternativamente, quando as células foram preparadas para congelamento, o sedimento foi ressuscitado em 1mL de solução de CaCl₂ 50mM / glicerol 15% (v/v) gelada.
- 7 – O tubo contendo as células foi mantido por pelo menos meia hora, quando as células então foram consideradas competentes. Desse modo, foram usadas imediatamente após o preparo ou então congeladas em banho de gelo seco e etanol e posteriormente armazenadas no freezer a -80°C.
- 8 – Após os procedimentos realizados acima, 100 a 200 μ L de células competentes foram incubadas com 100 a 500 μ g de DNA plasmidial em banho água/gelo por pelo menos 30 minutos.
- 9 – Em seguida, os sistemas de transformação foram incubados a 42°C por 3 minutos, e após este período eles foram rapidamente retornados ao gelo por até 1 minuto.
- 10 – Adicionou-se 1mL de meio LB aos sistemas submetidos ao choque térmico. Depois, os tubos foram incubados por pelo menos 1 hora a 37°C. Após este período, semeou-se 50 a 100 μ L (plasmídio intacto) ou 200 a 500 μ L (sistema de ligação) das células transformadas em placas contendo meio LB ágar com ampicilina a uma concentração final de 150 μ g/mL. As placas foram mantidas a 37°C durante a noite.

- Preparo de células competentes para transformação por eletroporação (Maranhão, A. Q, in Azevedo *et al*, 2003).

- 1 – Uma colônia isolada de *E. coli* foi inoculada em 10mL de meio SB. A cultura foi incubada durante a noite a 37°C sob uma agitação de 250 rpm.

2 – No dia seguinte, utilizou-se 500 μ L do pré-inóculo para 500 mL de meio SB contendo 2,5mL de glicose 2M e 2,5mL de solução estoque de Mg²⁺ 2M. A cultura foi incubada a 37°C sob a agitação de 250 rpm até que fosse atingida a OD a 600nm de 0,7 a 0,9. Após esse passo, o frasco contendo a cultura já na densidade óptica desejada deve ser resfriado a 0°C (no gelo), bem como todas as soluções a serem utilizadas, ponteiras, pipetas e outros materiais necessários para o procedimento.

3 – As células foram centrifugadas a 3.000 x g por 20 minutos a 4°C.

4 – Após a centrifugação, o sedimento foi ressuscitado em 25mL de glicerol 10% (v/v) gelado, utilizando pipetas pré-resfriadas. A seguir, adicionou-se mais 75mL de glicerol 10% (v/v) e centrifugou-se por 20 minutos a 3.000 x g e 4°C. O sobrenadante foi descartado e esse procedimento foi repetido mais uma vez.

5 – O sedimento foi ressuscitado em 25mL de glicerol 10% (v/v) gelado. Em seguida, as células foram transferidas para um tubo de 50mL e centrifugadas a 3.000 x g por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado.

6 – As células foram ressuscitadas com glicerol 10% (v/v) para uma densidade óptica a 600nm de 200 a 250 (aproximadamente 1 a 2mL). Em geral, não é necessário adicionar mais solução de glicerol, sendo as células ressuscitadas no volume residual presente no tubo da centrífuga após o descarte do sobrenadante.

7 – Neste ponto, as células foram consideradas competentes, sendo utilizadas imediatamente ou, alternativamente, sendo congeladas em alíquotas de 100 μ L em tubos novos no banho de gelo seco e álcool, sendo armazenadas a – 80°C.

- Transformação por eletroporação (Maranhão, A. Q, in Azevedo *et al*, 2003).

1 – Adicionou-se a um microtubo tipo Eppendorf, previamente resfriado em gelo picado, a amostra de DNA a ser transformada. As cubetas de eletroporação também foram previamente resfriadas. O volume máximo de DNA a ser eletroporado deve corresponder a 1/10 do volume de células usadas a fim de garantir a condutância adequada ao impulso elétrico.

2 – Após o descongelamento das alíquotas de células a serem utilizadas, elas foram misturadas ao DNA com movimentos circulares e suaves.

3 – A mistura de DNA com as células foi transferida rapidamente para a cubeta de eletroporação previamente resfriada. Os parâmetros elétricos para tal procedimento

foram os seguintes: 2,5 kV, 25 μ F e 200 Ω . O t (tempo em que a corrente passa pela amostra) esperado nessas condições é de 4,0 a 5,0 milissegundos.

4 – Imediatamente após a eletroporação adicionou-se meio SOC à cubeta (três lavagens com 1mL de meio para assegurar a remoção total das células eletroporadas). Os 3mL resultantes das lavagens foram juntados em um facon de 50mL estéril.

5 – O recipiente contendo as células transformadas foi incubado a 37°C por 1 hora sob agitação de 250 rpm.

6 – Em seguida, diluições desta cultura foram semeadas em placas contendo meio LB ágar e ampicilina a uma concentração final de 200 μ g/mL. As placas foram incubadas a 37°C durante a noite.

7 – No dia seguinte, observou-se o crescimento de colônias isoladas de bactérias, indicando a presença de células transformadas, ou seja, resistentes ao agente seletivo.

3.2.2) *Preparação de DNA plasmidial*

- Extração de DNA plasmidial em pequena escala pelo método de lise alcalina (adaptado de Sambrook e Russel, 2001).

1 – Uma colônia bacteriana contendo o plasmídio de interesse foi inoculada em 5mL de meio LB com 150 μ g/mL de ampicilina . A cultura foi crescida durante 16 a 20 horas sob agitação de 250 rpm a 37°C.

2 – No dia seguinte, o meio foi coletado em um microtubo de 1,5mL e centrifugado a 5.000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e a coleta foi realizada novamente, sob as mesmas condições.

3 – O sedimento foi ressuspenso em 200 μ L de solução I por meio de vigorosa agitação ou pipetagem.

4 – Em seguida, adicionaram-se 400 μ L de solução II (feita na hora). As amostras foram homogeneizadas por inversão de tubo (delicadamente), cerca de 5 vezes. Após a adição da solução II, as amostras não devem ficar mais do que 5 minutos à temperatura ambiente.

5 – Ao lisado celular foram adicionados 300 μ L de solução III, sendo feita novamente a homogeneização das amostras por inversão de tubos (5 vezes). Depois, incubou-se no gelo por 10 minutos.

6 – As amostras foram centrifugadas a 10.000 $\times g$ por 15 minutos a 4°C.

7 – O sobrenadante foi então coletado em novos tubos de 1,5mL, onde se adicionou RNase A a uma concentração final de 2µg/mL. Para a ação da enzima, as amostras foram incubadas a 37°C por 1 hora.

8 – Após a incubação com RNase, as proteínas das preparações foram extraídas adicionando-se 300 µL de clorofane às amostras. Essa mistura foi então agitada em aparelho do tipo *Vortex* por aproximadamente 2 minutos.

9 – Os tubos foram centrifugados a 10.000 x g por 5 minutos, e a fase aquosa da mistura (que continha o DNA plasmidial) foi transferida para outro microtubo de 1,5mL. Em seguida, ao tubo com as amostras recolhidas, adicionou-se 300µL de clorofil, e as amostras foram novamente agitadas no aparelho *Vortex* por 2 minutos e depois centrifugadas a 10.000 x g por 5 minutos.

10 – Após a centrifugação, a fase aquosa foi coletada em um microtubo de 2 mL, onde adicionou-se etanol 100% gelado até que se completasse o volume do tubo. As amostras foram então incubadas a – 20°C durante a noite ou então a – 80°C por pelo menos 1 hora, para a precipitação do DNA plasmidial. Essa metodologia foi realizada conforme descrito na sessão 3.2.12.

11 – Após a precipitação, o sedimento foi ressuspendido em 40µL de tampão Tris ou tampão TE (como o TE tem EDTA, que pode inibir algumas reações enzimáticas subsequentes, optou-se por ressuspende as amostras com o tampão Tris).

- Extração de DNA em larga escala pelo método de lise alcalina (adaptado de Sambrook e Russel, 2001).

1 – Uma colônia bacteriana foi inoculada em 3mL de meio LB contendo 150µg/mL de ampicilina. A cultura foi incubada sob agitação de 250 rpm, por 12 a 16 horas, a 37°C.

2 – Desse pré-inóculo, utilizou-se 500µL para inocular 250mL de meio LB com 150µg/mL de ampicilina. A cultura foi incubada a 37°C sob agitação de 250 rpm por 16 a 20 horas.

3 – A cultura foi então coletada por centrifugação a 6.000 x g por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado.

4 – O sedimento foi ressuspenso em 5mL de solução I por meio de vigorosa agitação.

5 – Adicionaram-se 10mL de solução II (feita na hora) às células ressuspendidas. O tubo foi homogeneizado por inversão (cuidadosamente) cerca de 5 vezes. As amostras não ficaram mais do que 5 minutos à temperatura ambiente.

6 – Depois, foram adicionados 7,5mL de solução III gelada, sendo feita nova homogeneização por inversão de tubos. As amostras foram incubadas no gelo por 20 minutos.

7 – Em seguida, os tubos foram centrifugados a $20.000 \times g$ por 30 minutos a 4°C .

8 – O sobrenadante foi transferido para um tubo menor, e a ele foram adicionados 0,6 volumes de isopropanol à temperatura ambiente. O sistema foi incubado por 5 minutos. Depois, centrifugou-se a amostra a $12.000 \times g$ por 30 minutos a 4°C .

9 – O sedimento foi seco e ressuspenso em 500 μL de TE, onde se adicionou RNase A a uma concentração final de $2\mu\text{g}/\text{mL}$. As amostras foram então incubadas a 37°C por pelo menos 1 hora e meia.

10 – Após a incubação com RNase, as proteínas das preparações foram extraídas com 1 volume de clorofane. Elas foram agitadas vigorosamente em aparelho do tipo *Vortex* por 2 minutos e centrifugadas a $10.000 \times g$ por 5 minutos. A fase aquosa foi coletada em outro microtubo e este procedimento foi repetido mais uma vez.

11 – Após a segunda extração com clorofane, adicionou-se 1 volume de clorofil. A mistura foi novamente agitada e centrifugada a $10.000 \times g$ por 5 minutos. A fase aquosa foi transferida para um novo microtubo.

12 – À última fase aquosa coletada, adicionou-se $\frac{1}{2}$ volume de acetato de amônio 7,5M e 2 volumes de etanol 100% gelado. As amostras foram então incubadas a -20°C durante a noite ou a -80°C por pelo menos 1 hora. Após este período, foi seguido o protocolo de término da precipitação descrito da sessão 3.2.12.

13 – Em seguida, o sedimento correspondente ao DNA plasmidial extraído foi ressuspenso em 200 μL de tampão Tris ou tampão TE (como o TE tem EDTA, que pode inibir algumas reações enzimáticas subsequentes, optou-se por ressuspende as amostras com o tampão Tris).

- Extração de DNA plasmidial em pequena escala utilizando o kit comercial QIAprep Spin Miniprep kit (Qiagen – número de catálogo 27106)

1 – Foi inoculada uma colônia bacteriana em meio LB com ampicilina a $150\mu\text{g}/\text{mL}$. A cultura foi incubada a 37°C por 12 a 16 horas sob agitação de 250 rpm.

2 – As amostras foram centrifugadas a 5.000 rpm por 5 minutos a temperatura ambiente em tubos de 1,5 mL. O sobrenadante foi descartado e esse procedimento repetido, sendo que no final o volume de células coletadas foi de 3mL.

- 3 – O sedimento foi ressuspenso em 250µL de tampão P1. A este tampão já foi adicionada RNase A.
- 4 – A essa mistura, adicionaram-se 250µL de tampão P2 (promove a lise celular), e misturou-se vagarosamente por inversão de tubo 4 a 6 vezes.
- 5 – Em seguida, foram adicionados 350µL de tampão P3 previamente resfriado às amostras. Elas foram homogeneizadas por inversão de tubo 4 a 6 vezes.
- 6 – Os tubos foram centrifugados a 13.000 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente.
- 7 – O sobrenadante foi coletado e aplicado na coluna de troca iônica do kit (QIAprep spin column).
- 8 – As colunas contendo o sobrenadante do passo 6 foram centrifugadas a 13.000 rpm por 30 a 60 segundos. O líquido que saiu da coluna foi descartado.
- 9 – Em seguida, a coluna foi lavada com 750µL de tampão PE e centrifugada a 13.000 rpm por 30 a 60 segundos. O líquido que saiu da coluna foi descartado.
- 10 – As colunas foram centrifugadas novamente nas mesmas condições para que o tampão PE residual fosse removido.
- 11 – As colunas foram colocadas em tubos novos de 1,5 mL. Para a eluição do DNA, foram adicionados 50 µL de tampão EB (Tris-HCl 10 mM pH 8,5) previamente aquecido por 10 minutos a 75°C no centro da coluna. Após 1 minuto, as amostras foram centrifugadas por 1 minuto, sendo o DNA recuperado nos microtubos.

- Extração de DNA plasmidial em larga escala utilizando o kit comercial QIAGEN Maxi Kit (QIAGEN-tip 500) (Qiagen – número de catálogo 12163).

- 1 – Uma colônia bacteriana foi inoculada em 3mL de meio LB com ampicilina a 150µg/mL e incubada por até 8 horas a 37°C sob agitação de 250 rpm.
- 2 – Quinhentos microlitros desse pré-inóculo foram adicionados a 250mL de meio LB com ampicilina a 150 µg/mL. A cultura foi então incubada a 37°C sob agitação de 250 rpm por 12 a 16 horas.
- 3 – As células foram centrifugadas a 6.000 x g por 15 minutos a 4°C. Descartou-se o sobrenadante.
- 4 – O sedimento foi ressuspenso em 10mL de tampão P1.
- 5 – Adicionaram-se 10mL de tampão P2 e misturou-se cuidadosamente por inversão de tubo (cerca de 5 vezes).

- 6 – À mistura, adicionaram-se 10mL de tampão P3 previamente resfriado. Homogeneizou-se o líquido por inversão de tubo (também cerca de 5 vezes).
- 7 – Os tubos foram centrifugados a $20000 \times g$ por 30 minutos a 4°C . O sobrenadante foi removido, colocado em outro tubo, e centrifugado novamente a $20000 \times g$ por 15 minutos a 4°C .
- 8 – Enquanto a centrifugação do passo 7 ocorria, a coluna QIAGEN-tip 500 foi equilibrada com 10mL de tampão QBT, que passou por meio da ação da gravidade.
- 9 – O sobrenadante do passo 7 foi aplicado na coluna já equilibrada, e também passou por meio da ação da gravidade.
- 10 – A coluna foi lavada 2 vezes com 30mL de tampão QC.
- 11 – O DNA foi eluído com 15mL de tampão QF. O líquido contendo o DNA plasmidial foi coletado em um tubo de 50 mL.
- 12 – O DNA foi precipitado com 10,5mL de isopropanol a temperatura ambiente (0,7 volumes). Misturou-se o líquido por inversão de tubo e centrifugou-se a $15.000 \times g$ por 30 minutos a 4°C . Descarte cuidadosamente o sobrenadante.
- 13 – O sedimento foi lavado com 5mL de etanol 70% gelado e centrifugado a $20000 \times g$ por 15 minutos a 4°C .
- 14 – O sobrenadante foi descartado e o sedimento secado a temperatura ambiente. Após a secagem, foi ressuspenso em $200\mu\text{L}$ de tampão EB.

3.2.3) Extração e purificação de DNA de gel de agarose

- Purificação de DNA a partir de pedaços de gel de agarose com o kit comercial QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen – número de catálogo 28104).

- 1 – A banda correspondente ao fragmento de DNA a ser purificado foi cortada do gel de agarose feito com tampão TAE.
- 2 – A banda foi pesada. Adicionou-se 3 volumes de tampão QG para 1 volume de gel (100mg correspondem a $100\mu\text{L}$).
- 3 – A mistura foi incubada a 50°C por 10 minutos, ou até que o gel se dissolvesse completamente no tampão. Para que esse processo ocorresse mais rapidamente, a mistura foi agitada vigorosamente em aparelho do tipo *Vortex* a cada 2 minutos.

- 4 – Após a dissolução do gel no tampão, a mistura adquiriu a cor amarela. Caso contrário, se a cor da mistura fosse laranja ou violeta, deveriam ser acrescentados 10 μ L de acetato de sódio 3M, pH 5,0.
- 5 – Foi adicionado 1 volume de isopropanol (esse passo foi realizado quando os fragmentos de DNA possuíam tamanho menor que 500 pb e maior que 4 kb).
- 6 – A coluna de troca iônica do kit foi posicionada no tubo coletor de 2mL, também fornecido pelo fabricante.
- 7 – A amostra foi aplicada na coluna e centrifugada a 13.000 \times g por 1 minuto.
- 8 – O líquido remanescente foi descartado.
- 9 – A coluna foi lavada com 750 μ L de tampão PE. Centrifugou-se a 13.000 \times g por 1 minuto e descartou-se o líquido remanescente.
- 10 – A coluna foi centrifugada novamente nas mesmas condições para que o tampão PE residual fosse removido.
- 11 – A coluna foi colocada em um microtubo novo de 1,5mL, e o DNA foi eluído com 50 μ L de tampão EB previamente aquecido a 75°C por 10 minutos. Após a adição do tampão, a coluna ficou em repouso por 1 minuto, e depois foi centrifugada a 13.000 \times g por 1 minuto.

- Purificação de DNA de gel de agarose utilizando o método de Freeze/Squeeze (Barbas III *et al*, 2001).

- 1 – A banda correspondente ao fragmento de DNA a ser purificado foi cortada do gel de agarose feito com tampão TAE.
- 2 – Foi feita uma bolsa com um pedaço de Parafilm para se colocar o pedaço de agarose cortado. Essa bolsa teve as extremidades seladas por pressão com a parte inferior de um microtubo de 1,5mL, e na parte não-selada a banda foi inserida.
- 3 – A bolsa contendo o pedaço de gel foi congelada a – 20°C por pelo menos 15 minutos ou a -80°C por 5 minutos.
- 4 – Após o congelamento, o fragmento de agarose foi amassado com o auxílio da tampa de um microtubo de 1,5mL. Quanto mais eficiente fosse a trituração da banda, maior o rendimento da eluição.
- 5 – O líquido que foi obtido com o processo de trituração e o gel triturado foram transferidos para uma unidade de pré-filtro de 0,45 μ m (Millipore Ultrafree Collum) adaptada em um tubo de 1,5mL.

6 – O sistema foi centrifugado a $12.000 \times g$ por 10 minutos, e após este procedimento a unidade de filtro foi descartada.

7 – O líquido contendo o DNA foi precipitado com 2,5 volumes de etanol 100%, 1/10 do volume de acetato de sódio 3M pH 5,2 e 3 μ L de glicogênio 20mg/mL, como descrito na sessão 3.2.12.

8 – Após a precipitação, o sedimento foi ressuspenso em 10 μ L de tampão Tris, e o DNA plasmidial foi quantificado em gel de agarose.

3.2.4) Digestão de DNA plasmidial com enzimas de restrição

As digestões das amostras de DNA plasmidial utilizadas neste trabalho foram realizadas conforme as instruções do fabricante. As enzimas de restrição utilizadas neste trabalho são do tipo II, ou seja, reconhecem seqüências palindrômicas do DNA, cortando-o no sítio de restrição, e com isso formando extremidades coesivas ou cegas, dependendo da enzima utilizada. A quantidade de enzima utilizada foi padronizada para 1U de enzima por μ g de DNA, sendo que esta reação ocorreu durante 2 a 6 horas, na temperatura recomendada pelo fabricante.

3.2.5) Reação de defosforilação com a enzima SAP (fosfatase alcalina de camarão - Promega).

Essa enzima remove o grupamento fosfato da extremidade 5' de DNAs fita-dupla, impedindo desse modo a auto-ligação. Para essa reação, foram incubados cerca de 1 μ g de DNA, 2U de enzima e o seu tampão apropriado. O sistema foi então incubado a 37°C por 1 hora e inativado por 20 minutos a 65°C.

3.2.6) Reação de polimerização de extremidades de DNA utilizando o fragmento Klenow da DNA polimerase I (Invitrogen).

Para a extensão das extremidades coesivas geradas por meio de digestão com enzima de restrição, utilizou-se a mistura de dNTP na concentração final da reação de 1mM e 0,5U de enzima para cada 100 ng de material utilizado na digestão. O tampão utilizado foi o tampão da própria enzima de restrição utilizada para a digestão do DNA, visto que o fragmento *Klenow* tem atividade ótima em qualquer tampão. A reação

ocorreu a 37°C durante 40 minutos e depois a enzima foi inativada a 65° C por 20 minutos.

3.2.7) *Análise de DNA em gel de agarose*

A agarose foi derretida em tampão TEB 1X (gel de análise) ou TAE 1X (gel de eluição) no microondas. Após o resfriamento do gel, adicionou-se brometo de etídeo a uma concentração final de 0,5 µg/mL. Após a gelificação, o gel foi colocado em uma cuba de eletroforese com tampão de corrida (TEB ou TAE 0,5 X) e submetido a uma corrente elétrica. À amostra contendo o DNA a ser analisado, foi adicionado o tampão de amostra para a concentração de 1X. Após a corrida, o DNA foi visualizado a partir da incidência de luz ultravioleta (Sambrook e Russel, 2001).

3.2.8) *Ligação de fragmentos de DNA*

As concentrações de DNA (vetor e inserto) utilizadas nos sistemas de ligação variaram de acordo com o experimento, sendo normalmente uma razão molar que variou de 1:1,5 a 1:5, aplicando-se a seguinte fórmula:

$$\frac{\text{ng vetor} \times \text{tamanho do inserto em pb}}{\text{tamanho do vetor em pb}} \times \text{razão} \frac{\text{inserto}}{\text{vetor}} = \text{ng de inserto}$$

As reações de ligação foram preparadas em tampão de ligase 1X contendo 1U de T4 DNA ligase. Os sistemas possuíam 10 a 20 µL de volume final, sendo incubados por 16 horas a 16°C ou 4°C, dependendo do tipo de extremidade do DNA. Após este período, o sistema foi transformado em células competentes de *E. coli*.

3.2.9) *Sequenciamento de DNA com o kit DYEnamic ET DYE Terminator Cycle Sequencing kit for MegaBACE (Amershan Pharmacia Biotech)*

As reações de sequenciamento foram realizadas conforme as instruções do fabricante. Os parâmetros de ciclagem da PCR utilizados são mostrados a seguir:

- desnaturação: 94°C por 20 segundos

- anelamento: 50°C por 15 segundos
 - polimerização: 60°C por 1 minuto
- 25 ciclos

Em seguida, a reação de PCR foi precipitada e o DNA ressuspendido. Após estes tratamentos, realizou-se a reação de sequenciamento no aparelho MegaBACE 500 Plus, que ocorreu por 100 minutos a 9 kVa. As seqüências foram depositadas no banco de dados do Laboratório de Biologia Molecular (<https://www.biomol.unb.br/>), sendo a qualidade das mesmas analisadas com o programa PHRED (Ewing *et al*, 1998).

3.2.10) *Precipitação de DNA utilizando glicogênio como carreador*

O volume do material a ser precipitado foi aferido. Em seguida, acrescentou-se, na ordem, 3µL de glicogênio 20mg/mL, 1/10 do volume de acetato de sódio 3M pH 5,0 e 2 volumes de etanol 100 % gelado. O sistema de precipitação foi incubado a – 20°C durante a noite. No dia seguinte, as amostras foram centrifugadas a 12.000 x g por 45 minutos a 4°C. Descartou-se o sobrenadante e o sedimento foi lavado com 200µL de etanol 70% (v/v) gelado, centrifugando-se a 12.000 x g por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi deixado à temperatura ambiente por cerca de 15 minutos para secar.

3.2.11) *Cultura de células*

Durante toda a manutenção da cultura, as células foram observadas em microscópio invertido de contraste de fase NIKON DIAPOH.

Congelamento de células eucarióticas – Criopreservação (Ruggiero, 2002)

1 – As células em cultura aderente foram lavadas 3 vezes com BSS.CMF. Após esse procedimento, foram adicionados 3mL de tripsina para que as células se soltassem da garrafa de cultura.

2 – A suspensão celular foi transferida para um tubo falcon de 15mL, ao qual se adicionou 3mL de meio apropriado (dependendo do tipo celular) com SFB, para a inativação da tripsina.

3 – As células foram centrifugadas a 130 g por 8 minutos.

4 – O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspensão no meio de cultura remanescente do tubo.

5 – 2×10^6 células foram distribuídas em alíquotas de 500 μ L em criotubos, onde foram adicionados 500 μ L de meio de congelamento. Os criotubos foram identificados com nome da linhagem celular e data do congelamento.

6 – Os criotubos foram incubados a 4°C por 30 minutos, depois a – 20°C por 30 minutos e depois a – 80°C durante a noite. As células poderiam permanecer estocadas a esta temperatura ou ser transferidas para a estocagem em nitrogênio líquido.

Descongelamento de células eucarióticas (Ruggiero, 2002)

1 – Os criotubos foram transferidos para um banho de 37°C até o total descongelamento das células.

2 – As células foram plaqueadas em densidade de 2×10^6 células por garrafa de 25cm² em meio adequado com SFB.

Tripsinização e inóculo celular (passagem de células) (Ruggiero, 2002)

1 – Este procedimento foi realizado quando as células atingiram a confluência de 90% na garrafa.

2 – O meio de cultura da garrafa foi descartado.

3 – A monocamada de células aderentes foi lavada 3 vezes com cerca de 1mL de BSS.CMF.

4 – Foram adicionados 3mL de tripsina.

5 – Após 3 minutos, as células começaram a se descolar da superfície da garrafa.

6 – A tripsina foi neutralizada com cerca de 3mL de meio com SFB.

7 – A suspensão celular foi transferida para tubos falcon de 15mL, e centrifugados a 130 x g por 8 minutos.

9 – O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspensão em 3mL de meio com SFB.

10 – Foram transferidas 10^5 células por garrafa de 25 cm² contendo 5mL de meio com SFB. As células foram repicadas a cada confluência, que ocorria geralmente a cada 2 dias. As garrafas foram incubadas na estufa a 37°C com 5% de CO₂ e 70% de umidade.

Estimativa do número de células por meio de contagem em câmara de Neubauer (adaptado de Spector *et al*, 1998)

- 1 – As células foram tripsinizadas e ressuspensas em 1mL de meio de cultura.
- 2 – A câmara de Neubauer foi coberta com a lamínula e foram aplicados 10µL de suspensão de células em cada compartimento da Câmara. Caso alguma diluição tivesse sido necessária, o número de células contado era multiplicado por esse fator de diluição.
- 3 – As células foram observadas em microscópio óptico (na objetiva com aumento de 40 vezes) e contadas nos quadrantes. Em seguida, foi utilizada a fórmula:

$$\frac{\text{número de células contadas X fator de diluição X } 10^4}{\text{número de quadrantes contados}} = \text{n}^\circ \text{ de células / mL}$$

Viabilidade celular (adaptado de Spector *et al*, 1998)

- 1 – As células foram tripsinizadas e transferidas para um tubo falcon de 15mL, ao qual se adicionou 3 mL de meio com SFB.
- 2 – As células foram centrifugadas a 130 x g por 8 minutos.
- 3 – O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em 3mL de meio de cultura remanescente.
- 4 – Vinte microlitros da suspensão celular foram incubados com 80µL da solução de Azul de Tripán (diluição de 5 vezes da cultura).
- 5 – A câmara de Neubauer foi montada, e nela aplicou-se um volume de 10µL da mistura.
- 6 – Foram contadas 200 células, entre viáveis (transparentes) e não-viáveis (azuis). A célula não-viável tem a membrana celular mais permeável, e por isso, o corante penetra na célula, tornando-a azul. Após a contagem, foi estabelecida a porcentagem de células viáveis.

Transfecção utilizando o reagente Lipofectamine 2000 (Invitrogen - n° de catálogo 11668019)

- 1 – Em uma placa de cultura de 24 poços foram semeadas cerca de 5×10^4 células por poço, adicionando-se em seguida 500 μ L de meio contendo SFB. Para a transfecção em placas de 6 poços, semeou-se cerca de 6×10^5 células por poço.
- 2 – As células foram incubadas em estufa a 37°C, 5% de CO₂ e 70% de umidade durante a noite, até que se atingisse a confluência de 90%.
- 3 – No dia seguinte, a monocamada celular foi lavada com 200 μ L de BSS, e depois se adicionou 500 μ L de meio de cultura sem soro. Para placas de 6 poços, utilizou-se 500 μ L de BSS e 2mL de meio de cultura.
- 4 – O DNA a ser transfectado foi diluído em meio de cultura sem soro. Para placas de 24 poços, a quantidade a ser utilizada é: 800 ng de DNA para um volume final de 50 μ L, completado com meio sem soro. Para placas de 6 poços, utiliza-se 4 μ g de DNA para um volume final de 250 μ L de meio sem soro.
- 5 – O reagente lipídico também foi diluído em meio de cultura sem soro. Para placas de 24 poços, a quantidade de lipídeo a ser utilizada é 2 μ L, para um volume final de 50 μ L. Em placas de 6 poços, o volume do reagente lipídico a ser utilizado é 10 μ L para um volume final de 250 μ L de meio sem soro.
- 6 – As duas diluições, do DNA e do lipídeo, foram misturadas e incubadas a temperatura ambiente por 15 minutos.
- 7 – Após este período, a mistura foi adicionada lentamente sobre o poço em movimentos cruciformes (no total, foram adicionados 100 μ L da mistura por poço).
- 8 – As células foram incubadas a 37°C com 5% de CO₂ e 70% de umidade.
- 9 – Transcorridas 5 horas após a transfecção, o meio de cultura sem soro foi trocado para um meio de cultura com soro. Em seguida, a placa foi incubada durante a noite nas mesmas condições descritas no passo 8.
- 10 – No tempo de 24 e 48 horas pós-transfecção as células foram submetidas ao ensaio de leitura da atividade da luciferase.
- 11 – No caso de transfecção em placas de 6 poços, para a produção do anticorpo anti-CD3 e ensaios de ELISA, o sobrenadante foi coletado 48 horas pós-transfecção, ou foi realizada a transfecção estável, como descrito no tópico abaixo, com adição de G418.

Curva de morte celular e transfecção estável (adaptado de Spector *et al*, 1998).

Para a obtenção de clone estável e que expresse o gene de interesse é necessário determinar a concentração mínima requerida do agente seletivo que leve à morte de células não transfectadas (controle).

- 1 – Para a seleção com G418, foram testadas concentrações que variavam de 300 a 800µg/mL.
- 2 – As células foram semeadas (com meio contendo 10% de SFB) para que no dia seguinte fosse atingida a confluência de 20 % em placas de 24 poços (10^4 células). As placas foram incubadas a 37°C, 5% de CO₂ e 70% de umidade.
- 3 – No dia seguinte, o meio de cultura foi trocado por meio contendo concentrações variadas de G418 (300, 400, 500, 600, 700 e 800µg/mL) e 10% SFB.
- 4 – O meio de cultura com antibiótico foi trocado a cada 48 horas, e as células foram visualizadas diariamente ao microscópio, por um período de até 14 dias, até que fosse determinada a concentração onde a maioria das células não-transfectadas morresse.
- 5 – Após a determinação da concentração do antibiótico a ser usada, a população mista de células transfectadas estavelmente foram passadas para garrafas de 25 cm², e a partir daí mantidas com metade da concentração de G418 até a obtenção dos clones estáveis finais.
- 6 – Para células CHO-K1, a concentração mínima de antibiótico a ser utilizada foi determinada em 600µg/mL, e o tempo para que as células do controle morressem foi de 10 dias (durante a observação, verificou-se que a concentração de 500µg/mL não matava as células em 14 dias, e que a concentração de 700µg/mL matava as células com apenas 6 dias, então optou-se pela concentração intermediária).
- 7 – Após a transfecção desta linhagem celular em placas de 6 poços com os plasmídios contendo o gene codificador do anticorpo anti-CD3, as células foram mantidas durante 30 dias com meio de cultura contendo 10% de SFB e 600µg/mL de G418. A cada 2 dias o sobrenadante era coletado para a realização de ensaios de ELISA, a fim de se verificar os níveis de produção do anticorpo em população mista (estável, mas sem seleção clonal). Para a obtenção da população mista, o antibiótico foi adicionado ao meio de cultura 48 horas pós-transfecção.

3.2.12) Ensaio de atividade da luciferase utilizando o Kit Dual Luciferase Assay System (Promega – n° de catálogo E1910)

Os ensaios foram realizados em um Luminômetro TD – 20/20, Turner Designs, com tempo de atraso de pré-leitura (*premeasurement delay*) de 5 segundos e tempo de leitura (*measurement*) de 30 segundos. Todos os ensaios foram feitos com triplicatas de cada amostra, em placas de transfecção de 24 poços, e cada ensaio foi repetido pelo menos três vezes.

Este kit permite a leitura simultânea da atividade de 2 luciferases distintas, a luciferase de vaga-lume (V) e a luciferase de *Renilla* (R). O valor da atividade apresentada pela primeira enzima é dividido pelo valor da atividade da segunda enzima, que funciona como um controle para minimizar diferenças na eficiência de transfecção. Assim, os dados apresentados nos gráficos indicam a razão entre a atividade de V/R.

Após a abertura do kit, o tampão Luciferase Assay Buffer (tampão de ensaio da luciferase) foi utilizado para ressuspender o Luciferase Assay Substrate, sendo que este reagente foi utilizado como substrato da luciferase de vaga-lume. A este reagente deu-se o nome de LAR II, e este foi alíquotado em tubos de 1,5mL e estocado a – 80°C. O tampão Stop and Glo Buffer também foi alíquotado em tubos de 1,5mL e estocado a – 20°C. O substrato Stop and Glo Substrate 50X foi diluído no tampão para a concentração 1X somente na hora do uso, pois esse reagente é muito sensível à degradação. Esse reagente, após a diluição, foi utilizado como substrato para a luciferase de *Renilla*. Durante os ensaios, os substratos são mantidos no gelo.

1 – No tempo de 24 e 48 horas pós-transfecção, as células transfectadas em placas de 24 poços foram retiradas da estufa de incubação, e em seguida foram lavadas com 200µL de PBS 1X, fora do fluxo laminar.

2 – Após a lavagem, o Tampão de Lise Passiva 5X (PLB) foi diluído para a concentração 1X, e a cada poço adicionou-se 100µL de PLB.

3 – A placa foi incubada a temperatura ambiente por 15 minutos com suave agitação, para permitir a lise celular.

4 – Enquanto as células eram lisadas, foram preparados tubos novos de 1,5mL para leitura das amostras, sendo que elas foram diluídas 1:1000 no próprio tampão de lise 1X.

5 – Após a lise, 20µL das amostras diluídas foram utilizados para a leitura da atividade das duas luciferases.

6 – À amostra diluída, foram acrescentados 100µL de LAR II para a leitura da atividade da luciferase de vaga-lume. O tubo foi homogeneizado por pipetagem e colocado no luminômetro para a leitura. Em seguida, o valor foi anotado.

7 – Após a adição do LAR II, foram adicionados 100µL de Stop and Glo (tampão+substrato) ao mesmo tubo de leitura. A mistura foi homogeneizada por pipetagem e o tubo foi colocado no luminômetro para a leitura da atividade da luciferase de *Renilla*. O valor foi anotado, e em seguida foi feita a razão V/R.

Os plasmídios contendo o gene repórter da luciferase de vaga-lume foram co-transfectados na proporção 10:1 com o plasmídio pGL.73, que contém o gene repórter da luciferase de *Renilla*. Com isso, a atividade da luciferase de vaga-lume das construções testadas é normalizada de uma forma mais fácil, visto que a leitura da atividade das duas luciferases pode ser feita sequencialmente e também no mesmo tubo, utilizando o kit comercial Dual Luciferase Assay System (Promega).

Cada construção foi transfectada em triplicata, sendo que cada poço transfectado fornece uma leitura da atividade da luciferase de vaga-lume e de *Renilla*. Com isso, haverá três leituras para cada construção testada. Os valores obtidos na leitura da atividade da luciferase de vaga-lume são divididos pelos valores obtidos na leitura da atividade da luciferase de *Renilla*, obtendo-se uma relação V/R. Dos três valores verificados para cada construção testada é feita uma média aritmética e o desvio-padrão para essa média. Os valores obtidos são plotados em um gráfico comparando a eficiência de cada construção. Cada experimento foi repetido como descrito acima pelo menos três vezes

3.2.13) Ensaio de ELISA “sanduíche” para a detecção dos níveis de produção do anticorpo recombinante anti-CD3 humanizado

1 – Os poços da placa de ELISA foram sensibilizados com 150µL de anticorpo primário (Anti-IgG humana H+L feita em cabra), diluído em PBS 1x na concentração 1:1000, por 2 horas, a temperatura ambiente.

2 – Após a sensibilização, o anticorpo primário é retirado dos poços, e pode ser guardado na geladeira para reutilização por mais um ensaio.

3 – Os poços foram lavados três vezes com 200 µL de PBST 1x.

- 4 – Após a lavagem, os poços foram bloqueados com 200 μ L de leite desnatado, durante a noite, a 4°C.
- 5 – Finalizado o bloqueio, os poços foram lavados três vezes com 200 μ L de PBST 1x.
- 6 – Os sobrenadantes da transfecção foram previamente centrifugados para a remoção de restos celulares, e adicionados de azida sódica, EDTA e PMSF. Após estes procedimentos, acrescentou-se 200 μ L do sobrenadante aos poços. Como controle positivo, utilizou-se IgG humana previamente quantificada, e como controles negativos, o sobrenadante das células não-transfectadas e PBS 1x. A placa foi incubada por 2 horas a temperatura ambiente.
- 7 – Os poços foram lavados três vezes com 200 μ L de PBST 1x.
- 8 – Adicionou-se 200 μ L do anticorpo secundário (Anti-Fc humano conjugado a fosfatase alcalina feito em cabra), na diluição de 1:5000, por 2 horas a temperatura ambiente.
- 9 – Os poços foram lavados três vezes com PBST 1x e uma vez com APB.
- 10 – Adicionou-se 100 μ L por poço de PNPP (para-nitro-fenil-fosfato), na concentração 3mg/mL, para a revelação da reação.
- 11 – A placa foi incubada por 15 a 30 minutos, a temperatura ambiente, para a posterior leitura da absorbância das amostras.
- 12 – Foi utilizado o leitor de ELISA *Microplate Reader (BioRad)*, modelo 450, no comprimento de onda de 405 nm.

3.2.14) Análise estatística dos valores de atividade da luciferase e dos experimentos de PCR em tempo real

O programa utilizado para as análises estatísticas dos dados provenientes dos ensaios de atividade da luciferase e de produção de mRNA do anticorpo anti-CD3 humano foi o Minitab versão 14.0. Os valores foram avaliados por meio de testes de ANOVA.

3.2.15) Extração de RNA total de células de mamífero (CHO-K1) com o reagente Trizol (Invitrogen)

Esse método baseia-se na ação do reagente comercial Trizol, que consiste em uma solução monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina, promovendo a extração

de RNA em um passo único (Chomczynski e Sacchi, 1987). De acordo com a metodologia, durante a homogeneização e lise da amostra, o Trizol mantém a integridade do RNA enquanto rompe as células e destrói componentes celulares, como proteínas e lipídeos. Além disso, esse é um método que pode ser utilizado tanto com pequenas quantidades de amostra ou tecido celular quanto com grandes quantidades. A seguir é apresentado o protocolo seguido para a extração de RNA de células de mamífero.

1 – Após a transfecção das células (6, 12, 24 e 48 horas pós-transfecção), 6×10^5 células em um poço de 10 cm^2 (correspondente ao da placa de 6 poços) foram lisadas diretamente com a adição de 1mL de Trizol no poço. As amostras foram homogeneizadas para melhor eficiência de lise.

2 – Em seguida, o volume correspondente ao lisado celular foi transferido para microtubos de 1,5mL e incubado a temperatura ambiente por 5 minutos, permitindo desse modo a completa dissociação do complexo de nucleoproteínas.

3 – Foram adicionados 200 μ L de clorofórmio para cada mL de Trizol, misturando-se vigorosamente por 15 segundos (com o vortex).

4 – As amostras foram novamente incubadas a temperatura ambiente por 3 minutos e depois centrifugadas a 4.000 g por 10 minutos. Após a centrifugação, a fase aquosa (superior, que contém o RNA) foi coletada em um novo microtubo, ao qual se adicionam 500 μ L de isopropanol. Estas foram homogeneizadas e incubadas a temperatura ambiente por 10 minutos.

5 – As amostras foram centrifugadas a 12.000 g por 10 minutos a temperatura ambiente, sendo que houve a formação de um sedimento com aspecto vítreo, difícil de ser visualizado.

6 – O sedimento do passo 5 foi lavado com 100 μ L de etanol 75% (v/v) e centrifugado a 12.000 g por 10 minutos.

7 – Descartou-se o sobrenadante e o sedimento foi deixado à temperatura ambiente para secar. Em seguida, ele foi ressuspenso em 30 μ L de água MiliQ *RNAse free*.

3.1.16) Tratamento do RNA total extraído de CHO-K1 com DNase RNAse free (Promega)

Após a extração e quantificação do RNA total extraído de CHO-K1, as amostras foram tratadas com a enzima DNase I RNase *free*, uma endonuclease que degradará somente as moléculas de DNA que por ventura estejam contaminando as amostras de RNA. A reação foi realizada com 5µg de RNA total, tampão de reação 10X, e uma unidade da enzima por micrograma de RNA tratado. Geralmente o volume final da reação ficava em torno de 20µL. Em seguida, esse sistema foi incubado a 37°C por 45 minutos, e após este período, foi adicionada a solução *Stop Solution* 10X, que contém EGTA e inibe a enzima, a uma concentração final de 1X. Por fim, o sistema foi aquecido a 65°C por 10 minutos para a inativação da enzima. Para a remoção dos compostos que poderiam inibir as reações subseqüentes (a de síntese da fita de DNA complementar, por exemplo), como o EGTA, o sistema foi precipitado com 2,5 volumes de etanol 100% e 1/10 do volume de acetato de sódio 3M, todos RNase *free*. Essa mistura foi precipitada a - 20°C durante a noite. No dia seguinte, as amostras foram centrifugadas a 12.000 x g por 45 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi lavado com 100µL de etanol 75% (v/v). As amostras foram novamente centrifugadas 12.000 x g por 15 minutos a 4°C, e após o descarte do sobrenadante, o sedimento foi deixado à temperatura ambiente para secar e ressuspensão em 10µL de água MiliQ RNase *free*.

3.2.17) Síntese do DNA complementar (cDNA) por meio de transcrição reversa (RT) com a enzima transcriptase reversa *Superscript III* da Invitrogen.

A reação de síntese da fita de DNA complementar por meio de transcrição reversa foi realizada com células de mamífero da linhagem CHO-K1 que foram transfectadas com os plasmídios construídos neste trabalho. Os RNAs tratados com a DNase RNase *free* foram utilizados como molde para a reação.

- 1 – A fita de cDNA foi sintetizada utilizando-se 2µg de RNA total tratado com DNase.
- 2 – Adicionou-se 1µL de oligo(dT)₂₀ e 1µL de um mix de dNTPs a 10 mM.
- 3 – O volume da reação foi completado para 13µL com água MiliQ RNase *free*.
- 4 – A mistura foi aquecida a 65°C por 15 minutos e incubada no gelo por pelo menos 1 minuto.

5 – Após breve centrifugação, aos componentes da reação foram adicionados 4 μ L do tampão 5X de síntese de cDNA, 1 μ L de DTT a 0,1M, 1 μ L de RNase OUT e 1 μ L de SuperScript III.

6 – A reação foi incubada a 50°C por 1 hora e inativada por 15 minutos a 70°C.

7 – O cDNA sintetizado era então utilizado para amplificação por PCR, geralmente 4 μ L da amostra.

3.2.18) Reação de qPCR (PCR quantitativa) utilizando os cDNAs preparados a partir de amostras de RNA de CHO-K1 tratadas com DNase I RNase free

Este experimento visa verificar os níveis de expressão do mRNA de luciferase das construções transfectadas em CHO-K1 para avaliar se a quantidade dos transcritos corresponde à atividade da luciferase observada nos ensaios. Para isso, a máquina cuja reação foi preparada foi a 7500 Fast Real-Time PCR System, da Applied Biosystems. O programa utilizado para a leitura da corrida foi o 7500 Fast System SDS Software, versão 1.3.1. Foi feita uma reação de qPCR relativa, ou seja, o valor obtido correspondente aos níveis de mRNA da amostra será comparado relativamente ao valor dos níveis de mRNA de um controle.

Para a reação de PCR, utilizou-se o kit *Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG (2X)*, da Invitrogen. Esse kit contém a enzima *Taq*, o corante SYBR Green, a mistura de dNTP, e a enzima UDP, que impede a reamplificação de transcritos durante os ciclos da reação. Para este experimento, que foi realizado em placas específicas de 96 poços, a reação padrão foi a seguinte:

SYBR Green Mix 2X	5 μ L
Primer 1 (10 μ M)	0,2 μ L
Primer 2 (10 μ M)	0,2 μ L
cDNA (diluído 1:50)	2 μ L
H ₂ O Milli-Q	2,6 μ L
Volume final	10 μ L

Após a pipetagem da reação na placa, que ocorreu dentro do fluxo laminar, foi ajustado o padrão de ciclagem da PCR no programa 7500 Fast System SDS Software, que é descrito a seguir:

Estágio 1 – Ativação/Inativação da enzima UDP

- | | |
|---------|-------------|
| 1) 50°C | 2 minutos |
| 2) 95°C | 5 minutos |
| 3) 95°C | 20 segundos |

Estágio 2 – Ciclagem

- | | |
|---------|-------------|
| 4) 95°C | 3 segundos |
| 5) 60°C | 30 segundos |

O estágio 2 foi repetido 40 vezes.

A placa foi bem selada com um adesivo antes de ser colocada na máquina. Após a reação de PCR, foi feita uma reação que fornece uma curva de dissociação dos iniciadores utilizados, indicando se eles formam dímeros e também se amplificam um só produto de PCR. Os parâmetros de ciclagem para esta curva são mostrados abaixo:

- | | |
|---------|-------------|
| 1) 95°C | 15 segundos |
| 2) 60°C | 1 hora |
| 3) 95°C | 15 segundos |

Após a obtenção dos dados brutos, eles foram analisados por meio de uma ferramenta existente no próprio programa, denominada *Relative Quantification Study*. Nesta ferramenta, os valores correspondentes às amostras-alvo são divididos pelo valor de uma amostra escolhida pelo próprio usuário, o calibrador. Esta ferramenta já calcula os valores de ΔCt , $\Delta\Delta Ct$, $2^{-\Delta Ct}$ e $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Este último valor foi plotado no gráfico mostrado na sessão de Resultados e Discussão.

A análise de quantificações relativas pode ser feita por meio do Método da Curva Relativa Padrão ou pelo Método Comparativo de Ct ($\Delta\Delta Ct$). O primeiro método requer que cada placa de reação tenha uma curva-padrão, o que demanda maior gasto de reagentes, visto que devem ser feitas várias diluições seriadas das amostras. O segundo método, por nós utilizado, não requer essa curva-padrão, havendo menor gasto de reagentes. Entretanto, para a utilização deste método, deve-se estabelecer se a eficiência da reação de PCR entre a amostra-alvo e a controle é equivalente. Feito isso, utiliza-se a fórmula aritmética $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Para a determinação do ΔCt , primeiro deve-se obter o Ct , que é o ciclo onde a linha de base intercepta a curva de reação, denominado *Threshold Cycle*, ou Ciclo de Limiar. O valor de Ct já é fornecido pela própria ferramenta de análise do programa. O valor de ΔCt é dado pela fórmula:

$$\Delta Ct = Ct \text{ amostra-alvo} - Ct \text{ amostra controle}$$

Utilizando os valores de ΔCt , é possível calcular o $2^{-\Delta Ct}$, que é dado pela fórmula:

$$2^{-\Delta Ct} = 2^{-Ct \text{ amostra-alvo}} - 2^{-Ct \text{ amostra controle}}$$

Em seguida, este último valor é submetido à fórmula aritmética $2^{-\Delta Ct}$ e os valores obtidos são mostrados no gráfico de análise.

3.2.19) Preparo de extratos nucleares de CHO-K1 e HEK293

- 1 – 24 horas antes da extração, o meio das células deve ser substituído para um meio sem SFB.
- 2 – Tripsinizou-se uma garrafa de 50 cm² para o experimento. As células foram coletadas por centrifugação, a 1000g por 5 minutos.
- 3 – As células foram lavadas com 10 mL de TBS. Centrifugou-se a mistura a 1000g por 5 minutos.
- 4 – As células foram ressuspensas com 1 mL de TBS, e transferidas para um eppendorf.
- 5 – As células foram brevemente centrifugadas por 30 segundos, a 1000g. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspenso em 1mL do **tampão A**, previamente resfriado. A ressuspensão foi feita pipetando-se lentamente o tampão.
- 6 – As células foram incubadas no gelo por 15 minutos.
- 7 – Adicionou-se 150μL de NP-40 (IGELPAL) 10%, e a amostra foi vortexada por 10 segundos.
- 8 – O tubo foi centrifugado a 7000g por 1 minuto. Descartou-se o sobrenadante (citoplasma + RNA), e ressuspendeu-se o sedimento em 300μL do **tampão C**, previamente resfriado.
- 9 – A amostra foi vortexada e agitada em agitador rotatório por 15 minutos. A cada 5 minutos, adicionou-se 6 μL de PMSF, para evitar a degradação protéica.

10 – Os extratos foram centrifugados a 11000g por 5 minutos. Nesta etapa, o **sobrenadante é coletado** e o sedimento é descartado.

Todos os passos foram realizados no gelo, dentro da câmara fria, utilizando centrífugas com refrigeração a 4°C. Os inibidores de protease foram adicionados aos tampões no momento do uso.

3.2.20) *Ensaio de Mudança de Mobilidade Eletroforética (do inglês Eletrophoretic Mobility Shift Assay – EMSA)*

A técnica de EMSA baseia-se no fato de que um complexo proteína-DNA migra mais lentamente em uma corrida eletroforética não-desnaturante em gel de poliacrilamida, do que um fragmento de DNA livre ou uma sonda de oligonucleotídeos dupla fita. Esta técnica é também conhecida como *bandshift*, e é uma das mais utilizadas para estudos de regulação da expressão gênica.

Podem ser utilizadas sondas marcadas com isótopos radioativos ou com fluorescência. No presente estudo foi utilizado o fluoróforo carboxifluoresceína (FAN), cuja emissão a 535 nm é detectada em um fluoroescaner (Typhoon 8600 Merham, Buckinghamshire-England).

1ª Etapa – Anelamento dos oligonucleotídeos complementares a serem empregados como sonda

1 – Os oligonucleotídeos foram ressuspensos a uma concentração final de 1µg/µL. De cada oligonucleotídeo, foram utilizados 500 ng, na seguinte reação:

 Oligo Forward: 0,5 µL

 Oligo Reverse: 0,5 µL

 Tampão de anelamento 5x (Tris-HCl 1M pH 7,7): 6 µL

 Água: 23 µL

2 – A reação foi fervida por 5 minutos. Após este período, a temperatura caiu naturalmente até 25°C.

3 – Para remoção de possíveis contaminações com oligonucleotídeos simples-fita, auto-anelados, ou mesmo produtos de degradação, as amostras aneladas foram purificadas em eletroforese, procedimento descrito na etapa seguinte.

2ª Etapa – Purificação dos oligonucleotídeos a serem utilizados como sonda por eletroforese

1 – A amostra de 30µL foi dividida em 5 alíquotas e as mesmas foram aplicadas nos poços para a corrida eletroforética, nas mesmas condições do experimento de *bandshift*. O gel foi marcado a cada 1 centímetro após a corrida, e depois foi escaneado no aparelho de leitura de fluorescência.

2 – Após a identificação da região contendo os produtos perfeitamente anelados, a banda foi excisada do gel.

3 – Sobre uma camada de aproximadamente 3 mm de agarose 1% em TBE 1X, previamente solidificada, depositou-se os fragmentos do gel de poliacrilamida contendo a sonda. Posteriormente, os fragmentos do gel foram cobertos com agarose fundida. Após a solidificação, foi feita uma perfuração na agarose, logo abaixo dos fragmentos de poliacrilamida, onde foi encaixada uma membrana de DEAE celulose. Para a migração da sonda da poliacrilamida para a membrana, o gel foi submetido a uma voltagem de 90 V por 80 minutos.

4 – Após a transferência, a membrana foi colocada em um tubo eppendorf de 1,5mL e coberta com 250µL de solução de alto sal. Incubou-se a reação a 45°C por 20 minutos.

5 – A solução de sais contendo a sonda eluída foi transferida para um novo tubo, repetindo-se a extração com a mesma membrana. Os dois volumes foram juntados em um mesmo tubo, onde precipitou-se a sonda com 1mL de etanol 100% gelado a -20°C por pelo menos 30 minutos.

6 – O tubo foi centrifugado a 13000g por 30 minutos, lavado com etanol 70% gelado, e seco ao ar. O sedimento foi ressuspenso em 30µL de água bidestilada.

3ª Etapa – Reação de ligação DNA-proteína

Após a purificação das sondas e da obtenção dos extratos protéicos nucleares, foi realizada a seguinte reação de ligação:

Sonda: 1 μ L
KCl 1M: 2 μ L
ZnCl₂: 1 μ L
p(dIdC) 1 μ g/ μ L: 2 μ L
Espermidina 80mM: 1 μ L
Oligos inespecíficos CKT067 e CKT068: 2 μ L
Água: 1 μ L

A essa mistura de reação, adicionou-se 10 μ L de extrato proteico nuclear. A mistura foi incubada no gelo por 10 minutos e submetida à eletroforese, como descrito na etapa a seguir.

4ª Etapa – Corrida eletroforética

Para a confecção dos géis e corrida eletroforética, foi utilizado o sistema *SE 600 Eletroforesis Unit (Amersham Biosciences)*. As placas de vidro foram exaustivamente lavadas com detergente neutro e água destilada e posteriormente polidas com o auxílio de lenço de papel macio e etanol 70%. Para o preparo de um gel, utilizou-se as seguintes soluções e volumes:

- Poliacrilamida (acrilamida 30% e bisacrilamida 0,36% em água bidestilada filtrada em membrana de 0,45 para a remoção de impurezas: 15 mL
- Glicerina 50%: 15 mL
- TBE 10X: 2,25 mL
- Água: 45 mL

A esta solução, foram adicionados:

- Persulfato de amônio 25%: 200 μ L
- TEMED: 50 μ L

Para a separação eletroforética, a câmara de eletroforese foi preenchida com TBE 0,25X até uma altura de cerca de 2/3 do volume dos poços. Os poços foram lavados exaustivamente com tampão de corrida. Antes da aplicação das amostras, com o auxílio de uma seringa Hamilton, foi realizada uma pré-corrída, a 500 V, 20 mA, por 15 minutos. A corrida eletroforética deve prosseguir até que o azul de bromofenol, presente

apenas na amostra da sonda livre, migre por cerca de 10 cm (aproximadamente 1h de corrida).

Após a corrida, o gel foi solto das placas de vidro e analisados no scanner, nas seguintes condições:

Filtro: Fluoresceína 526SP

Intensidade: 1000 (máxima)

Sensibilidade: alta

Pixel size: 200 microns

Plano focal: plane

4. Resultados e Discussão

Em função dos resultados obtidos em Quilici (2008), foi desenvolvida uma versão modificada do promotor de CMV com intron A, que possui alguns sítios de restrição alterados para melhor manipulação dos vetores nas clonagens e também para a manutenção do sítio acceptor de *splicing* na construção ?600. **As construções com intron A modificado, para fins de nomenclatura, foram denominadas construções sintéticas.** A construção ?400, em função dos resultados obtidos em Quilici (2008), não foi avaliada para o intron A sintético.

4.1. Promotor de CMV e intron A sintético influenciam a atividade do gene repórter da luciferase

Para a obtenção de construções que mantivessem o sítio acceptor de *splicing*, foi desenhado um promotor de CMV com intron A sintético, clonado entre os sítios de *Mlu* I e *Hind* III, conforme indicado na figura 11.

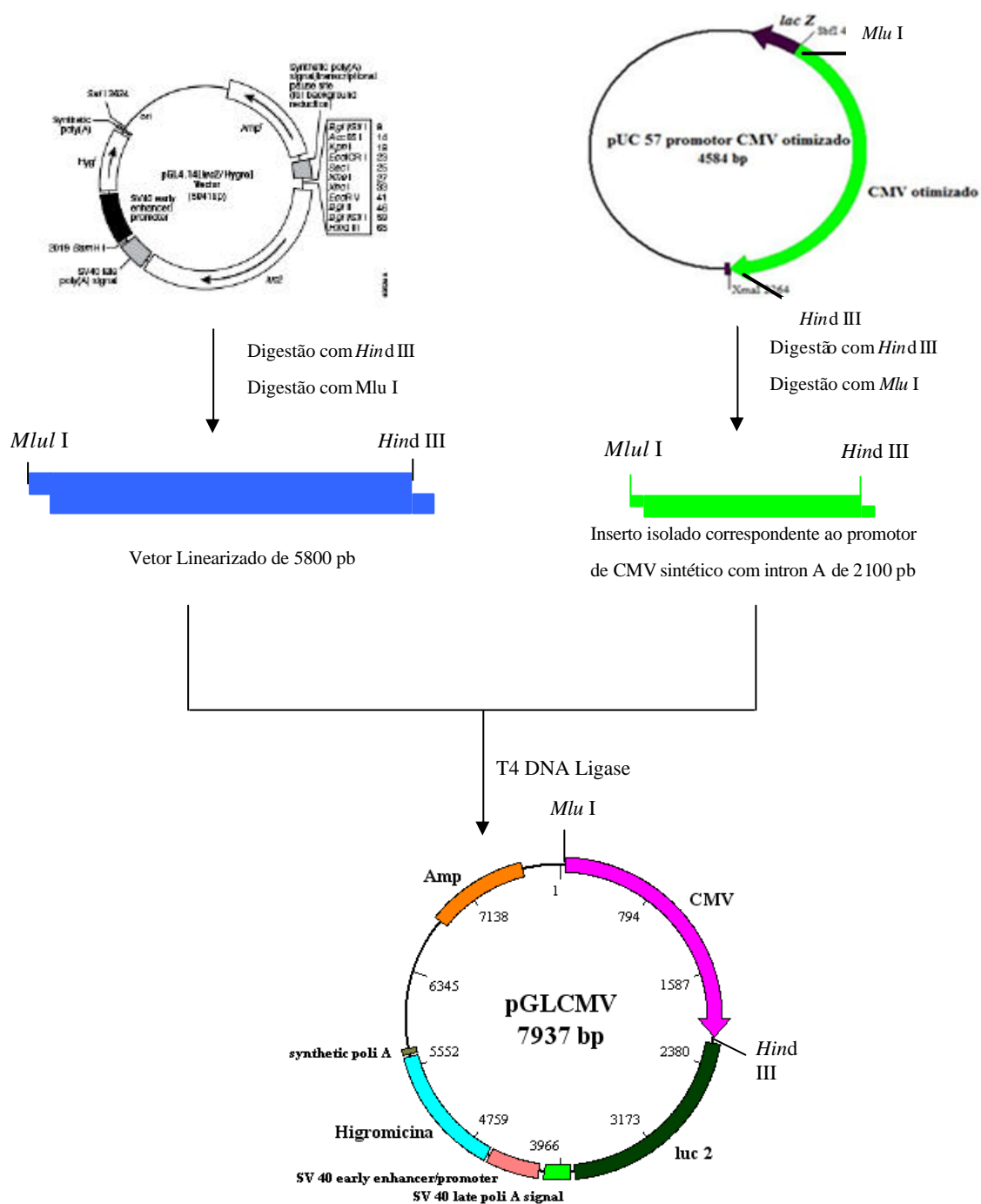


Figura 11. Construção do vetor pGLCMV com intron A sintético. O vetor pGL4.14 foi digerido com as endonucleases de restrição *Hind* III e *Mlu* I, obtendo-se o vetor linearizado de 5.800 pb para a ligação com o promotor com intron A. Já o vetor pUC57 com CMV sintético foi utilizado para a obtenção do inserto. Ele foi digerido com *Hind* III e *Mlu* I, obtendo-se um fragmento de 2100 pb, correspondente ao promotor e *enhancer* de CMV com intron A sintético. O vetor e o inserto foram ligados e obteve-se o vetor pGLCMV sintético, que contém o gene repórter da luciferase de vaga-lume *Luc2*, o gene de beta-lactamase que confere resistência à ampicilina, gene de resistência à Higromicina B, cuja expressão é dirigida pelo promotor de SV40, o sinal de poliadenilação de SV40 (para o gene da luciferase) e um sinal de poliadenilação sintético (para o gene de resistência à Higromicina B).

O promotor sintético, ao contrário do original, possui dois sítios de restrição para a enzima *BspE* I. A digestão do pGLCMV sintético com esta enzima libera o fragmento de 200 pb (deleção 200 pb do intron A) e a digestão dupla com as enzimas *BspE* I e *Nru* I libera o fragmento de 600 pb, preservando o sítio acceptor do *splicing*. Na construção ?600 sintética, após a clivagem com as enzimas de restrição, o vetor remanescente foi tratado com o fragmento Klenow da DNA polimerase I para a remoção das extremidades coesivas, então, religado. Neste processo, os sítios de *BspE* I e *Nru* I são perdidos. Essas digestões foram realizadas no PGLCMV sintético e clones contendo as diferentes construções foram obtidos.

A fim de se comparar a atividade e eficiência das construções contendo promotor/intron A sintético e original, células da linhagem CHO.K1 foram transfectadas com os diferentes vetores, em placas de 24 poços, em triplicata. Esta linhagem celular foi utilizada devido ao seu largo uso na produção de proteínas recombinantes com fins terapêuticos, sendo a linhagem celular com produção de maior número de proteínas aprovadas para uso em humanos (vide tabela 1).

Para normalização dos resultados, utilizou-se o plasmídeo que codifica o gene da luciferase de *Renilla*, conforme descrito na seção 3.2.13 de Materiais e Métodos. A co-transfecção dos plasmídeos permite que seja feita uma razão entre as atividades dos dois tipos de luciferase, sendo um controle para o experimento, levando-se em consideração a eficiência de transfecção. A figura 12 mostra a comparação da atividade da luciferase das novas construções sintéticas obtidas com aquelas que contêm o intron selvagem, 24 horas após a transfecção.

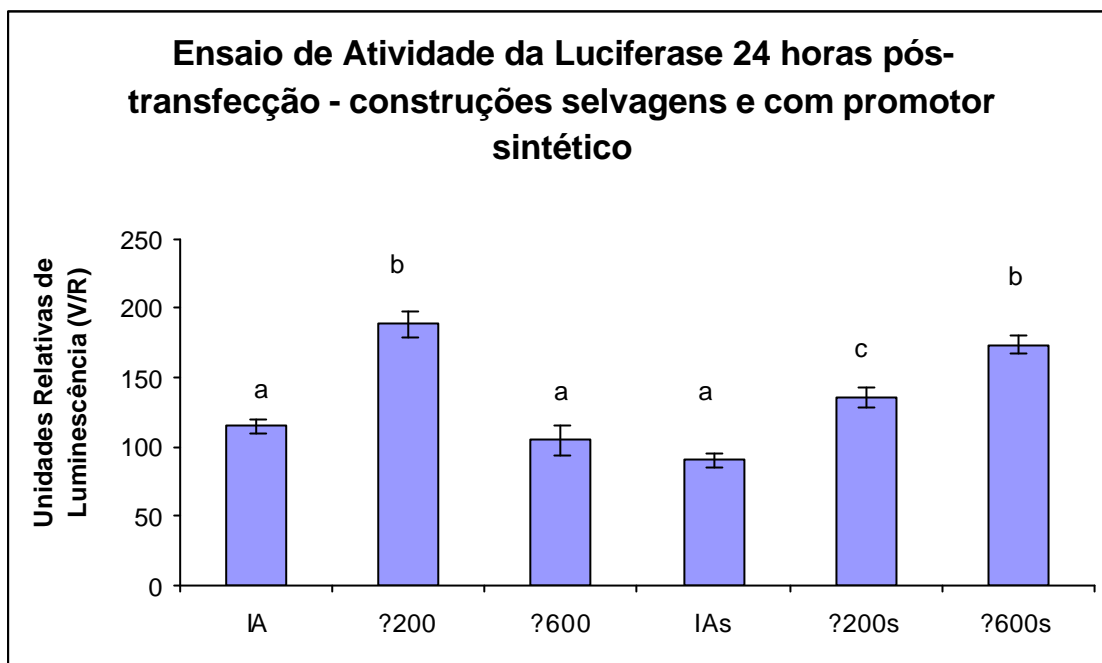


Figura 12. Ensaio de atividade da luciferase em CHO-K1 com as construções originais e sintéticas do promotor de CMV com intron A. O eixo das abscissas mostra as construções que foram transfectadas nas células CHO-K1, enquanto o eixo das ordenadas contém os valores da relação entre a luminescência proveniente da atividade da luciferase de vaga-lumina pela luciferase de *Renilla*. As construções sintéticas estão indicadas com “s”. Foram realizados três experimentos independentes, em triplicata. O gráfico mostra um experimento representativo. As letras mostradas acima das barras de valores representam a significância estatística entre as amostras, com $P < 0,05$.

O gráfico mostra que há um aumento da atividade da luciferase quando se utiliza o promotor com intron sintético contendo a deleção de 600 pb em relação à construção também deletada de 600 pb a partir do intron selvagem. Esse dado corrobora a hipótese de que a preservação do sítio acceptor de *splicing* no intron A pode influenciar a produção da proteína repórter. Curiosamente, observou-se uma redução da atividade da luciferase na construção sintética ?200s em relação à original. Apesar de ser uma redução com significância estatística, não foi em medidas acentuadas, sendo da ordem de 180 unidades relativas de luminescência para 150, aproximadamente, o que não invalida a construção sintética. A modificação da sequência do intron A pode ser uma possível explicação para tal efeito, devido à alteração de sequência que pode modificar sítios para ligação a fatores transcricionais. Em outras palavras, o que se destaca é justamente o aumento da expressão do gene repórter na construção ?600s, que pode ser explicada pela preservação do sítio acceptor de *splicing* do IA.

Além disso, a preservação do sítio acceptor de *splicing* na construção sintética pode permitir maior integração entre a maquinaria de processamento de RNA e de tradução (Pandit *et al*, 2008 e Han *et al*, 2011), promovendo, desse modo, maior estabilidade do mRNA da luciferase de vaga-lume e/ou incremento na produção da proteína final. O resultado desse fenômeno é observado por meio do aumento da atividade enzimática da luciferase na construção $\Delta 600$ sintética.

Comparando-se os dados obtidos no presente trabalho com Quilici (2008), verifica-se que a tendência de expressão é mantida entre as construções selvagens e sintéticas, com exceção apenas da construção $\Delta 600$ e a correspondente sintética $\Delta 600s$. Na construção selvagem, a atividade da luciferase se mantinha em 24 e 48h, havendo queda apenas nos níveis de mRNA em 48h pós-transfecção.

A fim de comparar os níveis de expressão de mRNA da luciferase entre as construções com IA selvagem e sintético, realizou-se qPCR, conforme indicado na figura 13.

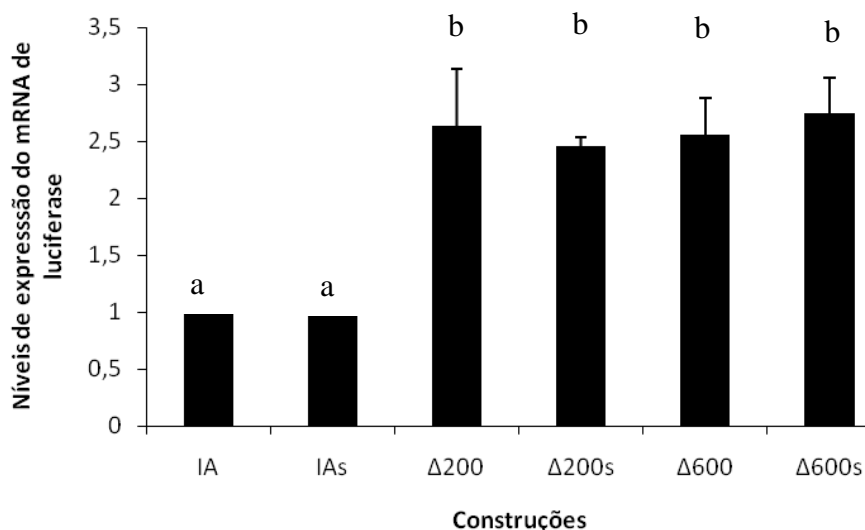


Figura 13. Medida dos níveis de mRNA de luciferase nas construções originais e sintéticas do promotor de CMV com intron A. O eixo das abscissas mostra as construções que foram transfectadas em células CHO-K1, enquanto o eixo das ordenadas contém os valores dos níveis de mRNA total detectados por meio de qPCR. As construções sintéticas foram representadas com “s”. Foi realizado um experimento, em triplicata. O IA original foi utilizado para normalização dos demais valores. As letras mostradas acima das barras de valores representam a significância estatística entre as amostras, com $P < 0,05$.

A análise da figura mostra que os níveis de expressão da luciferase de vagalume são equivalentes entre as construções originais e sintéticas. Em outras palavras, as modificações realizadas no intron sintético não influenciaram significativamente a produção dos transcritos do gene repórter. Esse dado corrobora os níveis de atividade da luciferase, apresentados na figura 13, que se mantiveram praticamente equivalentes. Observa-se que o aumento da quantidade de transcritos, comparando-se as construções com IA inteiro e com IA deletado, foi na ordem de 2 vezes, aproximadamente, tanto para a deleção de 200 quanto 600 pb. Em Quilici (2008), verificou-se que a queda nos níveis de transcrito para a construção selvagem $\Delta 600$ ocorria em apenas 48h pós-transfecção, o que sugeria início de processos de degradação dos transcritos por NMD, devido à perda do sítio acceptor de *splicing*.

Para confirmar se a manutenção do sítio acceptor de *splicing* na construção sintética $\Delta 600$ realmente seria capaz de diminuir os níveis de transcritos não-processados, foi desenhado um par de iniciadores para qPCR que reconhecem a região do exon A e parte da região do IA de CMV, como indicado na figura 14.

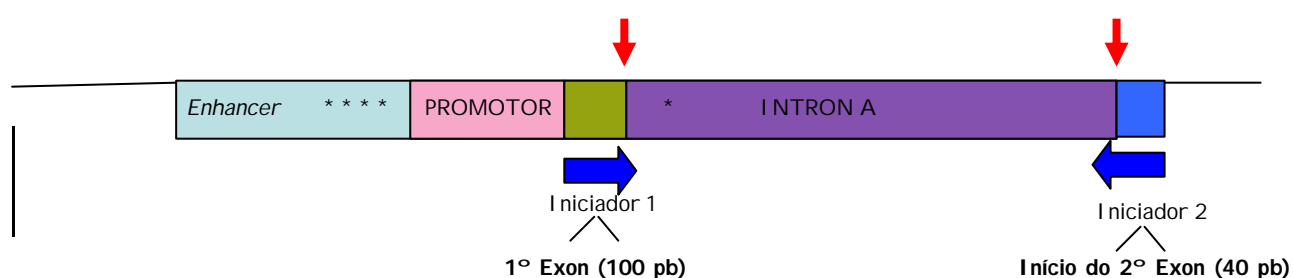


Figura 14. Esquema da região de reconhecimento dos iniciadores de qPCR para quantificação dos níveis de transcrito não processado do exon A de CMV. O *enhancer* com os 4 sítios de NF1 (*), o primeiro e o segundo exon e o intron A, o maior intron deste gene, com aproximadamente 800 pb, podem ser observados na figura. O intron A possui ainda o sítio mais forte de ligação a NF1, representado por (*). As setas vermelhas indicam os sítios de *splicing*, sendo que a primeira seta evidencia o sítio doador e a segunda o sítio acceptor de *splicing*. Os sítios de restrição utilizados para a clonagem deste promotor foram evidenciados. As setas azuis indicam os iniciadores utilizados para a reação de qPCR.

Como mostra a figura 15, verifica-se que a construção $\Delta 600$ original, que perdeu o sítio de *splicing*, acumulou RNA não-processado em uma razão 4 vezes maior que as

demais construções. Além disso, reforçando a hipótese experimental, a manutenção do sítio de *splicing* na construção sintética $\Delta 600$ reduziu os níveis de transcritos não-processados a valores equivalentes aos das demais construções, sintéticas e selvagens, que naturalmente preservam o sítio aceptor.

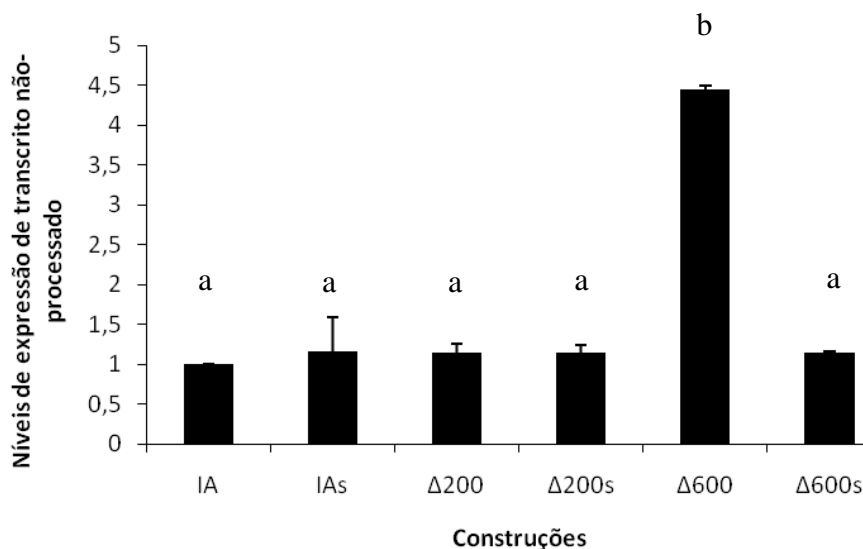


Figura 15. Medida dos níveis de transcrito não-processado do exon A de CMV, nas construções originais e sintéticas. O eixo das abcissas mostra as construções que foram transfectadas nas células CHO-K1, enquanto o eixo das ordenadas contém os valores dos níveis de mRNA detectados por meio de qPCR. As construções sintéticas foram representadas com “s”. As construções foram normalizadas com base no IA original. Foi realizado um experimento, em triplicata. As letras mostradas acima das barras de valores representam a significância estatística entre as amostras, com $P < 0,05$.

4.2. Expressão do anticorpo anti-CD3, fragmento FvFc, contendo os promotores com deleções no intron A sintético de CMV

Os resultados apresentados acima, obtidos com o gene repórter da luciferase, tornam as novas construções de promotores/intron A sintéticos importantes ferramentas para a produção de vetores de expressão de proteínas recombinantes com potencial biotecnológico. Desse modo, os promotores sintéticos nas versões com e sem deleções foram clonados no vetor construído por Alcântara (2010) em sua dissertação de mestrado, para produção heteróloga em células de mamífero. O esquema da clonagem

do promotor sintético sem deleção pode ser observado na figura 10, apresentada na seção 3.1.3 de Materiais e Métodos.

A partir deste novo vetor, denominado pCO, que contém o gene do fragmento FvFc do anticorpo anti-CD3 e o promotor de CMV sintético com intron A, foi possível obter os vetores com deleções no intron A, por meio da digestão simples com *BspE* I (deleção de 200 pb) e da digestão dupla com *BspE* I e *Nru* I (deleção de 600 pb).

Da mesma forma que os vetores com gene repórter da luciferase, a confirmação da obtenção dos clones foi feita por meio da digestão com a enzima *BspE* I, que na construção com deleção de 200 pb apenas lineariza o vetor, e na construção com deleção de 600 pb mantém o perfil do vetor intacto.

As construções foram transfectadas em CHO-K1 para a análise dos níveis de expressão transiente e estável (em população mista) do anticorpo anti-CD3 FvFc humanizado, conforme mostra a figura 16. Cabe ressaltar que o vetor controle sem intron utilizado no experimento, denominado pMIREs (Silva et al, 2009), possui diferenças no promotor se comparado ao promotor de CMV utilizado no pCO, inclusive à orientação do cassete de expressão.

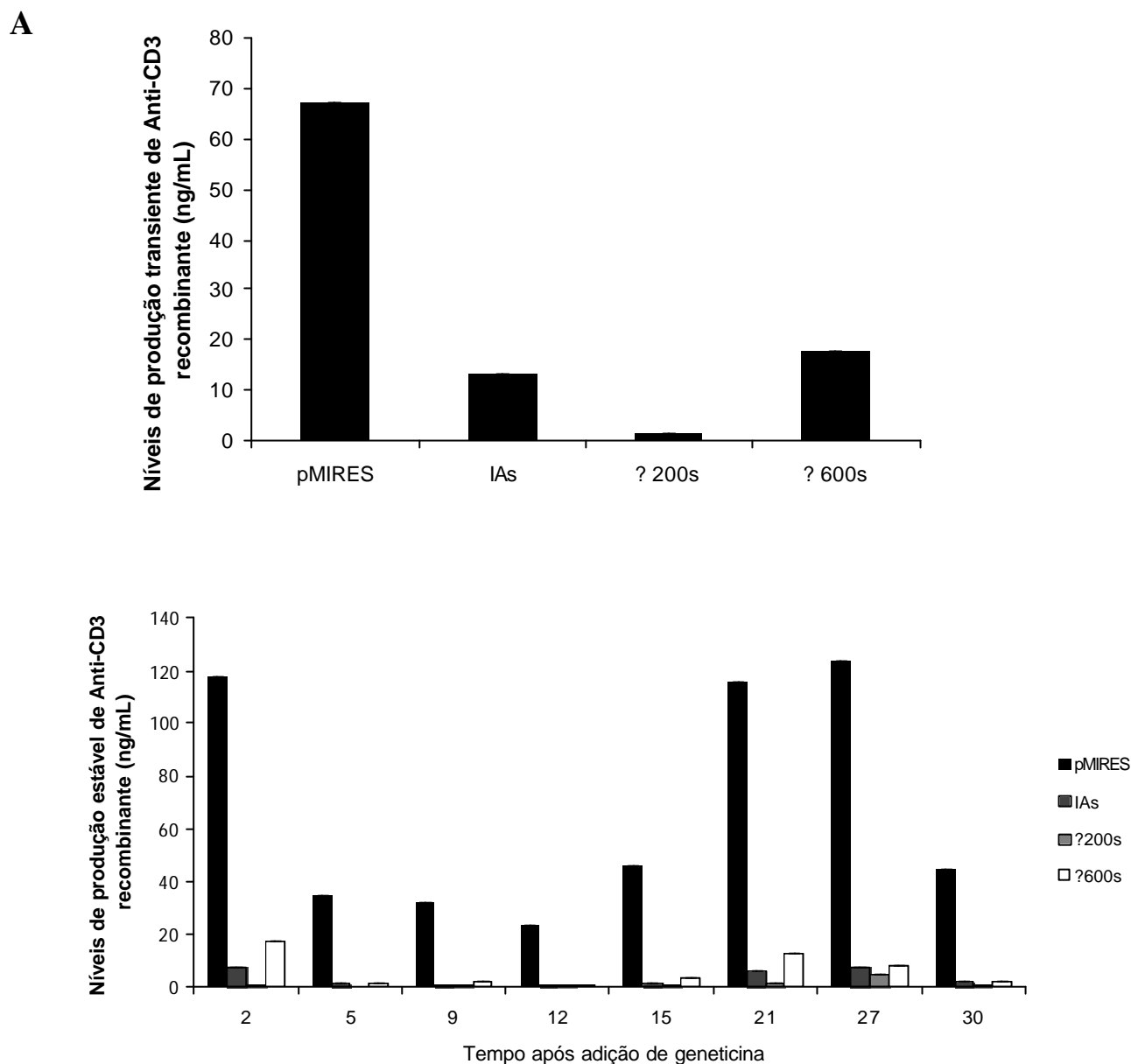


Figura 16. Produção do anticorpo anti-CD3 em CHO-K1. O painel A mostra os níveis de produção transitente do anticorpo recombinante 48 horas pós-transfecção. Os sobrenadantes de cultura foram coletados para o ensaio de ELISA sanduíche (seção 3.2.14 de Materiais e Métodos). A produção do anticorpo foi calculada com base na curva padrão de diluição de IgG humana. O painel B mostra os níveis de produção estável do anticorpo recombinante em população mista, nas diferentes construções de promotores sintéticos apresentadas, com a adição de geneticina em concentração final de $600\mu\text{g}/\mu\text{L}$ que foi mantida ao longo do experimento. Os sobrenadantes de cultura foram coletados para o ensaio de ELISA sanduíche. No eixo das abscissas está indicado o número de dias após a adição de geneticina, e o eixo das ordenadas, a quantificação da produção do anticorpo, calculada com base na curva padrão da diluição de IgG humana.

A produção de anticorpo recombinante mostrada na figura 16 mostra que os níveis de anticorpos secretados são reduzidos para as construções contendo o intron A e suas deleções, comparadas com o vetor pMIREs. É importante ressaltar que este efeito se mantém ao longo de 30 dias, como analisado na figura 16B. A produção de anticorpos secretados chega a cair em quase 100 vezes, no caso da construção sintética com deleção de 200 pb, ao contrário do que se observa na produção da luciferase por meio de sua atividade, onde a construção $\Delta 200$ s apresenta a segunda melhor produção. A luciferase, cabe ressaltar, é uma proteína intracelular, sendo a sua produção realizada nesse compartimento celular. Esse efeito foi também verificado em outros estudos (Mariatti *et al.*, 2010a; Mariatti *et al.*, 2010b), onde os níveis de proteínas secretadas, expressas por meio de vetores com fortes promotores “engenheirados”, não correspondiam aos níveis de atividade da luciferase, que eram sempre maiores.

Uma hipótese para explicar os baixos níveis de anticorpos secretados detectados pelo ensaio de ELISA sanduíche, e que não foi testada pelos outros estudos, é o acúmulo da grande quantidade de mRNA do anticorpo anti-CD3 humanizado, que pode não totalmente ser processada pela maquinaria de tradução, ou ainda, os altos níveis de cadeias leve e pesada que não são corretamente montadas para a secreção da molécula completa (Gomez *et al.*, 2011). A produção de mRNA do anticorpo recombinante seria tão intensa que a célula hospedeira não teria a capacidade para recrutar a maquinaria necessária para traduzir o mRNA ou, ainda o aparato secretório da célula não conseguiria assegurar a correta montagem dessa proteína recombinante, havendo o acúmulo de proteína mal formada no retículo endoplasmático que ativaria a resposta UPR (do inglês *unfolded protein response*). Segundo Xu e Robson (2010), a resposta UPR ativa diversos mecanismos celulares, dentre eles a proteólise, que diminuem os níveis de proteínas heterólogas recombinantes secretadas, dentre elas o fragmento de anticorpo scFv.

Outra explicação para os baixos níveis de anti-CD3 detectados pelo ELISA pode ser a quantidade insuficiente de proteínas que integram a maquinaria de processamento do mRNA, tradução, transporte e secreção da proteína final. Como os níveis de mRNA da proteína de interesse na célula hospedeira cresceriam significativamente em pouco tempo, haveria grande quantidade deste mRNA na célula sem destino, que seria provavelmente degradado pelos mecanismos de NMD (Le Hir *et al.*, 2003). Adicionalmente, a grande quantidade de mRNA do anticorpo recombinante que se acumularia na célula poderia inclusive dificultar o processamento e tradução de outros

transcritos necessários à manutenção da atividade basal da célula, como proteínas do citoesqueleto, retículo endoplasmático, proteínas ribossomais, etc. Com isso, o efeito negativo da expressão do anticorpo recombinante poderia ser um resultado de morte celular.

Dessa forma, para verificar se os níveis de transcritos do fragmento FvFc do anticorpo anti-CD3 eram muito superiores aos níveis de proteína secretada, observados nos ensaios de ELISA, foram desenhados três pares de iniciadores para ensaios de qPCR para detecção dos níveis de mRNA do anticorpo anti-CD3, sendo um para a região codificadora da porção constante (Fc), outro para a região codificadora do domínio variável leve (VL) e um terceiro par direcionado para a região que codifica o domínio variável pesado (VH). As sequências dos iniciadores estão descritas na tabela 2 da seção 3.1.15 de Materiais e Métodos. A figura 17 mostra a curva de dissociação dos pares de iniciadores desenhados.

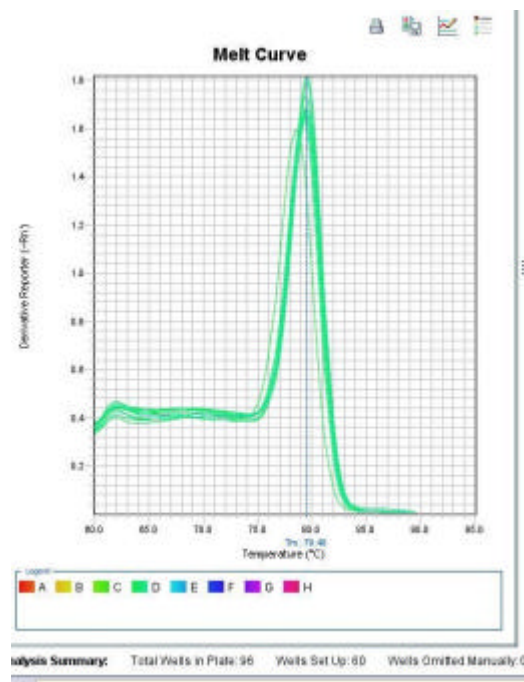
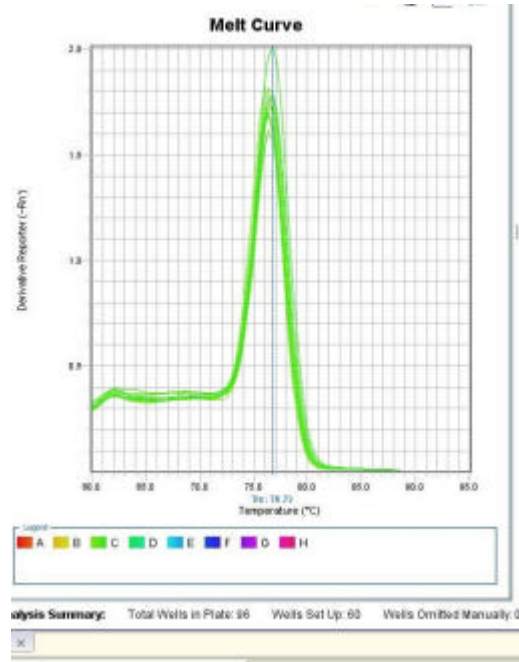
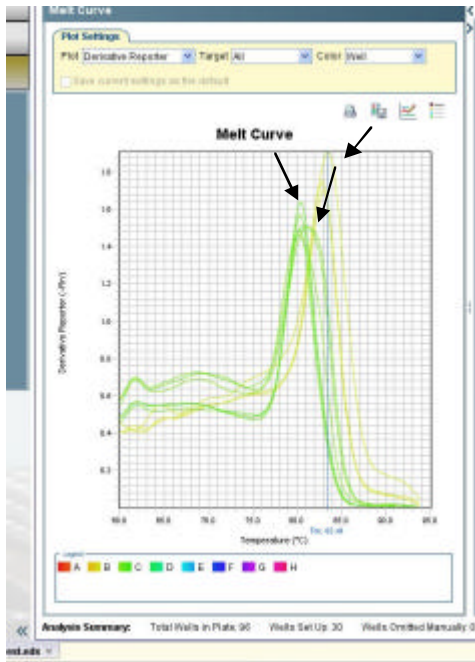


Figura 17. Curvas de dissociação dos iniciadores para qPCR do anticorpo humanizado anti-CD3. São mostradas na figura as curvas de dissociação dos iniciadores para as regiões codificadoras dos fragmentos correspondentes ao Fc (painel A), VH (painel B) e VL (painel C) do anticorpo anti-CD3 para a realização de ensaios de qPCR. As setas no painel A indicam os três picos distintos de dissociação, observados apenas para os iniciadores de Fc.

Tendo em vista que a curva de dissociação do iniciador de Fc apresentou três picos (figura 17 A), indicando que pode ter ocorrido formação de dímeros ou amplificação de produtos inespecíficos, utilizou-se para os ensaios de qPCR apenas os iniciadores dirigidos para as regiões codificadoras dos domínios VH e VL. Para a análise dos dados, foi utilizada a ferramenta do programa 7500 Fast System SDS Software denominada *Relative Quantification Study*. Esta ferramenta verifica os dados obtidos na placa de reação, e retorna os valores médios de Ct, que é o ciclo de limiar (*threshold*). Este ciclo é obtido por meio da intersecção da linha de base (uma linha paralela à linha do eixo das abscissas, que elimina o *background*) com a curva sigmóide de amplificação das amostras.

Com a obtenção do valor de Ct para todas as amostras, o estudo da quantificação relativa da expressão gênica pode ser feito por meio da fórmula aritmética 2^{-Ct} . Este estudo é denominado estudo pelo Método do Ct comparativo. Quando se usa o corante SYBRGreen, que pode gerar algum *background* inespecífico, deve ser realizado um experimento de validação da reação.

Este experimento é feito por meio da reação de amostras-alvo e amostras-controle em diferentes diluições seriadas. Os valores da diluição são quotados no gráfico na forma logarítmica (no eixo X), e o valor de Ct é colocado no eixo das ordenadas. A linha obtida no gráfico com as amostras testadas deve ser próxima à linha de tendência, como mostrado na figura 18. Para o gráfico, foram feitas diluições de 1 ng, 0,1 ng e 0,001 ng do vetor que codifica para o anticorpo recombinante, para o teste das eficiências dos iniciadores VH e VL. Como controle constitutivo utilizou-se o gene GAPDH de hamster, cujo iniciador foi previamente testado (Quilici, 2008)

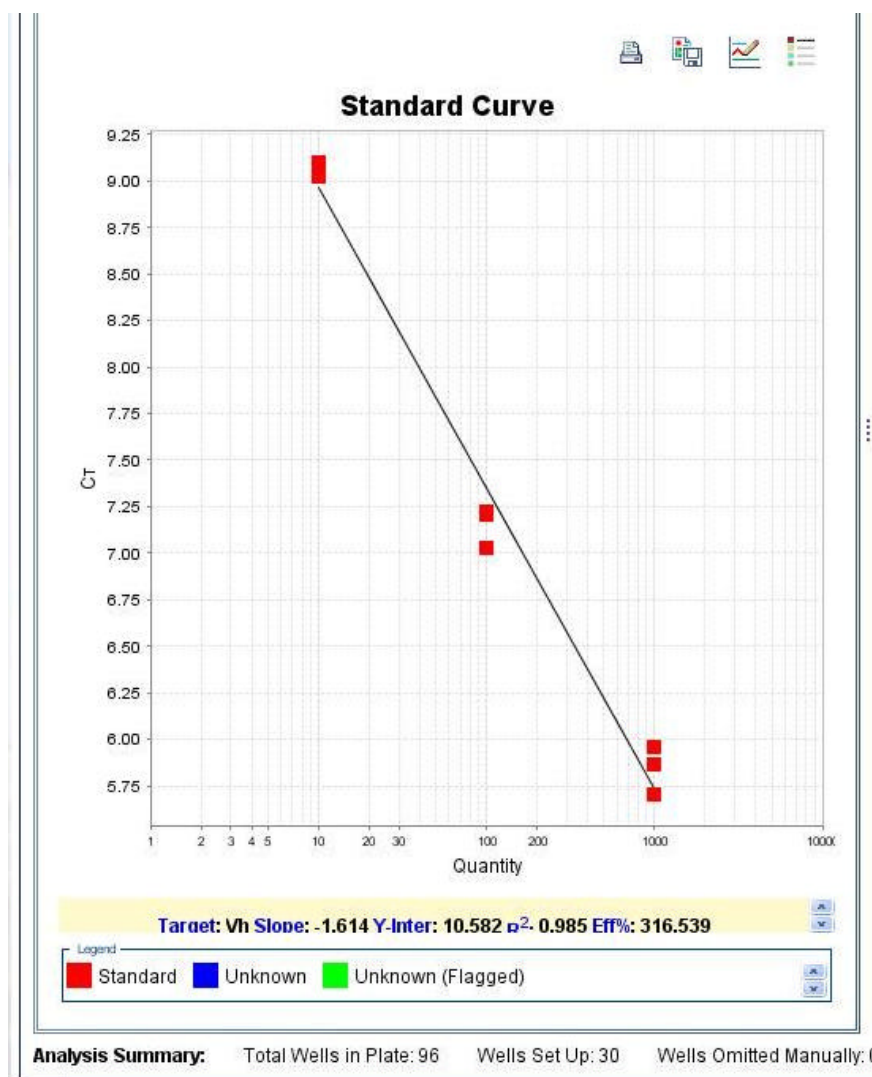


Figura 18. Validação da reação de qPCR para a quantificação relativa da expressão gênica do anticorpo humanizado anti-CD3. No eixo das abscissas são mostrados os valores da quantificação das amostras. No eixo das ordenadas observa-se o valor de Ct.

Para a mensuração dos níveis de mRNA do anticorpo recombinante, células CHO-K1 foram transfectadas com as construções sintéticas e a construção sem intron (pMIREs – Silva et al, 2009), e 24 horas pós-transfecção, o RNA total foi extraído, conforme descrito na seção 3.2.16 de Materiais e Métodos. Na figura 19 podem ser observadas as amostras de RNA total das construções pMIREs, IAs, ?200s e ?600s.

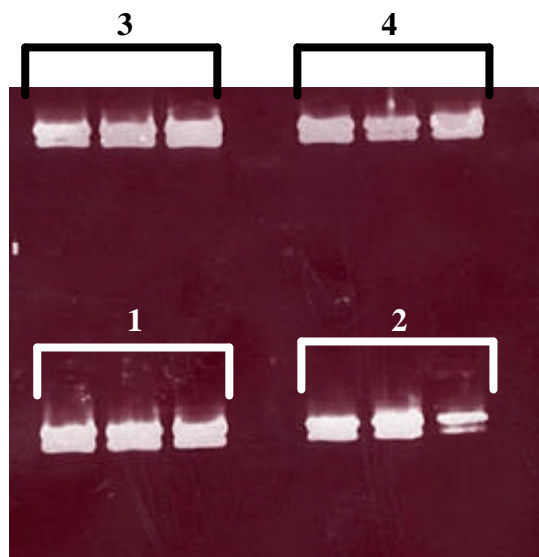


Figura 19. Gel de agarose para análise das amostras de RNA total de CHO-K1. Em 1 observam-se três amostras de RNA total extraído de poços transfectados com o plasmídeo pMIREs (anti-CD3 sem intron A); em 2 observam-se três amostras de RNA total extraído de poços transfectados com o plasmídeo pCO; em 3 observam-se três amostras de RNA total extraído de poços transfectados com o plasmídeo pCO?200; em 4 observam-se três amostras de RNA total extraído de poços transfectados com o plasmídeo pCO?600.

A partir das amostras de RNA total obtidas acima, sintetizou-se o cDNA que foi ser utilizado nas reações de qPCR. A figura 20 mostra os níveis de expressão dos transcritos de anti-CD3.

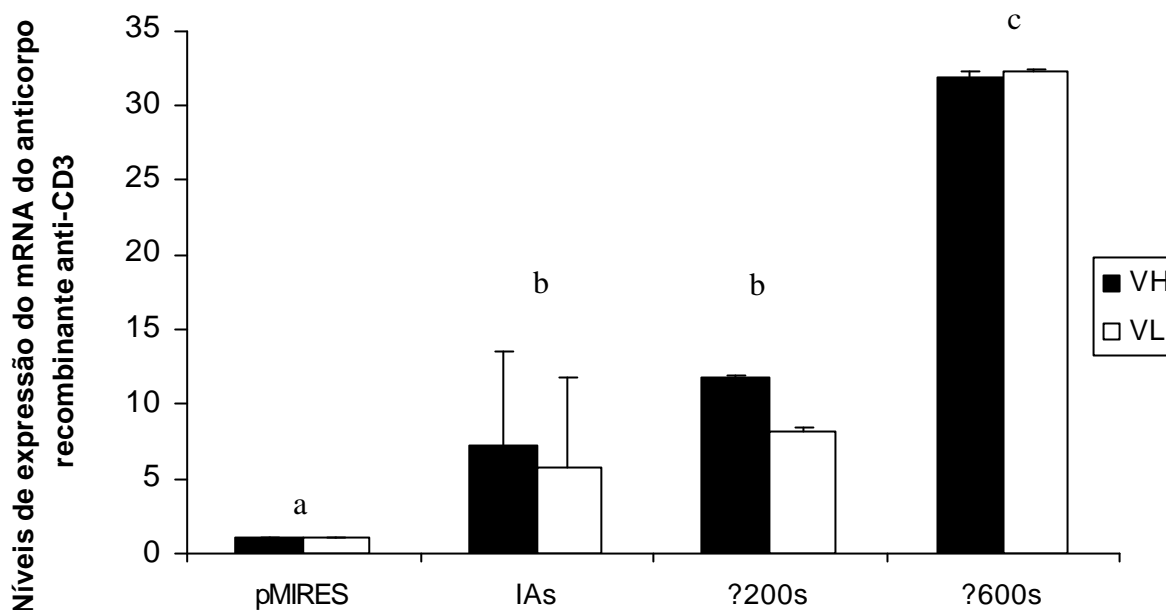


Figura 20. Níveis de expressão do mRNA do gene que codifica o anticorpo recombinante anti-CD3 em CHO-K1. O eixo das abscissas mostra as construções que foram transfectadas nas células CHO-K1, enquanto o eixo das ordenadas contém os valores de $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Como controle interno foi utilizado o gene GAPDH de hámster, e como controle das amostras, os valores da construção sem intron. Foram realizados três experimentos independentes, em triplicata. As letras mostradas acima das barras de valores representam a significância estatística entre as amostras, com $P < 0,05$.

A análise dos níveis de expressão do mRNA do anticorpo recombinante corrobora a hipótese de que o intron A e variantes melhoram significativamente os níveis dos transcritos do gene alvo. Entretanto, como o anticorpo é uma molécula complexa, montada no retículo endoplasmático para posterior secreção, os níveis de expressão do mRNA não correspondem aos níveis de proteína final secretadas (Shapiro *et al*, 1996). Isso pode ocorrer devido à necessidade de aumento no recrutamento da maquinaria celular necessária para síntese das cadeias, transporte e secreção, bem como a necessidade de incremento da própria maquinaria celular, como retículo endoplasmático, aparato de Golgi e proteínas de transporte. Adicionalmente, qualquer alteração celular que perturbe a homeostase do sistema, como o aumento da síntese de proteínas, por exemplo (Zhang e Kaufman, 2006), pode levar ao acúmulo de proteínas que não foram corretamente dobradas no retículo endoplasmático, o que acarreta a resposta UPR. Tendo em vista os rápidos aumentos dos níveis de expressão do transgene recombinante, é possível que a célula não acompanhe a produção do aparato necessário para a síntese da proteína final, ou ainda, que seja disparado esse mecanismo

para a degradação precoce das proteínas retidas. No caso específico, como estamos trabalhando com um fragmento FvFc, que não tem cadeias distintas, a hipótese mais provável é a retenção no retículo endoplasmático e degradação proteolítica por resposta UPR.

No caso da luciferase, há correlação entre nível de mRNA e níveis de proteínas detectadas (via atividade enzimática) (Quilici, 2008), pois a luciferase é uma proteína intracelular, cuja a atividade é medida por meio de um lisado das células pós-transfecção. Dessa forma, a via para detecção dos níveis da proteína-repórter não envolve todos os complexos mecanismos observados para o anticorpo recombinante.

Observa-se, inicialmente, que os níveis de mRNA do anticorpo anti-CD3 nas diferentes construções com intron deletado são correspondentes a atividade da luciferase, tanto nas versões sintética (figura 13) quanto original (Quilici, 2008). Adicionalmente, na figura 20 verifica-se o aumento significativo dos níveis de mRNA do anticorpo anti-CD3 para a construção $\Delta 600s$ (sintética). Em Quilici (2008), havia sido destacado que, para o gene repórter da luciferase, ouve um decréscimo da produção dos níveis de mRNA para a construção selvagem $\Delta 600$, e especulou-se que a perda do sítio acceptor de *splicing* durante o processo de clonagem do vetor poderia ser o responsável por tal efeito. Com a construção da versão sintética, a qual mantém o sítio acceptor de *splicing*, nota-se que tanto a atividade da luciferase (figura 13) quanto a produção de transcritos de anti-CD3 (figura 20), na construção $\Delta 600s$, aumentaram. Uma explicação pode ser, no caso da construção $\Delta 600$ selvagem, o acúmulo de mRNA não-processado, que o torna instável e suscetível à degradação por NMD (Jaillon *et al.*, 2008; Gudikote *et al.*, 2005 e Le Hir *et al.*, 2003). Com a manutenção do sítio acceptor de *splicing*, este efeito não é mais observado, e, portanto, os níveis de mRNA do anticorpo recombinante permanecem estáveis, e elevados. Com a mensuração dos níveis de transcritos não-processados, essa hipótese foi confirmada, como observado na figura 15. Além disso, foi mostrado que a construção $\Delta 600s$ é ainda mais eficiente do que a construção $\Delta 200$, o que pode ser explicado pela inclusão de novos sítios de restrição, que são eliminados em $\Delta 600s$ e mantidos em $\Delta 200$.

4.3. Estudo de possíveis fatores transcricionais ligados ao intron A do promotor de CMV

A expressão gênica em eucariotos é mediada por fatores em cis e em trans. Fatores protéicos podem, ao associar a regiões promotoras ou ainda intrônicas, influenciar positiva ou negativamente os níveis de mRNA produzidos (Le Hir *et al*, 2003 e Slekmann *et al*, 1996). Em outras palavras, os introns podem funcionar como sequências regulatórias que albergam sítios de ligação para proteínas potencializadoras (*enhancers*) da expressão de um transgene, ou repressoras da expressão.

Portanto, a fim de verificar a existência de ligação de alguma proteína regulatória da transcrição ao intron A do promotor de CMV, foram desenhados oligonucleotídeos marcados com o fluoróforo FAN, para a realização de ensaios de retardo de mobilidade eletroforética (EMSA). A hipótese é que algum fator inibitório se ligue na região de 200 pb da construção selvagem, que quando deletada, aumente significativamente a atividade da luciferase quando comparada à construção sem deleção. Quando esta sequência foi analisada por meio do *software* TFSEARCH (<http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html>), que verifica a existência de sítios putativos de ligação a proteínas regulatórias, não foi encontrado nenhum resultado significativo que apontasse sítios reconhecidos por fatores transcricionais ubíquos, visto que os resultados obtidos para a expressão do gene repórter da luciferase foram similares entre as 4 linhagens celulares estudadas em Quilici (2008).

Para o ensaio de EMSA foram utilizados os extratos nucleares de CHO-K1 e HEK 293, observados na figura 21. A linhagem HEK foi escolhida também para este estudo devido aos elevados valores de atividade da luciferase apresentados em transfecção transiente, conforme apresentado na figura 7 (Quilici, 2008).

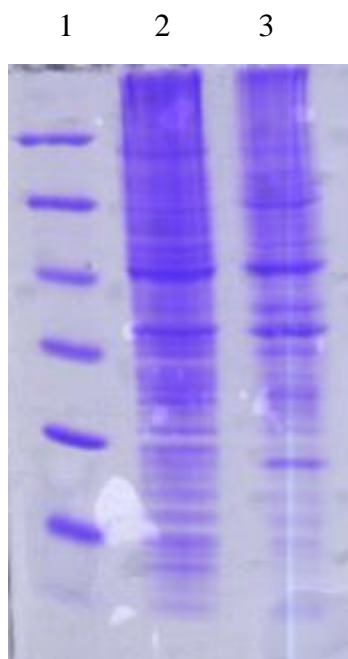


Figura 21. Análise do extrato nuclear de HEK-293 e CHO-K1. A figura mostra os extratos protéicos obtidos a partir do núcleo dessas linhagens celulares em um experimento que não há a formação de *pellet*, e com isso há menor degradação e contaminação da preparação com restos celulares (seção 3.2.20 de Materiais e Métodos). No poço 1 encontra-se o marcador de massa molar *See Blue*, da Invitrogen (148 kD, 98 kD, 64 kD, 50 kD, 36 kD, 22 kD e 16 kD), e nos poços 2 e 3 os extratos concentrados de CHO-K1 e HEK 293, respectivamente.

A figura 22 mostra um esquema de como foram desenhadas as sondas para o ensaio de EMSA.

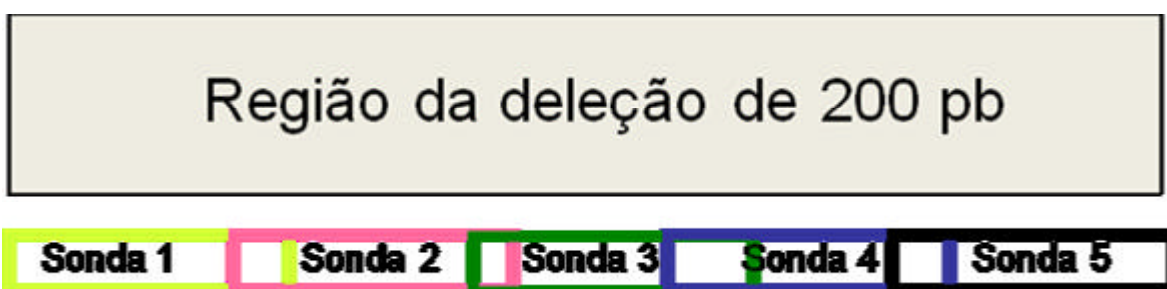


Figura 22. Esquema do desenho das sondas fluorescentes para os experimentos de EMSA. Foram desenhadas 5 sondas que se sobrepõem entre si, cobrindo o fragmento de 200 pb a ser estudado.

Cada par de oligonucleotídeos foi anelado a fim de se obter as sondas. Para a remoção das possíveis contaminações com oligonucleotídeos não-anelados (fita

simples), auto-anelados ou produtos de degradação, a reação foi purificada em gel de poliacrilamida nas mesmas condições de corrida para o experimento de EMSA. O gel obtido, após o anelamento dos oligonucleotídeos, pode ser observado na figura 23.

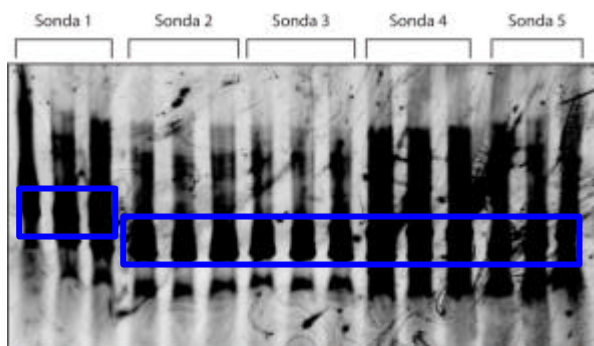


Figura 23. Análise do anelamento dos oligonucleotídeos complementares para obtenção de sondas. Os retângulos azuis indicam as regiões que foram removidas do gel para posterior purificação.

Para a reação de EMSA em si, preparou-se a reação com compostos de alto sal, oligonucleotídeos inespecíficos e a sonda anelada marcada, a fim de evidenciar prováveis interações das sondas com proteínas presentes no extrato nuclear. Esta reação foi incubada com o extrato nuclear e posteriormente submetida à eletroforese em um gel de poliacrilamida com malha específica. Os resultados da reação podem ser verificados na figura 24.

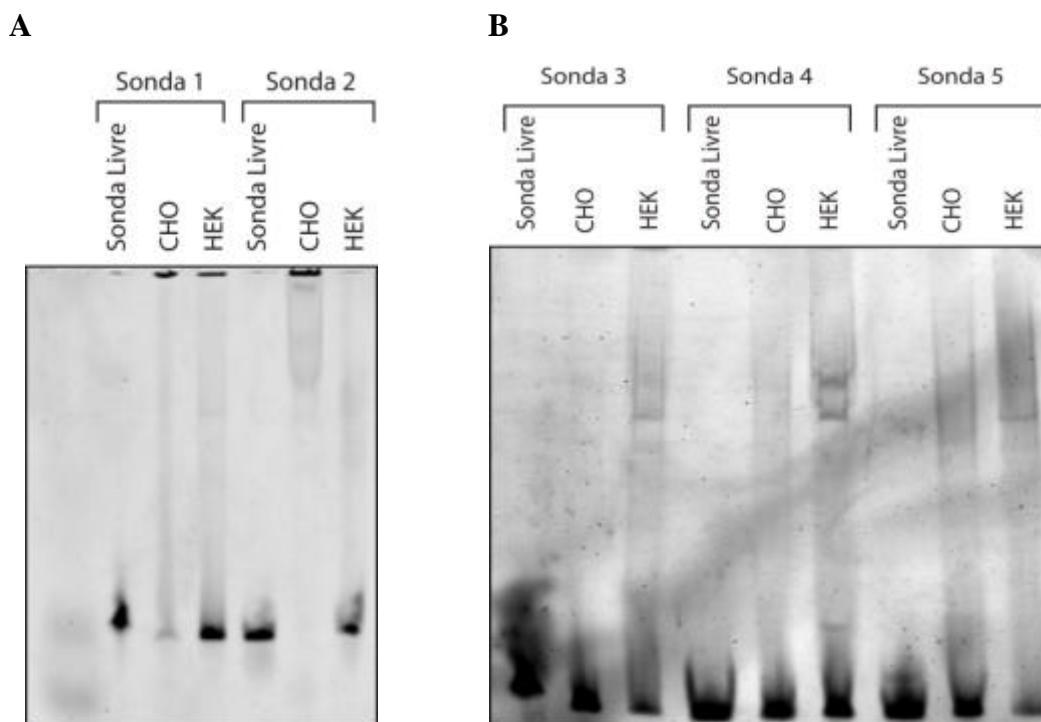


Figura 24. Ensaio de mobilidade eletroforética com as sondas purificadas e extratos nucleares de CHO-K1 e HEK 293. O painel A mostra as reações com os dois extratos celulares e as sondas 1 e 2, e o painel B mostra a reação com as sondas 3, 4 e 5.

A partir da análise da figura 26, constata-se que há a formação de bandas (regiões de ligação DNA-proteína) para as sondas 2 (apenas no extrato de CHO-K1), 3, 4 e 5 (apenas no extrato de HEK 293). Este resultado mostra-se curioso, pois sugere que há ligações de proteínas célula-específicas, o que indicaria que os efeitos da região de 200 pb do intron A seriam específicos para determinados tipos celulares. Entretanto, o efeito potencializador da remoção deste fragmento de DNA do intron A é observado em todas as linhagens celulares analisadas por Quilici (2008).

Para que se confirmasse a especificidade da ligação, foi realizado um ensaio com competidores específicos, que são as sondas não-marcadas (“sondas frias”). O resultado pode ser verificado na figura 25, apenas para as sondas 3 e 4 e para o extrato de HEK-293, tendo em vista a escassez dos extratos purificados para que fosse realizado o ensaio.

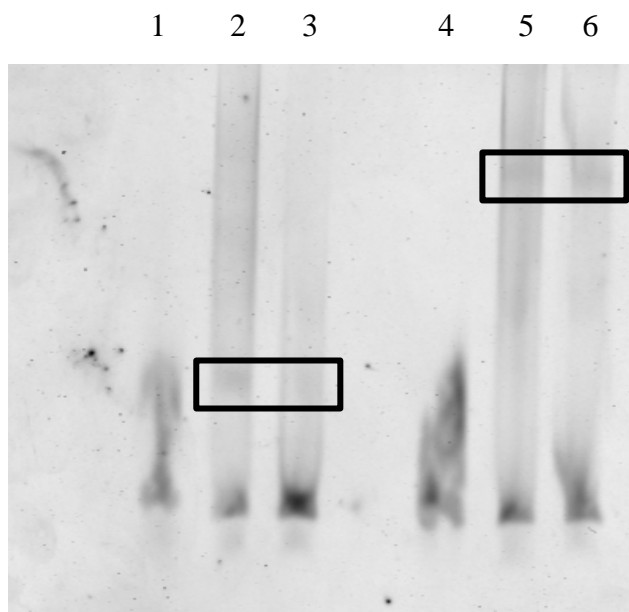


Figura 25. Ensaio de mobilidade eletroforética com as sondas purificadas e competidores específicos. Os poços 2 e 3 contêm as reações sem e com o competidor específico da sonda 3 e extrato nuclear de HEK-293, e os poços 5 e 6 as reações sem e com o competidor específico da sonda 4 e mesmo extrato nuclear. Os poços 1 e 4 apresentam as sondas livres.

A análise da figura 25 indica que a ligação não é específica, já que a banda permanece tanto na reação sem competidor quanto na reação com competidor. Desse modo, as bandas observadas nas sondas 3 e 4 não representam uma ligação específica à região do DNA à qual as sondas se anexam. Considerando que os experimentos foram realizados em um equipamento adaptado para o procedimento de EMSA (foi utilizada uma cuba de corrida normal dentro da câmara fria), apresentado, portanto resultados apenas sugestivos, as sondas ainda devem ser testadas novamente, especialmente as sondas 2 e 3, em um equipamento mais adequado para os ensaios de EMSA e com diferentes extratos nucleares.

Adicionalmente, foram observadas bandas bem definidas para as sondas 3, 4 e 5, apenas no extrato celular de HEK-293. Como o efeito potencializador da deleção de 200 pb é observado em várias linhagens celulares (Quilici, 2008), as bandas observadas apenas no extrato de HEK-293 podem ser artefatos da técnica ou bandas inespecíficas, ou ainda, problemas nas preparações dos extratos.

5. Conclusões e Perspectivas

No presente trabalho, foram analisadas diferentes construções com deleções no intron A do promotor de CMV, tanto por meio da expressão do gene repórter da luciferase quanto do gene do anticorpo recombinante anti-CD3, fragmento FvFc. Os estudos indicaram que as construções com deleção de 200 e 600 pb têm potencial para incremento da produção de proteínas de interesse, uma vez que os níveis de transcritos mostraram-se aumentados. Para se obter níveis de produção de proteína condizentes com aqueles observados em termos de mRNA deve-se ajustar as condições de expressão para cada proteína analisada. Os vetores de expressão em células de mamífero contendo o promotor de CMV com as novas sequências do intron A original foram patenteadas no Brasil (PI0803141-0 A2, publicada em 9 de março de 2010 pelo Instituto Nacional da Propriedade Industrial - INPI), sendo novas ferramentas para a produção de proteínas recombinantes com potencial econômico.

Com relação ao mecanismo pelo qual as novas construções influenciam a expressão dos transgenes estudados, ainda não há uma definição clara, mas acredita-se que as novas construções que mantêm o sítio acceptor de *splicing* sejam responsáveis por uma manutenção da estabilidade do mRNA, o que otimiza os níveis de produção da proteína final. Com a produção de mRNAs mais estáveis, reduz-se também os níveis de degradação dos transcritos por NMD. Com base nos resultados obtidos nos experimentos de EMSA, parece ser remota a possibilidade de que na região deletada de 200 pb do intron A haja algum sítio de ligação a proteína regulatória da transcrição.

Para esclarecermos o real mecanismo de ação destes introns nas novas construções, e também para verificarmos outros modos de ação dessas sequências, sugerem-se algumas perspectivas a serem testadas em trabalhos futuros:

- Análise da estabilidade dos mRNAs de transcritos testados nas construções de promotores de CMV com intron A, em experimentos do tipo *Run On*;
- Medida dos níveis de anticorpo anti-CD3 intracelular nos transfectados, a fim de corroborar a hipótese de que há altos níveis de proteína retida e não secretada;

- Análise do perfil de expressão e de transcritos utilizando-se outra proteína de interesse secretada como modelo. Nesse caso, já testou-se o efeito do intron A inteiro na expressão de FVIII (Campos-da-Paz *et al*, 2008), mas não com as versões deletadas.

6. Referências Bibliográficas

Alcântara, P.H.F. **Efeitos da clonagem de elementos de DNA anti-repressores em vetor de expressão na produção de Anti-CD3 em CHO-K1.** 2010. Dissertação de mestrado apresentada à Universidade de Brasília.

Ansmant, I. B e Izaurralde, E. **Quality control of gene expression: a stepwise assembly pathway for the surveillance complex that triggers nonsense-mediated mRNA decay.** *Genes and Development.* 2006; 20: 391-8.

Azevedo, M. O.; Felipe, M. S. S.; Brígido, M. M.; Maranhão, A. Q. e De-Souza, M. T. **Técnicas Básicas em Biologia Molecular.** 2003. 1ª edição. Editora UnB.

Blencowe, B. J.; Issner, R.; Nickerson, J. A. e Sharp, P. A. **A coactivator of pre-mRNA splicing.** *Genes and Development.* 1998; 12: 996-1009.

Bourdoun, V.; Harvey, A. e Lonsdale, D.M. **Introns and their position affect the translational activity of mRNA in plant cells.** *EMBO reports.* 2001; 2(5): 394-8.

Bucher, P. **Weight matrix descriptions of four eukaryotic RNA polymerase II promoter elements derived from 502 unrelated promoter sequences.** *Journal of Molecular Biology.* 1990; 212: 563-78.

Buchman, A. R. e Berg, P. **Comparison of intron-dependent and intron-independent gene expression.** *Molecular Cell Biology.* 1988; 8: 4395-405.

Burke, T. W. e Kadonaga, J. T. **Drosophila TFIID binds to a conserved downstream basal promoter element that is present in many TATA-box- deficient promoters.** *Genes and Development.* 1996; 10: 711-24.

Burke, T. W. e Kadonaga, J. T. **The downstream core promoter element, DPE, is conserved from Drosophila to humans and is recognized by TAF_{II}60 of Drosophila.** *Genes and Development.* 1997; 11: 3020-31.

Campos-da-Paz, M.; Costa, C.S.; Quilici, L.S.; Simões, I.C.; Kyaw, C.M.; Maranhão, A.Q. e Brígido, M.M. **Production of recombinant human factor VIII in different cell lines and the effect of human XBP-1 co-expression.** *Molecular Biotechnology*. 2008.

Chang, A.H.; Stephan, M.T. e Sadelain, M. **Stem cell-derived erythroid cells mediate long-term systemic protein delivery.** *Nature Biotechnology*. 2006; 24(8): 1017-21.

Chapman, B.S.; Thayer, R.M.; Vincent, K.A. e Haigwood, N.L. **Effect of intron A from human cytomegalovirus (Towne) immediate-early gene of heterologous expression in mammalian cells.** *Nucleic Acid Research*. 1991; 19(14): 3979-86.

Cheryath, V.; Novina, C. D. e Roy, A. L. **TFII-I regulates V_{β} promoter activity through an initiator element.** *Molecular Cell Biology*. 1998; 18: 4444-54.

Conti, E. e Izaurralde, E. **Nonsense-mediated mRNA decay: molecular insights and mechanistic variations across species.** *Current Opinion in Cell Biology*. 2005; 17(3): 316-25.

Corden, J.; Wasylyk, B.; Buchwalder, A.; Sassone-Corsi, P.; Kedinger, C. e Chambon, P. **Promoter sequences of eukaryotic protein-coding genes.** *Science*. 1980; 209: 1406-14.

Corden, J.; Wasylyk, B.; Buchwalder, A.; Sassone-Corsi, P.; Kedinger, C. e Chambon, P. **Promoter sequences of eukaryotic protein-coding genes.** *Science*. 1980; 209: 1406-14.

Cox III, R. S.; Surette, M. G. e Elowitz, M. B. **Programming gene expression with combinatorial promoters.** *Molecular Systems Biology*. 2007; 3(145): 2-11.

Degot, S.; Le Hir, H.; Alpy, F.; Kedinger, V.; Stoll, I.; Wendling, C.; Seraphin, B.; Rio, M. C. e Tomasetto, C. **Association of the breast cancer protein MLN51 with the**

exon junction complex via its speckle localizer and RNA binding module. *The Journal of Biological Chemistry*. 2004; 279(32): 33702-15.

Furger, A.; O'Sullivan, J. M.; Binnie, A.; Lee, B. A. e Proudfoot, N. J. **Promoter proximal splice sites enhance transcription.** *Genes and Development*. 2002; 16: 2792-99.

Gatfield, D. e Izaurralde, E. **REF1/Aly and the additional exon junction complex proteins are dispensable for nuclear mRNA export.** *The Journal of Cell Biology*. 2002; 159(4): 579-88.

Gazhal, P. e Nelson, J. A. **Enhancement of RNA Polymerase II initiation complexes by a novel DNA control domain downstream from the Cap Site of the cytomegalovirus major immediate-early promoter.** *Journal of Virology*. 1991; 65(5): 2299-307.

Gilbert, W. **Why genes in pieces.** *Nature*. 1978; 271(5645): 501.

Gluzman, Y. **SV-40 transformed simian cells support the replication of early SV-40 mutants.** *Cell*. 1981; 23(1): 175-82.

Gomez, N.; Subramanian, J.; Ouyang, J.; Nguyen, M.D.H.; Hutchinson, M.; Sharma, V.K.; Lin, A.A. and Yuk, I.H. (2011). **Culture Temperature Modulates Aggregation of Recombinant Antibody in CHO cells.** *Biotechnologist and Bioengineering*. doi: 10.1002/bit.23288.

Grahan, F.L.; Smiley, J.; Russel, W.C. e Nairn, R. **Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5.** *The Journal of General Virology*. 1977; 36(1): 59-74.

Gruss, P.; Lai, C.J.; Dhar, R. e Khoury, G. **Splicing is a requirement for biogenesis of functional 16S mRNA of simian virus 40.** *PNAS*. 1979; 76(9): 4317-21.

Hammariskjold, M-L.; Heimer, J.; Hammariskjold, B.; Sangwan, I.; Albert, L. e Rekosh, D. **Regulation of human immunodeficiency virus *env* expression by the *rev* gene product.** *Journal of Virology*. 1989; 63(5): 1959-66.

Han, J.; Xiong, J.; Wang, D. e Fu, X-D. **Pre-mRNA splicing: where and when in the nucleus.** (2011). *Cell press*. doi:10.1016/j.tcb.2011.03.003

Hardley, C. B. e Reynolds, R. P. **Analysis of *E. coli* promoter sequences.** *Nucleic Acids Research*. 1987; 15 (5): 2343-61

Hasania, S.; Lotfi, A. S.; Mahboudi, F.; Rezaii, A.; Rahbarizadeh, F. e Mohsenifar, A. **Elevated expression of human alpha-1 antitrypsin mediated by yeast intron in *Pichia pastoris*.** *Biotechnology Letters*. 2006; 28(19): 1545-50.

Hennighausen, L. e Fleckenstein, B. **Nuclear Factor 1 interacts with five DNA elements in the promoter region of human cytomegalovirus major immediate early gene.** *The EMBO Journal*. 1986; 5(6): 1367-71.

Holliger, P. e Hudson, P. J. **Engineered antibody fragments and the rise of single domains.** *Nature Biotechnology*, 2005; 23(9): 1126-1136.

Javahery, R.; Khachi, A.; Lo, K.; Zenzie-Gregory, B. e Smale, S. T. **DNA sequences requirements for transcriptional iniciator activity in mammalian cells.** *Molecular Cell Biology*. 1994; 14: 116-27.

Juven-Gershon, T.; Hsu, J-Y.; Theisen, J.W.M. e Kadonaga, J.T. **The RNA polymerase II core promoter – the gateway to transcription.** *Current Opinion in Cell Biology*. 2008. 20:253-59

Juven-Gershon, T. e Kadonaga, J.T. **Regulation of gene expression via the core promoter and the basal transcriptional machinery.** *Developmental Biology*. 2010. 339: 225-229.

Kataoka, N.; Yong, J.; Kim, V. N.; Velazquez, F.; Perkinson, R. A.; Wang, F. e Dreyfuss, G. **Pre-mRNA splicing imprints mRNA in the nucleus with a novel RNA-binding protein that persists in the cytoplasm** *Molecular Cell*. 2000; 6(3): 673-82.

Kim, S. J., Park, Y. e Hong, H. J. **Antibody engineering for the development of therapeutic antibodies.** *Molecular Cells*. 2005; 20 (1): 17-29.

Kim, V.N. e Dreyfuss, G. **Nuclear mRNA binding proteins couple pre-mRNA splicing and post-splicing events.** 2001. *Molecular Cells*. 12, 1-10.

Kim, U.; Wang, Y.; Sanford, T.; Zeng, Y. e Nishikura, K. **Molecular cloning of cDNA for double-stranded RNA adenosine deaminase, a candidate enzyme for nuclear RNA editing.** *PNAS*. 1994; 91(24): 11457-61.

Knowles, B.B.; Howe, C.C. e Aden, D.P. **Human hepatocellular carcinoma cell lines secrete the major plasma proteins and hepatitis B surface antigen.** *Science*. 1980; 209(4455): 497-9.

Kutach, A. K. e Kadonaga, J. T. **The downstream promoter element DPE appears to be as widely used as the TATA box in *Drosophila* core promoters.** *Molecular Cell Biology*. 2000; 20: 4754-64.

Kwek, K.Y.; Murphy, S.; Fungler, A.; Thomas, B.; O’Gorman, W.; Kimura, H.; Proudfoot, N.J. e Akoulitchev, A. **U1 snRNA associates with TFIIF and regulates transcriptional initiation** *Nature Structural Biology*. 2002; 9(11): 800-5.

Lagrange, T.; Kapanidis, A. N.; Tang, H.; Reinberg, D. e Ebright, R. H. **New core promoter element in RNA polymerase II – dependent transcription: sequence-specific DNA binding by transcription factor IIB.** *Genes and Development*. 1998; 12: 34-44.

Lauderdale, J. D. e Stein, A. **Introns of the chicken ovalbumin gene promote nucleosome alignment *in vitro*.** *Nucleic Acid Research*. 1992; 20(24): 6589-96.

Le Hir, H.; Gatfield, D.; Braun, I. C.; Forler, D. e Izaurralde, E. **The protein Mago provides a link between splicing and mRNA localization.** *EMBO Reports*. 2001; 2(12): 1119-24.

Le Hir, H.; Izaurralde, E.; Maquat, L. E. e Moore, M. J. **The spliceosome deposits multiple proteins 20-24 nucleotides upstream of mRNA exon-exon junctions.** *The EMBO Journal*. 2000; 19(24): 6860-69.

Le Hir, H.; Moore, M. J. e Maquat, L. E. **Pre-mRNA splicing alters mRNP composition: evidence for stable association of proteins at exon-exon junctions.** *Genes and Development*. 2000b; 14: 1098-1108.

Le Hir, H.; Nott, A. e Moore, M.J. **How introns influence and enhance eukaryotic gene expression.** *Trends in Biochemical Sciences*. 2003; 28(4): 215-20.

Legrain, P. e Rosbash, M. **Some cis- and trans- acting mutants for splicing target pre-mRNA to the cytoplasm.** *Cell*. 1989; 57(4): 573-83.

Leitzgen, K.; Knittler, M.R. e Haas, I.G. **Assembly of immunoglobulin light chains as a prerequisite for secretion.** *Journal of Biol Chem*. 1997. 19:3117.

Lewin, B. **Genes VII**. 2001. Editora Artmed, Porto Alegre, Rio Grande do Sul.

Lewis, B.A.; Kim, T.K. e Orkin, S.M. **A downstream element in the human beta-globin promoter: evidence of extended sequence-specific transcription factor IID contacts.** *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000. 97:7172-77

Li, J.; Menzel, C.; Meier, D.; Zhang, C.; Dübel, S. e Jostock, T. **A comparative study of different vector designs for the mammalian expression of recombinant IgG antibodies.** *Journal of Immunology Methods*. 2007. 3018:113-24.

Liu, K.; Sandgren, E. P.; Pamiter, R. D. e Stein, A. **Rat growth hormone gene introns stimulate nucleosome alignment *in vitro* and in transgenic mice.** *PNAS*. 1995; 92: 7724:28.

Lutz, C.S.; Murthy, K.G.; Schek, N.; O'Connor, J.P.; Manley, J.L. e Alwine, J.C. **The interaction between the U1 snRNP-A protein and the 160 kD subunit of cleavage-polyadenylation specificity factor increases polyadenylation efficiency *in vitro*.** *Genes & Development*. 1996; 10(3): 325-37.

Mariati; Ho, S.C.L.; Yap, M.G.S. e Yang, Y. **Evaluating post-transcriptional regulatory elements for enhancing transient gene expression levels in CHO K1 and HEK 293 cells.** *Prot Express Purif*. 2010a.69:9-15.

Mariati; N, Y.K.; Chao,S-H.; Yap, M.G.S. e Yang,Y. **Evaluating regulatory elements of human cytomegalovirus major immediate early gene for enhancing transgene expression levels in CHO-K1 and HEK293 cells.** *Journal of Biotechnol*. 2010b. 147:160-3.

Mayeda, A.; Badolato, J.; Kobayashi, R.; Zhang, M. Q.; Gardiner, E. M. e Krainer, A. R. **Purification and characterization of human RNPS1: a general activator of pre-mRNA splicing.** *The EMBO Journal*. 1999; 18(16):4560-70.

Memari, N.; Grass, L.; Nakamura, T.; Karakucuk, I. e Diamandis, E. P. **Human tissue kallikrein 9: production of recombinant proteins and specific antibodies.** *Biological Chemistry*. 2006; 387(6): 733-40.

Missha, L. e Shupisu, G. A. **Description of Artificial Sequence: expression vector cassette vector DNA plasmid.** Patente n° JP 2007506443-A, de 22 de março de 2007.

Morrison, S. e Scharff, M. **Heavy-chain producing variants of a mouse myeloma cell line.** *Journal of Immunol*. 1975. 114:655.

Nojima, T.; Hirose, T.; Kimura, H. e Haqiwara, M. **The interaction between Cap-binding Complex and RNA Export Factor is required for intronless mRNA transport.** *The Journal of Biological Chemistry*. 2007; 282(21): 15645-51.

Nott, A.; Meislin, S. H. e Moore, M. J. **A quantitative analysis of intron effects on mammalian gene expression.** *RNA*. 2003; 9: 607-17.

Pandit, S.; Wang, D. e Fu, X-D. **Functional integration of transcriptional and RNA processing machineries.** (2008). *Current Opinion in Cell Biology*. 20:260-265.

Pelerygina, L.; Patrusheva, I.; Hombaiah, S.; Zurkuhlen, H.; Wildes, M. J.; Patrushev, N. e Hilliard, J. **Production of herpes B virus recombinant glycoproteins and evaluation of their diagnostic potential.** *Journal of Clinical Microbiology*. 2005; 43(2): 620-8.

Penteado, F.C.L.; Medeiros, L.; Orellana, M.D.; Palma, P.; Fontes, A.M.; Takayanagui, O.M. e Covas, D.T. **Clonagem e expressão da glicoproteína transmembrana do retrovírus HTLV-1 em células de mamíferos.** *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2006; 39(2): 169-173.

Picanço, V.; Heinz, S.; Bott, D.; Behrmann, M.; Covas, D.; Seifried, E. e Tonn, T. **Recombinant expression of coagulation factor VIII in hepatic and non-hepatic cell lines stably transduced with third generation lentiviral vectors comprising the minimal factor VIII promoter.** *Cytotherapy*. 2007; 1-10

Puck, T. T.; Cieciura, S. J. e Robinson, A. **Long – Term cultivation of euploid cells from human and animal subjects.** *The Journal of Experimental Medicine*. 1958; 108(6): 945-56.

Quilici, L.S. **Estudo de elementos moduladores da expressão gênica em diferentes linhagens de células de mamífero.** (2008). Dissertação de Mestrado. Universidade de Brasília.

Rajendra, Y.; Kiseljak, D.; Baldi, L.; Hacker, D.L e Wurm, F.M. **A simple high-yielding process for transient gene expression in CHO cells.** *Journal of Biotech*. 2011. 153: 22-26

Reichert, J. P. **Monoclonal antibodies market.** *Nature reviews.* 2004; 3.

Ruggiero, L. A. **Clonagem de anticorpos recombinantes e expressão em cultura de células de Ovário de Hamster Chinês (CHO).** 2002. Dissertação de Mestrado. Universidade de Brasília.

Sambrook, J. e Russel, D. W. **Molecular Cloning – a laboratory manual.** 2001. 3ª edição. *Cold Spring Harbor, Nova York:* Cold Spring Harbor Laboratory.

Sellick, C.A.; Croxford, A.S.; Maqsood, A.R.; Gill, S.; Wasterhoff, H.V.; Goodacre, R. e Dickson, A.J. **Metabolite Profiling of Recombinant CHO Cells: Designing Tailored Feeding Regimes That Enhance Recombinant Antibody Production.** *Biotechnology and Bioengineering.* 2011. DOI 10.1002/bit.23269

Shapiro, A.L.; Scharff, M.D.; Maizel, J.V. e Uhr, J.W. **Synthesis of excess light chains of gamma globulin by rabbit lymph node cells.** *Nature.* 1996. 211:243.

Shi, M.; Xie, Z.; Yu, M.; Shen, B. e Guo, M. **Controlled growth of Chinese hamster ovary cells and high expression of antibody-IL-2 fusion proteins by temperature manipulation.** *Biotechnology Letters.* 2005; 27(23-24): 1879-84.

Silva, H.M. **Caracterização da atividade ligante e da função efetora de Anticorpos humanizados anti-CD3 humano.** Departamento de Biologia Celular. Universidade de Brasília. Dissertação de Mestrado. 2008.

Silva, H.M.; Vieira, P.M.M.M.; Costa, P.L.N.; Pimentel, B.M.S.; Moro, A.M.; Kalil, J.; Maranhão, A.Q.; Coelho, V. e Brigido, M.M. **Novel humanized anti-CD3 antibodies induce a predominantly immunoregulatory profile in human peripheral blood mononuclear cells.** *Immunology Letters.* 2009. 125:129-36.

Singer, V. L.; Wobbe, C. R. e Struhl, K. **A wide variety of DNA sequences can functionally replace a yeast TATA element for transcriptional activation.** *Genes and Development.* 1990; 4: 636-45.

Sleckman, B. P.; Gorman, J. R. e Alt, F. W. **Accessibility control of antigen-receptor variable-region gene assembly: role of *cis*-acting elements.** *Annual Reviews of Immunology*. 1996; 14: 459-81.

Spector, D. L.; Goldman, R. D. e Leinwand, L. A. **Cells: a Laboratory Manual.** 1998. 1st Edition, Cold Spring Harbor, N.Y., USA, CSHL Press, p 1.1 – 2.13.

Spingola, M.; Grate, L.; Haussler, D. e Ares, M.A. **Genome-wide bioinformatic and molecular analysis of introns in *Saccharomyces cerevisiae*.** *RNA*. 1999; 5: 221-34.

Stinski, M. F. **Cytomegalovirus promoter for expression in mammalian cells, em “Gene Expression Systems: Using Nature of the Art of Expression”.** 1999. Academic Press.

Sung, Y. H. e Lee, G. M. **Enhanced human thrombopoietin production by sodium butyrate addition to serum-free suspension culture of bcl-2-overexpressing CHO cells.** *Biotechnology Progress*. 2005; 21(1): 50-7.

Walsh, G. **Biopharmaceutical benchmarks 2006.** *Nature Biotechnology*. 2006; 24(7): 769-776.

Weis, L. e Reinberg, D. **Accurate positioning of RNA polymerase II on a natural TATA-less promoter is independent of TATA-binding-protein-associated factors and initiator-binding-proteins.** *Molecular Cell Biology*. 1997; 17: 2973-84.

Wurm, F.M. **Production of recombinant protein therapeutic in cultivated mammalian cells.** *Nature Biotechnology*. 2004; 22(11): 1393-8.

Xia, W.; Bringmann, P.; McClary, J.; Jones, P.P.; Manzana, W.; Zhu, Y.; Wang, S.; Liu, Y.; Harvey, S.; Madlansacay, M.R.; McLean, K.; Rosser, M.P.; MacRobbie, J.; Olsen, C.L. e Cobb, R.R. **High levels of protein expression using different mammalian CMV promoters in several cell lines.** *Protein Expression and Purification*. 2006; 45(1): 115-24.

Xu, Z.L.; Mizuguchi, H.; Watabe, A.I.; Uchida, E.; Mayumi, T. e Hayakawa, T. **Optimization of transcriptional regulatory elements for constructing plasmid vectors.** *Gene*. 2001; 272: 149-56.

Xu, P e Robinson, A.S. **Decrease secretion and unfolded protein response up-regulation are correlated with intracellular retention for single-chain antibody variants produced in yeast.** *Biotech bioeng*. 2010; 104(1):

Zhang, K e Jaufman, R.J. **Protein folding in the endoplasmatic reticulum and the unfolded protein response.** *Hand exp Pharmacol*. 2006; 172: 69-91.

Zhou, T. e Chiang, C. M. **The intronless and TATA-less human *TAF_{II}55* gene contains a functional iniciator and a downstream promoter element.** *Journal of Biological Chemistry*. 2001; 276: 25503-11.

ANEXO

**Pedido de patente submetido ao INPI em
02/07/2008, aprovado em 09/03/2010**

(21) **PI0803141-0 A2**

(22) Data de Depósito: 02/07/2008
(43) Data da Publicação: 09/03/2010
(RPI 2044)

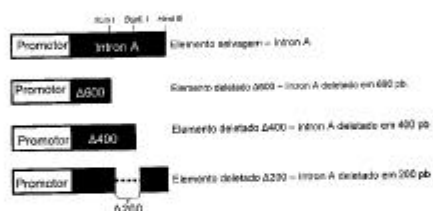
(51) *Int.Cl.*:
C12N 15/86 (2010.01)
A61K 38/16 (2010.01)

(54) Título: **VETORES DE EXPRESSÃO DE GENES HETERÓLOGOS EM CÉLULAS DE MAMÍFEROS**

(73) Titular(es): Fundação Universidade de Brasília

(72) Inventor(es): Andrea Queiroz Maranhão, Luana Salgado Quilici, Marcelo de Macedo Brigido

(57) Resumo: VETORES DE EXPRESSÃO DE GENES HETERÓLOGOS EM CÉLULAS DE MAMÍFEROS. A presente invenção se refere a vetores para clonagem de genes de diversas proteínas heterólogas e expressão em células de mamífero e de seu processo de obtenção. Estes vetores são constituídos basicamente de fragmentos do intron A do gene imediatamente precoce do citomegalovírus, resultantes de deleções diferenciadas do intron A inteiro, associado ao promotor do mesmo gene de citomegalovírus e ao seu intensificador. As deleções são diversificadas quanto ao número de pares de bases, variando de 100 a 780 pb, resultando em vetores estruturalmente menores, visando solucionar os problemas relacionados com baixos níveis de produção de proteínas heterólogas de interesse em células de mamíferos, principalmente a de linhagens HepG2, COS-7, HEK-293, CHO-K1 e BHK. As proteínas heterólogas produzidas por esta via são principalmente utilizadas como constituintes de formulações medicamentosas para o tratamento de diversas doenças e na formulação de meios de cultura para o cultivo de células de mamíferos, incluindo células-tronco.





"VETORES DE EXPRESSÃO DE GENES HETERÓLOGOS EM CÉLULAS DE MAMÍFEROS"

Campo da Invenção:

A presente invenção se refere a vetores para clonagem de genes de
5 diversas proteínas heterólogas e sua expressão em células de mamífero. Estes
vetores são constituídos basicamente de fragmentos do intron A do gene
imediatamente precoce do citomegalovírus, resultantes de deleções
diferenciadas do intron A inteiro ou selvagem, associado ao promotor do
mesmo gene de citomegalovírus (CMV) e ao seu *enhancer* (intensificador). As
10 deleções são diversificadas quanto ao número de pares de bases (pb),
variando de 100 a 760 pb, preferencialmente as de 545 a 750 pb e as de 150 a
270 pb. Este é o caso do vetor denominado pMACIA Δ 200, obtido pela deleção
do intron A de CMV em uma região de aproximadamente 200 pb. Estas
15 modificações no intron A original promovem um aumento na produção das
proteínas expressas. Outro aspecto da invenção está relacionado ao processo
de obtenção desses vetores e diversidade de aplicações das proteínas
produzidas por esta via de engenharia de vetores.

Devido ao aumento da produção de proteínas em culturas de células
transfectadas com os vetores da presente invenção, principalmente o
20 pMACIA Δ 200, são interessantes para setores da indústria que produzem
proteínas heterólogas em larga escala destinadas ao uso humano ou animal,
por meio do cultivo de células de mamífero, como as indústrias farmacêuticas.
Alguns produtos que podem ser obtidos com a utilização deste vetor são
anticorpos recombinantes, enzimas, hormônios peptídicos, citocinas e fatores
25 de coagulação plasmática, dentre outros.

Alguns exemplos de utilização dessas proteínas destacam-se o
emprego como constituintes de formulações medicamentosas e de meio de
cultura para o cultivo de células de mamíferos. Diante dessa variedade de
produtos obtidos pelo uso do presente invento, outros alvos de interesse
30 seriam as empresas que produzem kits de diagnósticos, as de medicamentos e
indústrias químicas.

Estado da Técnica:

A produção de proteínas heterólogas em células de mamífero é fundamental para o desenvolvimento de diversos produtos para uso humano ou veterinário, como vacinas, kits de diagnóstico, anticorpos recombinantes, enzimas e outras proteínas com fins terapêuticos e comerciais. Entretanto, sabe-se que os níveis de produção destes produtos nestas células não são muito altos, havendo a necessidade de modificações nas condições de expressão para que haja um aumento do produto recombinante final. Assim, além de mudanças nas condições do cultivo celular como temperatura de incubação ou a adição de compostos nos meios de cultura, a engenharia de vetores para a expressão heteróloga em células de mamífero é uma importante ferramenta para que haja uma melhora nos níveis de produção de proteínas com interesse biofarmacológico e industrial.

Um vetor é um fragmento de DNA manipulado e modificado utilizando-se a tecnologia do DNA recombinante (TDR). Quando ele se presta à expressão em células de mamíferos deve conter os seguintes elementos fundamentais para a produção da proteína de interesse: i) um promotor, que é uma região não-transcrita do plasmídeo onde se organizará o complexo de iniciação da transcrição, composto pela RNA polimerase II e seus fatores acessórios; ii) uma região denominada Múltiplos Sítios de Clonagens (MSC), composta por uma série de sítios para enzimas de restrição próprias para a clonagem da proteína de interesse; iii) um sinal de poliadenilação, que é uma seqüência que permitirá a adição de uma série de resíduos de adenina na região 3' do RNA mensageiro (mRNA) correspondente à proteína de interesse, fazendo com que este fique estável na célula hospedeira, sendo também um sinal terminador da transcrição; e finalmente: iv) uma origem de replicação e uma marca de seleção para *Escherichia coli*, para facilitar a propagação do plasmídeo (vetor) e a obtenção de grande quantidade do DNA plasmidial, fundamental para a manipulação e a posterior inserção em células de mamíferos. Estes vetores podem ainda possuir um gene de resistência a alguma marca de seleção que permita a produção e o isolamento de clones estáveis em células de mamífero (KUCHERLAPATI, R.; SKOULTCHI, A. I.,

Introduction of purified genes into mammalian cells, *CRC Crit Rev Biochem.* 16(4): 349-379, 1984). Assim, diversos vetores comerciais para expressão em células de mamífero foram desenvolvidos, tendo como arcabouço os componentes básicos acima descritos necessários para a produção de proteínas recombinantes. Entretanto, apesar de toda a tecnologia e de todas as inovações nesta área, a produção de proteínas recombinantes com fins terapêuticos, farmacológicos e comerciais ainda é um processo caro e laborioso.

O aumento da quantidade de produção de proteínas de interesse tem sido alvo de pesquisas acadêmicas e industriais nos últimos anos, indicado pelo aumento de publicações de artigos científicos em periódicos específicos e do aumento de depósito de patentes sobre o tema.

A busca do melhoramento dos níveis de expressão de proteínas recombinantes em diversas linhagens de células de mamífero de maneira eficiente, reprodutível e de menor custo foi o objetivo da presente invenção. Ela está relacionada à construção de novos vetores para expressão heteróloga contendo o promotor do Citomegalovírus (CMV) com o intron A modificado por sucessivas deleções, constituindo sítios para a clonagem da proteína de interesse. Dentre estas construções, algumas foram testadas com o gene repórter da luciferase em diversas linhagens celulares (construções formadas por deleção de 200, 400 e 600 pb), apresentando um aumento significativo da atividade da enzima em todas as células analisadas, principalmente as de 200 e 600 pb deletadas. Em seguida foram transferidas para o vetor pMAC dando origem aos vetores da presente invenção, formados por deleções do intron A de 100 a 760 pb, como os representados por pMACIA Δ 200, pMACIA Δ 400 e pMACIA Δ 600, os quais estão sendo testados para a produção de proteínas heterólogas, fatores plasmáticos recombinantes e anticorpos de interesse em células de mamíferos, tais como CHO-K1, HepG2, COS-7, BHK e HEK-293.

O promotor do CMV é amplamente utilizado nos vetores de expressão heteróloga em células de mamífero por ser ubíquo e muito forte. Ele possui regiões regulatórias, como um intensificador (*enhancer*) na posição a

montante do promotor e o intron A, um dos três introns que codificam os genes Imediatamente Precoces de CMV (IE).

Alguns pedidos de patentes descrevem modificações no promotor e *enhancer* do CMV, tanto murino quanto humano, visando uma melhora na expressão gênica em células de mamífero (PI0408246-0, CA2516157 e 5 US2007098690).

O intron A inteiro pode ser encontrado em vetores comerciais, como o pCMVLacI (Stratagene), ou ainda em construções de vetores para expressão heteróloga, as quais já foram patenteadas (US20060263882). Algumas versões 10 deletadas do intron A, mas que detiveram a capacidade de aperfeiçoar a expressão gênica também foi objeto de patente (US9977066). O diferencial do invento aqui apresentado é que regiões diferentes foram deletadas e aumentos de expressão da ordem de 600 a 6000 vezes quando comparados ao CMV sem intron foram encontradas dependendo do tipo celular estudado.

O intron A selvagem de CMV já foi descrito como potencializador da 15 expressão gênica em diversos sistemas de expressão heteróloga (XIA, W. *et al.*, High levels of protein expression using different mammalian promoters in several cell lines, *Protein Expression and Purification*, 45(1): 115-124, 2006; CHAPMAN, B. S. *et al.*, Effect of Intron A from human cytomegalovirus (Towne) immediate-early gene of heterologous expression in mammalian cells, *Nucleic Acid Research*, 19(14): 3979-3986, 1991). 20

Algumas deleções que também modificaram a sequência original do intron A foram feitas com essa finalidade como é o caso da patente americana US9977066 discutida anteriormente, e da patente japonesa JP2007506443-A. 25 Com relação a patente japonesa, a principal diferença com a presente invenção está ligada a uma deleção em região diferente do intron A (apesar de parcialmente sobreposta) e em uma quantidade menor de pares de bases do que a apresentada na presente invenção (< 50 pb).

Uma maior deleção no intron A resulta em uma estrutura menor do 30 vetor construído, tornando este plasmídeo mais fácil de ser transformado em bactérias e transfectado em células de mamífero. Este fato constitui em uma das principais vantagens tecnológicas da presente invenção com relação a

construções gênicas com a finalidade de aumentar a expressão de genes heterólogos em células de mamíferos.

Os critérios de deleção de pares de bases constituintes do intron A original adotados na presente invenção são fundamentadas em modificações neste intron que ainda permita que o novo elemento funcione como um ativador da expressão gênica, sendo possível a obtenção de um elemento menor, mas com funcionamento melhor. Resumidamente, estes critérios são manter ou melhorar os níveis de produção de RNA mensageiro do transgene, bem como aumentar a atividade biológica mensurável do produto recombinante. Para tanto, assegura-se ainda a ligação do aparato transcricional e o correto processamento (*splicing*) do mRNA do transgene. Além disso, buscou-se aumentar a estabilidade desses mRNAs, aumentando a sua meia-vida na célula, o que o disponibiliza para ser utilizado pelo aparato de tradução e, portanto, para produzir a proteína de interesse. No caso, a presente invenção teve esses critérios testados utilizando como repórter o gene da enzima luciferase que teve os níveis e a estabilidade do seu mRNA medidos e aumentados quando comparados à construção sem deleção do intron A. Esse efeito foi suficiente para aumentar a atividade biológica da enzima que também foi comparativamente maior que a observada por vetores contendo o Intron A intacto.

Ressaltando que em todas as patentes citadas, as deleções propostas são diferentes em local e tamanho com relação à estrutura original (completa ou selvagem) do intron A das apresentadas na presente invenção, sobretudo com relação ao vetor pMACIAΔ200. Assim, a presente invenção inova com relação ao conjunto e ao número de pares de bases deletadas no intron A para a construção dos vetores plasmidiais para aumentar a quantidade de expressão de proteínas heterólogas de interesse e pelas derivações desses vetores que também apresentam essa característica. Este é o caso das construções gênicas obtidas pela deleção no intron A de uma região de 100 a 760 pb, representadas por deleções de 200 pb e outra de 600pb, que juntamente com o promotor e *enhancer* de CMV, constituem os vetores de expressão heteróloga pMACIAΔ200 e pMACIAΔ600. Também foi construído e

analisado o vetor pMACIA Δ 400, obtido pela deleção no intron A de uma região de 400 pb.

Conforme mencionado anteriormente, o maior problema com relação à expressão de proteínas de interesse comercial em células de mamífero é o baixo nível de produção, o que acarreta em um alto custo para a produção e viabilização dos produtos. Com isso, este invento busca a melhora significativa dos níveis de expressão de diversas proteínas heterólogas secretadas em células de mamífero. Assim, com mais proteína sendo produzida, a purificação não se torna mais uma etapa limitante e conseqüentemente, o custo e a viabilidade da produção são otimizados.

A presente invenção prevê construções de vetores que levam a um aumento de expressão de proteínas heterólogas a partir do uso de fragmentos do intron A original com deleções de pares de bases em uma faixa variando de 100 a 760 pb, preferencialmente as de 545 a 750 pb e de 150 a 270 pb. Outras derivações são previstas, tais como as derivações e uso de outros elementos como a introdução de seqüências codificadoras do peptídeo sinal e múltiplos sítios de clonagem.

O desenvolvimento dos vetores da presente invenção visa suprir a necessidade crescente da indústria e de laboratórios de pesquisa na obtenção de maiores níveis de produção de proteínas heterólogas em células de mamífero. Além disso, outras vantagens associadas ao uso desses vetores, principalmente para o vetor pMACIA Δ 200 são listadas a seguir:

- melhoria na manipulação dos vetores de expressão na produção de proteínas heterólogas, pois as estruturas menores desses vetores facilitam a sua entrada nas células de mamíferos e também a sua amplificação em sistemas bacterianos;

- possibilidade de o vetor ser usado para clonar genes que codificam para inúmeras proteínas heterólogas com interesse comercial, farmacológico, biotecnológico e industrial. Assim, podem ser clonados genes de proteínas para kits de diagnóstico, biofármacos, proteínas terapêuticas, anticorpos recombinantes, dentre outros;

7/23

- variedade de proteínas heterólogas obtidas em maior escala (otimização da produção) a partir da sua expressão em células de mamíferos, já estabelecidas pela técnica;

- potencial biotecnológico, já que sua implementação não necessita de um grande investimento para que seja comercializado.

Descrição do invento:

O intron A selvagem de CMV é de conhecimento da técnica e funciona como potencializador da expressão gênica em diversos sistemas de expressão heteróloga. Os vetores plasmidiais propostos na presente invenção são constituídos de fragmentos do intron A do gene imediatamente precoce do citomegalovírus, resultantes de deleções diferenciadas do intron A inteiro, associado ao promotor do mesmo gene de citomegalovírus (CMV) e ao seu *enhancer* (intensificador). As deleções no intron A de CMV, principalmente em intervalos variando de 100 a 760 pb, preferencialmente a de 545 a 750 pb e de 150 a 270 pb foram usadas no desenvolvimento dos vetores para expressão de proteínas heterólogas com fins biotecnológicos em diversas linhagens de células de mamífero, tais como as CHO-K1, HepG2, COS-7, BHK e HEK-293. Estes vetores são constituídos de promotor/intensificador de CMV humano, sinal de poliadenilação do vírus SV40, marca seletiva para ampicilina, origem de replicação *colE1*. No caso do vetor pMACIA Δ 200, ele contém o promotor do CMV com o intron A deletado em aproximadamente 200 (pb), e no pMACIA Δ 600 deletado em cerca de 600pb, conforme ilustrado na **Figura 1**. Nesta Figura também é descrito a construção gênica de pMACIA Δ 400, com deleções referente a aproximadamente 400 pb.

Estes vetores apresentam atividade de aumentar a expressão de proteínas heterólogas de diferentes tipos. Os promotores de CMV com intron A inteiro, deletado em 200 e 600 pb foram clonados no vetor pMAC, dando origem aos plasmídios pMACIA, pMACIA Δ 200, pMACIA Δ 600 e, ainda ao pMACIA Δ 400, com menor eficiência para um determinado tipo de proteína heteróloga. O vetor plasmidial pMACIA é representado esquematicamente pelas **Figuras 2 e 3**, respectivamente, em sua forma de plasmídeo e sequenciamento com as marcações para as deleções na construção dos

vetores pMACIAΔ200, pMACIAΔ400 e pMACIAΔ600, melhor detalhadas no **Exemplo 1**. O vetor pMACIA contendo o intron A inteiro foi usado como uma referência na avaliação da eficiência no processo de transcrição e produção de proteínas heterólogas por culturas de células de mamíferos modificadas pelos vetores da presente invenção, tratadas nos **Exemplos 2 e 3**.

O pMACIAΔ200 é representado pela seqüência Seq. ID N^o 1, conforme descrito na Listagem de Seqüências em anexo. Os demais vetores também estão listados na **Tabela 1**, juntamente com os códigos de sequenciamento utilizados nesta Listagem. As deleções do intron A são promovidas pela ação de enzimas de restrição específicas, tais como *Xcm* I, *BspE* I e *Hind* III. O controle da posição e o tamanho a ser deletado é em geral aproximado e satisfatório. Por exemplo, o vetor pMACIA, contendo o intron A inteiro, apresenta 237 pb a mais que o pMACIAΔ200 (deleções programadas de 200 pb). Por sua vez, o pMACIAΔ400 e o pMACIAΔ600 apresentaram uma diferença de 433 pb e 668 pb, respectivamente, com relação ao pMACIA.

TABELA 1

Vetor plasmidial	Código de seqüência
pMACIAΔ200	Seq.ID N ^o 1
pMACIAΔ400	Seq.ID N ^o 2
pMACIAΔ600	Seq.ID N ^o 3

A eficiência na expressão de proteínas heterólogas dirigida pelos promotores e diferentes versões do intron A contidos nesses vetores plasmidiais foi testada pela atividade da luciferase (proteína heteróloga teste), nas linhagens de células de mamíferos CHO-K1, HepG2, HEK-293 e COS-7. Esta enzima foi escolhida por apresentar atividade de fácil mensuração e boa correspondência de sua atividade com os níveis de mRNA após a confirmação do incremento da atividade transcricional. Embora possam ser usados com sucesso na produção de uma variedade de proteínas heterólogas, tais como anticorpos humanizados para uso em rejeição a transplante, tratamento de diabetes autoimune, prevenção de recidiva de hepatite em pacientes

imunossuprimidos pós-transplante, para o tratamento de doenças auto-imunes, etc. Além desses anticorpos estes vetores plasmidiais também são utilizados para expressar fatores plasmáticos da coagulação sanguínea, como o Fator VIII (para tratamentos de pacientes com hemofilia A) e o Fator IX (para
5 tratamento de pacientes com Hemofilia B). Essas proteínas heterólogas assim obtidas podem ser utilizadas como constituintes de formulações medicamentosas. Assim como o caso das citocinas recombinantes, que são passíveis de utilização para tratamento de doenças do sistema imune, ou ainda em laboratório para o cultivo de células de mamíferos, incluindo células-tronco.

10 A invenção poderá ser melhor compreendida por meio da seguinte descrição detalhada mediante os Exemplos de 1 a 3 para a obtenção dos vetores e os resultados experimentais que comprovam o aumento da expressão de uma proteína heteróloga, a luciferase (proteína-modelo), incluindo avaliação da atividade transcricional por experimentos de PCR em
15 tempo Real. Os resultados foram apresentados nos gráficos das **Figuras 4 e 5**, descritas abaixo, referentes a atividade de luciferase quando os elementos deletados dirigem a transcrição do gene dessa enzima (**Figura 4**). O detalhamento dos procedimentos experimentais para os ensaios de atividade da luciferase foram descritos no final desse relatório descritivo. Os resultados
20 foram comparados com os de vetores obtidos sem nenhuma deleção do intron A (elemento preservado ou inteiro), inclusive por experimentos de PCR em tempo Real (**Figura 5**).

A **Figura 1** se refere a uma representação esquemática das
25 construções envolvendo o promotor/intensificador do Citomegalovírus humano e o Intron A inteiro e as deleções que originaram os elementos $\Delta 600$, $\Delta 400$ e $\Delta 200$. O retângulo branco representa o promotor/intensificador do promotor pCMV e o retângulo preto o elemento Intron A inteiro ou deletado. As deleções foram obtidas a partir da digestão do DNA selvagem com as enzimas de restrição: *Xcm* I e *Hind* III – para o elemento $\Delta 600$; *BspE* I e *Hind* III para o
30 elemento $\Delta 400$; e *Xcm* I e *BspE* I para o elemento $\Delta 200$, utilizados na expressão de proteínas heterólogas em células de mamífero.

A **Figura 2** se refere a uma representação esquemática do vetor plasmidial pMACIA, contendo o intron A selvagem ou inteiro com 5446 pb, dado como base (vetor parental) para a construção dos vetores da presente invenção, os quais contêm fragmentos do intron A (formados por deleções do

5 inteiro).

A **Figura 3** se refere a um esquema ilustrativo da sequência do vetor plasmidial pMACIA, indicando as regiões de deleção de pares de base ocorridas na construção dos vetores pMACIA Δ 200, pMACIA Δ 400 e pMACIA Δ 600. A região em destaque entre 4286 e 4522 corresponde a região

10 deletada no vetor pMACIA Δ 200.

A **Figura 4** se refere ao efeito das deleções do intron A na atividade da luciferase em diferentes tipos de células de mamíferos: **A)** CHO-K1; **B)** HepG2; **C)** COS-7 e **D)** HEK-293. As construções são referentes aos plasmídios com o gene repórter da luciferase de vaga-lume e promotor de CMV

15 com intron A: inteiro ou sem deleções (**Intron A**); deletado em 200 pb (**Δ 200**); deletado em 400 pb (**Δ 400**) e deletado em 600 pb (**Δ 600**). As atividades da luciferase foram medidas em períodos de 24 e 48 horas pós-transfecção nas quatro linhagens de células de mamíferos.

A **Figura 5** se refere à medida dos níveis de Transcrito por qPCR

20 utilizando o normalizador luciferase de *Renilla*. Células de CHO-K1 transfectadas por meio de lipídios catiônicos (Kit Lipofectamine 2000) com os plasmídios contendo os diferentes elementos promotores: com apenas o promotor/intensificador de CMV (**Sem intron**); com o Intron A selvagem (**IntronA**); com o intron A deletado em cerca de 200 pb (**Δ 200**); com o intron A

25 deletado em cerca de 400 pb (**Δ 400**) e com o Intron A deletado em cerca de 600pb (**Δ 600**). Estas construções foram lisadas 24 e 48 horas após a transfecção nas células para a preparação de RNA total (método do TRIzol – Invitrogen). Em seguida o cDNA foi sintetizado utilizando-se o kit SuperScriptIII (Invitrogen). Essa preparação serviu de molde para a realização da PCR em

30 Tempo Real (qPCR) que possibilita a quantificação do transcrito. Cada ponto foi medido em triplicata e as barras representam uma média da medida. O desvio-padrão está mostrado para cada ponto experimental.

11/23

Dentre as construções testadas (contendo deleções do intron A em aproximadamente 200, 400 e 600 pb), quando comparadas àquela com Intron A selvagem, a construção que contém o Intron A com a deleção de 200 pb ($\Delta 200$) foi aquela que apresentou tanto maior atividade de luciferase quanto maiores níveis de transcrito. A construção que contém o Intron A com uma deleção de 400 pb ($\Delta 400$) diminuiu a atividade da luciferase e a quantidade de transcrito. A construção $\Delta 600$ que contém o Intron A com uma deleção de 600 pb, apresentou valores de atividade da luciferase e de quantidade de transcrito similares aos da construção selvagem, com a vantagem de ser um elemento de menor tamanho e de manipulação gênica mais fácil. Tendo em vista os bons resultados obtidos com esses promotores inovadores nas construções-testes (com o gene repórter da luciferase), os elementos foram transferidos para um vetor específico para expressão em células de mamífero contendo o elemento deletado de 200 pb, originando o vetor pMACIA $\Delta 200$, ou o elemento deletado de 600 pb, originando o vetor pMACIA $\Delta 600$. Estes vetores são propícios para a clonagem de diversas proteínas heterólogas de interesse, seguindo a finalidade que se propõe a presente invenção.

Exemplo 1:

Este exemplo se refere à obtenção dos vetores propostos na presente invenção relacionados a deleções diferenciadas no intron A de CMV principalmente em intervalos variando de 100 a 760 pb. Estes vetores não contêm qualquer gene completo do intron A de CMV.

Para nortear as construções de genes que propiciam a expressão de proteínas heterólogas de interesse, os resultados das deleções foram testados na atividade da luciferase. Inicialmente os elementos foram testados nos vetores comerciais da série pGL, mais especificamente o pGL4.14 (Promega). Estes vetores são comercializados sem região promotora, e nesse exemplo clonamos a montante ao gene da enzima Luciferase as diferentes construções do promotor de CMV contendo as variações do intron A: intron A inteiro (denominado pGLCMV), intron A deletado em 200 pb (pGLCMV $\Delta 200$), intron A deletado em 400 pb (pGLCMV $\Delta 400$) e intron A deletado em 600 pb (pGLCMV $\Delta 600$). Em linhas gerais os procedimentos adotados para a obtenção

desses vetores é de conhecimento da técnica, tendo sido utilizadas enzimas de restrição e procedimento padrão da Tecnologia do DNA Recombinante.

Após o teste nos vetores derivados do pGL4.14 as construções variantes do promotor/Intron A foram transferidas para o vetor pMAC (RUGGIERO, L. A. Clonagem de Anticorpos Recombinantes e Expressão Em Cultura de Células de Ovário Hamister Chinês (CHO). *Dissertação de Mestrado* - Universidade de Brasília, 2002), substituindo a região promotora deste. Dessa forma, obteve-se os vetores pMACIA (esquematizado nas Figuras 2 e 3), pMACIA Δ 200, pMACIA Δ 400 e pMACIA Δ 600, representados respectivamente por Seq.ID N^o 1 a 3.

De forma resumida, os vetores de expressão gênica da presente invenção são constituídos de fragmentos do intron A do gene imediatamente precoce do citomegalovírus, resultantes das deleções, associado ao promotor do mesmo gene de citomegalovírus (CMV), conforme ilustrado na **Figura 1**. Nesta figura, os vetores pMACIA (Intron A inteiro), pMACIA Δ 200 (IntronA deletado de 200 pb), pMACIA Δ 400 (Intron A deletado de 400 pb) e pMACIA Δ 600 (Intron A deletado de 600 pb) podem ser utilizados para a expressão de proteínas heterólogas em células de mamífero. A região progressivamente deletada nos vetores Δ 200, Δ 400 e Δ 600 é mostrada em retângulo pontilhado, o Intron A inteiro ou remanescente é mostrado em preto e o promotor/intensificador de CMV é mostrado no retângulo branco. As deleções em 600 pb foram obtidas pela digestão com enzimas de restrição *Xcm I* e *Hind III*. As deleções em 400 pb foram obtidas pela digestão com enzimas de restrição *BspE I* e *Hind III*, enquanto que para as deleções de 200 pb, foram usadas *Xcm I* e *BspE I*.

As regiões de deleção no intron A inteiro em sequências de nucleotídeos são mostradas na **Figura 3**. Nesta figura são destacados as citosinas 4286, 4521 e 4522 e a adenina 4953 representando os limites excluídos nas estruturas dos vetores pMACIA Δ 200 (de 4286 a 4522), pMACIA Δ 400 (de 4521 a 4953) e pMACIA Δ 600 (de 4286 a 4943), representados respectivamente por Seq.ID N^o 1 a 3. A discriminação das regiões deletadas desses vetores plasmidiais em relação ao vetor parental

pMACIA está mostrada na **Tabela 2**. O vetor pMACIA inteiro possui 5446 pb e os novos vetores formados se diferem pela exclusão da região deletada em 237, 433 e 668 pb, respectivamente para Seq.ID Nº 1 a 3.

Com base no esquema do plasmídeo pMACIA apresentado na **Figura 2**, pode ser visualizadas partes integrantes do mesmo e presentes nos vetores construídos (Seq.ID Nº 1 a 3). O pMACIA é obtido de vetores comerciais contendo parte do genoma de citomegalovírus humano, com a função de dirigir a transcrição. As regiões destacadas em preto, está representado o promotor de CMV. Em cinza, o intron A completo, sem modificações. O vetor pMACIAΔ200 foi construído deletando-se a região entre os sítios de restrição Xcm I e BspE I, destacados na figura. O vetor pMACIAΔ400 foi construído por meio da eliminação da região entre os sítios de BspE I e Hind III, também mostrados na figura. Por fim, o vetor pMACIAΔ600 foi construído com a deleção da região entre os sítios de Xcm I e Hind III, mostrados na figura.

O intensificador (*enhancer*) do gene de citomegalovírus ou um fragmento intensificador da expressão funcional do mesmo também são constituintes dos vetores de interesse.

Nos vetores da presente invenção são clonados genes que codificam inúmeras proteínas heterólogas com interesse comercial, farmacológico, biotecnológico e industrial. Dessa forma estes vetores podem ser utilizados no processo de produção de diferentes tipos de proteínas, principalmente em larga escala. Dentre as proteínas heterólogas de interesse, já se encontra em fase de teste alguns anticorpos que são utilizados como biofármacos em diferentes tratamentos (câncer, rejeição a transplantes, doenças auto-imunes, etc.) e fatores plasmáticos recombinantes (utilizados em terapias de reposição para hemofílicos). Além disso, esses vetores podem ser utilizados para a produção de hormônios protéicos, enzimas, citocinas e outras proteínas de interesse farmacológico ou mesmo empregadas como constituintes de formulações de meio de cultura para células de mamíferos, incluindo células-tronco.

14/23

TABELA 2

Vetor plasmidial (cód. Seq)	Região deletada em relação ao pMACIA	Sequência da região deletada em relação ao pMACIA (região ausente nos vetores propostos)
pMACIAΔ200 (Seq.ID Nº 1)	4286 a 4522	CTATTGGTGACGATACTTTCCATTACTAATCCATAA CATGGCTCTTTGCCACAACATATCTCTATTGGCTTAT GCCAATACTCTGTCCCTCAGAGACTGACACGGACT CTGTATTTTTACAGGATGGGGTCCCATTATATTT ACAAATTCACATATACAACAACGCCGTCCTCCCGTGC CCGCAGTTTTTATAAACATAGCGTGGGATCTCCAC GCGAATCTCGGGTACGTGTTCC
pMACIAΔ400 (Seq.ID Nº 2)	4521 a 4953	CCGGACATGGGCTCTTCCCGGTAGCGGGGAG CTTCCACATCCGAGCCCTGGTCCCATGCCTCCAG CGGCTCATGGTCGCTCGGCAGCTCCTTGCTCCTA ACAGTGGAGGCCAGACTTAGGCACAGCACAATGCC CACCACCACAGTGTGCCGCAACAAGCCGTGGCG GTAGGGTATGTGTCTGAAAATGAGCTCGGAGATTG GGCTCGCACCGTGACCGAGATGGAAGACTTAAGGC AGCGGCAGAAGAAGATGCAGGCAGCTGAGTTGTTG TATTCTGATAAGAGTCAAGGTAACCTCCGTTGCGG TGCTGTTAACGGTGGAGGGCAGTGTAGTCTGAGCA GTAATCGTTGCTGCCGCGCGCCACCAGACATAAT AGCTGACAGACTAACAGACTGTTCTTTCCATGGGTG TTTTCTGCAGTCAA
pMACIAΔ600 (Seq.ID Nº 3)	4286 a 4953	CTATTGGTGACGATACTTTCCATTACTAATCCATAA CATGGCTCTTTGCCACAACATATCTCTATTGGCTTAT GCCAATACTCTGTCCCTCAGAGACTGACACGGACT CTGTATTTTTACAGGATGGGGTCCCATTATATTT ACAAATTCACATATACAACAACGCCGTCCTCCCGTGC CCGCAGTTTTTATAAACATAGCGTGGGATCTCCAC GCGAATCTCGGGTACGTGTTCCGGACATGGGCTCT TCTCCGGTAGCGGGGAGCTTCCACATCCGAGCCC TGCTCCCATGCCTCCAGCGGCTCATGGTCCGCTCGG CAGCTCCTTGCTCCTAACAGTGGAGGCCAGACTTAG GCACAGCACAATGCCACCACCAGTGTGCCGCA CAAGCCGTGGCGGTAGGGTATGTGTCTGAAAATG AGCTCGGAGATTGGGCTCGCACCGTGACGCAGATG GAAGACTTAAGGCAGCGGCAGAAGAAGATGCAGGCA GCTGAGTTGTTGATTCTGATAAGAGTCAAGGTAAC TCCCGTTGCGGTGCTGTTAACGGTGGAGGGCAGTGT AGTCTGAGCAGTACTCGTTGCTGCCGCGCGCCAC CAGACATAATAGCTGACAGACTAACAGACTGTTCTTT CCATGGGCTTTTTCTGCAGTCAA

Exemplo 2:

Este exemplo se refere a avaliação da atividade da luciferase utilizando os elementos promotores-intensificador /intron A que constam nos vetores pMACIA (representado nas Figuras 2 e 3), pMACIA Δ 200, pMACIA Δ 400 e pMACIA Δ 600 (representados pelas seqüências Seq. ID Nº 1 a 3) com a finalidade de comprovar o aumento da expressão gênica de proteínas heterólogas conforme proposto na presente invenção. Estes novos promotores foram testados para análise de sua eficiência com o gene repórter da enzima luciferase. Para tanto células em cultura de diferentes linhagens celulares foram transfectadas pelo método de lipídeos catiónicos, kit Lipofectamina 2000 (Invitrogen). As linhagens de células utilizadas e algumas condições de cultivo foram:

- CHO-K1 (ATCC nºCCL-61): linhagem celular derivada de células epiteliais de ovário de hamster chinês (*Cricetulus griseus*). As células foram cultivadas em meio HAM-F12 (Hyclone) contendo soro fetal bovino (SFB) a uma concentração de 10% (v/v).

- COS-7 (ATCC nºCRL-1651): esta linhagem celular é proveniente de células fibroblastóides do rim do macaco verde africano (*Cercopithecus aethiops*). As células foram cultivadas em meio DMEM (GIBCO) contendo SFB a uma concentração de 10% (v/v).

- HepG2 (ATCC nºHB-8065): esta linhagem celular é derivada de um hepatocarcinoma celular humano. As células foram cultivadas em meio RPMI-1640 (GIBCO) contendo SFB a uma concentração de 10% (v/v).

- HEK-293 (ATCC nºCRL-1573): é uma linhagem derivada de células de rim embrionário humano que contém o genoma do adenovírus tipo 5. As células foram cultivadas em meio DMEM (GIBCO) contendo SFB a uma concentração de 10% (v/v).

Os resultados de atividade da luciferase depois de 24 horas pós-transfecção dos vetores construídos às células de mamíferos acima descritas estão mostrados na **Figura 4** (relativas às construções contém o promotor de CMV com o intron A inteiro (**Intron A**) e construções que contém o intron A com a deleção de 200 pb ($\Delta 200$), 400 pb ($\Delta 400$) e 600 pb ($\Delta 600$). Neste ensaio, verificou-se o aumento da atividade da enzima nas construções contendo o promotor com intron deletado, sendo que este aumento variou dependendo da linhagem de células testadas (**Figura 4**). Nos gráficos, observa-se que a construção com a deleção de 200 pb no promotor de CMV do vetor (Seq.ID N^o 1) contendo o gene repórter da luciferase teve a melhor atividade da enzima. Dentre as outras construções destaca-se ainda aquela onde 600 pb foram deletados ($\Delta 600$), um elemento promotor/Intron A mínimo, de tamanho reduzido (Seq.ID N^o 3) que, quando transfectada nas diferentes linhagens celulares, consegue manter os níveis da atividade enzimática em níveis compatíveis com a construção selvagem, isto é, contendo o Intron A inteiro.

Foi observado que os vetores construídos por fragmentos do intron A do promotor de CMV foram capazes de melhorar os níveis de expressão da enzima luciferase e de proteínas de interesse em diferentes tipos de células de mamífero, preferencialmente a representada pela Seq.ID N^o 1.

20 **Exemplo 3:**

Este exemplo se refere a avaliação dos níveis de transcrito do gene da luciferase quando expresso sob controle dos elementos promotores/intron A que constam nos vetores pMACIA (usado como controle), pMACIA $\Delta 200$, pMACIA $\Delta 400$ e pMACIA $\Delta 600$ (representados pelas seqüências Seq. ID N^o 1 a 3) com a finalidade de comprovar o aumento da expressão gênica conforme proposto na presente invenção. Estes promotores foram testados para análise de sua eficiência com o gene repórter da enzima luciferase. Os resultados foram mostrados na **Figura 5**. Neste ensaio, verificou-se o aumento dos níveis de transcrito nas construções contendo o promotor com intron deletado, em especial daquela deletada de 200 pb (Seq.ID N^o 1). Em alguns casos foram observados aumentos de expressão da proteína de interesse da ordem de 600 a 6000 vezes quando comparados ao CMV sem intron, como é o caso de

COS- 7 e Hek 293. Também foi evidenciada em termos de atividade na produção de proteína heteróloga a construção contendo o Intron A com uma deleção de cerca de 600 pb, um elemento promotor/Intron A mínimo (Seq.ID N^o 3), de tamanho reduzido mantém os níveis de transcritos em níveis compatíveis com a construção selvagem, isto é, contendo o Intron A inteiro.

As modificações no intron A do promotor de CMV propostas nos vetores da presente invenção foram capazes de melhorar os níveis de expressão do gene da enzima luciferase ou de pelo menos manter esses níveis em valores condizentes com aqueles esperados para a expressão de genes de proteínas de interesse em diferentes tipos de células de mamífero.

Estes resultados comprovam o aumento do nível de expressão de proteínas heterólogas em células de mamíferos e, conseqüentemente, o aumento da produção dessas proteínas no meio de cultura que são recuperadas posteriormente por métodos de separação conhecidos da técnica (isolamento da proteína a partir da célula hospedeira ou do sobrenadante da cultura dessas células). A eficiência na obtenção das proteínas de interesse através das modificações de células de mamíferos propiciadas pela introdução dos vetores da presente invenção, principalmente o pMACIA Δ 200 e pMACIA Δ 600, representados por Seq. ID N^o 1 e 3, respectivamente, depende de uma etapa de transfecção estável ou transiente para uma célula de mamífero hospedeira, dependendo também de outros fatores ligados ao cultivo de células de mamíferos. O meio de cultura deve ser rico em nutrientes, pela inclusão de aminoácidos, vitaminas, fatores de crescimento e outros aditivos conhecidos da técnica. Normalmente é empregado um diluente específico, correspondendo a um meio básico para a manutenção mínima da viabilidade celular, como por exemplo, o DMEM, RPMI-1640 disponibilizados pelo comércio, complementados com soro usado para promover a proliferação celular tais como o SFB, largamente empregado em meios de cultura, adicionados com outros aditivos tais como compostos anti-oxidantes, antibióticos, sais inorgânicos e soluções tampão para controlar o pH.

- Detalhamento dos procedimentos experimentais realizados nos Exemplos 2 e 3

Os ensaios foram realizados em um Luminômetro TD – 20/20, Turner Designs, com tempo de atraso de pré-leitura (*premeasurement delay*) de 5 segundos e tempo de leitura (*measurement*) de 30 segundos. Todos os ensaios foram feitos com triplicatas de cada amostra, em placas de transfecção de 24 poços, e cada ensaio foi repetido pelo menos três vezes.

Este kit permite a leitura simultânea da atividade de 2 luciferases distintas, a luciferase de vaga-lume (V) e a luciferase de *Renilla* (R). O valor da atividade apresentada pela primeira enzima é dividido pelo valor da atividade da segunda enzima, que funciona como um controle para minimizar diferenças na eficiência de transfecção. Assim, os dados apresentados nos gráficos indicam a razão entre a atividade de V/R.

Após a abertura do kit, o tampão Luciferase Assay Buffer (tampão de ensaio da luciferase) foi utilizado para ressuspender o Luciferase Assay Substrate, sendo que este reagente foi utilizado como substrato da luciferase de vaga-lume. A este reagente deu-se o nome de LAR II, e este foi aliquotado em tubos de 1,5mL e estocado a baixas temperaturas, - 80°C. O tampão Stop and Glo Buffer também foi aliquotado em tubos de 1,5mL e estocado a - 20°C. O substrato Stop and Glo Substrate 50X foi diluído no tampão para a concentração 1X somente na hora do uso, pois esse reagente é muito sensível à degradação. Esse reagente, após a diluição, foi utilizado como substrato para a luciferase de *Renilla*. Durante os ensaios, os substratos são mantidos no gelo.

A luciferase de vaga-lume encontra-se nos vetores em que foram clonados os novos elementos promotores a serem testados, derivados do pGL4.14 (vetor comercial da Promega). A luciferase de *Renilla* está no vetor comercial da Promega pGL4.73, que é co-transfectado com os vetores a serem testados a fim de se estabelecer uma relação entre as atividades, pela normalização dos resultados.

Os plasmídios contendo o gene repórter da luciferase de vaga-lume foram co-transfectados na proporção 10:1 com o plasmídio pGL.73, que

contém o gene repórter da luciferase de *Renilla*. Com isso, a atividade da luciferase de vaga-lume das construções testadas é normalizada de uma forma mais fácil, visto que a leitura da atividade das duas luciferases pode ser feita sequencialmente e também no mesmo tubo, utilizando o kit comercial Dual Luciferase Assay System (Promega).

5 Cada construção foi transfectada em triplicata, sendo que cada poço transfectado fornece uma leitura da atividade da luciferase de vaga-lume e de *Renilla*. Com isso, haverá três leituras para cada construção testada. Os valores obtidos na leitura da atividade da luciferase de vaga-lume são divididos
10 pelos valores obtidos na leitura da atividade da luciferase de *Renilla*, obtendo-se uma relação V/R. Dos três valores verificados para cada construção testada é feita uma média aritmética e o desvio-padrão para essa média. Os valores obtidos são plotados em um gráfico comparando a eficiência de cada construção. Cada experimento foi repetido como descrito acima pelo menos
15 três vezes. O programa utilizado para as análises estatísticas dos dados provenientes dos ensaios de atividade da luciferase foi o Minitab versão 14.0. Os valores foram avaliados por meio de testes de ANOVA.

Além da medida de atividade enzimática, a capacidade de aumentar a síntese de mRNAs também foi medida para esses novos elementos. A
20 técnica utilizada foi a de PCR em tempo real ou PCR quantitativo (qPCR). Estes experimentos visam verificar os níveis de expressão do mRNA de luciferase das construções transfectadas em CHO-K1 para avaliar se a quantidade dos transcritos corresponde à atividade da luciferase observada nos ensaios. Nesse sentido uma preparação total de RNA das células CHO-K1
25 transfectadas com as diferentes construções de pGL 4.14 contendo os elementos IntronA selvagem, IntronA Δ 200, IntronA Δ 400 e IntronA Δ 600, foi realizada 24 e 48 horas após a transfecção. A extração foi feita utilizando o reagente TRIzol (Invitrogen) seguindo instruções do fabricante. Em seguida foi realizada a síntese do DNA complementar utilizando os RNAs tratados com a
30 DNase RNase free foram utilizados como molde para a reação. O procedimento consistiu de síntese da fita de cDNA utilizando-se 2 μ g de RNA total tratado com DNase (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante.

O cDNA sintetizado era então utilizado para amplificação por qPCR. Para isso, a máquina cuja reação foi preparada foi a 7500 Fast Real-Time PCR System, da Applied Biosystems. O programa utilizado para a leitura da corrida foi o 7500 Fast System SDS Software, versão 1.3.1. Foi feita uma reação de qPCR
5 relativa, ou seja, o valor obtido correspondente aos níveis de mRNA da amostra será comparado relativamente ao valor dos níveis de mRNA de um controle. Neste caso, foi feita uma comparação entre os valores dos níveis de mRNA de luciferase de vagal-me (*target*) e de *Renilla* (*endogenous*). Foi feita também uma reação com GAPDH, para verificar se a amplificação das
10 amostras foi homogênea, mas os valores dos níveis de mRNA de GAPDH não foram utilizados para os cálculos.

Para o experimento de PCR, utilizou-se o kit *Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG (2X)*, da Invitrogen. Esse kit contém a enzima *Taq*, o corante SYBR Green, a mistura de dNTP, e a enzima UDP, que impede a
15 reamplificação de transcritos durante os ciclos da reação fornecida constituintes do kit. Este experimento foi realizado em placas específicas de 96 poços, delimitando reação padrão em placa previamente selada, conduzida dentro de fluxo laminar, contendo a seguinte proporção entre os reagentes (volumes adicionados): 5 μ L de SYBR Green Mix 2X; 0,2 μ L de Primer 1
20 (10 mM); 0,2 μ L de Primer 2 (10 mM); 2 μ L de cDNA (diluído 1:50); 2,6 μ L de H₂O MiliQ; apresentando um volume final de 10 μ L.

Após a pipetagem dessa mistura reacional foi ajustado o padrão de ciclagem da PCR no programa 7500 Fast System SDS Software, submetidos
25 sequencialmente aos estágios 1 e 2, descritos na **Tabela 3**. O estágio 2 foi repetido 40 vezes.

Após o ensaio de PCR, foi feito um experimento para obtenção da curva de dissociação dos iniciadores utilizados, na obtenção de parâmetros importantes na avaliação da reação de transfecção, indicando se eles formam dímeros ou também se amplificam um só produto de PCR. Os parâmetros de
30 ciclagem para esta curva são: **1) 95°C = 15 segundos; 2) 60°C = 1 hora; e 3) 95°C = 15 segundos**. Em seguida, os dados brutos foram obtidos e analisados por meio de uma ferramenta existente no próprio programa,

denominada *Relative Quantification Study*. Nesta ferramenta, os valores correspondentes às amostras-alvo são divididos pelo valor de uma amostra escolhida pelo usuário, o calibrador. Esta ferramenta fornece os valores de ΔCt , $\Delta\Delta Ct$, $2^{\Delta Ct}$ e $2^{\Delta\Delta Ct}$.

TABELA 3

ESTÁGIO 1 Ativação/Inativação da enzima UDP Temperatura (°C) Tempo (s)		ESTÁGIO 2 Ciclagem Temperatura (°C) Tempo (s)	
50	120	95	3
95	300	60	30
95	20		

5 A análise de quantificações relativas pode ser feita por meio do Método da Curva Relativa Padrão ou pelo Método Comparativo de Ct ($\Delta\Delta Ct$). O primeiro método requer que cada placa de reação tenha uma curva-padrão, o que demanda maior gasto de reagentes, visto que devem ser feitas várias diluições seriadas das amostras. O segundo método, utilizado na presente
10 invenção, não requer essa curva-padrão, havendo menor gasto de reagentes. Entretanto, para a utilização deste método, deve-se estabelecer se a eficiência da reação de PCR entre a amostra-alvo e a controle é equivalente (**Equações 1 e 2**); em seguida utiliza-se a fórmula aritmética dada pela **Equação 3**.

15 A determinação do $\Delta\Delta Ct$ depende do cálculo de Ct, que é o ciclo onde a linha de base se intercepta com a curva de reação, denominado *Threshold Cycle*, ou Ciclo de Limiar. O valor de Ct é fornecido pela ferramenta de análise do programa. O valor de ΔCt é dado pela **Equação 1**. Utilizando os valores de ΔCt , o cálculo de $\Delta\Delta Ct$, é dado pela **Equação 2**. Finalmente, $\Delta\Delta Ct$ é submetido à fórmula aritmética (3) e os resultados obtidos são mostrados na
20 **Figura 5**.

$$\Delta Ct = Ct \text{ amostra-alvo} - Ct \text{ amostra controle} \quad (1)$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ amostra-alvo} - \Delta Ct \text{ amostra controle} \quad (2)$$

$$2^{-\Delta\Delta Ct} \quad (3)$$

O método de determinação de $\Delta\Delta Ct$ (Equações 1 a 3) usado é descrito na literatura (BUBNER, B.; GASE, K.; Baldwin, Ian T. Two-fold differences are the detection limit for determining transgene copy numbers in plants by real-time PCR. *BMC Biotechnology*, 4:14, 2004).

5 A quantificação dos produtos da PCR em tempo real (qPCR) é baseada na descrição do aumento em escala exponencial do número de moléculas amplificadas (Equação 4).

$$X_n = X_o \times (1+E)^n \quad (4)$$

Onde X_n é o número de moléculas-alvo após n ciclos, X_o é o número inicial de moléculas-alvo, n é o número de ciclos e E é a eficiência da reação, que 10 deve ser de próxima a 100% para que este método seja utilizado. O valor de E próximo a 1 indica que o número de moléculas dobra a cada ciclo.

Apesar do valor de X_n ser fisicamente mensurado por fluorescência, uma máquina de PCR em tempo real apenas fornece o valor de Ct . Este valor representa o número do ciclo C o qual o produto de PCR dispara um 15 determinado valor de fluorescência (threshold). Baixos valores de Ct indicam que há uma grande quantidade do produto alvo, enquanto altos valores de Ct indicam o oposto.

Como em reações com eficiência próxima a 100% ($E \sim 1$) a quantidade de produto dobra a cada ciclo, a relação abaixo pode ser aplicada:

$$2 \times X_o = Ct - 1 \quad (5)$$

20 Consequentemente, se o número inicial de moléculas alvo X_o dobra, o valor de fluorescência cruzará a linha "threshold" um ciclo anterior. Para

normalizar o valor obtido no gene alvo, deve ser utilizado um gene de referência, cujo valor de Ct será diminuído do valor da amostra alvo, conforme indicado na **Equação 2**.

5 O valor ΔCt de uma amostra alvo deve posteriormente ser normalizado com o valor ΔCt de um calibrador, que é a amostra não-tratada. No caso deste trabalho, o gene normalizador é o da luciferase de *Renilla*, e o calibrador é o valor de ΔCt do promotor sem intron, visto que o efeito que se deseja analisar é justamente o do intron A. Assim, se tem a relação dada pela **Equação 1**.

10 Por fim, a razão entre o número inicial de moléculas alvo (X_a) pelo número de moléculas do calibrador (X_c), que é o valor final normalizado a ser apresentado nos gráficos, pode ser representado pela **Equação 6**:

$$X_a/X_c = (1+E)^{-\Delta\Delta Ct} \quad (6)$$

Considerando a reação com eficiência de 100%, o valor E será igual a 1 e a equação a ser utilizada ficaria:

$$X_a/X_c = 2^{-\Delta\Delta Ct} \quad (7)$$

15 Para confirmar se a eficiência da reação está em torno de 100%, deve ser feita uma diluição seriada da amostra alvo. Os valores de Ct serão cotados em um gráfico contra o logaritmo das diluições. A reta obtida deve ter inclinação próxima a da linha de tendência.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS BIOLÓGICAS

1) Informações gerais do Pedido de Patente

(i) Dados do Requerente:

a) Nome: Fundação Universidade de Brasília

b) Endereço: Campus Universitário Darcy Ribeiro, Asa Norte, Faculdade de Tecnologia, Módulo AT-05, Caixa Postal 04397 CEP: 70919-970, Brasília – DF.

(ii) Título da invenção: "VETORES DE EXPRESSÃO DE GENES HETERÓLOGOS EM CÉLULAS DE MAMÍFEROS"

(iii) Número de sequências constantes do pedido: 3 (três)

(iv) Formato para leitura no computador: Microsoft Word; Windows XP; computador tipo PC.

2) Informações gerais das sequências

Descrição da sequência: Seq. ID N° 1

a) Tamanho da sequência: 5209 pares de base

b) Tipo da sequência: DNA

c) topologia: DNA circular

d) nome: pMACIAΔ200

e) fonte original da molécula: vetores comerciais, genoma de citomegalovirus humano.

Descrição da Sequência

TATAGTGAGT	CGTATTACAA	TTCACTGGCC	GTCGTTTTAC	AACGTCGTGA	CTGGGAAAAC	60
CCTGGCGTTA	CCCAACTTAA	TCGCCTTGCA	GCACATCCCC	CTTTCGCCAG	CTGGCGTAAT	120
AGCGAAGAGG	CCCGCACCGA	TCGCCTTCC	CAACAGTTGC	GCAGCCTGAA	TGGCGAATGG	180
ACGCGCCCTG	TAGCGGCGCA	TTAAGCGCGG	CGGGTGTGGT	GGTTACGCGC	AGCGTGACCG	240
CTACACTTGC	CAGCGCCCTA	GCGCCCGCTC	CTTTCGCTTT	CTTCCCTTCC	TTTCTCGCCA	300
CGTTGCGCGG	CTTCCCGCT	CAAGCTCTAA	ATCGGGGGCT	CCCTTAGGG	TTCCGATTTA	360
GAGCTTTACG	GCACCTCGAC	CGCAAAAAC	TTGATTTGGG	TGATGGTTCA	CGTAGTGGGC	420
CATCGCCCTG	ATAGACGGTT	TTTCGCCCTT	TGACGTTGGA	GTCCACGTTT	TTTAATAGTG	480
GACTCTTGT	CCAACTGGA	ACAACACTCA	ACCCTATCTC	GGTCTATTCT	TTTGATTTAT	540
AAGGGATTTT	GCCGATTTCC	GCCTATTGGT	TAAAAATGA	GCTGATTTAA	CAAATATTTA	600
ACGCGAATTT	TAACAAATA	TTAACGTTTA	CAATTCGCC	TGATGCGGTA	TTTCTCCTT	660
ACGCATCTGT	GCGGTATTTT	ACACCGCATA	CAGGTGGCAC	TTTTCGGGGA	AATGTGCGCG	720
GAACCCCTAT	TTGTTTATTT	TTCTAAATAC	ATTCAAATAT	GTATCCGCTC	ATGAGACAAAT	780

2/7

AACCCGTGATA	AATGCTTCAA	TAATATTGAA	AAAGGAAGAG	TATGAGTATT	CAACATTTCC	840
GTGTCGCCCT	TATTCCTTT	TTGCGGCAT	TTGCGCTTCC	TGTTTTTGCT	CACCCAGAAA	900
CGCTGGTGAA	AGTAAAAGAT	GCTGAAGATC	AGTTGGGTGC	ACGAGTGGGT	TACATCGAAC	960
TGGATCTCAA	CAGCGGTAAG	ATCCTTGAGA	GTTTTCGCCC	CGAAGAACGT	TTTCCAATGA	1020
TGAGCACTTT	TAAAGTTCTG	CTATGTCATA	CACTATTATC	CCGTATTGAC	GCCGGGCAAG	1080
AGCAACTCGG	TCGCCGGGCG	CGGTATTCTC	AGAATGACTT	GTTGAGTAC	TCACCACTCA	1140
CAGAAAAGCA	TCTTACGGAT	GGCATGACAG	TAAGAGAATT	ATGCAGTGCT	GCCATAACCA	1200
TGAGTGATAA	CACTGCGGCC	AACTTACTTC	TGACAACGAT	CGGAGGACCG	AAGGAGCTAA	1260
CCGCTTTTTT	GCACAACATG	GGGATCATG	TAACTCGCCT	TGATCGTTGG	GAACCGGAGC	1320
TGAATGAAGC	CATACCAAAC	GACGAGCGTG	ACACCACGAT	GCCTGTAGCA	ATGCCAACAA	1380
CGTTGCGCAA	ACTATTAAC	GGCGAACTAC	TTACTCTAGC	TTCCCAGCAA	CAATTAATAG	1440
ACTGGATGGA	GGCGGATAAA	GTTGCAGGAC	CACTTCTGCG	CTCGGCCCTT	CCGGCTGGCT	1500
GGTTTATTGC	TGATAAATCT	GGAGCCGGTG	AGCGTGGGTC	TCGCGGTATC	ATTGCAGCAC	1560
TGGGGCCAGA	TGGTAAGCCC	TCCCGTATCG	TAGTTATCTA	CACGACGGGG	AGTCAGGCAA	1620
CTATGGATGA	ACGAAATAGA	CAGATCGCTG	AGATAGGTGC	CTCACTGATT	AAGCATTGGT	1680
AACTGTCAGA	CCAAAGTTTAC	TCATATATA	TTTAGATTGA	TTTAAACTT	CATTTTAAT	1740
TTAAAAGGAT	CTAGGTGAAG	ATCCTTTTTG	ATAATCTCAT	GACCAAATC	CCTTAACGTG	1800
AGTTTTCGTT	CCACTGAGCG	TCAGACCCCG	TAGAAAAGAT	CAAAGGATCT	TCTTGAGATC	1860
CTTTTTTCT	GCGCGTAATC	TGCTGCTTGC	AAACAATAAA	ACCACCGCTA	CCAGCGGTGG	1920
TTTGTTCGCC	GGATCAAGAG	CTACCAACTC	TTTTTCCGAA	GGTAACTGGC	TTCAGCAGAG	1980
CGCAGATACC	AAATACTGTC	CTTCTAGTGT	AGCCGTAGTT	AGGCCACCAC	TTCAAGAACT	2040
CTGTAGCACC	GCCTACATAC	CTCGCTCTGC	TAATCCTGTT	ACCAGTGGCT	GCTGCCAGTG	2100
GCGATAAGTC	GTGTCTTACC	GGGTTGGACT	CAAGACGATA	GTTACCGGAT	AAGGCGCAGC	2160
GGTCGGGCTG	AACGGGGGGT	TCGTGCACAC	AGCCCAGCTT	GGAGCGAACG	ACCTACACCG	2220
AACTGAGATA	CCTACAGCGT	GAGCTATGAG	AAAGCGCCAC	GCTTCCCGAA	GGGAGAAAGG	2280
CGGACAGGTA	TCCGGTAAGC	GGCAGGGTCG	GAACAGGAGA	GCGCACGAGG	GAGCTTCCAG	2340
GGGGAAACGC	CTGGTATCTT	TATAGTCCCTG	TCGGGTTTCG	CCACCTCTGA	CTTGAGCGTC	2400
GATTTTTGTG	ATGCTCGTCA	GGGGGGCGGA	GCCTATCGAA	AAACGCCAGC	AACGCGGCCT	2460
TTTTACGGTT	CCTGGCCTTT	TGCTGGCCTT	TTGCTCACAT	GTTCTTTCCT	GCGTTATCCC	2520
CTGATTCTGT	GGATAACCGT	ATTACCGCCT	TTGAGTGAGC	TGATACCGCT	CGCCGCAGCC	2580
GAACGACCGA	GCGCAGCGAG	TCAGTGAGCG	AGGAAGCGGA	AGAGCGCCCA	ATACGCAAAC	2640
CGCCTCTCCC	CGCGCGTTGG	CCGATTCATT	AATGCAGCTG	GCACGACAGG	TTCCCGACT	2700
GGAAAGCGGG	CAGTGAGCGC	AACGCAATTA	ATGTGAGTTA	GCTCACTCAT	TAGGCACCCC	2760
AGGCCTTACA	CTTTATGCTT	CCGGCTCGTA	TGTTGTGTGG	AATTGTGAGC	GGATAACAA	2820
TTCACACAGG	AAACAGCTAT	GACCATGATT	ACGCCAAGCT	ATTTAGGTGA	CACTATAGAA	2880
TACTCAAGCT	ATGCATCCAA	ACGCGTTTTG	AGATTTCTGT	CGCCGACTAA	ATTCATGTCG	2940
CGCGATAGTG	GTGTTTATCG	CCGATAGAGA	TGGCGATATT	GGAAATCGAT	ATTTGAAAAT	3000
ATGGCATATT	GAAAATGTCG	CCGATGTGAG	TTTCTGTGTA	ACTGATATCG	CCATTTTCC	3060
AAAAGTGATT	TTTGGGCATA	CGCGATATCT	GGCGATACGG	CTTATATCGT	TTACGGGGGA	3120
TGGCGATAGA	CGACTTTGGC	GACTTGGGCG	ATTCTGTGTG	TCGCAAATAT	CGCAGTTTCG	3180
ATATAGGTGA	CAGACGATAT	GAGGCTATAT	CGCCGATAGA	GGCGACATGA	AGCTGGCACA	3240
TGGCCAATGC	ATATCGATCT	ATACATTGAA	TCAATATTGG	CAATTAGCCA	TATTAGTCAT	3300
TGTTTATATA	GCATAAATCA	ATATTGGCTA	TTGGCCATTG	CATACGTTGT	ATCTATATCA	3360
TAATATGTAC	ATTTATATTG	GCTCATGTCC	AATATGACCG	CCATGTTGAC	ATTGATTATT	3420
GACTAGTTAT	TAATAGTAAT	CAATTACGGG	GTCATTAGTT	CATAGCCCAT	ATATGGACTT	3480
CCGCGTTACA	TAACTTACGG	TAAATGGCCC	GCCTCGTGAC	CGCCCAACGA	CCCCCGCCA	3540

3/7

```

TTGACGTCAA TAATGACGTA TGTCCCATA GTAACGCCAA TAGGGACTTT CCATTGACGT 3600
CAATGGGTGG AGTATTTACG GTAACCTGCC CACTTGGCAG TACATCAAGT GTATCATATG 3660
CCAAGTCCGG CCCCTATTG ACGTCAATGA CGGTAAATGG CCCGCCTGGC ATTATGCCCA 3720
GTACATGACC TTACGGGACT TTCCTACTTG GCAGTACATC TACGTATTAG TCATCGCTAT 3780
TACCATGGTG ATGCGGTTTT GGCAGTACAC CAATGGGCGT GGATAGCGGT TTGACTCACG 3840
GGGATTTCCA AGTCTCCACC CCATTGACGT CAATGGGAGT TTGTTTTGGC ACCAAAATCA 3900
ACGGGACTTT CCAAAATGTC GTAATAACCC CGCCCCGTTG ACGCAAATGG GCGGTAGGCG 3960
TGTACGGTGG GAGGTCTATA TAAGCAGAGC TCGTTTAGTG AACCGTCAGA TCGCCTGGAG 4020
ACGCCATCCA CGCTGTTTTG ACCTCCATAG AAGACACCGG GACCGATCCA GCCTCCGCGG 4080
CCGGGAACGG TGCATTGGAA CGCGGATPCC CCGTGCCAAG AGTGACGTAA GTACCGCCTA 4140
TAGACTCTAT AGGCACACCC CTTTGGCTCT TATGCATGCT ATACTGTTTT TGGCTTGGGG 4200
CCTATACACC CCCGCTCCTT ATGCTATAGG TGATGGTATA GCTTAGCCTA TAGGTGTGGG 4260
TTATTGACCA TTATTGACCA CTCCCGGACA TGGGCTCTTC TCCGGTAGCG GCGGAGCTTC 4320
CACATCCGAG CCCTGGTCCC ATGCCTCCAG OGGCTCATGG TCGCTCGGCA GCTCCTTGCT 4380
CCTAACAGTG GAGGCCAGAC TTAGGCACAG CACAATGCCC ACCACCACCA GTGTGCCGCA 4440
CAAGGCCGTG GCGGTAGGGT ATGTGTCTGA AAATGAGCTC GGAGATTGGG CTCGCACCGT 4500
GACGCAGATG GAAGACTTAA GGCAGCGGCA GAAGAAGATG CAGGCAGCTG AGTTGTGTGA 4560
TTCTGATAAG AGTCAGAGGT AACTCCCGTT GCGGTGCTGT TAACGGTGGG GGGCAGTGTA 4620
GYCTGAGCAG TACTCGTTGC TGCCGCGCGC GCCACCAGAC ATAATAGCTG ACAGACTAAC 4680
AGACTGTTC TTTCCATGGG TCTTTTCTGC AGTCAAGCTT GCTAGCGGCC GCTCGAGGCC 4740
GGCAAGGCCG GATCCAGACA TGATAGATA CATTGATGAG TTGGACAAA CCACAAC TAG 4800
AATGCAGTGA AAAAAATGCT TTATTGTGA AATTTGTGAT GCTATTGCTT TATTTGTAAC 4860
CATTATAAGC TGCAATAAAC AAGTTAACAA CAACAATTGC ATTCATTTTA TGTTTCAGGT 4920
TCAGGGGGAG GTGGGGAGGT TTTTAAAGC AAGTAAARCC TCTACAAATG TGGTATGGCT 4980
GATTATGATC CGGCTGCCTC GCGGTTTTG GTGATGACGG TGAAACCTC TGACACATGC 5040
AGCTCCCGGA GACGGTCACA GCTTGTCTGT AAGCGGATGC CGGGAGCAGA CAAGCCCGTC 5100
AGGGCGCGTC AGCGGGTGTG GCGGGGTGTC GGGGCGCAGC CATGAGGTCG ATCGACCTGC 5160
AGGCGGCCCA TGGCGGCCGG GAGCATGCGA CGTCGGGCCC AATTCGCC 5209

```

Descrição da sequência: Seq. ID N° 2

- a) Tamanho da sequência : 5013 pares de base
- b) Tipo da sequência: DNA
- c) topologia: DNA circular
- d) nome: pMACIAΔ400
- e) fonte original da molécula: vetores comerciais, genoma de citomegalovírus humano.

Descrição da Sequência

```

TATAGTGAGT CGTATTACAA TTCACTGGCC GTCGTTTTAC AACGTCGTGA CTGGGAAAAC 60
CCTGGCGTTA CCCAACTTAA TCGCCTTGCA GCACATCCCC CTTTCGCCAG CTGGCGTAAT 120
AGCGAAGAGG CCCGCACCGA TCGCCCTTCC CAACAGTTGC GCAGCCTGAA TGGCGAATGG 180

```

ACGCGCCCTG TAGCGGGCGCA TTAAGCGCGG CGGGTGTGGT GGTTACGCGC AGCGTGACCG 240
 CTACACTTGC CAGCGCCCTA GCGCCCGCTC CTTTCGCTTT CTTCCTTCC TTTCTCGCCA 300
 CGTTCGCCGG CTTTCCCGGT CAAGCTCTAA ATCGGGGGCT CCCTTTAGGG TTCCGATTTA 360
 GAGCTTTACG GCACCTCGAC CGCAAAAAC TTGATTTGGG TGATGGTTCA CGTAGTGGGC 420
 CATCGCCCTG ATAGACGGTT TTTCCGCCCT TGACGTTGGA GTCCACGTTT TTTAATAGTG 480
 GACTCTGTGT CCAAACCTGGA ACAACACTCA ACCCTATCTC GGTCTATTCT TTTGATTTAT 540
 AMGGGATTTT GCCGATTTTC GCCTATTGGT TAAAAAATGA GCTGATTTAA CAAATATTTA 600
 ACGCGAATTT TAACAAAATA TTAACGTTTA CAATTCGCC TGATGCGGTA TTTTCTCCTT 660
 ACGCATCTGT GCGGTATTTT ACACCGCATA CAGGTGGCAC TTTTCGGGGA AATGTGCGCG 720
 GAACCCCTAT TTGTTTATTT TTCTAAATAC ATTCAAATAT GTATCCGCTC ATGAGACAAT 780
 AACCCCTGATA AATGCTTCAA TAATATTGAA AAAGGAAGAG TATGAGTATT CAACATTTCC 840
 GTGTCGCCCT TATTCCTTTT TTTGCGGCAT TTTGCCTTCC TGTTTTTGCT CACCCAGAAA 900
 CGCTGGTGAA AGTAAAAGAT GCTGAAGATC AGTTGGGTGC ACGAGTGGGT TACATCGAAC 960
 TGGATCTCAA CAGCGGTAAG ATCCTTGAGA GTTTTCGCCC CGAAGAACGT TTTCCAATGA 1020
 TGAGCACTTT TAAAGTTCTG CTATGTCTA CACTATTATC CCGTATTGAC GCCGGGCAAG 1080
 AGCAACTCGG TCGCCGGGCG CGGTATTCTC AGAATGACTT GGTTGAGTAC TCACCAGTCA 1140
 CAGAAAAGCA TCCTACGGAT GGCATGACAG TAAGAGAATT ATGCAGTGCT GCCATAACCA 1200
 TGAGTGATAA CACTGCGGCC AACTTACTTC TGACAACGAT CGGAGGACCG AAGGAGCTAA 1260
 CCGCTTTTTT GCACAACATG GGGGATCATG TAACTCGCCT TGATCGTTGG GAACCGGAGC 1320
 TGAATGAAGC CATAACCAAC GACGAGCGTG ACACCACGAT GCCTGTAGCA ATGCCAACAA 1380
 CGTTGCGCAA ACTATTAAC TGGGAACTAC TTAATCTAGC TTCCCGGCAA CAATTAATAG 1440
 ACTGGATGGA GCGGATAAAA GTTGACAGAC CACTTCTGCG CTCGGCCCTT CCGGCTGGCT 1500
 GGTATTATGC TGATAAATCT GGAGCCGGTG AGCGTGGGTC TCGCGGTATC ATTGACGAC 1560
 TGGGGCCAGA TGGTAAGCCC TCCCGTATCG TAGTTATCTA CACGACGGGG AGTCAGGCAA 1620
 CTATGGATGA ACGAAATAGA CAGATCGGTG AGATAGGTGC CTCACTGATT AAGCATTGGT 1680
 AACTGTCTGA CCAAGTTTAC TCATATATAC TTTAGATTGA TTTAAAACCT CATTTTTTAAT 1740
 TTAAGGAT CTAGGTGAAG ATCCTTTTTG ATAATCTCAT GACCAAAATC CCTTAAACGTG 1800
 AGTTTTCGTT CCACTGAGCG TCAGACCCCG TAGAAAAGAT CAAAGGATCT TCTTGAGATC 1860
 CTTTTTTTCT GCGCGTAATC TGCTGCTTGC AAACAAAAA ACCACCGCTA CCAGCGGTGG 1920
 TTTGTTTGCC GGATCAAGAG CTACCAACTC TTTTTCGAA GGTAACCTGGC TTCAGCAGAG 1980
 CGCAGATACC AAATACTGTC CTTCTAGTGT AGCCGTAGTT AGGCCACCAC TTCAGAAGCT 2040
 CTGTAGCACC GCCTACATAC CTCGCTCTGC TAATCCTGTT ACCAGTGGCT GCTGCCAGTG 2100
 GCGATAAGTC GTGTCTTACC GGGTTGGACT CAAGACGATA GTTACCGGAT AAGGCGCAGC 2160
 GGTGCGGCTG AACGGGGGGT TCSTGCACAC AGCCCAGCTT GGAGCGAACG ACCTACACCG 2220
 AACTGAGATA CCTACAGCGT GAGCTATGAG AAAGCGCCAC GCTTCCCGAA GGGAGAAAGG 2280
 CGGACAGGTA TCCGGTAAGC GGCAGGGTCG GAACAGGAGA GCGCACGAGG GAGCTTCCAG 2340
 GGGGAAACGC CTGSTATCTT TATAGTCCTG TCGGGTTTCG CCACCTCTGA CTTGAGCGTC 2400
 GATTTTTGTG ATGCTCGTCA GGGGGGCGGA GCCTATCGAA AAACGCCAGC AACCGGCTT 2460
 TTTTACGGTT CCTGGCCTTT TGCTGGCCTT TTGCTCACAT GTTCTTTCTT CGGTATATCC 2520
 CTGATTCTGT GGATAACCGT ATTACCGCCT TTGAGTGAGC TGATACCGCT CGCCGAGCC 2580
 GAACGACCGA GCGCAGCGAG TCAGTGAGCG AGGAAGCGGA AGAGCGCCCA ATACGCAAAC 2640
 CGCCTCTCCC CGCGGTPGG CCGATTCATT AATGCAGCTG GCACGACAGG TTTCCCGACT 2700
 GGAAAGCGGG CAGTGAGCGC AACGCAATTA ATGTGAGTTA GCTCACTCAT TAGGCACCCC 2760
 AGGCPTTACA CTTTATGCTT CCGGCTCGTA TGTGTGTGG AATTGTGAGC GGATAACAAT 2820
 TTCACACAGG AAACAGCTAT GACCATGATT ACGCCAAGCT ATTTAGGTGA CACTATAGAA 2880
 TACTCAAGCT ATGCATCCAA ACGCGTTTTG AGATTTCTGT CCGCGACTAA ATTCATGTG 2940

```

CGCGATAGTG GTGTTTATCG CCGATAGAGA TGGCGATATT GAAATCGAT ATTTGAAAAT 3000
ATGGCATATT GAAAATGTCG CCGATGTGAG TTTCTGTGTA ACTGATATCG CCATTTTTC 3060
AAAAGTGATT TTTGGGCATA CGCGATATCT GGCGATACGG CTTATATCGT TTACGGGGGA 3120
TGGCGATAGA CGACTTTGGC GACTTGGGCG ATTCTGTGTG TCGCAAATAT CGCAGTTTCG 3180
ATATAGGTGA CAGACGATAT GAGGCTATAT CGCCGATAGA GGCGACATGA AGCTGGCACA 3240
TGGCCAATGC ATATCGATCT ATACATTGAA TCAATATTGG CAATTAGCCA TATTAGTCAT 3300
TGTTTATATA GCATAAATCA ATATTGGCTA TTGGCCATTG CATACGTTGT ATCTATAICA 3360
TAATATGTAC ATTTATATTG GCTCATGTCC AATATGACCG CCATGTTGAC ATTGATTATT 3420
GACTAGTTAT TAATAGTAAT CAATTACGGG GTCATTAGTT CATAGCCCAT ATATGGACTT 3480
CCGCGTTACA TAACTTACGG TAAATGGCCC GCCTCGTGAC CGCCCAACGA CCCCCGCCA 3540
TTGACGTCAA TAATGACGTA TGTTCCATA GTAACGCCAA TAGGGACTTT CCATTGACGT 3600
CAATGGGTGG AGTATTTACG GTAAACTGCC CACTTGGCAG TACATCAAGT GTATCATATG 3660
CCAAGTCCGG CCCCCTATTG ACGTCAATGA CGGTAATGG CCGCCTGGC ATTATGCCA 3720
GTACATGACC TTACGGGACT TTCTACTTGT GCAGTACATC TAGTATTAG TCATCGCIAT 3780
TACCATTGGT ATGCGGTTTT GGCAGTACAC CAATGGGCGT GGATAGCGGT TTGACTCACG 3840
GGGATTTCCA AGTCTCCACC CCATTGACGT CAATGGGAGT TTGTTTTGGC ACCAAAATCA 3900
ACGGGACTTT CCAAAATGTC GTAATAACCC CGCCCCGTTG ACGCAAATGG GCGGTAGGCG 3960
TGTACGGTGG GAGGTCTATA TAAGCAGAGC TCGTTTAGTG AACCCTCAGA TCGCCTGGAG 4020
ACGCCATCCA CGCTGTTTTG ACCTCCATAG AAGACACCGG GACCGATCCA GCCTCCGGG 4080
CCGGGAACGG TGCATTGGAA CGCGGATTCC CCGTGCCAAG AGTGACGTAA GTACCCCTA 4140
TAGACTCTAT AGGCACACCC CTTTGGCTCT TATGCATGCT ATACTGTTTT TGGCTTGGGG 4200
CCTATACACC CCGCTCCCTT ATGCTATAGG TGATGGTATA GCTTAGCCTA TAGGTGTGGG 4260
TTATTGACCA TTATTGACCA CTCCCCTATT GGTGACGATA CTTTCCATA CTAATCCATA 4320
ACATGGCTCT TTGCCACAAC TATCTCTATT GSCTTATGCC AATACTCTGT CCTTCAGAGA 4380
CTGACACGGA CTCGTATTTT TTACAGGATG GGGTCCCAT TATTATTTAC AAATTCACAT 4440
ATACAACAAC GCCGTCCCCC GTGCCCGCAG TTTTATTAA ACATAGCGTG GGATCTCCAC 4500
GCGAATCTCG GGTACGTGTT GCTTGCTAGC GGCCGCTCGA GGCCGGCAAG GCCGGATCCA 4560
GACATGATAA GATACATTGA TGAGTTTGGG CAAACCACAA CTAGAATGCA GTGAAAAAAA 4620
TGCTTTATTT GTGAAATTTG TGATGCTATT GCTTTATTTG TAACCATTAT AAGCTGCAAT 4680
AAACAAGTTA ACAACAACAA TTGCATTCAT TTTATGTTTC AGGTTACAGG GGAGGTGGGG 4740
AGGTTTTTTA AAGCAAGTAA AACCTCTACA AATGTGGTAT GGCTGATTAT GATCCGGCTG 4800
CCTCGCGCGT TTCGGTGATG ACGGTGAAAA CCTCTGACAC ATGCAGCTCC CGGAGACGGT 4860
CACAGCTTGT CTGTAAGCGG ATGCCGGGAG CAGACAAGCC CGTCAGGGCG CGTCAGCGGG 4920
TGTTGGCCGG TGTCGGGGCG CAGCCATGAG GTCGATCGAC CTGCAGGCGG CCCATGGCGG 4980
CCGGGAGCAT GCGACGTCGG GCCCAATTGG CCC 5013

```

Descrição da sequência: Seq. ID N^o 3

- a) Tamanho da sequência: 4778 pares de base
- b) Tipo da sequência: DNA
- c) topologia: DNA circular
- d) nome: pMACIA Δ 600
- e) fonte original da molécula: vetores comerciais, genoma de citomegalovírus humano.

Descrição da Sequência

TATAGTGAGT CGTATTACAA TTCACTGGCC GTCGTTTTAC AACGTCGTGA CTGGGAAAAC 60
CCTGGCGTTA CCCAACTTAA TCGCCTTGCA GCACATCCCC CTTTCGCCAG CTGGCGTAAT 120
AGCGAAGAGG CCGCACCAGA TCGCCCTTCC CAACAGTTGC GCAGCCTGAA TGGCGAATGG 180
ACGCGCCCTG TAGCGGCGCA TTAAGCGCGG CCGGTGTGGT GGTTACGCGC AGCGTGACCG 240
CTACACTTGC CAGCGCCCTA GCGCCCGCTC CTTTCGCTTT CTTCCCTTCC TTTCTCGCCA 300
CGTTCGCGG CTTTCCCGT CAAGCTCTAA ATCGGGGGCT CCCTTTAGGG TTCCGATTTA 360
GAGCTTTACG GCACCTCGAC CGCAAAAAC TTGATTTGGG TGATGGTTCA CGTAGTGGGC 420
CATCGCCCTG ATAGACGGTT TTTCCGCTT TGACGTTGGA GTCCACGTTT TTTAATAGTG 480
GACTCTTGT CCAAACCTGA ACAACACTCA ACCCTATCTC GGTCTATTCT TTTGATTTAT 540
AAGGGATTTT GCCGATTTCC GCCTATTGGT TAAAAAATGA GCTGATTTAA CAAATATTTA 600
ACGCGAATTT TAACAAAATA TTAACGTTTA CAATTTCCGC TGATGCGGTA TTTTCTCCTT 660
ACGCATCTGT GCGGTATTT ACACCGCATA CAGGTGGCAC TTTTCGGGGA AATGTGCGCG 720
GAACCCCTAT TTGTTTATTT TTCTAAATAC ATTCAAATAT GTATCCGCTC ATGAGACAAT 780
AACCCTGATA AATGCTTCAA TAATATTGAA AAAGGAAGAG TATGAGTATT CAACATTTCC 840
GTGTGCGCCT TATTCCTTT TTTGCGGCAT TTTGCTTCC TGTTTTGTCT CACCCAGAAA 900
CGCTGGTGAA AGTAAAAGAT GCTGAAGATC AGTTGGGTGC ACGAGTGGGT TAGATCGAAC 960
TGGATCTCAA CAGCGGTAAG ATCCTTGAGA GTTTTCGCCC CGAAGAACGT TTTCCAATGA 1020
TGAGCACTTT TAAAGTTCTG CTATGTCATA CACTATTATC CCGTATTGAC GCCGGGCAAG 1080
AGCAACTCGG TCGCGGGGCG CGGTATTCTC AGAATGACTT GGTGAGTAC TCACCAGTCA 1140
CAGAAAAGCA TCTTACGGAT GGCATGACAG TAAGAGATT ATGCAGTCT GCCATAACCA 1200
TGAGTGATAA CACTGCGGCC AACTTACTTC TGACAACGAT CGGAGGACCG AAGGAGCTAA 1260
CCGCTTTTTT GCACAACATG GGGGATCATG TAACTCGCCT TGATCGTTGG GAACCGGAGC 1320
TGAATGAAGC CATAACAAAC GACGAGCGTG ACACCACGAT GCCTGTAGCA ATGCCAACAA 1380
CGTTGCGCAA ACTATTAAC TCGGAACACT TACTCTAGC TTCCCGGCAA CAATTAATAG 1440
ACTGGATGGA GCGCGATAAA GTTGACAGAC CACTTCTGCG CTCGGCCCTT CCGGCTGGCT 1500
GGTTTATTGC TGATAAATCT GGAGCCGGTG AGCGTGGGTC TCGCGGTATC ATTGCAGCAC 1560
TGGGGCCAGA TGGTAAGCCC TCCCCTATCG TAGTTATCTA CACGACGGGG AGTCAGGCAA 1620
CTATGGATGA ACGAAATAGA CAGATCGCTG AGATAGGTGC CTCACTGATT AAGCATTGGT 1680
AACTGTGAGA CCAAGTTTAC TCATATATAC TTTAGATTGA TTTAAAACCT CATTTTTAAT 1740
TTAAAAGGAT CTAGGTGAAG ATCCTTTTTG ATAATCTCAT GACCAAAATC CCTTAACGTG 1800
AGTTTTCGTT CCACTGAGCG TCAGACCCCG TAGAAAAGAT CAAAGGATCT TCTTGAGATC 1860
CTTTTTTCT GCGCGTAATC TGCTGCTTGC AAACAAAAAA ACCACCGCTA CCAGCGGTGG 1920
TTTGTTCGCC GGATCAAGAG CTACCAACTC TTTTCCGAA GGTAACCTGC TTCAGCAGAG 1980
CGCAGATACC AAATACTGTC CTTCTAGTGT AGCCGTAGTT AGGCCACCAC TTCAAGAACT 2040
CTGTAGCACC GCCTACATAC CTCGCTCTGC TAATCCTGTT ACCAGTGGCT GCTGCCAGTG 2100
GCGATAAGTC GTGTCTTACC GGGTTGACT CAAGACGATA GTTACCGGAT AAGGCGCAGC 2160
GGTCGGGCTG AACGGGGGGT TCGTGACAC AGCCCAGCTT GGAGCGAACG ACCTACACCG 2220
AACTGAGATA CCTACAGCGT GAGCTATGAG AAAGCGCCAC GCTTCCCGAA GGGAGAAAGG 2280
CGGACAGGTA TCCGGTAAGC GGCAGGGTGC GAACAGGAGA GCGCACGAGG GAGCTTCCAG 2340
GGGAAACGC CTGGTATCTT TATAGTCTG TCGGGTTTCG CCACCTCTGA CTTGAGCGTC 2400
GATTTTTGTG ATGCTCGTCA GGGGGGCGGA GCCTATCGAA AAACGCCAGC AACCGGCCT 2460
TTTTACGGTT CTTGGCCTTT TGCTGGCCTT TTGCTCACAT GTTCTTCTCT GCGTTATCCC 2520
CTGATCTGT GGATAACCGT ATTACCGCCT TTGAGTGAGC TGATACCGCT CGCCGAGCC 2580
GAACGACCGA GCGCAGCGAG TCACTGAGCG AGGAAGCGGA AGAGCGCCCA ATACGCAAAC 2640

7/7

CGCCTCTCCC CGCGCGTTGG CCGATTCAAT AATGCAGCTG GCACGACAGG TTTCCCGACT 2700
GGAAAGCGGG CAGTGAGCGC AACGCAATTA ATGTGAGTTA GCTCACTCAT TAGGCACCCC 2760
AGGCTTTACA CTTTATGCTT CCGGCTCGTA TGTGTGTGG AATTGTGAGC GGATAACAAT 2820
TTCACACAGG AACAGCTAT GACCATGATT ACGCCAAGCT ATTTAGGTGA CACTATAGAA 2880
TACTCAAGCT ATGCATCCAA ACGCGTTTTG AGATTTCTGT CGCCGACTAA ATTCATGTCG 2940
CGCGATAGTG GTGTTTATCG CCGATAGAGA TGGCGATATT GGAATCGAT ATTTGAAAAT 3000
ATGGCATATT GAAAATGTCG CCGATGTGAG TTICTGTGTA ACTGATATCG CCATTTTICC 3060
AAAAGTGATT TTTGGGCATA CCGGATATCT GGGGATACGG CTTATATCGT TTACGGGGGA 3120
TGGCGATAGA CGACTTTGGC GACTTGGGCG ATTCTGTGTG TCGCAAATAT CGCAGTTTCG 3180
ATATAGGTGA CAGACGATAT GAGGCTATAT CGCCGATAGA GCGGACATGA AGCTGGCACA 3240
TGGCCAATGC ATATCGATCT ATACATTGAA TCAATATGG CAATTAGCCA TATTAGTCAT 3300
TGGTTATATA GCATAAATCA ATATTGGCTA TTGGCCATTG CATACTGTTG ATCTATATCA 3360
TAATATGTAC ATTTATATTG GCTCATGTCC AATATGACCG CCATGTTGAC ATTGATTATT 3420
GACTAGTTAT TAATAGTAAT CAATTACGGG GTCATTAGTT CATAGCCCAT ATATGGACTT 3480
CCGCGTTACA TAACCTACGG TAAATGGGCC GCCTCGTGAC CGCCCAACGA CCCCOCGCCA 3540
TTGACGTCAA TAATGACGTA TGTTCCCATG GTAACGCCAA TAGGGACTTT CCATTGACGT 3600
CAATGGGTGG AGTATTTACG GTAAACTGCC CACTTGGCAG TACATCAAGT GTATCATATG 3660
CCAAGTCCGG CCCCTATTG ACGTCAATGA CCGTAAATGG CCCGCCTGGC ATTTAGCCCA 3720
GTACATGACC TTACGGGACT TTCCTACTTG GCAGTACATC TACGTATTAG TCATCGCTAT 3780
TACCATGGTG ATGCGGTTTT GGCAGTACAC CAATGGGCGT GGATAGCGGT TTGACTCACG 3840
GGGATTTCCA AGTCTCCACC CCATTGACGT CAATGGGAGT TTGTTTTGGC ACCAAAATCA 3900
ACGGGACTTT CCAAAATGTC GTAATAACCC CGCCCGTTG ACGCAAATGG GCGGTAGCGC 3960
TGTACGGTGG GAGGTCTATA TAAGCAGAGC TCCTTTAGTG AACCGTCAGA TCGCCTGGAG 4020
ACGCCATCCA CGCTGTTTTG ACCTCCATAG AAGACACCGG GACCGATCCA GCCTCCGCGG 4080
CCGGGAACGG TGCAATTGAA CCGGATTCG CCGTGCCAAG AGTGACGTAA GTACCGCCTA 4140
TAGACTCTAT AGGCACACCC CTTTGGCTCT TATGCATGCT ATACTGTTTT TGGCTTGGGG 4200
CCTATACACC CCCGCTCCTT ATGCTATAGG TGATGGTATA GCTTAGCCTA TAGGTGTGGG 4260
TTATTGACCA TTATTGACCA CTCCCGCTTG CTAGCGGCCG CTCGAGGCCG GCAAGGCCGG 4320
ATCCAGACAT GATAAGATAC ATTGATGAGT TTGGACAAAC CACAACCTAGA ATGCAGTGAA 4380
AAAAATGCTT TATTTGTGAA ATTTGTGATG CTATTGCTTT ATTTGTAACC ATTATAAGCT 4440
GCAATAAACA AGTTAACAAC AACAAATGCA TTCATTTTAT GTTTCAGGTT CAGGGGGAGG 4500
TGGGGAGGTT TTTTAAAGCA AGTAAAACCT CTACAAATGT GGTATGGCTG ATTATGATCC 4560
GGCTGCCTCG CGCGTTTCGG TGATGACGGT GAAAACCTCT GACACATGCA GCTCCCGGAG 4620
ACGGTCACAG CTTGTCTGTA AGCCGATGCC GGGAGCAGAC AAGCCCGTCA GGGCGCGTCA 4680
GCGGGTGTG GCGGGTGTG GGGCGCAGCC ATGAGGTGCA TCGACCTGCA GGGGGCCCAT 4740
GGCGGCCGGG AGCATGCGAC GTCGGGCCCA ATTCGCCC 4778

REIVINDICAÇÕES

- 1- VETORES DE EXPRESSÃO DE GENES HETERÓLOGOS EM CÉLULAS DE MAMÍFEROS constituídos por fragmentos do intron A do gene imediatamente precoce do citomegalovírus, resultantes de deleções diferenciadas do intron A selvagem, associado ao promotor/intensificador do mesmo gene de citomegalovírus **caracterizado por** compreender deleções do intron A em um número de pares de bases no intervalo de 100 a 760 pb.
- 5
- 2- VETORES DE EXPRESSÃO DE GENES HETERÓLOGOS EM CÉLULAS DE MAMÍFEROS de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** compreender uma das sequências de DNA representadas pelas Seq. ID N^o 1 a Seq. ID N^o 3.
- 10
- 3- VETORES DE EXPRESSÃO DE GENES HETERÓLOGOS EM CÉLULAS DE MAMÍFEROS de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** compreender faixas de deleção preferenciais para as deleções do intron A selvagem entre uma região de 545 a 750 pb e de 150 a 270 pb, tais como as representadas por Seq. ID N^o 3 e Seq. ID N^o 1.
- 15
- 4- VETORES DE EXPRESSÃO de acordo com a reivindicação 1 ou 2, **caracterizado por** serem introduzidos a células de mamíferos para a expressão dos genes heterólogos na produção de diferentes tipos de proteínas através de procedimentos conhecidos da técnica de engenharia de vetores.
- 20
- 5- VETORES DE EXPRESSÃO de acordo com a reivindicação 4, **caracterizado pelo** fato das células de mamíferos serem de linhagens HepG2, COS-7, BHK, HEK-293 e CHO-K1.
- 6- Processo para a produção de uma proteína heteróloga **caracterizado por** compreender uma etapa de transfecção estável ou transiente para uma célula de mamífero hospedeira com pelo menos um vetor conforme definido na reivindicação 1 ou 2, anteriormente amplificado em sistemas bacterianos.
- 25
- 7- Processo para a produção de uma proteína heteróloga, de acordo com a reivindicação 6, **caracterizado por** utilizar os vetores contendo deleções do intron A no intervalo de 100 a 760 pb ou as seqüências de DNA representadas
- 30

por Seq. ID N° 1 a Seq. ID N° 3, compreendendo uma etapa de cultivo de célula de mamífero hospedeira, principalmente as de linhagens HepG2, COS-7, BHK, HEK-293 e CHO-K1, em condições que permitem a expressão da proteína heteróloga de interesse.

- 5 8- Processo para a produção de uma proteína heteróloga de acordo com a reivindicação 6 ou 7 **caracterizado por** compreender a etapa de recuperação e isolamento da proteína heteróloga de interesse da célula hospedeira ou do sobrenadante de culturas dessas células por métodos conhecidos da técnica.
- 9- Uso dos vetores de expressão conforme definido na reivindicação 1 ou 2,
- 10 **caracterizado por** ser para modificar células de mamíferos para expressar diferentes tipos de proteínas heterólogas.
- 10- Uso das proteínas heterólogas obtidas pela expressão de células de mamíferos modificadas pelos vetores de acordo com a reivindicação 1 ou 2, **caracterizado por** serem utilizadas como constituintes de formulações
- 15 medicamentosas, tais como anticorpos humanizados para uso em rejeição a transplante, tratamento de diabetes autoimune, prevenção de recidiva de hepatite em pacientes imunossuprimidos pós-transplante, para o tratamento de doenças auto-imunes, e fatores plasmáticos da coagulação sanguínea, como o Fator VIII para tratamentos de pacientes com hemofilia A e o Fator IX para
- 20 tratamento de pacientes com Hemofilia B, e ainda, citocinas recombinantes utilizadas para tratamento de doenças do sistema imune ou utilizadas como constituinte de formulações de meio de cultura para o cultivo de células de mamíferos, incluindo células-tronco.

1/4

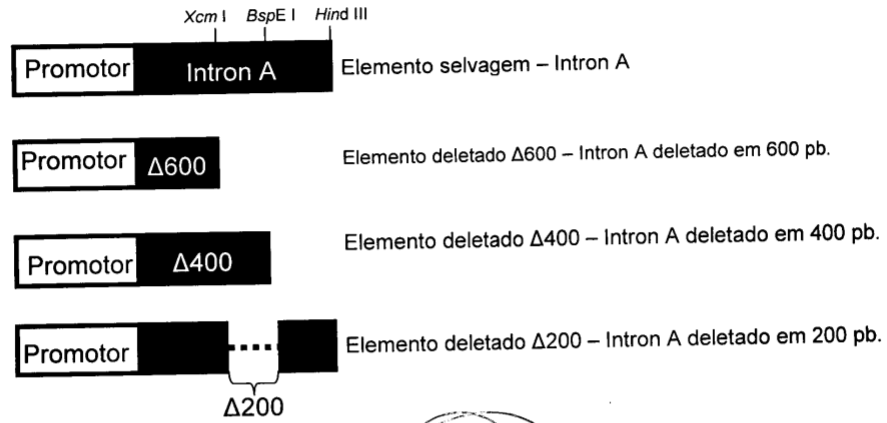


FIGURA 1

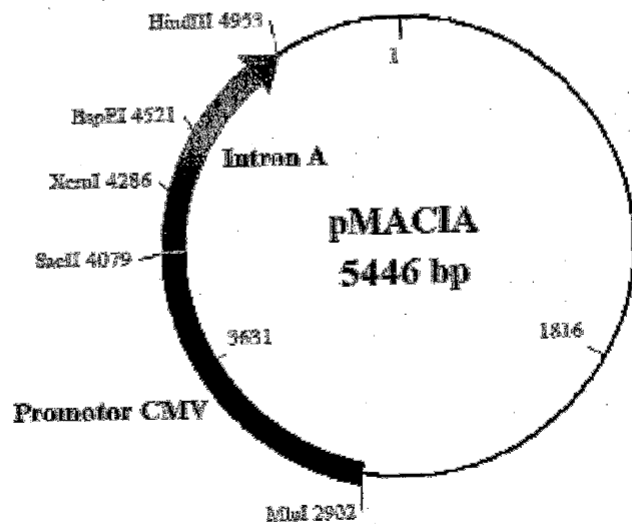


FIGURA 2

3/4

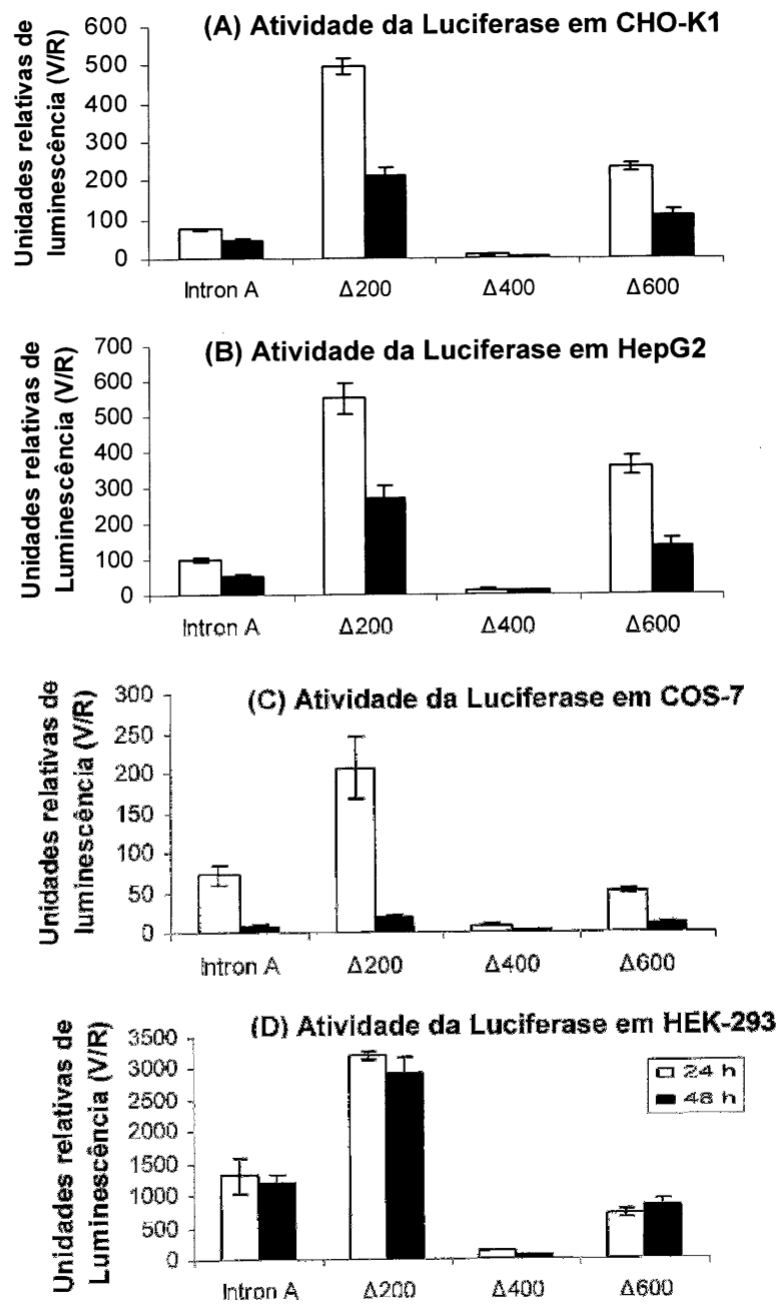
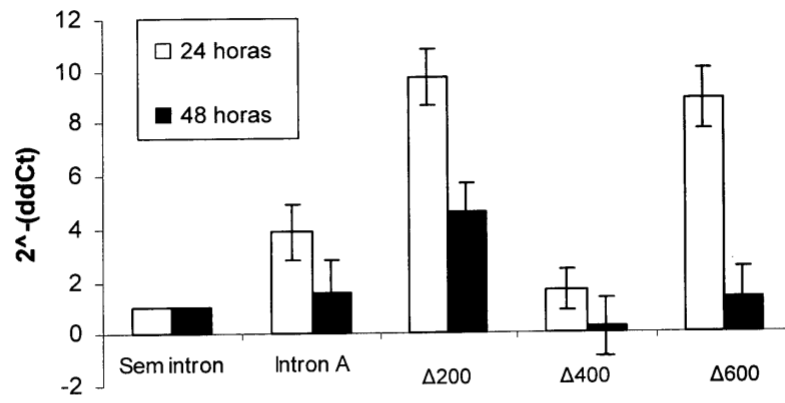


FIGURA 4

4/4

Normalizador Renilla**FIGURA 5**

RÉSUMO**“VETORES DE EXPRESSÃO DE GENES HETERÓLOGOS EM CÉLULAS DE MAMÍFEROS”**

A presente invenção se refere a vetores para clonagem de genes de
5 diversas proteínas heterólogas e expressão em células de mamífero e de seu
processo de obtenção. Estes vetores são constituídos basicamente de
fragmentos do intron A do gene imediatamente precoce do citomegalovírus,
resultantes de deleções diferenciadas do intron A inteiro, associado ao promotor
do mesmo gene de citomegalovírus e ao seu intensificador. As deleções são
10 diversificadas quanto ao número de pares de bases, variando de 100 a 760 pb,
resultando em vetores estruturalmente menores, visando solucionar os
problemas relacionados com baixos níveis de produção de proteínas
heterólogas de interesse em células de mamíferos, principalmente a de
linhagens HepG2, COS-7, HEK-293, CHO-K1 e BHK. As proteínas heterólogas
15 produzidas por esta via são principalmente utilizadas como constituintes de
formulações medicamentosas para o tratamento de diversas doenças e na
formulação de meios de cultura para o cultivo de células de mamíferos,
incluindo células-tronco.