

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR

LABORATÓRIO DE BIOLOGIA MOLECULAR

Estudo de elementos moduladores da expressão gênica em diferentes linhagens de células de mamífero

Luana Salgado Quilici

Orientadora: Prof^ª. Dra. Andréa Queiroz Maranhão

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

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

Brasília – DF

2008

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

Estudo de elementos moduladores da expressão gênica em diferentes linhagens de células de mamífero

Luana Salgado Quilici

Orientadora: Prof^ª. Dra. Andréa Queiroz Maranhão

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

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

Brasília – DF

2008

Banca Examinadora:

Dra. Santuza Maria Ribeiro Teixeira (UFMG – Membro Externo)

Prof. Dr. Márcio José Poças Fonseca (UnB – Membro Interno)

Prof^ª. Dra. Ildinete Silva Pereira (UnB – Suplente)

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

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

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
coragem nas horas em que mais
me desesperei...

... agradeço também à Andréa e
ao Marcelo, por me agüentarem
quatro anos e me ajudarem a
descobrir esse mundo
maravilhoso da Ciência!!!

... agradeço também ao Renato, que me ajudou em momentos muito complicados desse período, seja com palavras certas na hora certa, com as corridas, os carinhos, ou apenas com a companhia! Você é muito especial!

TE AMO ☺

AGRADECIMENTOS EXTRAS

Aos professores da banca, pelo tempo dispensado à leitura deste trabalho! Tomara que tenha valido a pena!!

À professora Ildinete, que me auxiliou em várias etapas deste trabalho, e sempre esteve disposta a ajudar! Será que agora você sabe o que é um "coacervado"??? Te considero minha co-co-orientadora!! Rsrtrs. Ao professor Márcio Poças pelas dicas da sala de cultura e de *bandshift*.

Aos demais professores da BioMol e agregados: 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! Sem esse equipamento esse trabalho não existiria!!! Susane, valeu!!

Ao professor Alan Carvalho, do Cenargen, e a todo o pessoal do seu laboratório! Sem vocês não teria nada de qPCR neste trabalho, e nem as Havaianas mais lindas!! Obrigada por me acolherem tão bem!

Ao pessoal do Lab1, que é simplesmente maravilhoso!! Isabella, você é uma amigona! Aprendi muito com você nesses anos. Barbarela, você já me agüentou uns cinco anos, vai ter que me engolir mais uns quatrol!! Admiro muito a sua persistência, inteligência e autenticidade... rsrtrs (como diz a sua mãe). E o que seria dos estágios da licenciatura sem as conversas nas horas ociosas?? Adoro você, você é uma grande amiga!! Hernandez, vou sentir saudades, de você, do seu mau-humor, do seu desespero para clonar e transfetar! Seja muito feliz em São Paulo!! Maryani, você é uma figura!! Divirto-me muito com nossos almoços! Mariana, obrigada por me ensinar tudo e mais um pouco sobre a sala de cultura! E só mesmo uma pisciana como eu pra entender porque somos tão grudentas (não chora não, senão eu choro também)!!! Victor, você é também uma figuraçã!!!! Meu primeiro estagiário!!! Rsrtrs.

Agradeço também a todos os outros colegas do Lab1 e agragados, que sempre me ajudaram em tudo: Carol, Rafa, Léo, Thayssa, Kelly, Yuri, Paulo, Alex (Lab2), Janaína, Fernanda, Mikael, Tiago, Hugo, Thiago, Lorena, Calliandra... enfim, vou esquecer alguém, mas não foi por mal não, tá? Obrigada a todos!!!

Obrigada à Izabel pela ajuda nas análises estatísticas, e também pelos produtos maravilhosos da Avon!!

Aos meninos do seqüenciamento, Marcus e Saulo, obrigada pela paciência e pela eficiência.

Ao Davi, OBRIGADA por sempre estar disposto a parar tudo que está fazendo para abrir aquele almoxarifado!! Você vai pro céu!!

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!!!

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!

Caminhada

Sei que a minha caminhada tem um destino e uma direção, por isso devo medir meus passos, prestar atenção no que faço e no que fazem os que por mim também passam ou pelos quais passo eu... Que eu não me iluda com o ânimo e o vigor dos primeiros trechos, porque chegará o dia em que os pés não terão tanta força e se ferirão no caminho e se cansarão mais cedo... Todavia, quando o cansaço houver, que eu não me desespere e acredite que ainda terei forças para continuar, principalmente quando houver quem me auxilie... É oportuno que, em meus sorrisos, eu me lembre de que existem os que choram para que, assim, meu riso não ofenda a mágoa dos que sofrem: por outro lado, quando chegar a minha vez de chorar, que eu não me deixe dominar pela desesperança, mas que eu entenda o sentido do sofrimento, que me nivela, que me iguala, que torna todos os homens iguais... Que eu não me considere melhor do que aqueles que ficarão atrás, porque pode vir o dia em que nada terei mais para minha jornada e aqueles, que ultrapassei na caminhada, me alcançarão e também poderão fazer como eu fiz e nada de fato fazer por mim, que ficarei no caminho sem concluí-lo... Quando o dia brilhar, que eu tenha vontade de ver a noite em que a caminhada será mais fácil e mais amena; quando for noite, porém e a escuridão tornar mais difícil a chegada, que eu saiba esperar o dia como aurora, o calor como bênção... Que eu perceba que a caminhada sozinho pode ser mais rápida, mas muito mais vazia... Quando eu tiver sede, que encontre a fonte no caminho, e quando eu me perder, que ache a indicação, a seta, a direção... Que eu não siga os que desviam, mas que ninguém se desvie seguindo os meus passos... Que a pressa em chegar não me afaste da alegria de ver as flores simples que estão a beira da estrada, que eu não perturbe a caminhada de ninguém, que eu entenda que seguir faz bem, mas que, às vezes, é preciso ter-se a bravura de voltar atrás e recomeçar e tomar outra direção... Que eu não caminhe sem rumo, que eu não me perca nas encruzilhadas, mas que eu não tema os que me assaltam, os que embuçam, mas que eu vá onde devo ir e, se eu cair no meio do caminho, que fique a lembrança de minha queda para impedir que outros caiam no mesmo abismo... Que eu chegue, sim, mas, ainda mais importante, que eu faça chegar quem me perguntar, quem me pedir conselho e, acima de tudo, me seguir confiando em mim!

(Ponsancini)

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas	i
Resumo	v
<i>Abstract</i>	vi
1 – INTRODUÇÃO	1
1.1 – A transcrição em eucariotos	1
1.2 – Elementos estruturais e funcionais na modulação da expressão gênica em eucariotos	5
1.2.1 – Intron	5
1.2.2 – Z-DNA	13
1.3 – Principais promotores utilizados em vetores para expressão de proteínas heterólogas em células de mamífero: o promotor de CMV e o intron A	17
1.4 – A produção de proteínas recombinantes em células de mamífero	20
1.5 – Modelo Experimental	22
2 – OBJETIVOS	23
3 – MATERIAIS E MÉTODOS	25
3.1 – Materiais	25
3.1.1 – Linhagens bacterianas	25
3.1.2 – Linhagens de células de mamífero	25
3.1.3 – Plasmídios utilizados nas clonagens e transfecções	26
3.1.4 – Meios de Cultura	29
3.1.5 – Soluções	31
3.1.6 – Antibióticos	35
3.1.7 – Materiais e soluções para a mensuração da atividade da luciferase	37
3.1.8 – Materiais e soluções para a extração de RNA total de CHO-K1	37

3.1.9 – Tampões de Reação	39
3.1.10 – Enzimas	41
3.1.11 – Marcadores de massa molecular de DNA	43
3.1.12 – Oligonucleotídeos utilizados para seqüenciamento, clonagens e reações de PCR	44
3.2 – Métodos	47
3.2.1 – Preparo e transformação de células competentes de <i>Escherichia coli</i>	47
3.2.2 – Preparação de DNA plasmidial	50
3.2.3 – Extração e purificação de DNA de gel de agarose	54
3.2.4 – Digestão de DNA plasmidial com enzimas de restrição	56
3.2.5 – Reação de defosforilação com a enzima SAP (fosfatase alcalina de camarão) ..	56
3.2.6 – Reação de polimerização de extremidades de DNA utilizando o fragmento Klenow da DNA polimerase I	56
3.2.7 – Reação de anelamento de oligonucleotídeos	56
3.2.8 – Análise de DNA em gel de agarose	57
3.2.9 – Ligaçao de fragmentos de DNA	57
3.2.10 – Seqüenciamento de DNA com o kit <i>DYEnamic ET DYe Terminator Cycle Sequencing kit for MegaBACE</i>	57
3.2.11 – Precipitação de DNA utilizando glicogênio como carreador	58
3.2.12 – Cultura de células	58
3.2.13 – Ensaio de atividade da luciferase utilizando o <i>Kit Dual Luciferase Assay System</i>	63
3.2.14 – Análise estatística dos valores de atividade da luciferase	64
3.2.15 – Extração de RNA total de células de mamífero (CHO-K1) com o reagente Trizol	65
3.2.16 – Tratamento do RNA total extraído de CHO-K1 com DNase RNase free	66
3.2.17 – Síntese do DNA complementar (cDNA) por meio de transcrição reversa (RT) com a enzima transcriptase reversa Superscript III	66
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	67

4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO	70
4.1 – Clonagem dos elementos gênicos	70
4.1.1 – Clonagem do promotor de CMV sem intron (pGLCMVI-)	71
4.1.2 – Clonagem do promotor de CMV com intron A (pGLCMV)	72
4.1.3 – Construção de versões deletadas do intron A	74
4.1.4 – Introdução de seqüências indutoras de Z-DNA no vetor pGLCMV	75
4.1.5 – Construção do vetor pMACIA scFvZ22 NLS	77
4.2 – Determinação dos níveis de expressão gênica das diferentes construções em células de mamífero	86
4.2.1 – O cultivo de diversas linhagens de células de mamífero	86
4.2.2 – Transfecção Transiente	86
4.2.2.1 – Efeito do intron A inteiro na atividade da luciferase nas linhagens celulares CHO-K1, CÓS-7, HepG2 e HEK-293	87
4.2.2.2 – Efeito das deleções do intron A na atividade da luciferase nas linhagens celulares CHO-K1, CÓS-7, HepG2 e HEK-293	90
4.2.2.2.1 – Efeito do intron A inteiro e deletado na expressão do mRNA da luciferase de vaga – lume	95
4.2.2.2.2 – Análise do <i>splicing</i> do intron A nas construções com intron A inteiro e deletado	106
4.2.2.3 – Efeito da remoção da região 5’ do promotor/ <i>enhancer</i> de CMV.....	109
4.2.2.4 – Efeito dos oligonucleotídeos indutores de Z-DNA na atividade da luciferase em células CHO-K1	111
4.2.3 – Transfecção Estável	112
5 – CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	115
6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	119

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	11
Figura 3. Três principais conformações assumidas pelo Z-DNA	14
Figura 4. Conformação espacial das bases nitrogenadas no DNA	15
Figura 5. Conformação adotada pela fita de DNA quando há a movimentação do aparato transcricional	16
Figura 6. Esquema do promotor completo de CMV	19
Figura 7. Mapas dos vetores utilizados para as clonagens do promotor com e sem intron A	27
Figura 8. Mapa do vetor pGL4.73 (Promega)	27
Figura 9. Mapas dos vetores pMACIA e pIg16, utilizados para a construção do pMACIA scFvZ22 NLS	28
Figura 10. Clonagem do promotor de CMV sem intron, resultando no vetor pGLCMVI-	71
Figura 11. Clonagem do promotor de CMV com intron A, resultando no vetor pGLCMV	73
Figura 12. Deleções realizadas no intron A de CMV	74
Figura 13. Anelamento dos oligonucleotídeos Z1, Z3 e Z5 e clonagem no vetor pGLCMV	75
Figura 14. Alinhamento da seqüência dos vetores pGLCMVZ5 (painel A) e pGLCMVZ3 (painel B)	77
Figura 15. Obtenção do fragmento scFvZ22 NLS – 1ª etapa	79
Figura 16. Obtenção do fragmento scFvZ22 NLS – 2ª etapa	81
Figura 17. Seqüência do scFvZ22 NLS	83
Figura 18. Clonagem do fragmento scFvZ22 NLS no vetor pMACIA	85
Figura 19. Efeito do intron A inteiro na atividade da luciferase em CHO-K1 (painel A), COS-7 (painel B), HepG2 (painel C) e HEK-293 (painel D)	88
Figura 20. Efeito das deleções do intron A na atividade da luciferase em CHO-K1 (painel A), HepG2 (painel B), COS-7 (painel C), e HEK-293 (painel D)	91

Figura 21. Curvas de amplificação das amostras com os iniciadores para os genes de GAPDH de <i>hamster</i> (painel A), da luciferase de <i>Renilla</i> (painel B) e para a luciferase de vaga-lume (painel C)	97
Figura 22. Curvas de dissociação dos iniciadores dos genes de GAPDH (painel A), luciferase de <i>Renilla</i> e vaga-lume (painel B)	99
Figura 23. Validação da reação de RT-qPCR para a quantificação relativa da expressão gênica da luciferase de vaga-lume	100
Figura 24. Ensaio de RT-qPCR utilizando o normalizador GAPDH	101
Figura 25. Ensaio de RT-qPCR utilizando o normalizador luciferase de <i>Renilla</i>	102
Figura 26. Análise do <i>splicing</i> nas construções contendo o intron A deletado	108
Figura 27. Efeito da deleção da região 5' do promotor/ <i>enhancer</i> de CMV na atividade da luciferase em CHO-K1 (painel A) e COS-7 (painel B)	110
Figura 28. Efeito dos oligonucleotídeos Z1, Z3 e Z5 na atividade da luciferase 24 e 48 horas pós-transfecção em CHO-K1	111
Figura 29. Efeito do anticorpo anti-Z-DNA na forma scFv Z22 com sinal de localização nuclear (NLS) em clones estáveis de Z3 e Z5 (CHO-K1)	113
Figura 30. Mecanismos que ocasionarão aumentos na expressão de um determinado gene de interesse quando os elementos são colocados em um mesmo vetor para expressão heteróloga	118

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Relação das proteínas terapêuticas produzidas em CHO-K1	20
Tabela 2. Sequências dos oligonucleotídeos utilizados nas diversas etapas deste trabalho	44
Tabela 3. Valores médios de Ct das amostras amplificadas com os iniciadores para GAPDH e luciferase de <i>Renilla</i>	104

LISTA DE ABRAVIATURAS

ATP – nucleotídeo trifosfato de adenosina

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

Z-DNA – DNA na conformação Z

η g - nanograma

η mol - nanomol

ρ mol - picomol

τ – tempo de passagem da corrente elétrica

Ω – 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

Foram construídos plasmídios com o promotor de CMV sem intron (pGLCMVI), com intron A (IA) completo (pGLCMV) e deletado em 200 (pGLCMVΔ200), 400 (pGLCMVΔ400) e 600 pb (pGLCMVΔ600), dirigindo a expressão do gene repórter da luciferase, além de diferentes seqüências indutoras de Z-DNA localizadas a montante do promotor. Estas construções foram transfectadas de forma transiente em células CHO-K1, COS-7, HepG2 e HEK-293. O IA aumentou em 100 a 1.000 vezes a atividade da luciferase em relação à construção sem intron, dependendo da linhagem celular testada. Dentre as versões deletadas do intron, a construção pGLCMVΔ200 foi a mais eficiente, aumentando de 3 a 6 vezes a atividade da luciferase, seguida da construção pGLCMVΔ600, cuja atividade melhorou em até 4 vezes, comparado com o IA selvagem. Entretanto, a remoção de 400 pb do IA resultou na redução da expressão gênica a níveis quase comparados aos da construção sem IA. Tomados em conjunto, esses dados sugerem a existência de uma região de ligação a um fator transcricional de inibição no fragmento de 200 pb. Os dados da atividade da luciferase foram corroborados com experimentos de RT-qPCR, que relacionaram o aumento da atividade da enzima com o aumento da expressão do gene nas diferentes construções testadas. O *splicing* nas construções com IA deletado foi estudado por RT-PCR, mostrando que há evidências de que não há processamento correto dos exons 1 e 2 de CMV quando o sítio acceptor é removido. Foi estudado o efeito da remoção da região 5' do promotor de CMV em CHO-K1 e COS-7, que resultou em uma redução de 50% da atividade da luciferase. Dentre os vetores contendo as seqüências indutoras de Z-DNA que também foram transfectados de forma transiente em CHO-K1, apenas naquele em que foi clonada a seqüência Z3 observou-se um aumento de 50% na atividade da luciferase comparado com a seqüência-controle Z5. Foram desenvolvidos clones estáveis de CHO-K1 com esta construção a fim de verificar o potencial de formação de Z-DNA desta seqüência na região adjacente ao promotor. Nestes clones estáveis, transfectou-se de forma transiente o plasmídeo pMACIA scFvZ22 NLS, um fragmento de anticorpo anti-Z-DNA. A atividade da enzima aumentou em 3 vezes quando este elemento em *trans* foi adicionado ao sistema de expressão, indicando que esta seqüência realmente forma Z-DNA e que a modulação da expressão gênica ocorre em níveis transcricionais. Portanto, neste trabalho foi mostrado que o IA e suas deleções inovadoras, bem como seqüências indutoras de Z-DNA, podem melhorar a expressão gênica, sendo ferramentas importantes para a otimização da expressão de proteínas de interesse comercial em células de mamífero.

ABSTRACT

It had been constructed plasmids with the promoter of CMV and the luciferase reporter gene comprising the following features: without the CMV intron A (IA) (pGLCMV I-), with the full IA (pGLCMV) or the deleted versions of it (pGLCMV Δ 200, pGLCMV Δ 400 and pGLCMV Δ 600), and Z-DNA inducer sequences upstream the promoter. These constructions had been transiently transfected in CHO-K1, COS-7, HepG2 and HEK-293 cells. The whole intron A resulted in a 100 to 1000-fold increase in the activity of luciferase compared to the intronless version, depending on the cell line tested. The pGLCMV Δ 200 construction had also enhanced in 3 to 6-fold the luciferase activity compared to the wild-type IA. Following the results obtained with the construction above, the IA deleted in 600 pb had improved the luciferase activity no more than 4 times, depending on the cell line used. The pGLCMV Δ 400 construction, instead, resulted in a reduction of gene expression to levels similar to the intronless construction. Taken together, these data suggest that there are a binding region for an inhibitory transcription factor comprising the 200 pb fragment. The data of the activity of luciferase had been corroborated with experiments of RT-qPCR, which had correlated the increases of luciferase activity for the different constructions above with the increase of the expression of the gene of luciferase. To verify the effect of *splicing* in the constructions with the deleted IA, a RT-PCR experiment was carried through showing that the removal of the donor *splicing* site might have a relation with the incorrect processing of exons 1 and 2 of the CMV IE gene. Amongst the Z-DNA-inducer sequences cloned upstream the CMV promoter, the Z3 sequence resulted in a 2-fold increase of the transient luciferase activity when compared to the control-sequence Z5. As a result, it had been developed stable clones of CHO-K1 cells with this sequence in order to verify if the sequence in question exerts its activity by means of the formation of Z-DNA in the adjacent region to the promoter. In these stable clones, it had been transiently transfected the pMACIA scFvZ22NLS plasmid, that codes for an antibody fragment anti-Z-DNA. The values of the luciferase activity had increased 3 times when this element in *trans* it was added to the expression system, indicating that this sequence really forms Z-DNA and that the effect observed occurs in transcriptional levels. Therefore, in this work it was shown that the intron A and its innovative deletions, as well as Z-DNA-inductive sequences, can improve the gene expression, being important tools for the optimization of clinical relevant protein expression in mammalian cells.

1. Introdução

1.1) A transcrição em eucariotos

Em 1998, Ruvkin e Robert mapearam aproximadamente 20000 genes no verme nematóide *Caenorhabditis elegans*. Pouco depois, em 2000, Adams e colaboradores identificaram em torno de 14000 genes em *Drosophila melanogaster*. Esses dados, quando comparados com os apresentados pelo genoma humano, com aproximadamente 30000 genes (Baltimore, D. 2001; Lander *et al*, 2001), indicam que a complexidade dos organismos existentes no planeta não pode se relacionar com o número de genes que eles possuem. Portanto, o que determina a variabilidade das espécies e a complexidade das mesmas é a regulação diferencial de seus genes, ou seja, os diferentes processos que ocorrem para proporcionar maior flexibilidade ao genoma. Além disso, outros fatores podem estar relacionados a esta complexidade genômica, como a presença de RNAs não codificadores e do *splicing* alternativo. Desse modo, quando maior a complexidade do organismo em questão, maior será a variedade de mecanismos de regulação existentes. Com isso, para que se entenda a complexidade do sistema transcricional eucariótico é necessário o estudo dos promotores eucarióticos, bem como o processo transcricional em si.

* *Estrutura dos promotores eucarióticos*

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 de leitura aberta (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.

Entretanto, 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*), e o Elemento de reconhecimento a TFIIB (BRE) (Smale e Kadonaga, 2003). 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.

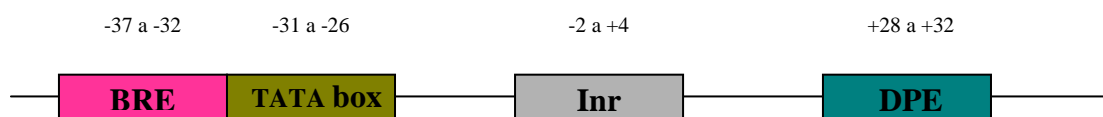


Figura 1. Localização dos componentes básicos de um promotor eucariótico. Esse esquema mostra alguns dos elementos que podem contribuir para a transcrição basal a partir do promotor. Acima dos retângulos coloridos são mostradas as possíveis regiões de ocorrência dessas seqüências dentro do promotor. Esquema adaptado de Smale e Kadonaga (2003).

- 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). 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 transcricionais 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 transcricional (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 (Butler 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 transcricional. 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 de outros fatores como TFII-I (Roy *et al*, 1991; Cheriyaath *et al*, 1998) e YY1 (Weis e Reinberg, 1997). Desse modo, a interação seqüência-específica destas proteínas com o elemento Inr de promotores eucarióticos leva a crer que elas participam ativamente do processo transcricional.

- DPE

Este 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. Além dos estudos avançados da importância desta seqüência em promotores de *Drosophila*, ela também foi identificada em humanos (Burke e Kadonaga, 1997; Zhou e Chiang, 2001). Estima-se que a seqüência 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

Este elemento é um sítio de ligação ao fator TFIIB, localizado imediatamente a montante do TATA box (Langrange *et al*, 1998). Sua seqüência 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 seqüência 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 seqüência-específico, o que favorece a regulação do processo da transcrição em eucariotos.

** 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 transcricionais (neste trabalho foram utilizadas seqüências de AP-1, CArG, NF-κB 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*.

Outros elementos em *cis* que podem ser adicionados nas regiões próximas a promotores para a modulação da expressão gênica em eucariotos são os introns e seqüências indutoras de Z-DNA. Estes elementos serão mais bem detalhados nos tópicos 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 correspondente transcrito de RNA por meio de um processo denominado *splicing*. Mais tarde, verificou-se que este evento é mediado por um complexo composto por ribonucleoproteínas e pequenos RNAs (snRNAs, do inglês *small RNAs*), conhecido como *spliceossomo*. Este complexo é responsável por cortar 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 dos introns e 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 abrange 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) melhoraram a expressão do Fator IX humano (FIX) plasmático com a inserção de um íntron entre o primeiro e o segundo exon do FIX. Estudos da função dos introns também foram realizados em plantas. Boudon 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 α -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. 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?

**Efeito dos introns em nível de DNA*

O efeito dos introns na otimização 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 remodelamento da cromatina, permitindo um aumento de até quinze vezes da produção da proteína comparando-se com a versão sem intron (Liu *et al*, 1995). Este remodelamento da cromatina 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 promotor 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 TFIID 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 TFIID com U1 foi verificada com experimentos *in vitro*, incubando-se diversos fatores de transcrição com RNAs randômicos. Após a ligação destes RNAs aos fatores transcripcionais utilizando T4 RNA ligase e fósforo marcado radioativamente, foi identificado um produto de aproximadamente 160 pb ligado ao fator TFIID, o 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 é proporcional à transcrição gênica, sendo que quanto maior a distância entre eles, menor é taxa de transcrição (Furger *et al*, 2002). Neste caso, foram clonados 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 próximo ao promotor, bem como a do intron mais distal, tiveram 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 a 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, apenas a construção com o intron distal foi capaz de aumentar a atividade do gene repórter.

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.

Sobre a interação do *splicing* com os estágios da iniciação da transcrição, Zorio e Bentley (2004) revisaram o papel do domínio C-terminal da RNA polimerase II (CTD). Os autores descrevem que a deleção deste domínio CTD inibe os três principais passos do processamento do pré-mRNA: a adição do cap, o *splicing* e a poliadenilação. Desse modo, eventos considerados tardios no metabolismo do RNA estão relacionados com a iniciação da transcrição, por meio da interação de suas maquinarias com a região CTD, um componente-chave para o processo transcricional em eucariotos.

Interação do **splicing com eventos de processamento de pré- mRNAs – efeito dos introns*

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 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.

**Efeito dos introns nos processos tardios do metabolismo do mRNA (transporte 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 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, de genes contendo introns, algumas proteínas responsáveis pelo transporte do transcrito, como Aly/REF, interagem com o RNA independentemente do *splicing*. Os autores verificaram essa afirmação 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 *in 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 *Saccharomyces cerevisiae*, esse reconhecimento independe de proteínas do EJC e do *splicing* (Conti e Izaurralde, 2005).

A iniciação 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.

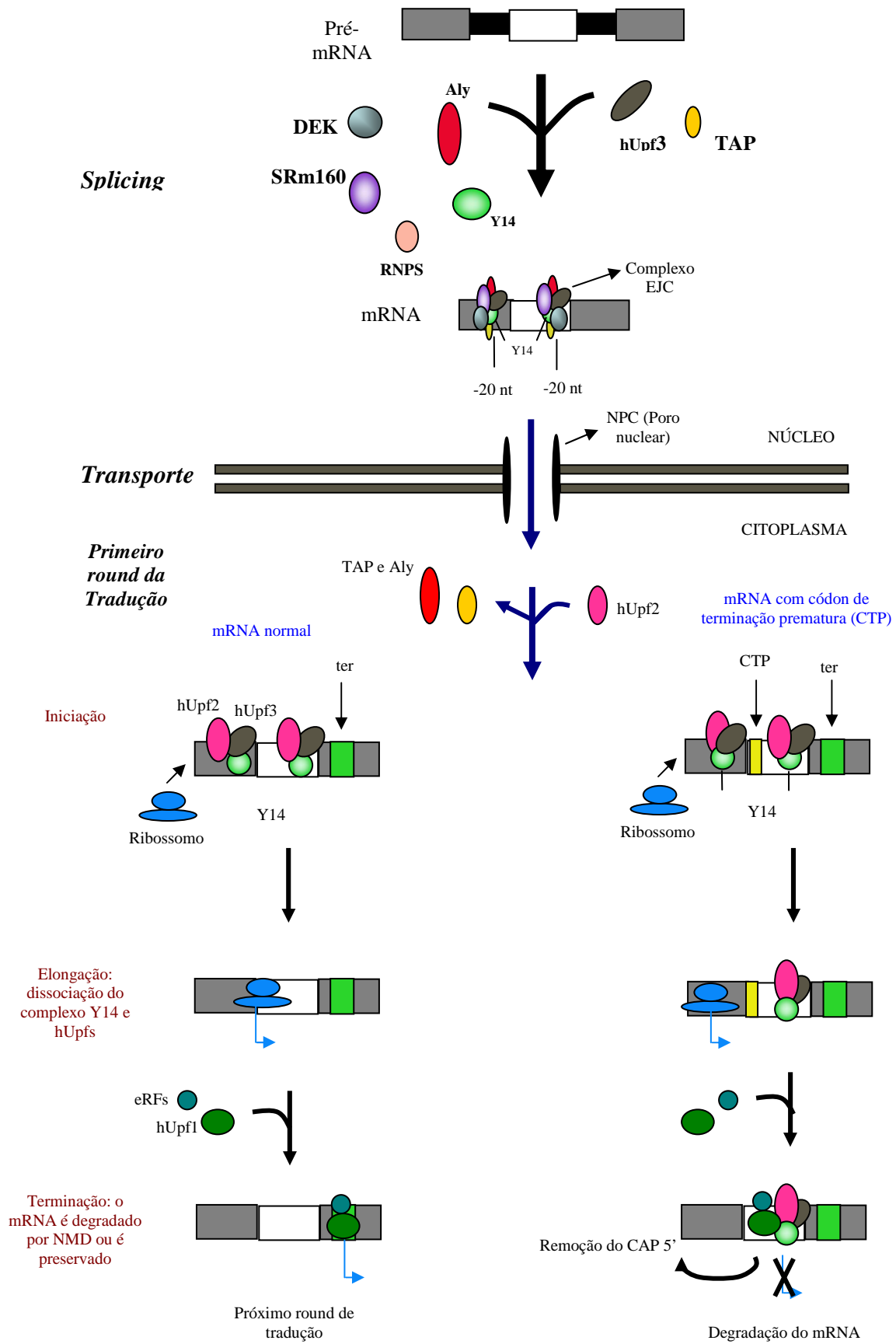


Figura 2. Ligação funcional entre o *splicing*, o transporte do mRNA núcleo-citoplasmático e o NMD, com a participação das proteínas do EJC. O EJC consiste de proteínas que se ligam ao mRNA produzido no núcleo por *splicing*. Após o transporte, algumas proteínas do EJC permanecem ligadas ao mRNA já no 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 *et al*, 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.

1.2.2) Z-DNA

O DNA pode assumir três conformações distintas: a forma A, B e Z (figura 3). A primeira conformação não é encontrada naturalmente nos seres vivos, e a hélice gira para a direita, sendo necessários 11 pares de base para que haja uma volta completa na hélice. Geralmente observa-se o A-DNA quando há poucas moléculas de água no meio para interagir com a hélice ou em alguns complexos DNA-proteína. O B-DNA é a forma mais encontrada nos seres vivos, e também tem a direção de rotação para a direita. Entretanto, esta forma é mais longa e fina do que o A-DNA, precisando-se de 10 pares de base para que se complete uma volta na hélice. O Z-DNA, ao contrário das outras duas formas, tem a orientação da hélice para a esquerda, e requer 12 pares de base para que se complete uma volta inteira na hélice. Este tipo ocorre geralmente quando há uma grande concentração iônica no meio.

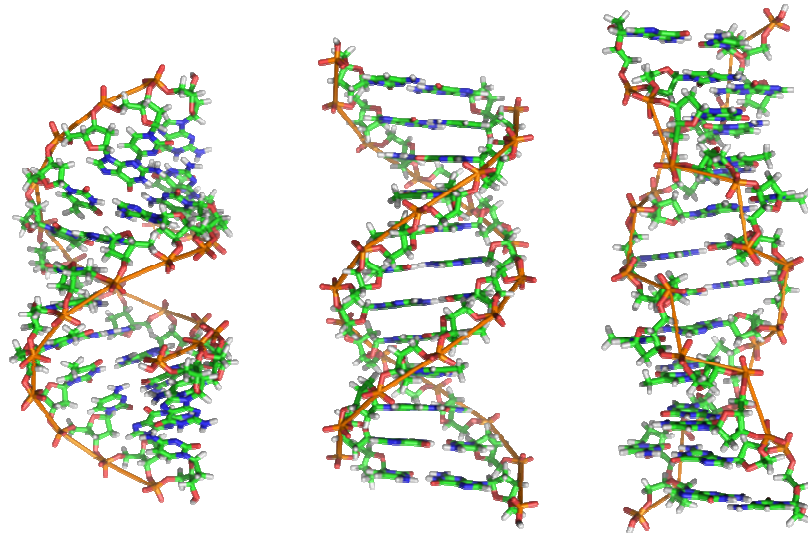


Figura 3. Três principais conformações assumidas pelo DNA. Da esquerda para a direita, observa-se o A-DNA, o B-DNA (o mais encontrado nos seres vivos) e o Z-DNA. Figura retirada do site http://pt.wikipedia.org/wiki/%C3%81cido_desoxirribonucleico em 20 de dezembro de 2007.

A mudança da conformação B para a Z requer um super-enrolamento negativo da molécula de DNA (Wolfl *et al*, 1996). Outro fator que estabiliza a conformação Z do DNA é a alta concentração de sais em solução devido à redução da repulsão eletrostática entre os grupamentos fosfato (Blackburn e Gait, 1995 em Lim e Feng, 2005). Além disso, o Z-DNA pode se formar quando ocorrem seqüências específicas no DNA que mostrem a alternância entre purinas e pirimidinas. Nessa situação, as bases púricas assumem uma conformação *sin* e as pirimidinas uma conformação *anti* em relação à pentose (figura 4) (Wolfl *et al*, 1995 em Lim e Feng, 2005).

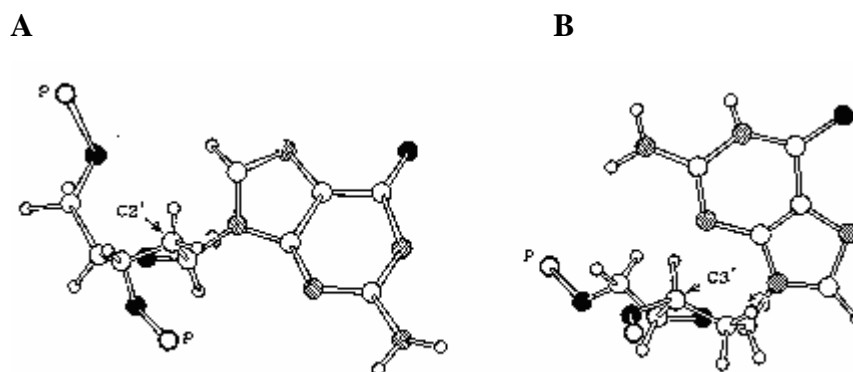


Figura 4. Conformação espacial das bases nitrogenadas no DNA. Em “a” observa-se a base guanina em conformação *anti* em relação à pentose. Em “b” pode ser verificada a conformação *sin* da guanina em relação à pentose. Na conformação Z do DNA, as purinas encontram-se na conformação *sin*, como se observa em “b”. O B-DNA, ao contrário, possui as purinas na conformação *anti*. Figura retirada, em 12 de dezembro de 2007, do site <http://www.personal.psu.edu/rch8/workmg/Struc Nucleic Acids Chpt2.htm>.

O tipo de seqüência mais relatada na literatura que induz a conformação Z no DNA é a alternância $(G.C)_n$ (Klysik *et al*, 1982; McLean e Weels, 1988; Peck *et al*, 1982 e Schroth *et al*, 1992). Entretanto, outras seqüências já se mostraram indutoras de Z-DNA, como a repetição $(A.T)_n$ flanqueada por pequenas regiões de até 5 repetições de $(G.C)$, a repetição $(T.G)_n$ e a repetição $(A.C)_n$ (McLean e Weels, 1988). Apenas a repetição $(A.T)_n$, ao contrário, inibe fortemente a formação do Z-DNA mesmo em condições de grandes torções negativas, sendo capaz de induzir a conformação cruciforme no DNA (McLean e Weels, 1988 e McClellan *et al*, 1986).

Regiões de Z-DNA ocorrem naturalmente no genoma de eucariotos. Entretanto, pouco se sabe da função biológica das ilhas de Z-DNA nestes locais. Schroth e colaboradores (1992) mapearam, por meio de um programa computacional, potenciais seqüências formadoras de Z-DNA no genoma humano, verificando que a maioria delas encontrava-se basicamente em regiões que flanqueiam a extremidade 5' dos genes avaliados, dentre eles o da β -actina, fator VII de coagulação, desmina e apolipoproteína A-I. Na época, o genoma humano ainda não estava completo, sendo que foram avaliados apenas 137 genes completos. Devido à localização dessas regiões próxima a promotores de genes do cromossomo estudado, especula-se que o Z-DNA esteja relacionado com a transcrição do DNA.

Liu e Wang, em 1987, propuseram um modelo no qual, durante a transcrição, a topologia de domínios locais do DNA é dinâmica, havendo o acúmulo de torção positiva à

direita do aparato transcricional e torção negativa à esquerda (figura 5). No caso de procariotos, a torção positiva é anulada pela enzima DNA girase e a negativa é eliminada pela DNA topoisomerase I. Mas em organismos com aparato transcricional mais complexo, considera-se que a formação de Z-DNA em regiões gênicas específicas tenha um importante papel na própria regulação da transcrição, facilitando a abertura da fita e anulando os efeitos de torções negativas, visto que o Z-DNA é estabilizado pelas torções negativas formadas pelo aparato transcricional.



Figura 5. Conformação adotada pela fita de DNA quando há a movimentação do aparato transcricional. “R” é o aparato transcricional, que se movimenta na direção indicada pela seta. À direita, há um acúmulo de torção positiva na molécula de DNA, enquanto que à esquerda, observa-se um acúmulo de torção negativa. Figura retirada de Liu e Wang, 1987.

Com isso, estudos verificando o real potencial de seqüências formadoras de Z-DNA modularem a expressão gênica começaram a ser realizados. Em 2002, Oh e colaboradores estudaram a ativação da transcrição do gene repórter da β -galactosidase em leveduras. Clonou-se a montante do promotor do gene repórter um oligonucleotídeo que induz a formação de Z-DNA no plasmídeo, fusionando-se ao domínio de ativação da proteína Gal4 o domínio de ligação a Z-DNA, conhecido como Z_{α} . Quando este domínio ligou-se à região formada pelo oligonucleotídeo clonado, a região em Z-DNA próxima ao promotor foi estabilizada, funcionando como um *enhancer* transcricional e aumentando a expressão do gene repórter em estudo. O domínio Z_{α} é um domínio de ligação a Z-DNA presente na enzima Deaminase de Adenosina de RNA-fita dupla (*double stranded RNA adenosine deaminase*), ou ADAR1. (Hebert e Rich, 1996; Schade *et al*, 1999, Kim *et al*, 1994). A caracterização deste domínio ligante a Z-DNA foi importante para os estudos de localização de Z-DNA *in vivo*, bem como a caracterização de anticorpos que reconhecem Z-DNA, como o Z22 (Sanford e Stollar, 1990; Andrade *et al*, 2000 e Brígido e Stollar, 1991).

Corroborando a tese de aumento da taxa de transcrição gênica por meio da formação de Z-DNA, um estudo abordou a ativação do gene CSF1 (*colony-stimulating*

factor 1) por meio de BRG1 (uma subunidade com atividade ATPásica que compõe o complexo BAF de remodelamento da cromatina por meio de modificações nas histonas), resultando na formação de Z-DNA na região promotora deste gene (Liu *et al*, 2006). Quando inativo, o gene CSF1 tem uma região constituída por uma repetição TG, que fica escondida no nucleossomo. Entretanto, a ativação por BRG1 desestabiliza este nucleossomo, ocasionando a formação de uma região expandida de Z-DNA. Porém, não é a transcrição ativa do gene que acarreta a formação do Z-DNA, visto que essa conformação já é observada mesmo quando o gene não está sendo transcrito. A região que contém o Z-DNA se expande à medida que a transcrição ocorre. Experimentos mostraram, ainda, que em construções gênicas sem a repetição TG presente na região promotora não se observou a formação de Z-DNA.

Outro estudo mostrando a importância biológica do Z-DNA na regulação da transcrição gênica foi realizado por Wolfl e colaboradores em 1996. Neste trabalho, os autores demonstraram que o gene do hormônio liberador de corticotropina humano (*human corticotropin-releasing hormone*) tem sua expressão dependente da formação de Z-DNA próxima à região do promotor. Isso foi verificado com a permeabilização do núcleo da célula estudada e o tratamento com um anticorpo que reconhece Z-DNA, indicando a presença desta conformação na região transcricional. Foi observado neste trabalho que a inibição da transcrição deste gene com a adição de dexametasona no meio de cultura também inibe a formação de Z-DNA na região próxima ao promotor (Wolfl *et al*, 1996).

Demonstrou-se que o Z-DNA está associado à modulação da expressão gênica em eucariotos. Desse modo, a adição de seqüências indutoras de Z-DNA em regiões próximas a promotores é uma ferramenta importante na construção de vetores para expressão em eucariotos.

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 quiméricos e que possuem diversos elementos moduladores como os descritos neste trabalho, os introns e seqüências indutoras de Z-DNA. Desse modo, uma forma de se otimizar a expressão de

proteínas heterólogas em eucariotos, como por exemplo, em células de mamíferos, é construir vetores plasmidiais que contêm os promotores engenherados.

Dentre os principais promotores utilizados na construção de vetores para expressão em células de mamífero, destacam-se o promotor de 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, foram testadas 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 (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* (Champman *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 (Champman *et al*, 1991; Hennighausen e Fleckenstein, 1986). Neste mesmo estudo, observou-se 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 (Champman *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 6 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

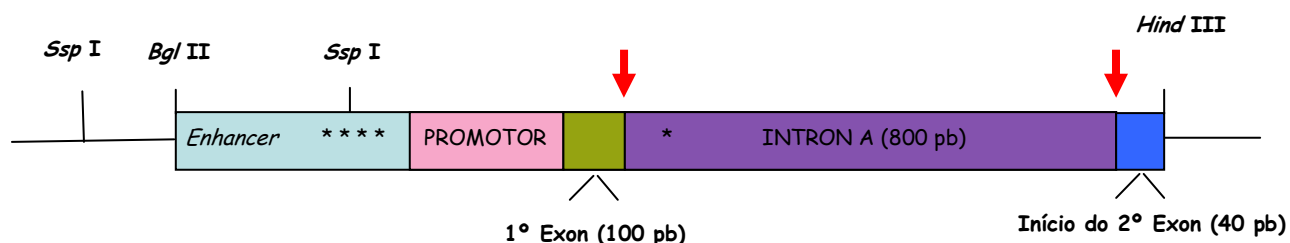


Figura 6. Esquema do promotor completo de CMV. O *enhancer* com os 4 sítios de NF1 (*), o primeiro e o segundo exon e o intron A, o maior intron deste gene, com aproximadamente 800 pb, podem ser observados na figura. O intron A possui ainda o sítio mais forte de ligação a NF1, representado por (*). As setas vermelhas indicam os sítios de *splicing*, sendo que a primeira seta evidencia o sítio doador e a segunda o sítio aceptor de *splicing*. Os sítios de restrição utilizados para a clonagem deste promotor foram evidenciados.

Diversos grupos de pesquisa utilizaram o IA com sucesso em suas construções, comparando níveis de expressão de diversas proteínas na presença e ausência do intron. Já se sabe que a adição de introns em construções gênicas é capaz de aumentar os níveis de produção de proteínas por diversos mecanismos já citados nesta introdução. Desse modo, alguns dos estudos realizados foram a análise da expressão de anticorpos (Xia *et al*, 2006), do fator VIII humano de coagulação e da gp120 de HIV (Champman *et al*, 1991), além de proteínas repórteres, como a luciferase (Xu *et al*, 2001). 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*, no prelo), 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 produzida a primeira proteína recombinante com fins terapêuticos em células de mamífero, a proteína ativadora de plasminogênio tissular humana (*human tissue plasminogen activator*) (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).

O tipo celular mais utilizado até então para tais fins é a linhagem parental imortalizada de células de ovário de *hamster* chinês (*Cricetulus griseus*) (CHO), sendo que inclusive a proteína ativadora de plasminogênio tissular humana foi produzida nesta linhagem. Essas células são epiteliais, têm a morfologia fibroblastóide e são aderentes ao material plástico 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 com fins comerciais produzidas em CHO</i>	<i>Referência</i>
Calicreína 9 humana	Memari, <i>et al</i> (2006)
Eritropoietina humana	Restelli <i>et al</i> (2006)
Anticorpo anti-IL2	Shi <i>et al</i> (2005)
Glicoproteínas do vírus da herpes B	Perelygina <i>et al</i> (2005)
Fator VIII humano	Yonemura <i>et al</i> (1993)

Atualmente, utilizam-se outros tipos celulares para a produção de proteínas heterólogas com fins terapêuticos. Dentre eles, destaca-se a linhagem HEK293, derivada de células embrionárias de rim humano transformadas 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 em larga escala 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 à otimização 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 em 1986, que tinha um rendimento de 50 mg/L de proteína recombinante. Quatorze anos depois, já se conseguia um rendimento de 5g/L de proteínas (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, pesquisas buscando o desenvolvimento de novos métodos para melhorar os níveis de produção de biofármacos e tentar otimizar essa relação de custo-benefício estão sendo realizadas, para que deste modo, se atinja um patamar de produção industrial. 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*, 1999); a melhora da eficiência de transfecção 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 introns e seqüências indutoras de Z-DNA.

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, 2001) e anti-CD3 (Hernandez Silva, 2008 – em preparação), e também fatores plasmáticos humanos, como o fator VIII e IX (Campos-da-Paz *et al*, no prelo). Todos os vetores que albergam estes genes contêm o promotor de CMV, sendo este nosso modelo de estudo. 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.

2. OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivo a caracterização e o estudo do intron A de CMV e de seqüências indutoras de Z-DNA, no contexto do promotor do gene IE de CMV, como elementos moduladores da expressão gênica em diferentes linhagens de células de mamífero.

2.1) *Abordagem experimental*

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

- 1 – Clonagem do promotor de CMV, com e sem o intron A, no vetor pGL4.14 (Promega) 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 – Remoção da região 5' do promotor/*enhancer* de CMV com intron A, e nesta região clonagem das seqüências indutoras de Z-DNA Z1, Z3 e do controle Z5.
- 4 – Transfecção transiente das construções citadas acima em CHO-K1, HepG2, COS-7 e HEK-293 para a mensuração da atividade da luciferase. As construções com as seqüências indutoras de Z-DNA foram analisadas apenas em CHO-K1.
- 5 – Clonagem do gene que codifica o fragmento de anticorpo scFv anti-Z-DNA Z22 contendo uma seqüência codificadora de um sinal de localização nuclear (NLS) e a proteína A e His-TAG como elementos para a detecção e isolamento da proteína.
- 6 – Produção de clones estáveis com as construções contendo as seqüências indutoras de Z-DNA e co-transfecção da construção codificadora do fragmento de anticorpo anti-Z-DNA com NLS.

7 – Mensuração dos níveis de produção de mRNA da luciferase de vaga-lume das diversas construções por meio de qPCR.

8 – Análise do *splicing* das variantes deletadas do intron A de CMV por meio de RT-PCR.

3. MATERIAS 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 lacIqZΔM15 Tn10* (Tetr)]. Os genes listados indicam alelos mutantes.
- DH5α: F'/*endA1 hsdR17(r_K⁻m_K⁺) supE44 thi⁻¹ recA1 gyrA* (Nal^r) *relA1 D(lacIZYA-argF)U169 deoR* (F80*dlacD(lacZ)M15*). Os genes listados indicam alelos mutantes.
- XL10-gold (Stratagene): Tet^rD(*mcrA*)183 D(^{mcr}CB-*hsdSMR-mrr*)173 *endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte* [F' *proAB lacIqZDM15 Tn10* (Tet^r) Amy Cam^r]. Os genes listados indicam alelos mutantes. Esta linhagem de *E. coli* foi desenvolvida para a transformação de moléculas de DNA grandes, e com alta eficiência.

3.1.2) Linhagens de células de mamífero

Para a transfecção das construções de DNA plasmidial obtidas neste trabalho, 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).

- COS-7 (ATCC n°CRL-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 n°HB-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 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 7a)**: 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 (*luc 2*), 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.

- **pCMVLacI (Stratagene) (figura 7b)**: este vetor de 8 kb foi utilizado nos procedimentos de clonagem do promotor de CMV com e sem intron A no vetor pGL4.14. Ele possui o promotor completo de CMV (com *enhancer* e intron A), o gene *lacI*, o sinal de localização nuclear (NLS) de SV40 (para que o produto do gene *lacI* seja direcionado para o núcleo), marca de resistência à higromicina B, origem de replicação pUC e f_1 .

- **pGEM-T Easy (Promega)**: este vetor comercial possui o tamanho de 3,15 kb, e foi utilizado para a clonagem de produtos de PCR. É constituído pelo promotor T7 e SP6,

múltiplos sítios de clonagem, gene α LacZ, gene da β -lactamase, origem de replicação de fago (f_1 ori) e origem de replicação plasmidial.

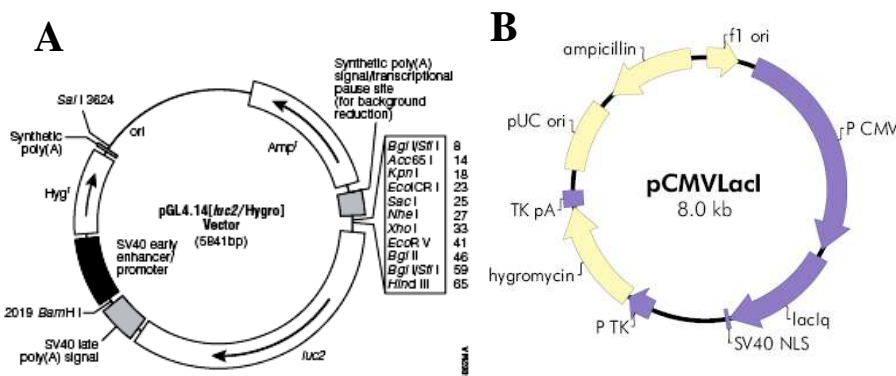


Figura 7. Mapas dos vetores utilizados para as clonagens do promotor com e sem intron

A. 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 de CMV para a análise da atividade do gene repórter da luciferase. Em “B” observa-se o vetor pCMVLac I (Stratagene, figura retirada do site www.stratagene.com), do qual retirou-se o promotor com e sem intron A para as clonagens.

- **pGL4.73 (Promega) (figura 8):** 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.

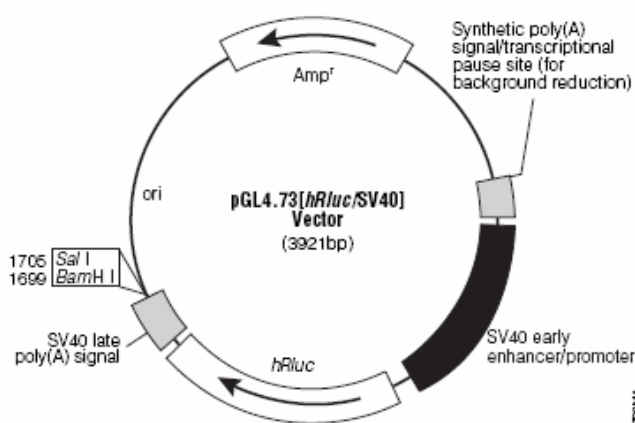


Figura 8. Mapa do vetor pGL4.73 (Promega). Este vetor foi utilizado para a co-transfecção com as demais construções feitas neste trabalho, para que desta forma a atividade da luciferase seja aferida como uma relação entre as atividades da luciferase de vaga-lume (construções testadas) e de *Renilla* (vetor pGL4.73). Esta figura foi retirada do site da Promega (www.promega.com)

- **pMACIA (figura 9a)**: este vetor de aproximadamente 5,5 kb foi construído por Hernandez Silva em 2007 durante sua dissertação de mestrado. Ele é derivado do vetor pMAC (Ruggiero, L. A, 2001 – dissertação de mestrado) pela substituição do promotor mínimo de CMV pelo promotor/*enhancer* de CMV com intron A.

- **pIg16 (Brígido *et al*, 1993) (figura 9b)**: este vetor de 4,1 kb possui o gene que codifica do fragmento de anticorpo na forma scFv Z22, um anticorpo anti-Z-DNA. Ele foi utilizado como substrato para a reação de PCR que permitia a introdução da sequência codificadora de NLS no gene do fragmento de anticorpo na forma scFv (do inglês *single chain variable fragment*) Z22 anti-Z-DNA.

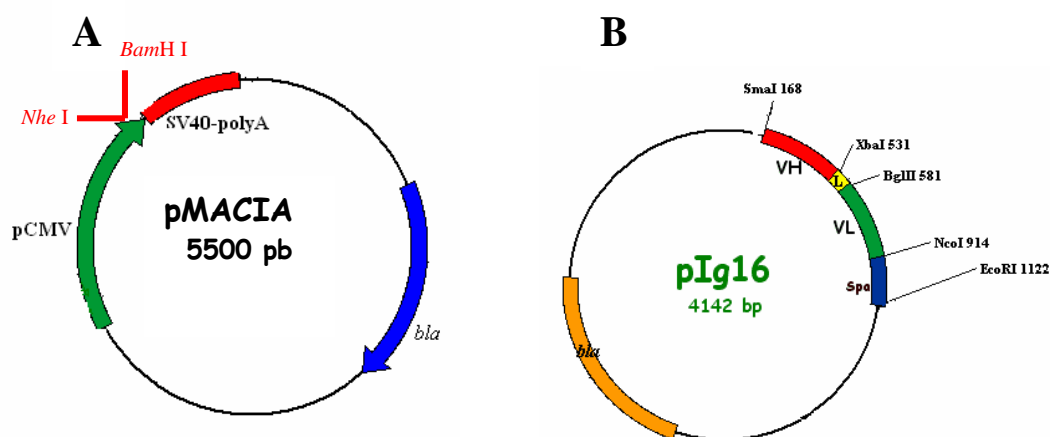


Figura 9. Mapas dos vetores pMACIA e pIg16, utilizados para a construção do pMACIA Z22 NLS. No painel A está representado o esquema do mapa do vetor pMACIA, onde foi clonado o gene do scFv de Z22 com NLS. O vetor pIg16, utilizado para a amplificação do produto correspondente ao scFv Z22 com NLS, está mostrado no painel B. Os sítios de clonagem no vetor pMACIA estão evidenciados em vermelho.

3.1.4) Meios de cultura

- Cultura de bactérias

LB (Luria-Broth)

Peptona de Caseína	1,0% (p/v)
Extrato de Levedura	0,5% (p/v)
NaCl	1,0% (p/v)
pH 7,2	

LB-ágar

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

SB (Super-Broth)

Peptona de Caseína	3,0% (p/v)
Extrato de Levedura	2,0% (p/v)
MOPS	1,0% (p/v)
pH 7,0	

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. Desse modo, 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.

HAM-F12 (Ham's Nutrient Mixture F-12)

Dissolver o conteúdo do pacote em 1L de água destilada e acrescentar 1,176g de bicarbonato de sódio.

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)

Dissolver o conteúdo do pacote em 1L de água destilada e acrescentar 3,7g de bicarbonato de sódio.

RPMI-1640

Dissolver o conteúdo do pacote em 1L de água destilada e acrescentar 2g de bicarbonato de sódio.

Os meios de cultura foram filtrados com filtro Millipore de 0,22µm para esterilização e o pH foi ajustado com NaOH 2M para 7,3.

Meio de Congelamento de Células

DMEM

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

CaCl₂ 0,014gMgSO₄.7H₂O 0,098gNa₂HPO₄ 0,048gKH₂PO₄ 0,06g

Glicose 1g

Vermelho de fenol 0,01g

H₂O qsp 1L

pH 7,3

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

NaCl 8g

KCl 0,4g

Na₂HPO₄ 0,048gKH₂PO₄ 0,06g

Glicose 1g

Vermelho de fenol 0,01g

H₂O 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 Tripan

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

Reagente de transfecção Lipofectamine 2000 (Invitrogen, nº de catálogo 11668019)

É um lipídeo catiônico 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
B-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%. 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.

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 e esterilizado por filtração em membrana Millipore de 0,22 µm. 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.

Higromicina

A higromicina liofilizada foi ressuspensa em água destilada na concentração de 40 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 higromicina foi utilizada para a obtenção de clones estáveis de construções com seqüências indutoras de Z-DNA na linhagem CHO-K1.

Antibiótico/Antimicótico 100X (GIBCO)

Penicilina	10.000U
Estreptomicina	10.000µg
Anfotericina B	25µg/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 ₂ PO ₄	11,5g
KH ₂ PO ₄	2g
NaCl	80g
KCl	2g
pH 7,4	

3.1.8) 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 aliquotado 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 ponteiras 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*.

3.1.9) Tampões de reação

- Tampões de Endonucleases de Restrição da Biolabs (NEB) 1X

NEBuffer 1

Bis-Tris-Propano-HCl	10mM
MgCl ₂	10mM
DTT	1mM
pH 7,0	

NEBuffer 2

Tris-HCl	10mM
MgCl ₂	10mM
DTT	1mM
NaCl	50mM
pH 7,9	

NEBuffer 3

Tris-HCl	50mM
MgCl ₂	10mM
DTT	1mM
NaCl	100mM
pH 7,9	

NEBuffer 4

Tris-acetato	20mM
Acetato de Magnésio	10mM
Acetato de Potássio	50mM
DTT	1mM
pH 7,9	

- Tampões de reação da GIBCO 1X

REACT 2

Tris-HCl	50mM
MgCl ₂	10mM
NaCl	50mM
Espermidina	25mM

- Tampão de reação da enzima Fosfatase Alcalina de Camarão (SAP) – Promega 1X

Tris-HCl	50mM
MgCl ₂	10mM
pH 9,0	

- Tampão de Reação da Enzima T4 DNA Ligase – Promega 1X

Tris-HCl	30mM
MgCl ₂	10mM
DTT	10mM
ATP	1mM
pH 7,6	

- Tampão de Reação da Enzima T4 DNA Ligase – Invitrogen 1X

Tris-HCl	50mM
MgCl ₂	10mM
ATP	1mM
DTT	1mM
Polietileno Glicol (PEG)-8000	25% (p/v)
pH 7,6	

- Tampão de Reação da Taq DNA Polimerase CENBIOT/RS 10X

Tris-HCl	0,1M
KCl	0,5M
BSA	0,1% (p/v)

Na PCR foi adicionado cloreto de magnésio para uma concentração final de 1mM.

- Tampão de Anelamento de Oligonucleotídeos

Tris-HCl	1M
MgCl ₂	100mM
pH 7,6	

- Tampão de Reação da DNase I RNase free 10X (Promega)

Tris-HCl pH 8,0	400mM
MgSO ₄	100mM
CaCl ₂	10mM

- Stop Solution da DNase I RNase free 10X (Promega)

EGTA pH 8,0	20mM
-------------	------

- Tampão de Reação da Transcriptase Reversa (5X RT Buffer) (Invitrogen)

Tris-HCl pH 8,3	250mM
KCl	375mM
MgCl ₂	15mM

- Outros 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.

3.1.10) Enzimas

- Enzimas de Restrição

Biolabs

Bgl II (10U/μL)

Hind III (10U/μL)

Sac II (20U/μL)

Mlu I (10U/ μ L)

Ssp I (5U/ μ L)

Xcm I (5U/ μ L)

BspE I (10U/ μ L)

BssH II (20U/ μ L)

- Outras enzimas

Invitrogen

T4 DNA Ligase (1U/ μ L)

Fragmento Klenow da DNA polimerase (0,5U/ μ L)

Superscript III (transcriptase reversa) (200U/ μ L)

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 μ M de dATP, 400 μ M de dCTP, 400 μ M de dGTP, 800 μ M 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 seqüências-alvo genuínas. Esta enzima é inativada pelas altas temperaturas durante a ciclagem da PCR.

Promega

T4 DNA Ligase (1U/ μ L)

Fosfatase Alcalina de Camarão (SAP) (1U/ μ L)

DNase I RNase *free* (1U/ μ L)

CENBIOT/RS

Taq DNA polimerase (2U/ μ L)

3.1.11) 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 μ L 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 μ L do marcador, correlaciona-se as bandas já citadas com as seguintes massas: 200, 120, 80, 60, 40 e 20 ng, respectivamente.

3.1.12) 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	SEQÜÊNCIA	UTILIZAÇÃO
M13 Universal	5' GTAAAACGACGGCCACT 3'	Utilizado para seqüenciamento de fragmentos de PCR clonados no vetor pGEM T-easy.
M13 Reverso	5' CAGGAAACAGCTATGAC 3'	Utilizado para seqüenciamento de fragmentos de PCR clonados no vetor pGEM T-easy.
Z0 <i>Ssp</i>	5' ACGCGGCCGCACGCGT 3'	Utilizado para se anelar com Z1, Z3 e Z5.
Z1 <i>Ssp</i>	5' CGCACACACGCACACGCACGCACACACACGCGG CCG 3'	Quando anelado com Z0, é clonado no sítio de <i>Ssp</i> I no vetor pGLCMV para formação de Z-DNA. Derivado de seqüências repetitivas que induzem Z-DNA no genoma de camundongo.
Z3 <i>Ssp</i>	5' CACGCACGCACGCACGCACGCACGCGGCCG 3'	Quando anelado com Z0, é clonado no sítio de <i>Ssp</i> I no vetor pGLCMV para

		formação de Z-DNA. Derivado de seqüências repetitivas que induzem Z-DNA no genoma de camundongo.
<i>Z5 Ssp</i>	5' ACGCGGCCGACGCGT 3'	Quando anelado com Z0, é clonado no sítio de <i>Ssp</i> I no vetor pGLCMV para formação de Z-DNA.
Seq pGL4.14	5' CTAGCAAATAGGCTCCC 3'	Utilizado para sequenciamento de regiões clonadas no vetor pGL4.14 (Promega)
Z22NLS int. UP	5'GAAGAAGCGGAAGGTAGGTAAGGTGCAACTT GTTGAGT 3'	Iniciador de PCR para a amplificação interna do fragmento scFv Z22 com NLS
Z22NLS int. LOW	5'AGCCATGATGGTGATGGTGAGCTTTTGGT GCTTGT 3'	Iniciador de PCR para a amplificação interna do fragmento scFv Z22 com NLS
Z22NLS ext. <i>Nhe</i>	5'GGCTAGCCACCATGGCTCCAAAGAAGAAGCGG AAGGTA 3'	Iniciador de PCR para amplificação externa do fragmento scFv Z22 com NLS. Adiciona o sítio de <i>Nhe</i> I.
Z22NLS ext. <i>Bam</i>	5'CTCGGATCCTTAGCCATGATGATGGTGATGGT	Iniciador de PCR

	GAGCTT 3'	para amplificação externa do fragmento scFv Z22 com NLS. Adiciona o sítio de <i>Bam</i> H I.
5' pCMV	5' GCGTGTACGGTGGGAGGTCTA 3'	Utilizado para seqüenciamento do promotor de CMV
3' pCMV	5' GCATTCTAGTTGTGGTTTGTTC 3'	Utilizado para seqüenciamento do promotor de CMV
Primer pCMV 1088 Low	5' CCGTGCCAAGAGTGACGTA 3'	Utilizado para a reação de PCR a partir do cDNA produzido pelo primer <i>RT pCMV 1115 Low</i>
Primer pCMV104 Up	5' CCGTGCCAAGAGTGACGTA 3'	Utilizado para a reação de PCR a partir do cDNA produzido pelo primer <i>RT pCMV 1115 Low</i>
Primer RT pCMV 1115 Low	5' ATATGTGCGTCGGTAAAGGC 3'	Primer específico tilizado para a síntese da fita de cDNA do promotor de CMV e intron A
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
H Luc Foward *	5' CTCGCTGCAAGCAAATGAAC 3'	Utilizado na reação de qPCR para a amplificação do gene da luciferase de <i>Renilla</i>
H Luc Reverse *	5' GCAGCGTTACCATGCAGAAA 3'	Utilizado na reação de qPCR para a amplificação do gene da luciferase de <i>Renilla</i>
Fly Luc2 Foward *	5' CAGCTGCACAAAGCCATGAA 3'	Utilizado na reação de qPCR para a amplificação do gene da luciferase de <i>Renilla</i>
Fly Luc2 Reverse *	5' CGAAGTACTCGGCGTAGGTAATG 3'	Utilizado na reação de Qpcr para a amplificação do gene da luciferase de <i>Renilla</i>

* 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 500µL 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 ressuspensionado em 10mL de solução de CaCl_2 50mM gelada por meio de suave agitação. A partir deste momento, a suspensão de células foi mantida sempre no gelo.

5 – Centrifugou-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 ressuspensionado em 1mL de solução de CaCl_2 50mM gelada. Alternativamente, quando as células foram preparadas para congelamento, o sedimento foi ressuspensionado em 1mL de solução de CaCl_2 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 μL de células competentes foram incubadas com 100 a 500 ηg 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 μL (plasmídeo intacto) ou 200 a 500 μL (sistema de ligação) das células transformadas em placas contendo meio LB ágar com ampicilina a uma concentração final de 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$. As placas foram mantidas a 37°C durante a noite.

- Preparo de células competentes para transformação por eletroporação (Maranhão, A. Q, em 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 μL do pré-inóculo para 500 mL de meio SB contendo 2,5mL de glicose 2M e 2,5mL de solução estoque de Mg^{2+} 2M. A cultura foi incubada a 37°C sob a agitação de 250 rpm até que fosse atingida a OD a 600 ηm 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 ressuspensionado 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 ressuspensionado 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 ressuspensionadas 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 ressuspensas 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 100µL em tubos novos no banho de gelo seco e álcool, sendo armazenadas a – 80°C.

- Transformação por eletroporação (Maranhão, A. Q. em 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 µF e 200 Ω. O τ (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 falcon 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 200µg/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 150µg/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 ressuspensão em 200µL de solução I por meio de vigorosa agitação ou pipetagem.

4 – Em seguida, adicionaram-se 400µL 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 300µL 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 adicionou-se 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 μ L 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 \times 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 300 μ L de clorofil, e as amostras foram novamente agitadas no aparelho *Vortex* por 2 minutos e depois centrifugadas a 10.000 \times 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 ressuspensionado em 40 μ L de tampão Tris ou tampão TE (como o TE tem EDTA, que pode inibir algumas reações enzimáticas subsequentes, optou-se por ressuspender 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 150 μ g/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 500 μ L para inocular 250mL de meio LB com 150 μ g/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 \times g por 15 minutos a 4°C . O sobrenadante foi descartado.

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

5 – Adicionaram-se 10mL de solução II (feita na hora) às células ressuspensionadas. 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 adicionou-se 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 subseqüentes, 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 ressuspendido em 250 μL de tampão P1. A este tampão já foi adicionada RNase A.

4 – A essa mistura, adicionaram-se 250 μL de tampão P2 (promove a lise celular), e misturou-se vagarosamente por inversão de tubo 4 a 6 vezes.

- 5 – Em seguida, foram adicionados 350 μ L 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 750 μ L 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 μ L 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 150 μ g/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 μ g/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 \times 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 ressuspensionado em 200µL 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 100µL).
- 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 10µL 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 x 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 x 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 x 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 x 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 ressuscitado 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 apresentadas no item 3.1.8 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 μg 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 μg 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) Reação de anelamento de oligonucleotídeos

100 μmoles de cada oligonucleotídeo foram colocados em um microtubo de 1,5mL, juntamente com 6,6 μL de tampão de anelamento e água MiliQ para um volume final de 50 μL . Essa mistura foi fervida durante 10 minutos, e depois a temperatura do banho foi caindo lentamente, até que fosse atingida a temperatura ambiente. Esse processo durou

cerca de 3 horas. A partir daí, os oligonucleotídeos anelados já estavam prontos para a reação de ligação aos vetores plasmidiais.

3.2.8) *Análise de DNA em gel de agarose (Sambrook e Russel, 2001).*

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.

3.2.9) *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*.

3.2.10) *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).

3.2.11) *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.

3.2.12) *Cultura de células*

Durante toda a manutenção da cultura, as células foram observadas em no 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 $130 \times g$ por 8 minutos.
- 4 – O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspense no meio de cultura remanescente do tubo.
- 5 – As células foram distribuídas em alíquotas de $500\mu\text{L}$ em criotubos, onde foram adicionados $500\mu\text{L}$ 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 2×10^2 células por garrafa de 25cm^2 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 $130 \times g$ por 8 minutos.
- 9 – O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspense em 3mL de meio com SFB.
- 10 – Foram transferidas 10^5 células por garrafa de 25cm^2 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 CO_2 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 10 μ L 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 80 μ L 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 10 μ L 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 entra na célula, tornando-a azul. Após a contagem, foi estabelecida a porcentagem de células viáveis.

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

- 1 – Em uma placa de cultura de 24 poços foram semeadas cerca de 5 x 10⁴ células por poço, adicionando-se em seguida 500 μ L de meio contendo SFB.
- 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 200µL de BSS, e depois se adicionou 500µL de meio de cultura sem soro.
- 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 50µL, completado com 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 2µL, para um volume final de 50µL.
- 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 100µL 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.

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 Higromicina B, foram testadas concentrações que variavam de 50 a 550µg/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 (10⁴ 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 Higromicina (50, 150, 250, 350, 450 e 550µg/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 Higromicina até a obtenção dos clones estáveis finais.

6 – Para células CHO-K1, a concentração mínima de antibiótico a ser utilizada foi determinada em 100µg/mL, e o tempo para que as células do controle morressem foi de 10 dias (durante a observação, verificou-se que a concentração de 50µg/mL não matava as células em 14 dias, e que a concentração de 150µg/mL matava as células com apenas 6 dias, então optou-se pela concentração intermediária, de 100µg/mL).

7 – Após a transfecção desta linhagem celular em placas de 24 poços com os plasmídios contendo os plasmídios com luciferase, intron A e os oligonucleotídeos Z3 e Z5, as células foram mantidas durante 10 dias com meio de cultura contendo 10% de SFB e 100µg/mL de Higromicina B.

8 – Após este período, verificou-se que todas as células do controle morreram. As células que foram transfectadas com o DNA plasmidial contendo a marca seletiva ainda foram mantidas nas placas de 24 poços por mais 4 dias (com meio contendo 10% de SFB e 100 µg/mL de higromicina B), até que a confluência deste poço chegasse a 90%.

9 – Em seguida, as células do poço foram tripsinizadas e transferidas para garrafas de 25 cm².

10 – Após 1 semana, as células (ainda mantidas com a mesma concentração de antibiótico) atingiram a confluência de 90% na garrafa.

11 – A população mista de células estáveis foi tripsinizada e transferida para um tubo falcon de 15mL, ao qual se adicionou meio com SFB para a inativação da tripsina.

12 – O tubo foi centrifugado a 130 x g por 8 minutos.

13 – O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi ressuspensionado em 5mL de meio de cultura.

14 – Em seguida, as células foram contadas na câmara de Neubauer.

15 – Após a contagem, foram feitas diluições seriadas de 0,1 célula por poço, 1 célula por poço e 10 células por poço, em placas de 96 poços (8 poços para cada diluição para cada construção). Ao poço foi adicionado 100µL de meio com 10% de SFB e 50µg/mL de Higromicina B.

16 – As células na placa foram observadas durante 1 semana no microscópio de contraste de fase invertido. Quando era possível observar um pequeno aglomerado celular, que possuía aproximadamente 3 a 5 células agrupadas em um formato circular, considerava-se

que no poço havia um clone estável. Se houvesse mais de um aglomerado celular no poço, ele era excluído da análise, pois não eram clones isolados, e sim uma população mista.

17 – Este clone foi propagado da placa de 96 poços para uma de 48 poços, e em seguida para uma garrafa de 25 cm², ainda contendo antibiótico a 50µg/mL e SFB a 10%. A partir de então, as células já poderiam ser congeladas.

3.2.13) Ensaio de atividade da luciferase utilizando o Kit Dual Luciferase Assay System (Promega – n^o 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 aliqotado em tubos de 1,5mL e estocado a – 80°C. O tampão Stop and Glo Buffer também foi aliqotado 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, 20 μ L das amostras diluídas foram utilizados para a leitura da atividade das duas luciferases.

6 – À amostra diluída, foram acrescentados 100 μ L 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 100 μ L 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.

3.2.14) Análise estatística dos valores de atividade da luciferase

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.

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 rpm 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 rpm 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 rpm por 10 minutos.

7 – Descartou-se o sobrenadante e o sedimento foi deixado à temperatura ambiente para secar. Em seguida, ele foi ressuscitado 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 subsequentes (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 ressuspenso 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 4µL do tampão 5X de síntese de cDNA, 1µL de DTT a 0,1M, 1µL de RNase OUT e 1µL 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 4µL 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. No nosso 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 amostras foi homogênea, mas os valores dos níveis de mRNA de GAPDH não foram utilizados para os cálculos.

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 µL
Primer 1 (10 mM)	0,2 µL
Primer 2 (10 mM)	0,2 µL
cDNA (diluído 1:50)	2 µL
H ₂ O MiliQ	2,6 µL
Volume final	10 µL

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 ir à 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 $\Delta\Delta Ct$, primeiro deve-se obter o 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 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 $\Delta\Delta Ct$, que é dado pela fórmula:

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

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

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1) Clonagem dos elementos gênicos

4.1.1) Clonagem do promotor de CMV sem intron (pGLCMVI-)

A expressão de proteínas heterólogas em células de mamífero esbarra em uma questão ainda difícil de resolver: qual o melhor promotor a ser utilizado? Em seu trabalho, Xu e colaboradores (2001) verificaram que a eficiência do promotor em um vetor plasmidial para expressão heteróloga depende do tipo celular utilizado. Em nosso trabalho, foi avaliado o potencial de expressão do gene repórter da luciferase em 4 linhagens de células de mamífero distintas: CHO-K1, COS7, HEPG2 e HEK-293. Em todos os tipos celulares estudados, foram testadas diversas construções do promotor de Citomegalovírus (CMV).

Este promotor já foi utilizado por diversos grupos de pesquisa para a produção de proteínas recombinantes em várias linhagens celulares (Ciafrè *et al*, 1998; Berdoz *et al*, 1999; McLean *et al*, 2000; Schiedner *et al*, 2002; Papagatsias *et al*, 2007; Thanaketpaisarn *et al*, 2008). Alguns trabalhos mostram ainda que o promotor de CMV, juntamente com o *enhancer*, é mais eficiente do que outros promotores que também são utilizados em vetores para expressão em células de mamífero, como o promotor de SV40 e o do vírus do Sarcoma de Rous (Mc. Lean *et al*, 2000; Xu *et al*, 2001; Gruh *et al*, 2008; Ogawa *et al*, 2007). Com base nesses estudos que demonstram a eficiência do promotor/*enhancer* de CMV, o nosso grupo de Imunologia Molecular vem utilizando este promotor para a expressão e produção de anticorpos recombinantes humanizados e fatores de coagulação sanguínea, e por isso, foi o nosso objeto de estudo.

Como neste trabalho pretendemos avaliar o potencial de otimização da expressão gênica do promotor de CMV juntamente com o elemento em *cis* denominado intron A, é necessária a construção do vetor com um gene repórter e o promotor de CMV sem o intron A, para que posteriormente a atividade da luciferase possa ser comparada. Na figura 10 é mostrado um esquema da clonagem do promotor de CMV sem intron A no vetor pGL4.14 (Promega), arcabouço que contém o gene repórter da luciferase de vaga-lume.

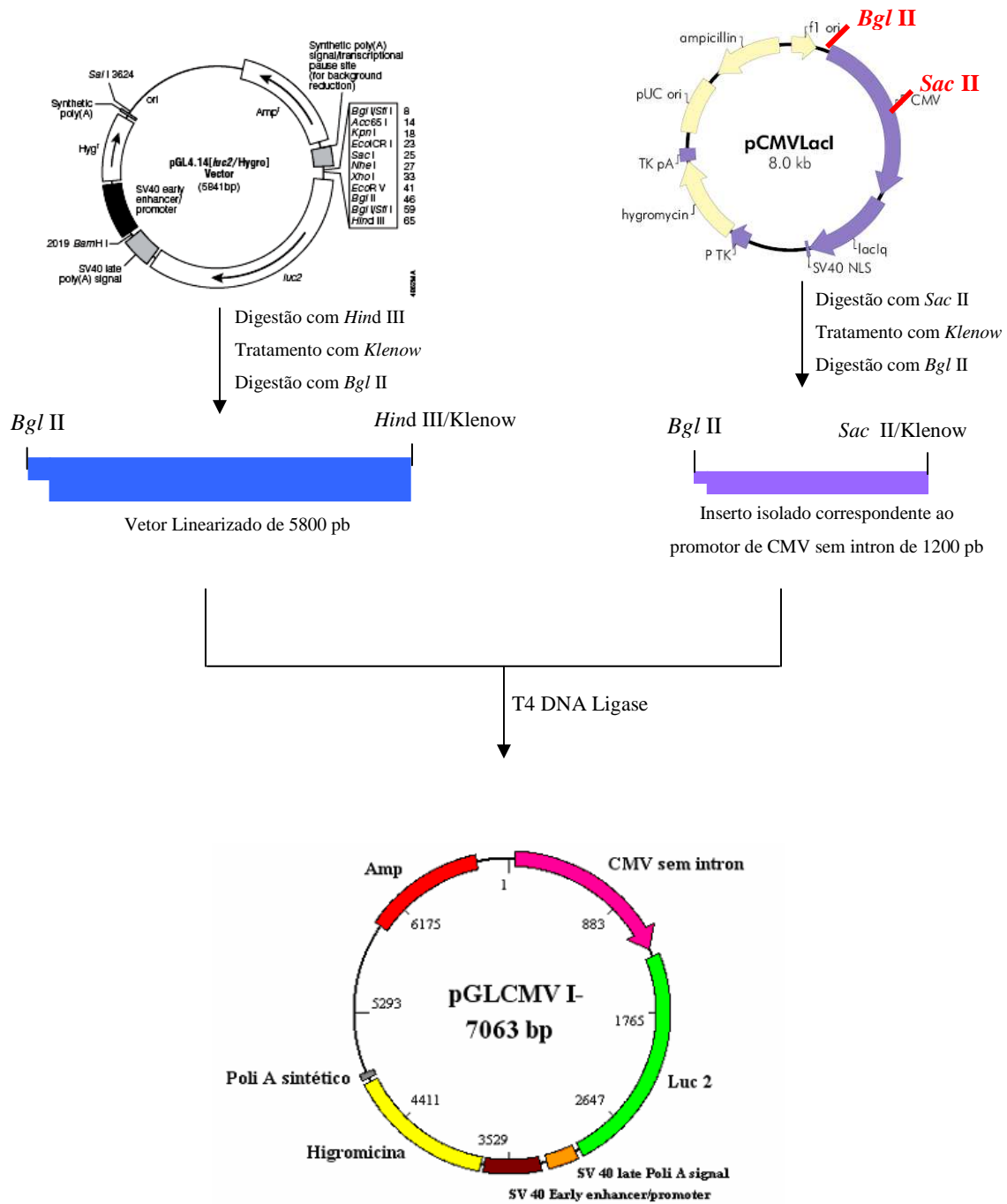


Figura 10. Clonagem do promotor de CMV sem intron, resultando no vetor pGLCMVI-. O vetor pGL4.14 foi digerido com *Hind* III e tratado com o fragmento *Klenow* da DNA polimerase I para a obtenção de extremidades abruptas. Em seguida, digeriu-se o mesmo vetor com *Bgl* II, obtendo-se o vetor linearizado de 5800 pb para a ligação com o promotor sem intron. Já o vetor pCMVLacI foi utilizado para a obtenção do inserto. Ele foi digerido com *Sac* II e posteriormente tratado com *Klenow*, para a formação de extremidades abruptas. Depois, o vetor foi digerido com *Bgl* II, obtendo-se um fragmento de 1200 pb, correspondente ao promotor e *enhancer* de CMV, sem intron A. O vetor e o inserto foram ligados e obteve-se o vetor pGLCMVI-, 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 promotor de CMV sem intron (que foi clonado), 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).

Para a obtenção do vetor pGLCMVI-, os fragmentos de DNA obtidos após as digestões com as enzimas de restrição indicadas na figura 10 foram analisados em gel de agarose para eluição. As bandas correspondentes a esses fragmentos de DNA foram cortadas do gel e eluídas por *freeze-squeeze*. Os fragmentos de DNA foram ligados e esta reação transformada em células competentes XL10-gold por choque térmico. Os clones transformantes foram analisados por perfil de restrição com as enzimas *Bgl* II e *Pst* I. Os clones considerados positivos foram também seqüenciados com os iniciadores seqpGL4.14, 5'pCMV e 3'pCMV.

4.1.2) Clonagem do promotor de CMV com intron A (pGLCMV)

O vetor pGLCMV é o vetor para a expressão do gene repórter da luciferase de contém o intron A de citomegalovírus. O procedimento para a clonagem do promotor/*enhancer* de CMV com intron A no vetor pGL4.14 foi o seguinte: digeriu-se este plasmídeo com *Bgl* II e *Hind* III, obtendo-se um fragmento linear com aproximadamente 5800 pb, sendo as duas extremidades de ligação coesivas. O vetor pCMV LacI foi digerido com as mesmas enzimas, sendo isolado um fragmento de aproximadamente 2100 pb. O vetor e o inserto foram ligados com a enzima T4 DNA Ligase, e este sistema de ligação foi transformado em células XL10-gold por choque térmico. Os clones obtidos foram tiveram seu perfil de restrição analisado em gel de agarose 0,8% com as enzimas *Bgl* II e *Hind* III, liberando o fragmento clonado em torno de 2000 pb. Além da confirmação por digestão, a seqüência do clone positivo foi também confirmada por seqüenciamento com os mesmos iniciadores utilizados para o vetor pGLCMVI-. A figura 11 mostra o esquema da estratégia de construção do vetor.

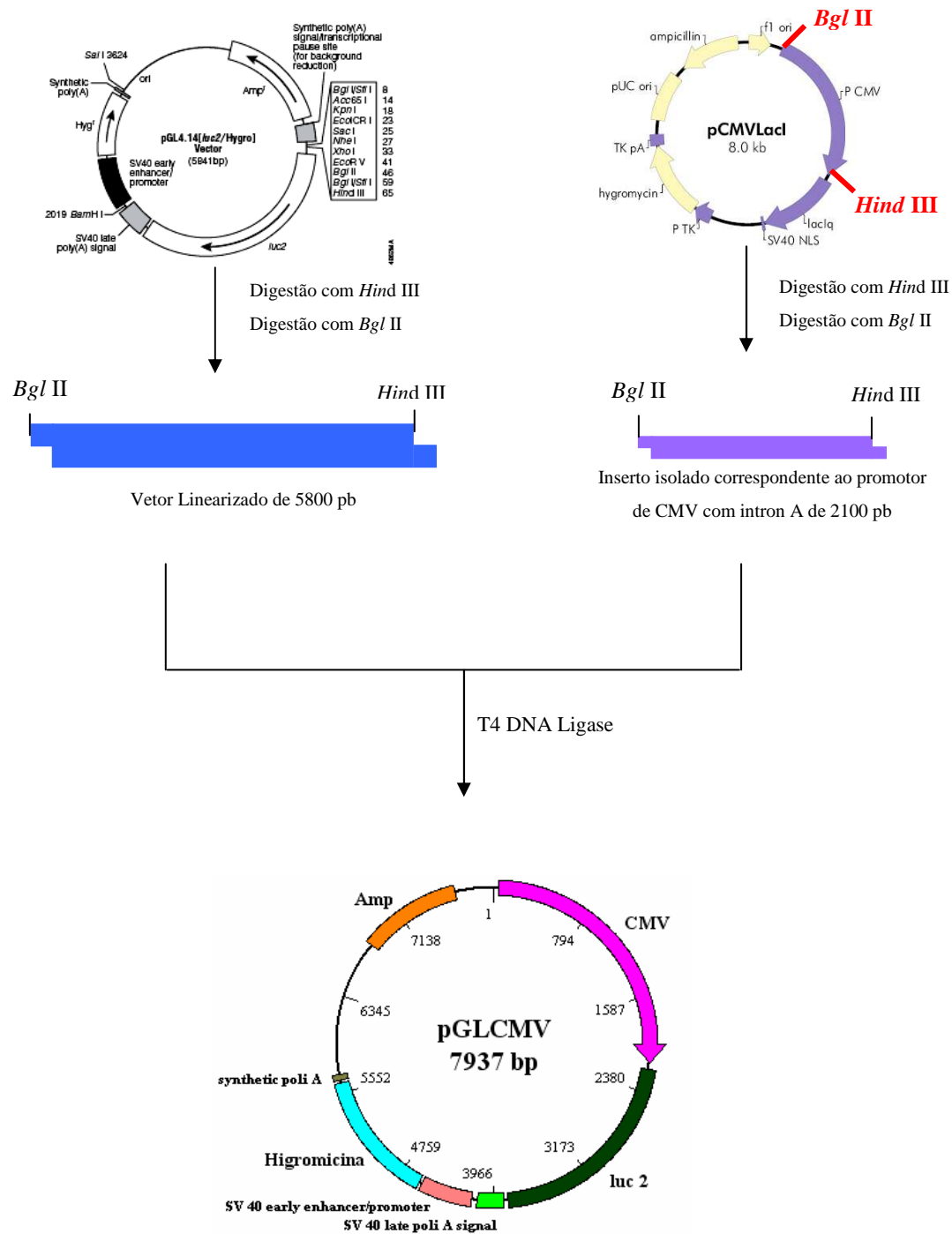


Figura 11. Clonagem do promotor de CMV com intron A, resultando no vetor pGLCMV. O vetor pGL4.14 foi digerido com *Hind* III e *Bgl* II, obtendo-se o vetor linearizado de 5800 pb para a ligação com o promotor com intron A. Já o vetor pCMVLacI foi utilizado para a obtenção do inserto. Ele foi digerido com *Hind* III e *Bgl* II, obtendo-se um fragmento de 2100 pb, correspondente ao promotor e *enhancer* de CMV com intron A. O vetor e o inserto foram ligados e obteve-se o vetor pGLCMV, 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 promotor de CMV sem intron (que foi clonado), 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).

4.1.3) Construção de versões deletadas do intron A (IA)

O potencial de melhoramento da expressão de proteínas de interesse foi avaliado por diversos autores (Chapman *et al*, 1991; Xia *et al*, 2006; Xu *et al*, 2001), que compararam a produção dos produtos por meio de análises quantitativas do sobrenadante das culturas celulares, como ELISA e *Western Blot*. Entretanto, pouco se sabe sobre as regiões específicas do intron A necessárias para a sua função, sendo que apenas uma patente teve como abordagem a deleção de uma região do intron A (Missha e Shupisu, 2007). Desse modo, foram construídas 3 versões de vetores contendo o gene repórter da luciferase de vaga-lume, cada uma com uma deleção distinta do intron A. Assim, busca-se um intron mínimo que possa funcionar de maneira similar ao intron selvagem, ou melhor. A figura 12 mostra um esquema de como foram realizadas as deleções no intron A do vetor pGLCMV.

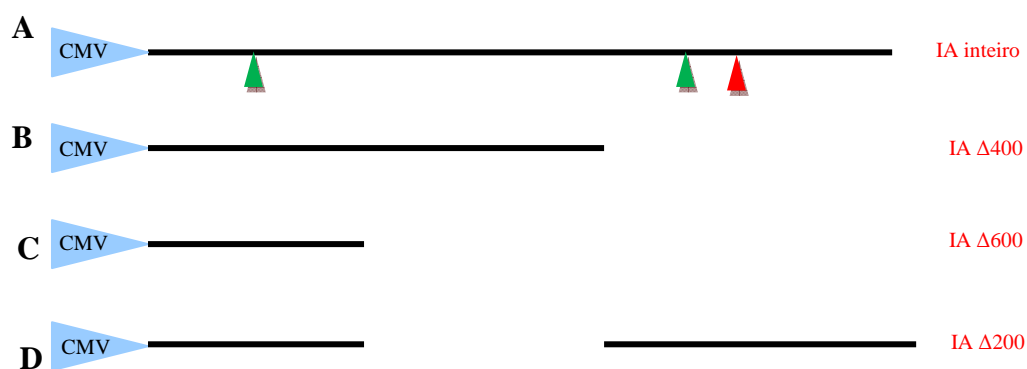


Figura 12. Deleções realizadas no intron A de CMV. Os quatro painéis mostram construções com o intron A deletado (B, C e D) comparadas com a construção contendo o intron A selvagem (A). Os triângulos azuis representam o promotor e *enhancer* de CMV, e os traços pretos o intron A, inteiro ou deletado. No painel “A” estão evidenciados os três sítios de restrição utilizados para a realização das deleções, os potenciais sítios doador e acceptor de *splicing* (▲), e o ATG predito (▲). O promotor e intron não estão em escala.

Como observado na figura 12, foram construídas 3 versões de vetores com o intron A deletado e o gene repórter da luciferase. No painel “A” é mostrada a construção pGLCMV, e nos painéis “B”, “C” e “D” as construções com as deleções de 400, 600 e 200pb, respectivamente. Elas foram denominadas pGLCMVΔ400 (B), pGLCMVΔ600 (C) e pGLCMVΔ200 (D). No anexo 1 são fornecidos maiores detalhes sobre a construção das versões deletadas do intron A.

4.1.4) Introdução de seqüências indutoras de Z-DNA no vetor pGLCMV

Tendo em vista o potencial da conformação Z do DNA de interferir na expressão gênica (Schroth *et al*, 1992; Liu e Wang, 1987; Oh *et al*, 2002), foi adicionado ao vetor pGLCMV, que já contém o intron A, seqüências que podem induzir a conformação Z do DNA próximas à região do promotor de CMV. Suas seqüências podem ser verificadas na tabela 2 da sessão Materiais e Métodos. A figura 13 mostra um esquema de como foi realizado o anelamento dos oligonucleotídeos denominados Z1, Z3 e Z5 e a clonagem deles no vetor pGLCMV.

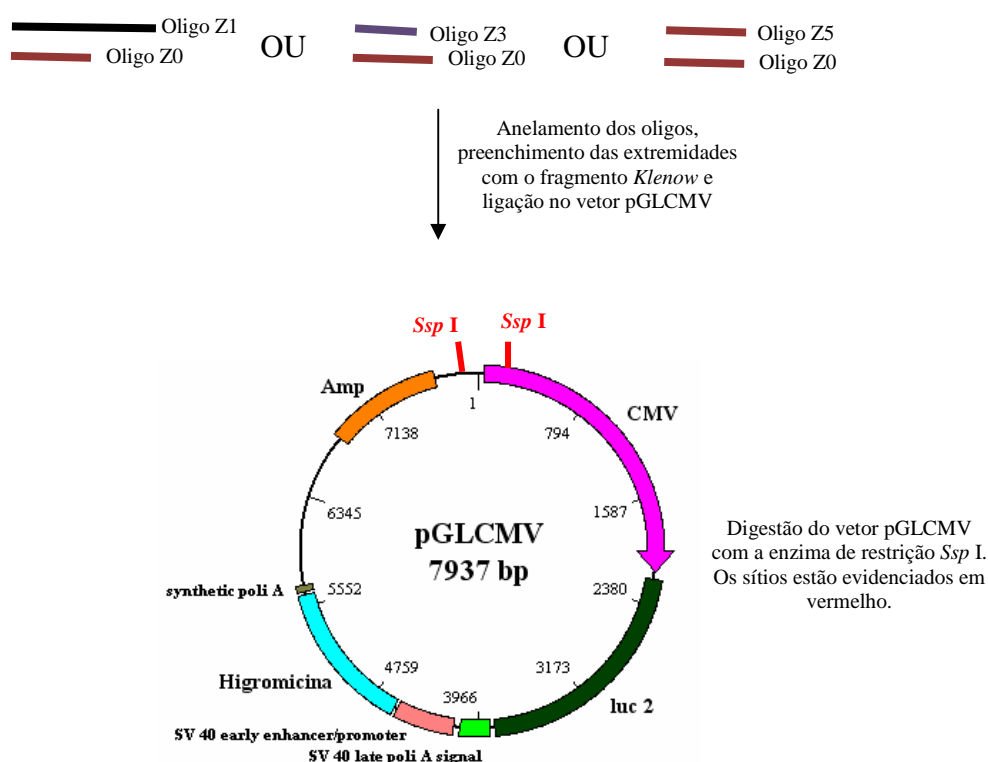


Figura 13. Anelamento dos oligonucleotídeos Z1, Z3 e Z5 e clonagem no vetor pGLCMV.

Os oligonucleotídeos foram todos anelados ao oligonucleotídeo Z0, e em seguida, as extremidades sobressalentes foram preenchidas por meio de tratamento com o fragmento *Klenow* da DNA polimerase I. Após esse tratamento, as seqüências resultantes foram clonadas no vetor pGLCMV, entre os sítios de restrição da enzima *Ssp I*, evidenciados em vermelho na região 5' do promotor de CMV.

Como foi verificado na figura 15, o oligonucleotídeo Z0 foi usado como base para o anelamento dos outros três (Z1, Z3 e Z5). É possível verificar também pela figura e pela análise da tabela 2 (Materiais e Métodos) que as seqüências dos oligonucleotídeos Z0 e Z5 são inteiramente complementares, sendo que desse modo, o anelamento não originará

extremidades sobressalentes. Diferentemente das seqüências Z1 e Z3, que após o anelamento com Z0 e extensão com *Klenow* resultam em alternâncias de purinas e pirimidinas, a seqüência Z5 não possui esse padrão de repetições. Com isso, esta seqüência não induz a formação de Z-DNA, mas funciona apenas como um controle para a manipulação do vetor, sendo uma seqüência não-relacionada introduzida no mesmo sítio de clonagem das demais seqüências, os objetos de estudo.

Com a análise da figura 13, observa-se que a digestão do vetor pGLCMV com a enzima de restrição *Ssp* I removeu propositalmente a região inicial do promotor de CMV. Esta região contém 4 sítios de ligação ao fator de transcrição NF1 (Hennighausen e Fleckenstein, 1986), como foi representado na figura 6 da Introdução, sendo que eles foram eliminados do promotor após a digestão do vetor. Segundo Chapman e colaboradores (1991), esses sítios de NF1 na região 5' do promotor/*enhancer* funcionam como moduladores negativos na expressão de transgenes em células da linhagem COS-7. Com isso, a remoção desta região nessas construções do vetor pGLCMV com seqüências formadoras de Z-DNA pareceu ser importante para a melhor atividade do promotor.

Após a digestão do vetor com a enzima *Ssp* I, o vetor linearizado e os oligonucleotídeos (anelados e tratados com *Klenow*) foram ligados com a enzima T4 DNA ligase. O sistema de ligação, antes de ser transformado, foi digerido com a enzima *Ssp* I, a fim de que fossem eliminados os plasmídios que religaram. Isso impede que vários oligonucleotídeos se liguem entre si, permitindo apenas a ligação de uma seqüência indutora de Z-DNA no vetor. Apenas depois desse tratamento que o sistema de ligação foi transformado em células DH5 α por choque térmico. Os clones transformantes foram analisados por digestão com a enzima de restrição *Not* I e por seqüenciamento. As seqüências obtidas foram alinhadas no programa BioEdit com a seqüência predita dos oligonucleotídeos. Na figura 14 são mostrados os alinhamentos dos clones obtidos para os vetores pGLCMVZ5 e pGLCMVZ3. Não foi obtida nenhuma seqüência de qualidade do vetor pGLCMVZ1, mas ele foi confirmado como sendo positivo pela digestão com a enzima de restrição citada acima. Uma outra construção derivada da digestão do vetor pGLCMV com a enzima de restrição *Ssp* I foi denominada **pGLCMV Δ 5'**, pois ela resulta apenas da digestão do vetor e remoção da região de aproximadamente 700 pb do início (5') do promotor de CMV, que tinha sido descrita como inibotória COS-7 (Chapman *et al*, 1991).

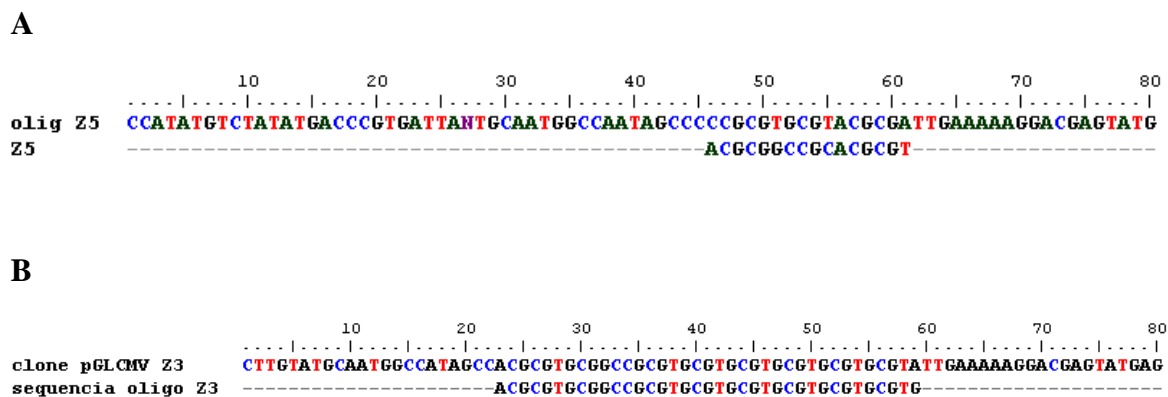


Figura 14. Alinhamento da seqüência dos vetores pGLCMVZ5 (painel A) e pGLCMVZ3 (painel B). As seqüências obtidas por seqüenciamento automático com o MegaBace foram alinhadas no programa BioEdit com as seqüências previstas para os oligonucleotídeos Z5 e Z3 (painel B e A, respectivamente) após o anelamento com Z0 e preenchimento das extremidades com *Klenow*.

4.1.5) Construção do vetor *pMACIA scFvZ22NLS*

O grupo de Imunologia Molecular da UnB já utiliza o anticorpo recombinante anti-Z-DNA denominado Z22 há mais de 10 anos (Brígido *et al*, 1993; Andrade *et al*, 2000; Ruggiero, 2001; Vaz de Andrade *et al*, 2005; Burtet *et al*, 2007), tanto na forma scFv (do inglês *single chain fragment variable*) quanto na forma FvFc, que consiste na forma scFv com a porção cristalizável do anticorpo (Fc), ou ainda como Fab recombinante. O Fab é um fragmento de anticorpo que contém o sítio de reconhecimento do antígeno, com uma cadeia leve e parte de uma cadeia pesada, obtido por digestão enzimática. Apesar de já ser conhecido e utilizado desde a década de 80 como anticorpo monoclonal, foi somente na década de 90 que o gene codificando este anticorpo na forma scFv foi clonado, seqüenciado e expresso em *E. coli* (Brígido *et al*, 1993). Este anticorpo reconhece o Z-DNA, independentemente da seqüência associada à esta conformação (Brígido e Stollar, 1991).

Desse modo, a fim de verificar se as regiões onde foram clonadas as seqüências indutoras de Z-DNA realmente promovem a formação desta conformação, foi construído um plasmídio para transfecção em células de mamífero que continha o gene correspondente ao fragmento scFv do Z22. Entretanto, ao contrário dos vetores já existentes que possuem um peptídeo sinal para a secreção do anticorpo após a sua produção, este vetor contém uma seqüência codificadora do sinal de localização nuclear

(NLS, do inglês *nuclear localization signal*), que direciona o anticorpo para o núcleo após a produção. Isso porque as seqüências indutoras de Z-DNA encontram-se nos plasmídios que foram transfectados em células de mamífero de forma transiente ou estável, e dessa forma, permanecem no núcleo de forma episomal ou integrada. A seqüência correspondente ao NLS foi inserida no lugar da seqüência do peptídeo sinal, na região 5' do gene. Essa mesma construção de um vetor com o NLS depois do gene também foi feita por Stallings e Silverstain em 2005, que verificaram a presença do NLS na região 5' da ORF (do inglês *open reading frame*) do vírus da Varicella. Esta construção, alpm do NLS, contém a proteína A e uma seqüência His-TAG para a detecção e recuperação desta proteína. Segundo Iosef e colaboradores (2007), para a construção de uma proteína recombinante com NLS, é fundamental que a molécula resultante tenha o tamanho máximo de aproximadamente 40 kDa, visto que proteínas com tamanho maior têm dificuldade para atravessar o poro nuclear. No caso da construção realizada neste trabalho, o tamanho da proteína com o NLS, proteína A e His-TAG não ultrapassa este valor, tendo um tamanho aproximado de 30 kDa.

Para a construção do vetor pMACIA scFvZ22NLS, foram realizadas as seguintes etapas:

- a) Realização de 2 PCRs com 2 pares de iniciadores distintos (seqüências observadas na tabela 2 da sessão Materiais e Métodos). Na primeira PCR o vetor utilizado como molde foi o vetor pIg16, cujo mapa esquemático foi mostrado na figura 9. Esta PCR utiliza um par de iniciadores que amplificam o gene do fragmento scFvZ22 e inserem a seqüência correspondente ao NLS, resultando em uma banda correspondente a um fragmento de DNA de aproximadamente 1000 pb (figura 15).

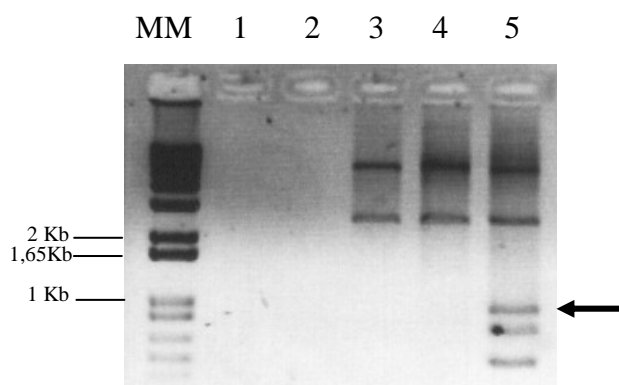


Figura 15. Obtenção do fragmento scFvZ22NLS – 1ª Etapa. O primeiro poço do gel mostra o marcador de tamanho molecular 1 Kb plus da Invitrogen (MM). Em “1” e “2” são mostrados dois controles negativos sem o DNA molde. O poço “3” é a reação sem o iniciador 5’, e o poço “4” é a reação sem o iniciador 3’. As duas bandas que aparecem nos poços “3” e “4” representam o DNA plasmidial utilizado como molde e que foi colocado nas reações. O poço “5” é a reação de PCR completa, com os dois iniciadores e o DNA plasmidial molde. Na seta foi indicado o tamanho esperado da banda de amplificação. No gel foi aplicado 1/10 do volume total da PCR.

Os componentes utilizados para a primeira reação são mostrados a seguir:

DNA molde (50 ng) = 1 μ L

Tampão 10X CenBIOT = 5 μ L

dNTP 10mM = 1 μ L

MgCl₂ 50mM = 2 μ L

Primer 5’ 10mM = 4 μ L

Primer 3’ 10 mM = 4 μ L

Taq CenBIOT (2 u/ μ L) = 1 μ L

Água MiliQ = 32 μ L

Volume Final = 50 μ L

O padrão de ciclagem realizado nesta reação é mostrado abaixo:

1- 94°C	5 minutos
2- 94°C	1 minuto
3- 58°C	1 minuto
4- 72°C	2 minutos
5- ir ao passo 2	30 vezes
6- 72°C	10 minutos
7- 4°C	indefinidamente
8- Fim	

Tendo em vista o aparecimento de bandas inespecíficas na reação, tentamos realizar a mesma PCR em outras condições: modificando a concentração de cloreto de magnésio da reação e aumentando a temperatura de anelamento dos iniciadores. A primeira condição não evitou o aparecimento das outras bandas no gel, e o aumento da temperatura de anelamento não resultou no aparecimento da banda esperada na reação. A combinação do aumento da temperatura de anelamento e da concentração de magnésio também não resultou na amplificação de bandas no gel. Com isso, optamos por seguir os parâmetros citados acima, que apesar de mostrarem uma amplificação inespecífica, resultam no aparecimento do fragmento de DNA do tamanho esperado.

- b) No próprio gel de agarose, visualizou-se a banda correspondente ao fragmento de DNA do tamanho esperado. Apesar de ter ocorrido uma amplificação inespecífica que resultou no aparecimento de mais duas bandas que representam fragmentos de DNA de tamanhos diferentes do esperado, a banda maior foi isolada para o próximo passo da PCR. Com uma micropipeta, inseriu-se a ponta de uma ponteira na região do gel onde se observava a banda, com auxílio da luz UV. Recolheu-se um pouco de líquido que continha o DNA a ser utilizado como molde para a segunda PCR. Na segunda PCR, foram utilizados dois iniciadores que inseriram sítios para as enzimas de restrição *BamH I* e *Nhe I* nas extremidades do gene. Estes sítios são fundamentais para a clonagem deste produto no vetor pMACIA, que é o vetor para a expressão heteróloga em células de mamífero. O produto dessa reação de PCR também é um fragmento de DNA com aproximadamente 1000 pb (figura 16).

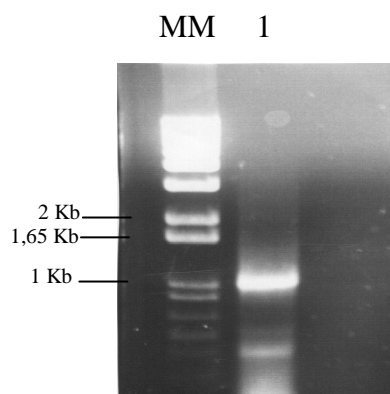


Figura 16. Obtenção do fragmento scFvZ22NLS – 2ª Etapa. No primeiro poço do gel mostrado na figura verifica-se o marcador molecular 1 kb plus da Invitrogen (MM). No poço representado por “1”, observa-se a segunda reação de PCR completa, utilizando como molde o DNA oriundo da banda de tamanho esperado do gel da primeira PCR. No gel foi aplicado 1/10 do volume total da PCR.

Os componentes utilizados nesta reação foram os seguintes:

DNA molde da primeira PCR = 4 μ L

Tampão 10X CenBIOT = 5 μ L

dNTP 10mM = 1 μ L

MgCl₂ 50mM = 2 μ L

Primer 5' 10mM = 4 μ L

Primer 3' 10 mM = 4 μ L

Taq CenBIOT (2 u/ μ L) = 1 μ L

Água MiliQ = 28 μ L

Volume Final = 50 μ L

Os parâmetros de ciclagem da segunda PCR foram idênticos aos da primeira reação. Neste caso, ainda apareceram algumas bandas de fragmentos de DNA inespecíficas, mas a banda correspondente ao fragmento de DNA com tamanho esperado era mais forte e mais nítida.

- c) A banda no gel correspondente ao fragmento de DNA de 1000 pb oriundo da segunda reação de PCR foi cortada do gel e o DNA foi purificado da agarose por *freeze-squeeze*. O fragmento de DNA resultante foi ligado no vetor pGEM T-easy, da Promega, com a enzima T4 DNA Ligase. Este vetor possui extremidades

coesivas com o desoxinucleotídeo timidina. Em produtos de PCR amplificados com a enzima *Taq polimerase*, há a formação de extremidades contendo um nucleotídeo de adenosina. A seqüência do clone considerado positivo é observada na figura 17.

```

      L A T M A P K K K R K V G K V Q L V E S G G G L V Q
1  GGCTAGCCACCATGGCTCCAAAGAAGAAGCGGAAGGTAGGTAAGGTGCAACTTGTGAGTCTGGTGGAGGATTGGTGCAG 80

      P K G S L K L S C A A S G F N F N T Y A M N W V R Q A
81  CCTAAAGGGTCATTGAAACTCTCATGTGCAGCCTCTGGATTCAACTTCAATACCTACGCCATGAACTGGGTCCGCCAGGC 160

      P G K G L E W V A R I R S K S N N Y A T Y Y A D S M
161  TCCAGGAAAGGGTTTGGAAATGGTTGCTCGCATAAGAAGTAAAAGTAATAATTATGCAACATATTTATGCCGATTCAATGA 240

      K D R F T I S R D D S E N M L Y L Q M I N L K A E D T
241  AAGACAGATTCACCATCTCCAGAGATGATTCAGAAAACATGCTCTATCTGCAAATGATCAACTTGAAAGCTGAGGACACA 320

      A M Y Y C V R Q A Y S N Y G A M D Y W G Q G I S V T V
321  GCCATGTATTACTGTGTGAGACAGGCATATAGTAACTACGGTCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAATTCAGTCACCGT 400

      S S R G G G G S G G G G S G G G G S D L Q M T Q T T
401  CTCTCTAGAGGTGGGGGCGGTTTCGGGTGGCGGGGGTTCGGGCGGGGGAGGCTCAGATCTCCAGATGACGCAGACTACAT 480

      S S L S A S L G D R V T I S C S A S Q G I S N Y L N W
481  CCTCCCTGTCTGCTCTCTGGGAGACAGAGTCACCATCAGTTGCAGTGCAAGTCAGGGCATTAGTAATTATTTAAACTGG 560

      Y Q Q K P D G T V K L L I Y Y T S R L H S G V P S R F
561  TATCAGCAGAAACCAGATGGAAGTGTAAACTCTGATCTATTACACATCAAGATTACACTCAGGAGTCCCATCAAGGTT 640

      S G S G S G T D Y S L T I S N L E P E D I A T Y F C
641  CAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGATTATTCTCTCACCATCAGCAACCTGGAACCTGAAGATATTGCCACTTATTTTTGTC 720

      Q Q Y S K F P F T F G S G T K L E I K H H H H G D P
721  AGCAGTATAGTAAGTTCCCATTCACGTTTCGGCTCGGGGACAAAGTTGGAAATAAAAACATCATCATCACCATGGTGATCCG 800

      K A D N K F N K E Q Q N A F Y E I L H L P N L N E E Q
801  AAAGCTGACAACAAATTCAACAAGAACAACAAATGCTTTCTATGAAATCTTACATTTACCTAACTTAAATGAAGAACA 880

      R N G F I Q S L K D D P S Q S A N L L A E A K K L N
881  ACGCAATGGTTTCATCCAAAGCTTAAAAGATGACCCAAGCCAAGCGCTAACCTTTTAGCAGAAGCTAAAAAGCTAAATG 960

      D A Q A P K A H H H H H H G *
961  ATGCACAAGCACAAAAGCTCACCATCACCATCATCATGGCTA 1000

```

Figura 17. Seqüência do scFvZ22NLS. É mostrada a seqüência do clone 7 do vetor pGEM scFvZ22NLS obtida por meio do seqüenciamento automático. Acima da seqüência de nucleotídeos foi evidenciada a seqüência de aminoácidos da proteína predita. Em vermelho está representada a seqüência do NLS. Em verde observa-se a seqüência da região variável pesada (VH) do anticorpo, em amarelo o peptídeo conector, ou *linker*, em roxo a seqüência da porção variável leve (VL) do fragmento scFv, em marrom a seqüência da proteína A e em azul o His-Tag.

d) O clone do pGEM scFvZ22NLS foi digerido com *Nhe* I e *Bam*H I, mesmas enzimas usadas para a digestão do vetor pMACIA (representado na figura 9). Após as digestões dos dois vetores para a obtenção de um vetor linear e do inserto, os fragmentos de DNA foram ligados com a enzima T4 DNA ligase, e os clones obtidos a partir da transformação do sistema de ligação por choque térmico em células DH5 α foram digeridos com *Bgl* II para análise do perfil de restrição e confirmação da clonagem final. Assim, obteve-se o vetor pMACIA scFvZ22NLS para a co-transfecção com os plasmídios contendo as seqüências indutoras de Z-DNA. Um esquema da clonagem do fragmento scFv Z22NLS no vetor pMACIA pode ser verificado na figura 18.

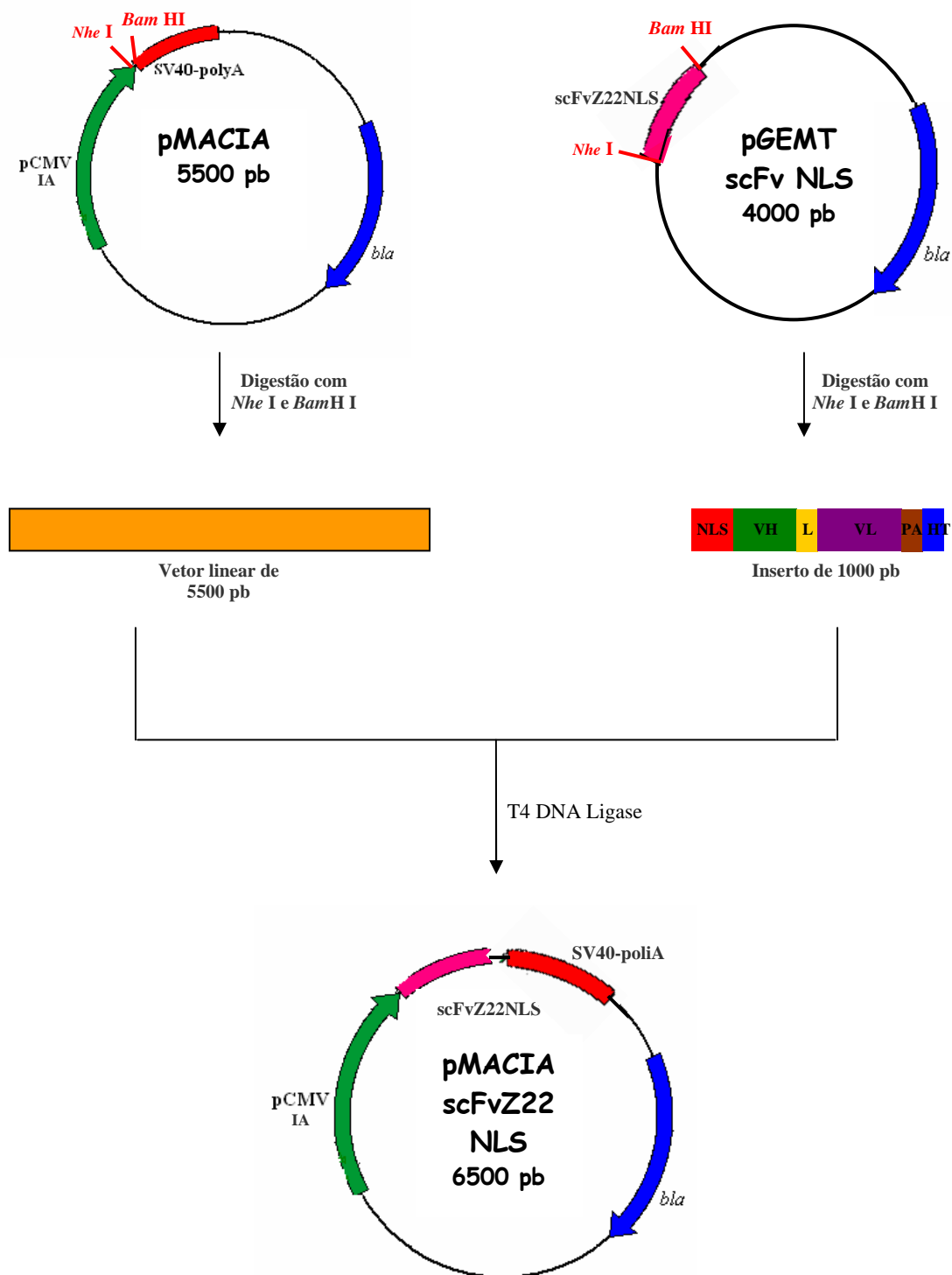


Figura 18. Clonagem do fragmento scFvZ22NLS no vetor pMACIA. A clonagem do fragmento de DNA de aproximadamente 1000 pb no vetor para a expressão em células de mamífero pMACIA (vetor com promotor de CMV e intron A) foi realizada conforme o esquema acima. Os sítios para as enzimas de restrição utilizadas foram evidenciados em vermelho. A seta azul identificada por “*bla*” é o gene da β -Lactamase, que confere resistência à ampicilina para a amplificação dos plasmídios em bactérias.

4.2) Determinação dos níveis de expressão gênica das diferentes construções em células de mamífero

4.2.1) O Cultivo de diversas linhagens de células de mamífero

Neste trabalho foram utilizadas as seguintes linhagens para a transfecção transiente dos plasmídios contendo o gene repórter da luciferase: CHO-K1, COS-7, HepG2 e HEK-293. A linhagem CHO-K1 foi cultivada com meio HAM-F12 suplementado com 10% (v/v) de SFB. As linhagens COS-7 e HEK-293 foram crescidas em meio DMEM, também contendo 10% de SFB. Por fim, a linhagem HepG2 foi cultivada em meio RPMI com 10% de SFB. Todas as garrafas foram mantidas na estufa a 37°C, 70% de umidade e 5% de CO₂. Quando o meio de cultura tornava-se amarelado (significando maior acidez), as células eram tripsinizadas e passadas em menor quantidade para as garrafas. Após três passagens (metodologia descrita na sessão Materiais e Métodos), as células já estavam prontas para serem transfectadas com os plasmídios contendo os elementos a serem testados.

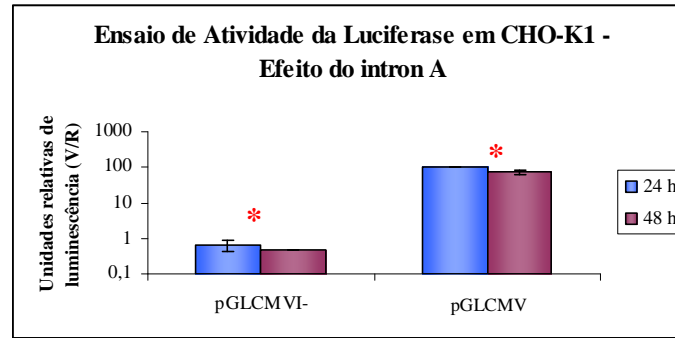
4.2.2) Transfecção Transiente

Após o número mínimo de passagens requeridas para a transfecção, as células foram transferidas para placas de cultura de 24 poços e transfectadas com os plasmídios de interesse utilizando-se o lipídio catiônico Lipofectamine 2000 (Invitrogen). Em todas as linhagens celulares estudadas, foram testadas as seguintes construções por meio de transfecção transiente: os plasmídios contendo o gene repórter da luciferase com o promotor de CMV sem intron, com intron A inteiro e deletado (deleções de 200 pb, 400 pb e 600 pb). Nas linhagens CHO-K1 e COS-7 foram testadas a construção que contém o promotor de CMV deletado na região 5' e com intron A inteiro. Por fim, apenas na linhagem CHO-K1 foram testadas todas as construções com intron A e oligonucleotídeos indutores de Z-DNA (Z1, Z3 e Z5).

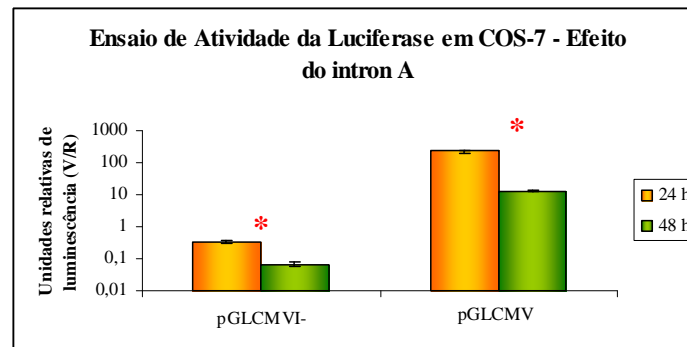
4.2.2.1) Efeito do intron A inteiro na atividade da luciferase nas linhagens celulares CHO-K1, COS-7, HepG2 e HEK-293

As construções pGLCMVI- e pGLCMV, que contêm respectivamente o promotor de CMV sem o intron A e com o intron A inteiro, foram transfectadas transientemente em CHO-K1, COS-7, HepG2 e HEK-293, e após a transfecção a atividade da luciferase foi medida 24 e 48 horas após a transfecção. Na figura 19 são mostrados os gráficos referentes a esses valores em todas as linhagens celulares citadas. Cada gráfico representa um experimento significativo de três repetições realizadas.

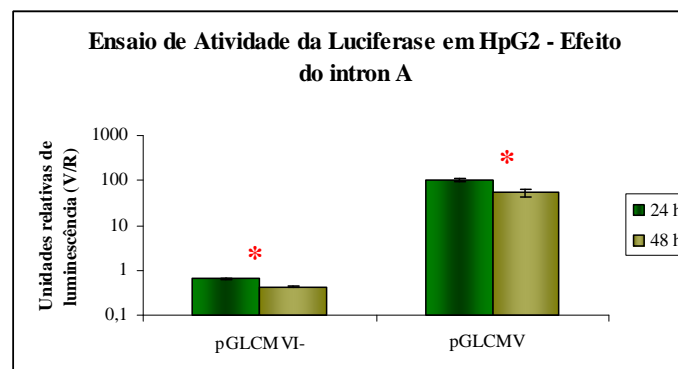
A



B



C



D

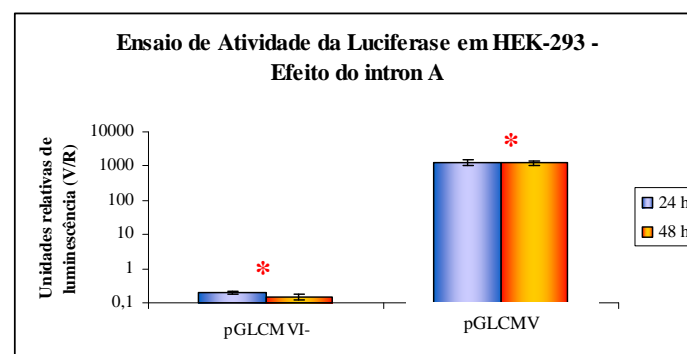


Figura 19. Efeito do intron A inteiro na atividade da luciferase em CHO-K1 (painel A), COS-7 (painel B), HepG2 (painel C) e HEK-293 (painel D). As construções referentes aos plasmídios com o gene repórter da luciferase de vaga-lume e promotor de CMV sem intron A (pGLCMVI-) e com intron A (pGLCMV) foram transfectadas em quatro linhagens de células de mamíferos e posteriormente mediu-se a atividade da luciferase 24 e 48 horas pós-transfecção. O asterisco vermelho indica que os valores apresentados são estatisticamente significativos, com $P < 0,05$.

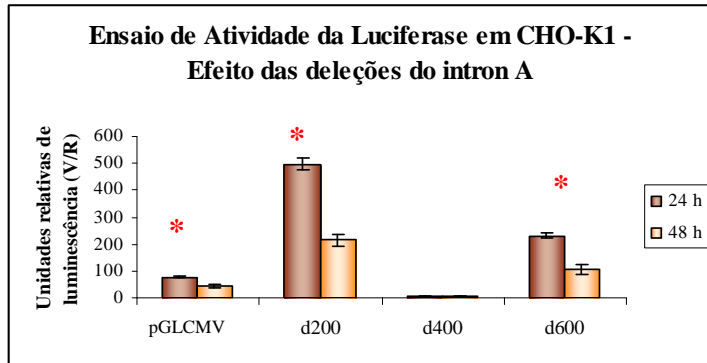
Os resultados acima mostram a grande eficiência do intron A para a melhora da atividade da luciferase induzida em condições de transfecção transiente, sendo que foram observados aumentos de 100 até quase 1000 vezes da atividade da enzima, dependendo da linhagem celular. Destaca-se a linhagem celular HEK-293, que apresentou os maiores níveis de atividade da luciferase. Este dado corrobora a afirmação de que esta linhagem celular é uma das mais eficientes para a obtenção de níveis significativos de proteínas em transfecções transientes (Durocher *et al*, 2002). O intron A já foi utilizado na sua forma inteira em diversos trabalhos (Tripathy *et al*, 1996; Chapman *et al*, 1991; Xu *et al*, 2001; Xia *et al*, 2006), sendo que em todos os estudos foi mostrado que este elemento tem um grande potencial de otimização da expressão gênica, com aumentos de 2 a 9 vezes da expressão do produto de interesse, dependendo do tipo celular utilizado e da proteína produzida. Apesar destes aumentos observados na literatura serem bem menores do que os apresentados neste trabalho, deve-se considerar que o tipo de ensaio é diferente. Na maioria dos autores analisados, o estudo comparativo foi realizado com proteínas secretadas e que sofrem modificações pós-traducionais, como glicosilação. Nossos ensaios foram feitos verificando a atividade da enzima luciferase, que é uma proteína menos complexa que as dos demais estudos, tendo produção intracelular e não apresentando nenhuma modificação pós-traducional. Com isso, os dados de aumento da atividade da luciferase mostram o real potencial de otimização da expressão gênica do intron A sem a influência de fatores complicadores, como a complexidade da proteína de estudo, dos tipos celulares e de suas capacidades de secreção.

No trabalho de Xu e colaboradores (2001) demonstrou-se também que o intron A, dentre os outros introns utilizados (intron da β -actina e intron quimérico), foi o que apresentou melhor eficiência de expressão gênica (*in vivo* e *in vitro*) dentre todas as linhagens de células de mamífero por ele testadas. Nos experimentos *in vitro*, os aumentos em relação aos introns da β -actina e quimérico variaram de 3 a 8 vezes, dependendo da linhagem celular. A atividade dos outros dois introns era similar. Nos experimentos *in vivo*, o aumento foi de 2 vezes para células hepáticas e 4 vezes para células musculares. Com isso, os resultados obtidos corroboram os dados da literatura, que mostram o intron A como um importante elemento para a otimização da expressão gênica.

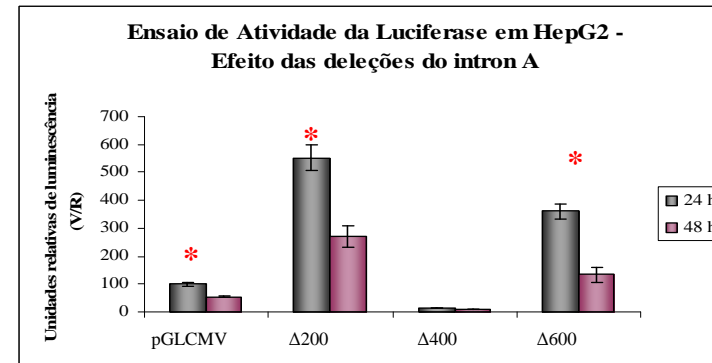
4.2.2.2) Efeito das deleções do intron A na atividade da luciferase nas linhagens celulares CHO-K1, COS-7, HepG2 e HEK-293.

Uma vez definida a ação positiva da presença do intron A, passamos a tentar a delimitar a região capaz de exercer essa atividade, com o objetivo de tentar identificar introns mais curtos com menor impacto nos vetores utilizados. Foram feitas construções em que o intron A foi deletado em algumas regiões, a fim de verificar a porção mínima do intron que fosse funcional. As diferentes construções com o intron A deletado estão descritas na figura 13. Todas elas foram transfectadas de forma transiente em CHO-K1, COS-7, HepG2 e HEK-293, e 24 e 48 horas pós-transfecção foi medida a atividade da luciferase. Na figura 20 são mostrados os gráficos com os valores relativos da atividade da luciferase para as quatro linhagens de células destacadas. Cada gráfico representa um experimento significativo de três repetições realizadas.

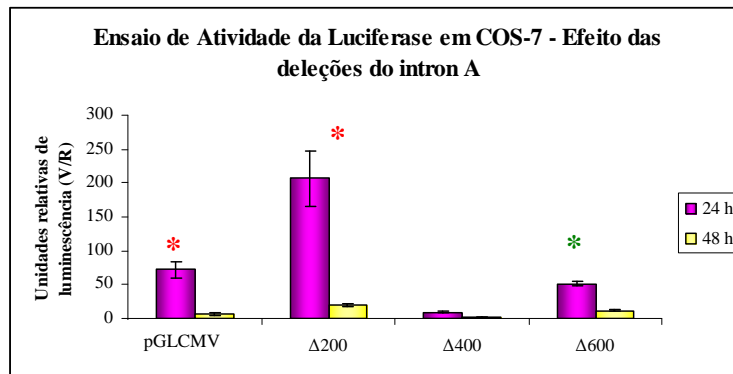
A



B



C



D

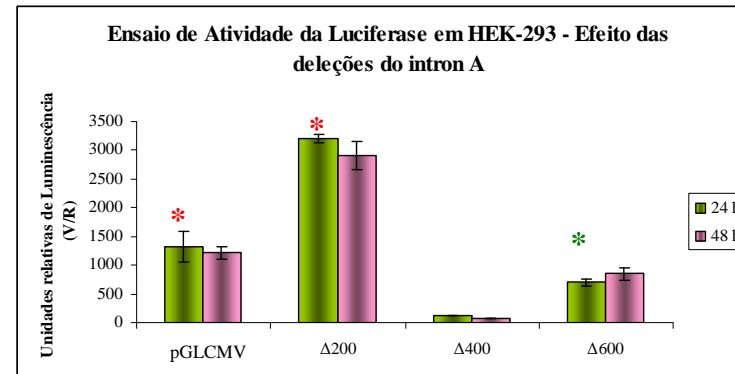


Figura 20. Efeito das deleções do intron A na atividade da luciferase em CHO-K1 (painel A), HepG2 (painel B), COS-7 (painel C) e HEK-293 (painel D). As construções referentes aos plasmídios com o gene repórter da luciferase de vaga-lume e promotor de CMV com intron A (pGLCMV), intron A deletado em 200 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 e posteriormente mediu-se a atividade da luciferase 24 e 48 horas pós-transfecção. Os asteriscos vermelhos indicam que os valores apresentados têm diferença estatisticamente significativa, com $P < 0,05$. Os asteriscos verdes indicam que não há diferença significativa entre o valor de pGLCMV $\Delta 600$ e de pGLCMV para as linhagens celulares em questão.

Os valores mostrados nos gráficos acima indicam que as construções com intron A deletado funcionam tão bem quanto ou até melhor do que a construção com intron A selvagem. A deleção de 200 pb no intron A foi a que apresentou melhores resultados em relação ao aumento da atividade da luciferase, que foi de aproximadamente 4 a 6 vezes, dependendo da linhagem celular.

A deleção de 400 pb, ao contrário, resultou em uma queda brusca da atividade da luciferase em todas as células estudadas, sendo que essa redução chegou a mais de 10 vezes. A deleção de 600 pb melhorou a atividade da luciferase apenas em HepG2 (em torno de 3 vezes) e em CHO-K1 (em torno de 2 vezes), enquanto que nas outras células essa construção não mostrou uma diferença significativa na atividade da luciferase quando comparada com a atividade da construção com intron A inteiro. É importante ressaltar também que os valores da atividade da luciferase na linhagem celular HEK-293 foram os maiores dentre todas as linhagens celulares estudadas, o que pode ser verificado pela análise da escala dos gráficos, que é 10 vezes maior em HEK-293 do que nas outras três linhagens.

Uma possível explicação para os valores obtidos das deleções no intron A está na presença de um sítio de ligação a um fator inibidor da transcrição na região de 200 pb deletada na construção pGLCMV Δ 200. Com a remoção desta região, o fator não mais se ligaria e conseqüentemente não inibiria a atividade da luciferase. Porém, no intron A inteiro essa região está presente e mesmo assim não se observa um efeito de modulação negativa na atividade da luciferase. Em 1991, Ghazal e Nelson mostraram que um sítio de ligação a um fator transcricional desconhecido é encontrado no exon 1, e que apenas este elemento, sem o intron A, já é capaz de melhorar a expressão da enzima CAT (do inglês *chloranphenicol acetyltransferase*) em quase 10 vezes em células da linhagem HeLa. Como observado na figura 6 da Introdução, o exon 1 contém a região 5'UTR do mRNA do gene IE1 de CMV. Além disso, há a presença do sítio de ligação ao fator NF-1 (Chapman *et al*, 1991), que é um ativador transcricional. Portanto, o sítio inibidor putativo, estando dentro do contexto do intron A, exon 1 e 2 teria um efeito atenuado. Além disso, pode haver outros sítios que anulem ou atenuem o efeito deste possível sítio de ligação a um fator inibidor localizados na região mais distal do intron A, que em conjunto contribuiriam para o efeito do intron A na sua forma completa. Apesar do extenso estudo sobre o intron A e o gene IE de CMV, ainda não foram identificados ou mapeados muitos sítios para ligação de fatores transcpcionais. Apenas o trabalho de Ghazal e Nelson indicou a presença de um sítio onde se liga um

fator de transcrição desconhecido de ativação e o trabalho de Chapman e colaboradores (1991) descreveu a presença e função do sítio para ligação ao fator NF-1. O que ainda se encontra na literatura sobre fatores de inibição foi mostrado por Stinski (1999), relata a ligação do fator de inibição YY1 no promotor de CMV, mas não no intron A.

A presença de um sítio de ligação a um fator de inibição da transcrição também explicaria a redução abrupta da atividade da luciferase na construção pGLCMV Δ 400. Como nesta construção não foi removida a região que pensamos conter um sítio de ligação a um fator transcricional de inibição, ela atuará de forma a regular negativamente a expressão do gene estudado, sendo que este efeito é verificado pela redução significativa da atividade da luciferase. Além disso, nesta construção foram removidos o exon 2 e o sítio acceptor de *splicing*, o que pode ter alguma influência para a atividade da luciferase.

Por fim, os valores da atividade da luciferase praticamente inalterados observados para a construção pGLCMV Δ 600 podem também estar relacionados à remoção desta região de 200 pb, onde se ligaria um fator de inibição. Apesar da remoção de 75% do elemento (o intron A, juntamente com os exons 1 e 2 contêm 800 pb, aproximadamente) e do sítio acceptor de *splicing* 3', a atividade ainda permaneceu em níveis semelhantes aos observados para a construção com o intron A inteiro para as linhagens COS-7 e HEK-293, ou maiores, para as linhagens CHO-K1 e HepG2. Com isso, pode-se dizer que a atividade mínima de otimização do intron A está compreendida nesta região contida na construção pGLCMV Δ 600. Outra observação a ser feita sobre os resultados obtidos com esta construção é que o efeito é variável dependendo do tipo celular estudado. Na região mais distal do intron A e do exon 2 pode haver algum sítio para ligação de um fator transcricional tipo-celular-específico. A deleção desse sítio putativo não teve efeitos detectáveis em COS-7 e em HEK-293, mas em CHO-K1 e em HepG2 a remoção desta região promoveu um aumento significativo da atividade da luciferase.

Ghazal e Nelson (1991) mostraram que parte da atividade otimizadora do elemento estava contida no exon 1 devido à presença de um sítio para ligação de um fator transcricional de ativação. Além disso, a região inicial do intron A contém um sítio de ligação a NF1, mais forte que os quatro sítios presentes na região inicial do promotor/*enhancer* de CMV (Chapman *et al*, 1991). Desse modo, os dados observados neste trabalho poderiam indicar que o intron A possui um forte sítio de ligação a um fator transcricional de inibição, mas que pode permanecer atenuado devido à presença

de outros sítios complementares de ligação a fatores ativadores. Cabe ainda mostrar que mesmo com a remoção da região correspondente ao exon 2 e ao sítio acceptor de *splicing*, a atividade da luciferase apresentada por esta construção ainda é tão boa quanto, ou melhor, do que a atividade do intron A selvagem.

A fim de verificar se o efeito da região de 200 pb deletada no vetor pGLCMV Δ 200 é em nível pré ou pós-transcricional, poderia ser feita uma construção em que a seqüência correspondente a essa região estivesse com sua orientação invertida. Se o efeito estiver realmente relacionado ao fato de haver uma região de ligação a um fator transcricional no DNA, a melhora da atividade da luciferase ainda será verificada. Entretanto, se o seu efeito residir em alguma seqüência do pré-mRNA, a inversão da seqüência no DNA alterará os níveis da atividade da luciferase. Este experimento ainda está em fase de andamento.

Outro efeito verificado na linhagem COS-7 no tempo de 48 horas pós-transfecção foi a redução significativa da atividade da luciferase em todas as construções analisadas. Entretanto, esse resultado se deve a um aumento muito maior da atividade da luciferase de *Renilla*, presente no vetor pGL4.73 (Promega), em detrimento da atividade da luciferase de vaga-lume, em valores absolutos. Este vetor comercial utilizado como controle da transfecção contém o promotor de SV40 dirigindo a expressão do gene repórter da luciferase de *Renilla*. Desse modo, fazendo-se a razão, a atividade relativa diminui bastante. Na literatura não há relatos sobre a eficiência do promotor de SV40 em células COS-7, mas provavelmente esse aumento repentino da atividade da luciferase de *Renilla* se deve a um melhor funcionamento deste promotor em relação ao promotor de CMV, já que a linhagem COS-7 foi desenvolvida a partir da infecção de células CV1 com o vírus SV40 (Gluzman, 1981).

A fim de verificar se o efeito modulador do intron A e de suas deleções na atividade da luciferase está diretamente relacionado a uma mudança na expressão do mRNA da luciferase de vaga-lume, foi realizado um experimento de RT-PCR quantitativa em tempo real, que será melhor detalhado a seguir. Além disso, será verificado se o *splicing* do intron A nas construções com as deleções ocorre normalmente, e se isso tem alguma relação com os valores mostrados da atividade da luciferase.

4.2.2.2.1) Efeito do intron A inteiro e deletado na expressão do mRNA da luciferase de vaga-lume.

Desde 1983, quando a reação de PCR (do inglês *polymerase chain reaction*) foi criada, já foram descritas diversas modificações que proporcionaram o uso mais extenso dessa tecnologia. Uma reação derivada da PCR é a PCR quantitativa em tempo real, ou qPCR. Nesse tipo de experimento, é realizado o monitoramento do progresso da PCR na medida em que ela ocorre, e não somente no final da reação, com a verificação do produto que foi acumulado. Desse modo, a aferição do progresso da reação é feita a partir do início da fase exponencial da reação, e não na fase de platô, como ocorre na reação de PCR normal. Após a aferição dos níveis de transcritos produzidos após os ciclos de amplificação, estes são comparados com os níveis iniciais de DNA ou RNA molde. A qPCR é também uma metodologia mais sensível, que é capaz de detectar uma diferença de até duas cópias de DNA ou RNA na amostra, ao contrário da detecção da PCR normal, que é feita por meio de análise em gel de agarose corado com brometo de etídio, uma técnica bem menos sensível.

Para o estudo dos níveis de expressão de um determinado transcrito, pode ser realizada a RT-qPCR, a transcrição reversa do RNA total associada à reação de qPCR. Nesse caso, o molde para a reação será o cDNA. A quantidade do cDNA obtido será então medida a cada ciclo da reação. A quantificação da expressão de um determinado mRNA pode ser absoluta ou relativa.

Na quantificação relativa, o que se busca é a mudança da expressão gênica em uma determinada amostra relativa à outra amostra de referência, um controle. Um exemplo para esse uso pode ser o estudo da mudança do padrão de expressão de um determinado gene em resposta a um tratamento de determinada linhagem celular com uma droga. Nesse caso, serão utilizadas as amostras de RNA no tipo celular que foi tratado com a droga e do RNA de células não-tratadas, que será a amostra de referência.

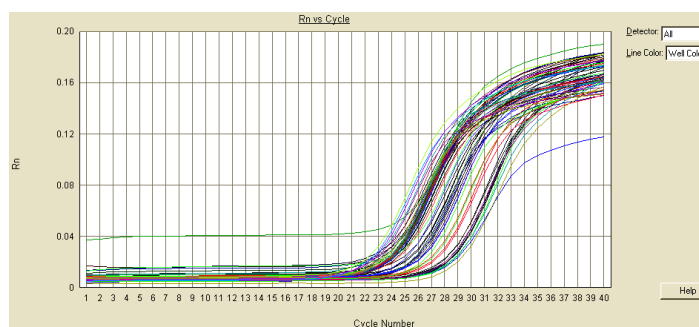
Em nosso estudo, foi realizada uma quantificação relativa, já que se desejava verificar a mudança da expressão do gene repórter da luciferase quando o promotor de CMV foi modificado por meio da adição do intron A inteiro e deletado. Com isso, a amostra de referência, ou seja, o controle a construção do promotor de CMV sem intron.

O experimento foi então realizado da seguinte forma: foram transfectadas em células CHO-K1 as construções do vetor contendo o gene repórter da luciferase de vaga-lume (pGLCMVI-, pGLCMV, pGLCMV Δ 200, pGLCMV Δ 400 e pGLCMV Δ 600)

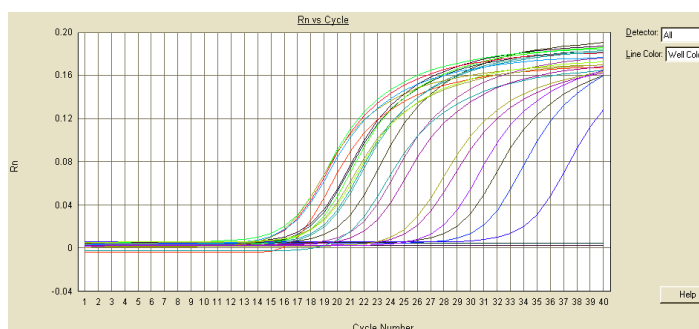
e *Renilla*. Após 6, 12, 24 e 48 horas, o RNA total das células transfectadas foi extraído, e a partir dele foi sintetizada a fita de cDNA utilizando-se como iniciador um oligonucleotídeos de politimidina (OligodT). A quantidade de RNA utilizada para esta reação foi a mesma para todas as amostras.

Para a realização da reação de qPCR, foi utilizado o corante SYBRGreen, que intercala no DNA dupla-fita (dsDNA). À medida a reação de amplificação ocorre, mais corante se liga ao dsDNA, havendo um aumento do sinal proporcional ao aumento da quantidade de DNA sintetizada . Após todos os ciclos de reação, o programa da máquina para a leitura e análise dos dados fornece curvas sigmóides que representam todo o processo da reação em cada amostra. Essas curvas são mostradas na figura 21, sendo que cada painel representa a amplificação com um iniciador específico (os iniciadores de GAPDH de *hamster*, da luciferase de *Renilla* e da luciferase de *vagalume*).

A



B



C

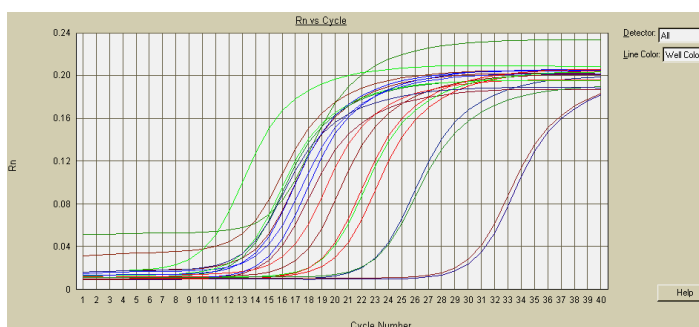


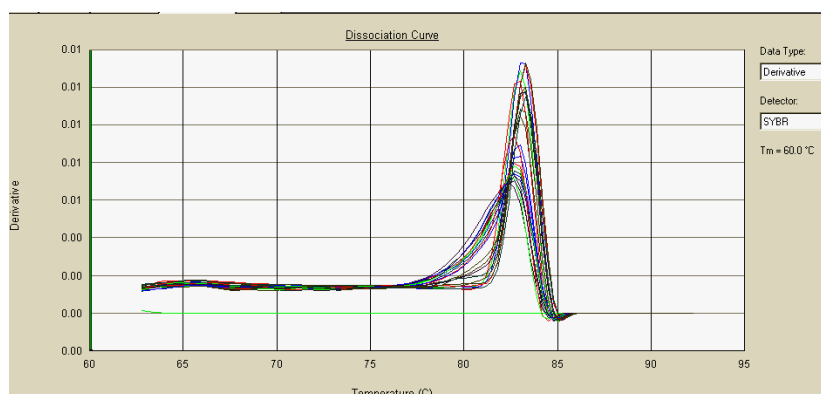
Figura 21. Curvas de amplificação das amostras com os iniciadores para os genes de GAPDH de *hamster* (painel A), da luciferase de *Renilla* (painel B) e para a luciferase de *vaga-lume* (painel C). Cada linha colorida nos gráficos é de uma amostra específica, sendo que no total foram utilizadas 24 amostras (4 tempos de extração de RNA e 6 construções – não-transfectado, sem intron, intron A, $\Delta 200$, $\Delta 400$ e $\Delta 600$). No eixo das abscissas é mostrado o número do ciclo da reação, e no eixo das ordenadas o valor de leitura da fluorescência do corante (Rn).

As curvas sigmóides indicam que a fase exponencial de amplificação começa a ocorrer em ciclos variados, dependendo da amostra e do iniciador utilizado. Quanto menor é o ciclo onde se iniciou a detecção do sinal de amplificação, maior é a expressão do gene, já que são necessários menos ciclos para a mensuração do sinal inicial. Em outras palavras, quanto mais à esquerda estiver a curva, mais o gene é expresso. No caso das curvas com o iniciador de GAPDH, a variação dos ciclos de amplificação foi menor e sempre em ciclos avançados, já que este é um controle endógeno, que é expresso

constitutivamente pela célula e em níveis inferiores daqueles encontrados para o promotor heterólogo. Desse modo, o gene de GAPDH não sofre alterações de expressão com a modificação da construção transfectada ou com o tempo de extração de RNA pós-transfecção.

Após a amplificação das amostras, foi realizado um outro controle, uma reação que é denominada dissociação dos iniciadores. Essa reação, cujos parâmetros foram descritos na sessão de Materiais e Métodos, gera uma curva que deve ter apenas um pico. Esse pico indica que o iniciador utilizado amplifica especificamente um produto e que não há a formação de dímero de iniciador. A figura 22 mostra esses gráficos, denominados curvas de dissociação.

A



B

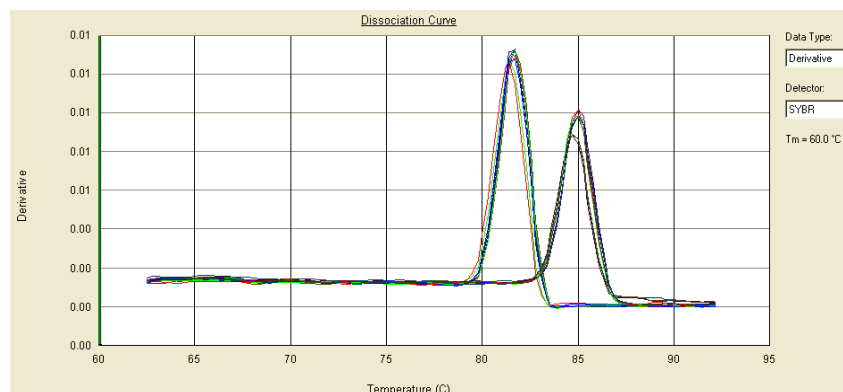


Figura 22. Curvas de dissociação dos iniciadores dos genes GAPDH (painel A), luciferase de *Renilla* e vaga-lume (painel B). Cada linha colorida é a curva de dissociação de uma amostra específica. No eixo das abscissas dos gráficos é mostrada a temperatura de dissociação do iniciador, e no eixo das ordenadas verifica-se a derivada dos valores de leitura do corante SYBRGreen. No painel B, a primeira curva (com temperatura de aproximadamente 82°C) é a do iniciador da luciferase de *Renilla*, e a segunda curva (com temperatura de aproximadamente 85°C) é a do iniciador da luciferase de vaga-lume.

Todos os gráficos mostrados acima mostram uma única curva, indicando que os iniciadores utilizados na reação não formam dímeros e que amplificam especificamente um produto de PCR.

Para a análise dos dados obtidos, 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 $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Este estudo é denominado estudo pelo Método do Ct comparativo. Com o uso dessa fórmula, não é necessário o uso de uma curva padrão, e deve ser utilizado apenas se a eficiência de amplificação da amostra - alvo e da amostra - controle for equivalente. Quando é usada a sonda Taqman para a amplificação, não é necessária essa verificação. Porém, 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 ΔCt (o cálculo deste valor já foi mostrado na sessão Materiais e Métodos) 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 23. No nosso gráfico, foram feitas diluições de 1 ng, 0,1 ng e 0,001 ng das amostras com luciferase de vaga-lume e *Renilla*. Este experimento ainda não foi realizado para os iniciadores de GAPDH.

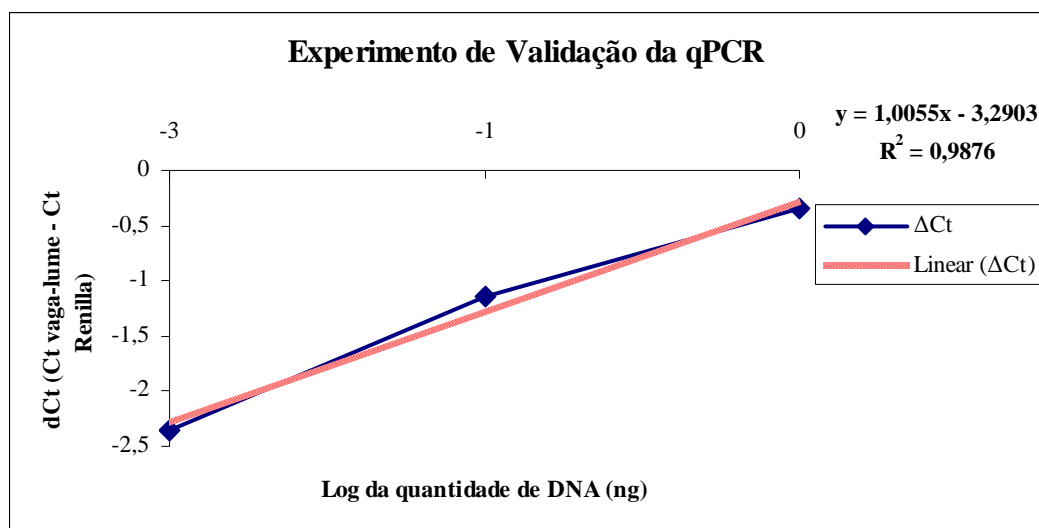


Figura 23. Validação da reação de RT-qPCR para a quantificação relativa da expressão gênica da luciferase de vaga-lume. No eixo das abscissas são mostrados os valores das diluições das amostras utilizadas na reação na forma de logaritmo. No eixo das ordenadas é mostrado o valor de ΔCt das amostras após a reação. Esse valor é dado pela diferença entre o Ct da luciferase de vaga-lume pelo Ct da luciferase de *Renilla*.

A análise do gráfico acima mostra que a eficiência de amplificação tanto da amostra alvo quanto da amostra controle é equivalente, e o estudo por meio do Método Comparativo de Ct pode ser realizado. Com isso, foram feitos dois tipos de cálculo para a obtenção dos gráficos que mostram os níveis relativos da expressão gênica da luciferase de vaga-lume: no primeiro cálculo, o valor de Ct obtido com os iniciadores da luciferase de vaga-lume foi diminuído do valor de Ct das amostras amplificadas com o iniciador de GAPDH. Isso porque o GAPDH é o controle endógeno da célula, e deve ser constante para todos os tempos de extração de RNA e para todas as construções analisadas. Com esse cálculo obtém-se o valor de ΔCt . Apesar de não ter sido feito o experimento de validação da PCR para estes iniciadores, foi considerado inicialmente que a eficiência de amplificação foi similar a dos dois outros genes testados. Esse valor de todas as amostras foi posteriormente diminuído do valor de ΔCt da construção sem intron, que é a amostra controle (sem “tratamento”), gerando assim o valor $\Delta\Delta Ct$. Por fim, esse valor foi utilizado na fórmula aritmética $2^{-\Delta\Delta Ct}$, e foi quotado no gráfico mostrado na figura 24. No segundo cálculo, os valores obtidos pela amplificação com os iniciadores da luciferase de vaga-lume foram diminuídos dos valores obtidos com os iniciadores da luciferase de *Renilla*, que é um controle de transfecção, e não um normalizador endógeno. Os cálculos foram realizados como descrito acima, e os valores obtidos de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ foram quotados no gráfico mostrado na figura 25. É importante ressaltar que os resultados referentes aos gráficos abaixo ainda são preliminares, sendo que devem ser realizadas mais repetições e análises mais refinadas dos dados.

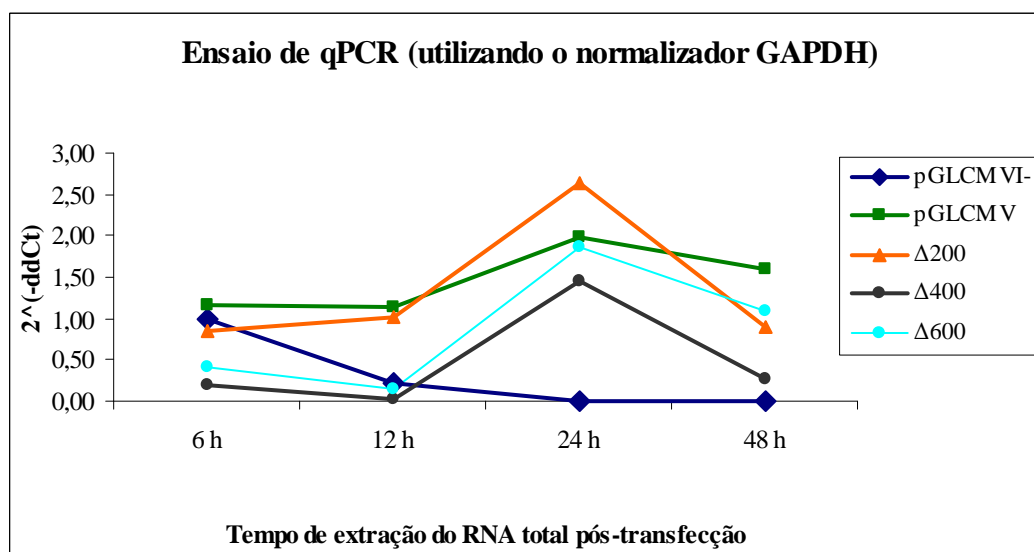


Figura 24. Ensaio de RT-qPCR utilizando o normalizador GAPDH.

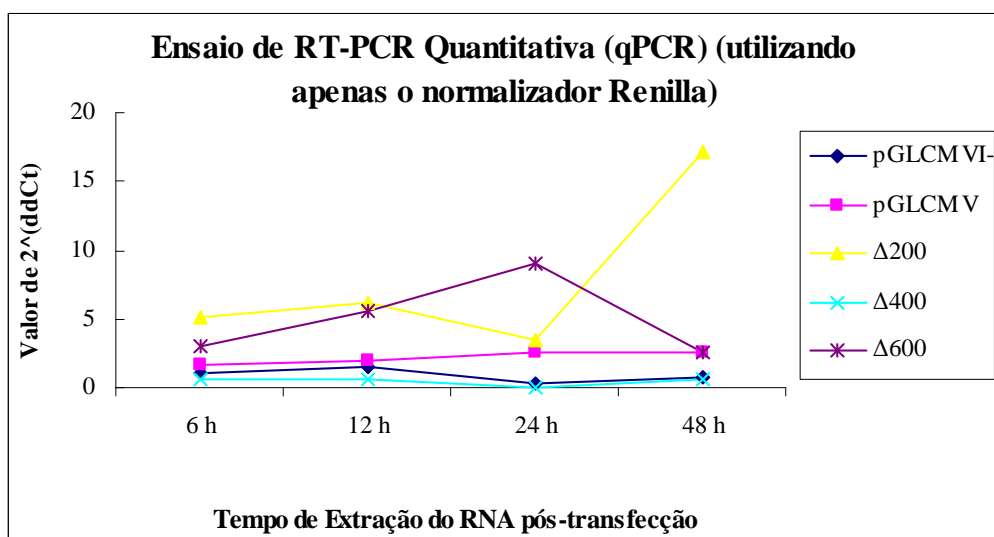


Figura 25. Ensaio de RT-qPCR utilizando o normalizador luciferase de *Renilla*.

A análise dos gráficos mostrados nas figuras 24 e 25 mostra que há uma diferença do padrão de expressão relativa do gene da luciferase de vaga-lume dependendo do gene utilizado como normalizador. Quando se utiliza o normalizador GAPDH, as construções com intron A inteiro e as deleções dele mostram um padrão de expressão semelhante entre os tempos de extração, sendo que a diferença está nos níveis da expressão do gene da luciferase de vaga-lume. Nos tempos de 6 e 12 horas, a expressão do gene é praticamente inalterada, sendo que há um pico de expressão no tempo de 24 horas e uma redução da expressão no tempo de 48 horas. Na construção com intron A inteiro, há uma tendência a uma estabilidade da expressão nos tempos analisados, já que as variações são menores do que nas outras construções. Na construção com a deleção de 200 pb, há o maior pico de expressão em 24 horas pós-transfecção, sendo que o valor desse pico é o maior de todas as construções analisadas. As construções com a deleção de 400 e 600 pb apresentam uma semelhança no padrão das curvas, sendo que a curva da deleção de 600 pb está sempre acima da de 400 pb. Isso indica que a expressão do gene da luciferase de vaga-lume é maior quando há a deleção de 600 pb no intron A do que quando a deleção é de 400 pb. Por fim, a amostra sem intron apresenta uma curva com comportamento distinto, apresentando uma queda gradativa da expressão gênica ao longo do tempo, chegando a quase zero no tempo de 48 horas.

Entretanto, quando o normalizador utilizado foi a luciferase de *Renilla*, as curvas apresentaram um padrão distinto do mostrado acima. Para as amostras sem intron, com intron A inteiro e com a deleção de 400 pb, os valores permaneceram quase constantes ao longo do tempo. Entretanto, de acordo com o gráfico, o nível de expressão do gene da luciferase de vaga-lume na deleção de 400 pb do intron A é menor do que na construção sem intron, o que não condiz com os dados da atividade da luciferase. Na construção de 600 pb, observa-se um aumento gradativo da expressão do gene estudado até o tempo de 24 horas, e depois há uma queda brusca da expressão. Na construção com a deleção de 200 pb, a expressão permanece constante até o tempo de 24 horas, havendo um grande aumento no tempo de 48 horas. Esse dado também não se relaciona com os dados observados para a atividade da luciferase, já que ela cai no tempo de 48 horas pós-transfecção em relação ao tempo de 24 horas.

Desse modo, visto que os valores apresentados no gráfico em que se utilizou o normalizador GAPDH se relacionam melhor com os dados da atividade da luciferase apresentados em gráficos anteriores, parece que é melhor o uso deste normalizador em detrimento do normalizador da transfecção, que é a luciferase de *Renilla*. Este é um gene exógeno (assim como o gene alvo a ser testado), e também pode sofrer variações distintas da expressão gênica que não foram avaliadas neste experimento e que podem influenciar na relação dos dados. Outro ponto a ser considerado é que após a leitura da atividade das duas luciferases é feita uma razão entre os dois valores, e não uma subtração, e esta razão, independentemente dos valores absolutos, tem pouca variação (exceto a variação entre os valores referentes às diferentes construções). Como para as análises de qPCR deve ser feito o cálculo em que o valor da amostra-alvo é subtraído do valor da amostra-controle, pode haver uma variação maior que não mostre uma correlação entre a atividade da luciferase e a expressão do mRNA, já que as operações aritméticas para a análise da atividade da luciferase e para a quantificação da expressão de um mRNA por qPCR são bastante distintas. Então, apesar deste controle ser utilizado para a normalização da atividade da luciferase, para o estudo dos níveis de expressão do mRNA talvez seja necessária a utilização de um gene endógeno, que seja constitutivamente expresso pela célula.

A escolha de um normalizador para qPCR é uma etapa importante da delineação experimental, visto que pode haver alteração nos resultados se a variação da expressão do gene controle for muito significativa (Bustin *et al*, 2005; Szabo *et al*, 2004). Foi então realizado o teste estatístico ANOVA para analisar se havia variação entre os

valores de Ct das diferentes construções com os iniciadores de GAPDH e de *Renilla*. No caso de GAPDH, não houve variação significativa entre os valores de Ct, resultando em um valor de “P” igual a 0,34. Em contrapartida, os valores de Ct para as amostras amplificadas com os iniciadores de *Renilla* tiveram uma variação significativa, segundo análises estatísticas da variação do valor de Ct entre as construções, com valor de “P” igual a 0,001. Na tabela 3 são mostrados os valores das médias de Ct de cada construção, os valores de desvio-padrão e de “P”.

Tabela 3. Valores médios de Ct das amostras amplificadas com os iniciadores para GAPDH e luciferase de *Renilla*.

	Média Ct GAPDH	Desvio-Padrão GAPDH	Ct <i>Renilla</i>	Desvio-padrão <i>Renilla</i>
Sem Intron (6h,12h,24h e 48h)	25,84	1,677	25,843	6,456
Intron A (6h,12h,24h e 48h)	24,44	1,025	18,105	0,784
Δ 200 (6h,12h,24h e 48h)	24,85	2,054	17,733	1,725
Δ 400 (6h,12h,24h e 48h)	26,578	1,038	25,758	0,486
Δ 600 (6h,12h,24h e 48h)	24,275	2,561	18,455	0,849
	P = 0,34		P = 0,001	

Desse modo, tendo em vista a baixa variação da expressão do controle GAPDH, ele foi escolhido como normalizador da reação de RT-qPCR. Em outros trabalhos também foi mostrado que a utilização de GAPDH como controle endógeno para experimentos de qPCR era a melhor opção dentre as testadas em diversos modelos experimentais (Goossens *et al*, 2005; Liu *et al*, 2007; Vascotto *et al*, 2005; Winer *et al*, 1999; Goswami *et al*, 1997). Entretanto, alguns autores ainda criticam a utilização deste gene em controles para experimentos de qPCR pois em algumas situações experimentais há variações significativas da expressão gênica, como por exemplo entre indivíduos distintos (Bustin *et al*, 1999), em células cancerosas (Chang *et al*, 1998; Bhatia *et al*, 1994) e em diferentes estágios do ciclo celular de células normais humanas (Mansur *et al*, 1993). Porém, em determinadas condições experimentais, como no caso de tratamento com fármacos ou observação de mudanças celulares temporais (ciclo

celular, diferentes estágios de desenvolvimento), é de se esperar que haja uma mudança global do padrão de expressão gênica, inclusive de genes considerados constitutivos. Desse modo, a escolha do gene controle do experimento de qPCR deve ser avaliada de acordo com o procedimento experimental a ser analisado. Como mostrado na tabela 3, não houve variação significativa da expressão do gene de GAPDH nas condições experimentais avaliadas neste trabalho, ou seja, entre os tempos pós-transfecção e entre as diferentes construções analisadas. Portanto, é importante que se avalie mais de um gene para ser utilizado como controle da reação para a fim de se determinar qual possui a expressão mais constante na condição experimental a ser estudada (Bustin *et al*, 2005; Goossens *et al*, 2005; Vascotto *et al*, 2005). Neste trabalho foram avaliados dois possíveis genes-controle, o de GAPDH e o da luciferase de *Renilla*, sendo que se estabeleceu como melhor controle o de GAPDH.

Os dados observados na figura 24 aproximam-se mais do que se esperava ao padrão da expressão do gene da luciferase de vaga-lume. A queda gradativa da expressão gênica observada na construção sem o intron A em relação ao tempo pós-transfecção pode ser explicada pelo mecanismo de degradação de mRNAs denominado NMD (*nonsense mediated RNA decay*). Já foi descrito que esse mecanismo é responsável pela degradação de mRNAs com códons de terminação prematuros, além de mRNAs oriundos de genes recombinantes sem introns, ou seja, cDNAs (Le Hir, 2003). Esse último caso pode explicar o decaimento da expressão do gene repórter da luciferase na construção sem intron A, já que este é um intron natural de CMV. Além disso, não se pode descartar a possibilidade de que o intron A contenha algum elemento que possa ser fundamental para a estabilidade do mRNA. A construção com intron A inteiro parece realmente ter uma estabilidade maior de expressão ao longo do tempo, já que os níveis de expressão do mRNA da luciferase de vaga-lume se alteram pouco nos tempos estudados. Por fim, os padrões apresentados pelas construções com deleções no intron A também correspondem aos valores da atividade da luciferase mostrados, sendo que a construção pGLCMV Δ 200 tem maior expressão do gene da luciferase de vaga-lume do que a construção pGLCMV Δ 600. Esta, por sua vez, apresenta maior expressão do gene estudado do que a construção pGLCMV400, que possui o menor nível de expressão dentre as construções com o intron A/deleções. Esse padrão se relaciona com os níveis de atividade da luciferase observados. Entretanto, no tempo de 24 para 48 horas na construção pGLCMV Δ 200, há uma queda brusca dos níveis de mRNA da luciferase, sendo que esta queda foi maior do que a observada nas outras construções. Este padrão

de expressão não condiz com o que se observa em relação aos níveis de atividade da luciferase.

Como já foi dito anteriormente, esses experimentos ainda necessitam de maiores ajustes, como repetições sistemáticas para a melhor avaliação do padrão de expressão entre os tempos de extração do RNA. É também importante mencionar que a relação entre os tempos de extração do RNA celular e da mensuração da atividade da luciferase não são essencialmente equivalentes, visto que a produção do mRNA é sempre anterior à produção da proteína. Em outras palavras, o tempo de extração de RNA de 24 horas pós-transfecção não indica que esses níveis de mRNA estão presentes nas mesmas quantidades quando a atividade da luciferase é medida 24 horas pós-transfecção. Para que fosse feita uma melhor correlação entre os níveis do mensageiro e os da proteína (nesse caso representados pela atividade da luciferase), seria necessária uma aferição da atividade da luciferase em tempos anteriores ao de 24 horas pós-transfecção.

O estudo da expressão do mRNA da luciferase de vaga-lume em relação à expressão do gene endógeno de GAPDH corrobora os dados da luciferase e apóia a hipótese de que o aumento da atividade estaria relacionada a uma maior estabilidade conferida ao transcrito pelo intron A. A ausência deste elemento, por outro lado, favoreceria a degradação do mRNA provavelmente por meio do mecanismo do tipo NMD.

4.2.2.2.2) *Análise do splicing do intron A nas construções com intron A inteiro e deletado.*

O gene IE1 de CMV possui 4 exons e 3 introns, entre eles o intron A (Awasthi *et al*, 2004). Este gene pode sofrer *splicing* alternativo, devido a um sítio acceptor de *splicing* críptico no meio do exon 4, gerando uma proteína de 72 kDa quando há o *splicing* normal e uma de 19 kDa quando há o *splicing* alternativo (Awasthi *et al*, 2004). Esta mesma autora também mostrou que havia outros sítios aceptores de *splicing* no chamado gene IE 2, que possui apenas um exon. Com isso, há a junção do exon 3 do gene IE1 com regiões distintas do exon do gene IE2, formando proteínas de 86, 55 e 18 kDa (Awasthi *et al*, 2004). Quanto ao *splicing* do intron A, ainda não foi encontrado nenhum sítio que possa substituir o sítio acceptor de *splicing* presente no exon 2, que foi removido nas construções com a deleção de 400 e 600 pb do intron A.

Para avaliar se o *splicing* do fragmento do intron A nas construções em que foi deletado o sítio acceptor ocorreu de forma normal, foi realizado um experimento com o objetivo de amplificar o fragmento correspondente ao exon 1 (aproximadamente 100 pb) juntamente com a região inicial do exon 2 (aproximadamente 50 pb, sendo que a região inteira tem 200 pb) após o *splicing*. A hipótese caso o processamento das versões deletadas sem o sítio acceptor original ocorresse normalmente é a de que pode haver sítios críticos de *splicing* que permitam o correto processamento destas construções. Para isso, extraiu-se o RNA total de células CHO transfectadas com as construções pGLCMV, pGLCMV Δ 200, pGLCMV Δ 400 e pGLCMV Δ 600. A partir desse RNA foi sintetizada uma fita de cDNA com um iniciador específico que reconhecia o gene da luciferase. Depois, utilizando como molde a fita de cDNA sintetizada, foi realizada uma reação de PCR com iniciadores que reconheciam as regiões proximais do exon 1 e do gene da luciferase. Se a construção for processada corretamente, o fragmento de DNA amplificado terá um tamanho aproximado de 150 pb, correspondente ao exon 1, parte do exon 2 e parte do gene da luciferase. Qualquer outro padrão de amplificação indicará uma forma alternativa de *splicing*. Na figura 26 é mostrado um esquema de como foi realizado este experimento.

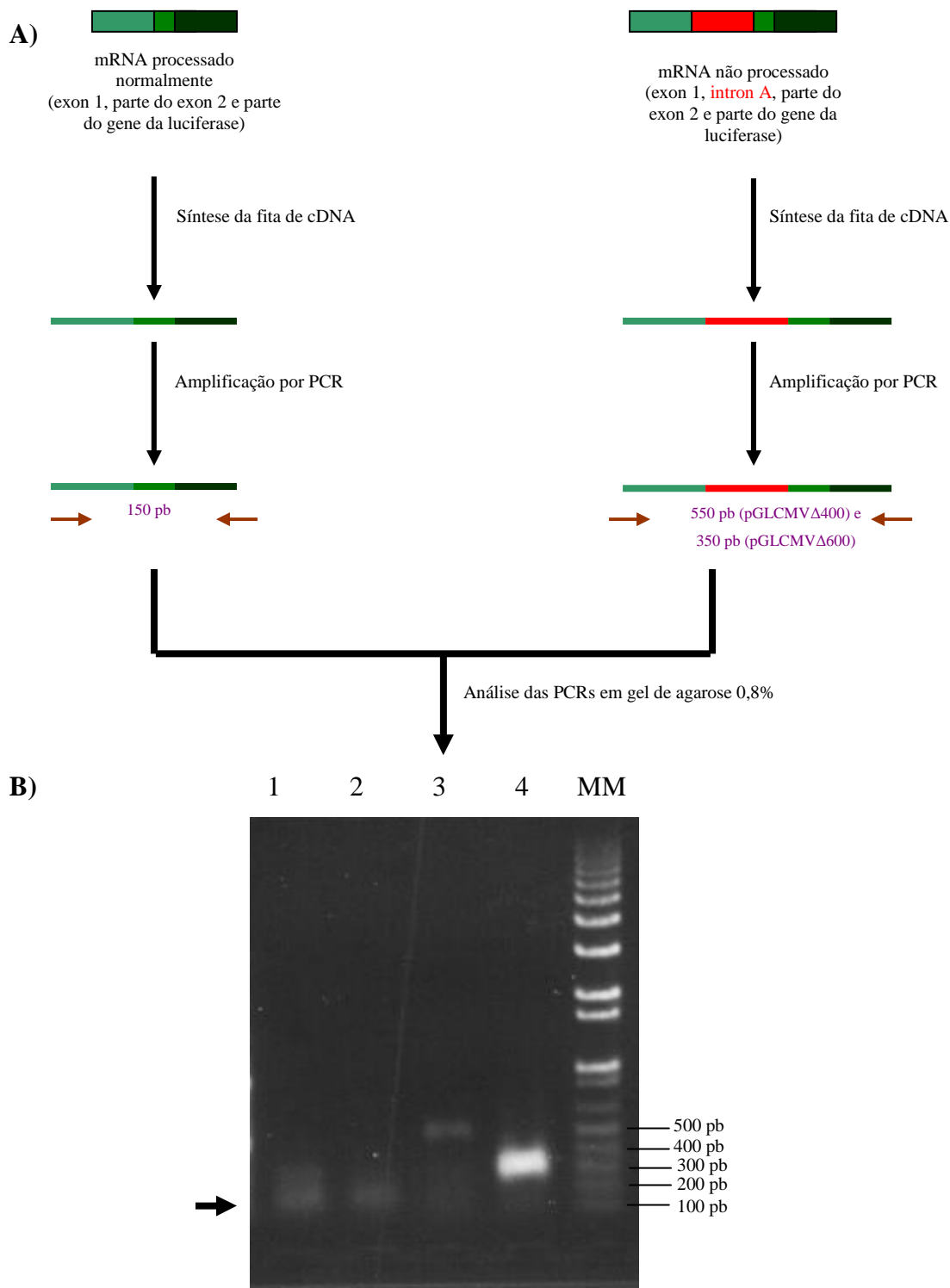


Figura 26. Análise do *splicing* nas construções contendo o intron A deletado.
 A) Exemplo de dois mRNAs, um proveniente de uma amostra que sofreu processamento correto e outra que não foi devidamente processada. Após a reação de PCR, as amostras foram analisadas em gel de agarose 0,8% (B). Em “B”, “1” representa a amostra com intron A selvagem, “2” representa a amostra com a deleção de 200 pb no intron A, “3” é a amostra com a deleção de 400 pb no intron A e “4” é a amostra com a deleção de 600 pb no intron A. “MM” é o marcador molecular 1 kb plus da Invitrogen. No gel foram utilizados 10 μ L de um volume total de 50 μ L da reação de PCR. A seta preta indica o tamanho de banda esperado para o transcrito normalmente processado.

A figura 26 mostra que o *splicing* ocorreu normalmente nas construções com o intron A inteiro e deletado em 200 pb (“1” e “2”), visto que a banda correspondente ao fragmento de DNA esperado tem um tamanho de aproximadamente 150 pb, que é o tamanho aproximado do exon 1 juntamente com o exon 2. Já as amostras “3” e “4” aparentemente não sofreram o processamento correto, já que apareceram bandas correspondentes a fragmentos de DNA de tamanhos maiores do que 150 pb. No caso da construção com deleção de 400 pb do intron A, o tamanho da banda observada foi de aproximadamente 550 pb, que é o tamanho correspondente à versão não-processada da construção. Na construção com a deleção de 600 pb, o tamanho da banda observado foi de aproximadamente 350 pb, que também é o tamanho correspondente à versão não-processada desta construção. Isso indica que a parte do intron A que não foi removida nas construções com deleções de 400 e 600 pb foi amplificada na PCR, resultando no tamanho da banda visualizado.

Desse modo, pode-se inferir que a remoção do sítio acceptor de *splicing* nas construções com deleções de 400 e 600 pb no intron A impede que este seja removido corretamente do transcrito primário, permanecendo no mRNA final. Entretanto, para a confirmação exata de que essas bandas observadas no gel sejam mesmo os transcritos processados e não-processados, o DNA deve ser eluído do gel e clonado em um vetor para seqüenciamento posterior. Outro ajuste que pode ser feito neste experimento é a utilização de outros iniciadores para que uma banda de tamanho maior seja amplificada, melhorando assim a visualização e definição no gel.

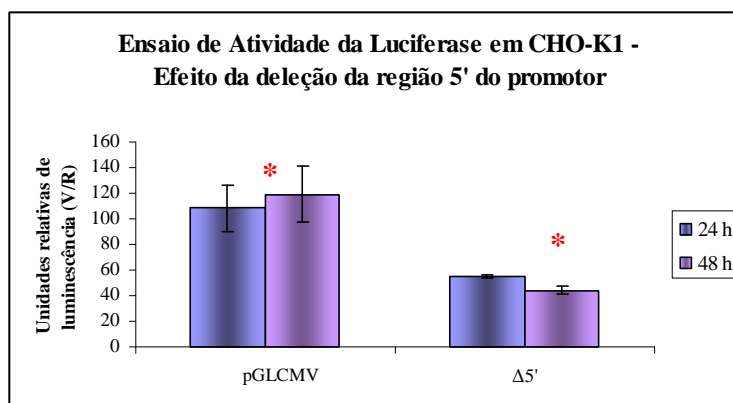
Com relação à funcionalidade das construções para o aumento da expressão gênica, infere-se que o correto processamento do transcrito do gene IE1 de CMV não é fundamental para a observação deste efeito nos níveis da atividade da luciferase. Isso porque a construção pGLCMV Δ 600 ainda mantém níveis tanto de expressão do transcrito quanto da atividade da luciferase similares aos da construção selvagem (pGLCMV). Desse modo, com o não-processamento do intron A e do exon 1, haveria a formação de um mRNA híbrido de luciferase com a região 5'URT do gene IE1 de CMV, mas produzindo uma proteína ainda biologicamente ativa.

4.2.2.3) Efeito da remoção da região 5' do promotor/enhancer de CMV

Segundo Chapman e colaboradores (1991), a região entre os sítios de *Ssp* I na região inicial do promotor/enhancer de CMV tem um efeito de modulação negativa para

a expressão de proteínas heterólogas em COS-7. Desse modo, a fim de avaliar o efeito da deleção dessa porção inicial do promotor de CMV (que contém 2 sítios de ligação a NF1) na atividade da luciferase em CHO-K1 e COS-7, foi feita uma construção denominada pGLCMV Δ 5'. Esta construção possui o promotor de CMV deletado na região 5' e o intron A inteiro, e foi transfectada transientemente em CHO-K1 e COS-7 para a aferição da atividade da luciferase 24 e 48 horas pós-transfecção. Este plasmídio foi também utilizado como arcabouço para a clonagem dos oligonucleotídeos Z1, Z3 e Z5, cujo efeito será analisado no tópico seguinte. O gráfico da figura 27 mostra o efeito dessa deleção na atividade da enzima repórter.

A



B

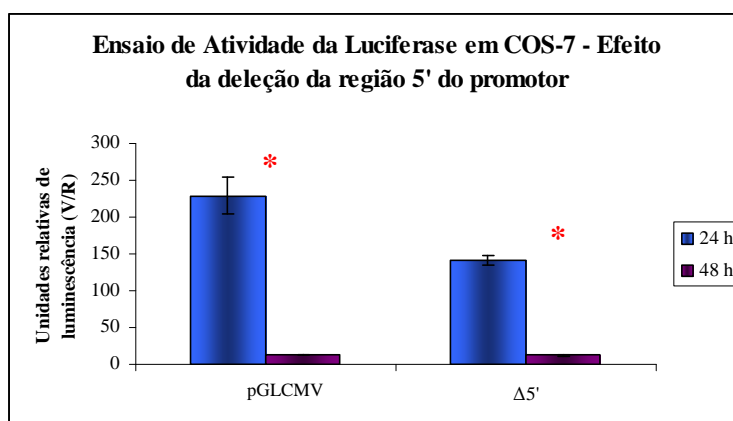


Figura 27. Efeito da deleção da região 5' do promotor/enhancer de CMV na atividade da luciferase em CHO-K1 (painel A) e COS-7 (painel B). Foram transfectadas as construções com intron A inteiro (pGLCMV) e com a deleção na região 5' do promotor de CMV (Δ 5'). Os asteriscos vermelhos indicam que há diferença significativa entre os valores, com $P < 0,05$.

Os valores mostrados nos gráficos da figura 27 indicam que a deleção da região 5' do promotor de CMV diminuiu a atividade da luciferase em quase 50%, tanto em CHO-K1 quanto em COS-7, sendo que estes valores são estatisticamente significativos. Os dados acima não corroboram os de Chapman e colaboradores (1991), que mostraram que a retirada desta região aumentava a expressão do FVIII humano recombinante e da glicoproteína do vírus HIV gp120. Talvez as diferenças entre a luciferase e as glicoproteínas expressas por Chapman *et al* (1991) reflitam um mecanismo não antecipado que pode envolver a natureza do transgene. No nosso modelo de estudo, a proteína luciferase consiste em uma proteína intracelular e sem modificações ou processamento pós-traducional, o que difere das glicoproteína estudadas por Chapman e colegas (1991), que têm natureza complexa quanto às modificações pós-traducionais e aos processos celulares de secreção.

4.2.2.4) Efeito dos oligonucleotídeos indutores de Z-DNA na atividade da luciferase em células CHO-K1 (transfecção transiente).

As construções pGLCMV, pGLCMVZ1, pGLCMVZ3 e pGLCMVZ5 foram transfectadas transientemente em células CHO-K1, e após 24 e 48 horas, as células foram lisadas para a aferição da atividade da luciferase. A figura 28 mostra esses valores para as construções com os oligonucleotídeos Z1, Z3 e Z5.

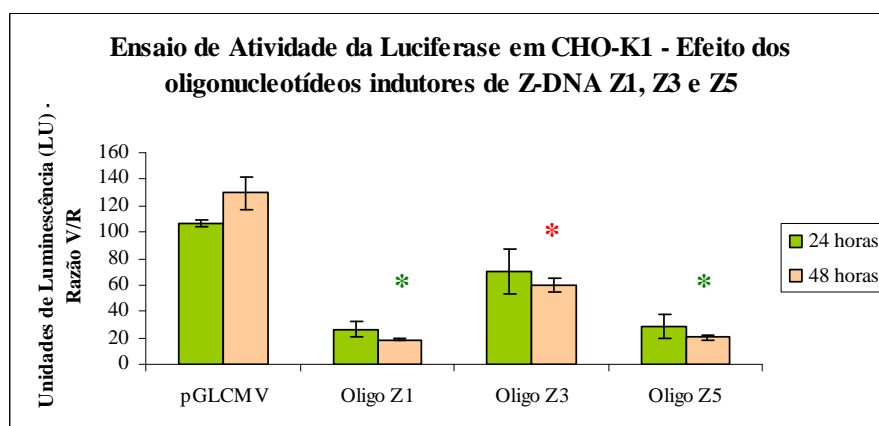


Figura 28. Efeito dos oligonucleotídeos Z1, Z3 e Z5 na atividade da luciferase 24 e 48 horas pós-transfecção em CHO-K1. Foram transfectadas as construções com intron A inteiro (pGLCMV) e com intron A e os oligonucleotídeos Z1 (oligo Z1), Z3 (oligo Z3) e Z5 (oligo Z5). Os asteriscos vermelhos indicam que há diferença significativa entre os valores, com $P < 0,05$. Os asteriscos verdes mostram que não há diferença significativa entre os valores, com $P > 0,05$.

O oligonucleotídeo Z3 aumentou significativamente (em mais de 50%) a atividade da luciferase em CHO-K1 em relação à construção com o oligonucleotídeo Z5, como mostrado na figura 38. A atividade da construção com a seqüência Z3 é ainda menor do que a da construção selvagem pGLCMV, já que para a clonagem do oligonucleotídeo foi necessária a remoção da região 5' do promotor/*enhancer*. Como já foi mostrado na figura 27, a remoção desta região diminuiu a atividade da luciferase tanto em CHO-K1 quanto em COS-7, tanto que a construção com o oligonucleotídeo Z5, que é o controle da manipulação destes plasmídios, teve valores da atividade da luciferase semelhantes aos da construção pGLCMV Δ 5', que é apenas a deleção da região 5' sem a adição de nenhuma seqüência externa. Desse modo, a comparação da modulação da atividade da luciferase deve ser feita sempre com a construção que contém o oligonucleotídeo Z5. Nesse caminho, os valores da atividade da luciferase da construção Z1 mostraram-se equivalentes aos da construção Z5, indicando que este oligonucleotídeo não teve o efeito de modulação positiva esperado.

Dentre os oligonucleotídeos utilizados neste trabalho, apenas o Z3 foi capaz de melhorar a atividade da luciferase como esperado. Entretanto, ainda não se sabe se este efeito se deve à formação de Z-DNA na região adjacente ao promotor de CMV. Para isso, foram estabelecidos clones estáveis das construções com as seqüências Z3 e Z5 em CHO-K1, sendo que este tópico será mais bem discutido a seguir.

4.2.3) *Transfecção estável*

De acordo com o gráfico da figura 28, o oligonucleotídeo Z3 foi a única seqüência, dentre todas as que foram clonadas próximas à região 5' do promotor de CMV, que apresentou o resultado esperado de aumento da atividade da luciferase. Portanto, para que a hipótese de que essa seqüência forma Z-DNA e que foi essa formação a responsável pelo aumento da atividade da luciferase, foram estabelecidos clones estáveis em CHO-K1 das construções Z3 e Z5, como um controle. Nestes clones, foi transfectado transientemente o plasmídio pMACIAscFvZ22 NLS. A hipótese é que se a seqüência Z3 realmente induzir a conformação Z no DNA, o fragmento de anticorpo anti-Z-DNA, que foi produzido no citoplasma e redirecionado ao núcleo, se ligará nessa região do promotor, estabilizando então a conformação Z e proporcionando maior acessibilidade de fatores transcripcionais ao promotor de CMV. Também como controle, foi transfectado transientemente o plasmídio pMAC vazio, que é o mesmo

arcabouço onde foi clonado o gene do anticorpo anti-Z-DNA. A transfecção deste plasmídeo não deve afetar a atividade da luciferase nos clones estáveis, já que não foi introduzido nenhum gene exógeno para ser transcrito e traduzido, servindo de controle para quaisquer efeitos de seqüestro de fatores transcricionais, já que todos os vetores são baseados no promotor de CMV. O gráfico mostrando a atividade da luciferase em clones estáveis de Z3 e Z5 transfectados transientemente com o vetor pMAC vazio e pMAC scFvZ22NLS é mostrado abaixo na figura 29.

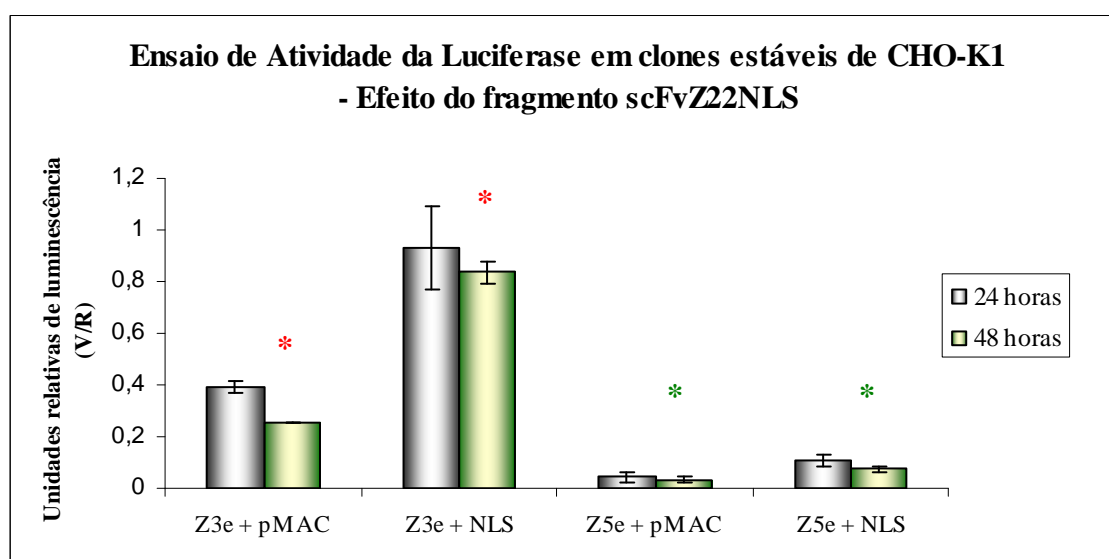


Figura 29. Efeito do anticorpo anti-ZDNA Z22 na forma scFv Z22 com sinal de localização nuclear (NLS) em clones estáveis de Z3 e Z5 (CHO-K1). Foram transfectadas transientemente nos clones estáveis (Z3 e Z5) as construções pMAC (vetor pMAC vazio) e NLS (vetor pMAC scFvZ22NLS). Os asteriscos vermelhos indicam que há diferença significativa entre os valores, com $P < 0,05$. Os asteriscos verdes mostram que não há diferença significativa entre os valores, com $P > 0,05$.

A transfecção do gene do fragmento de anticorpo anti-Z-DNA Z22 no clone estável de Z3 aumentou significativamente a atividade da luciferase, comparando-se com as amostras que foram transfectadas com o vetor pMAC vazio. Esse aumento foi aproximadamente 3 vezes. É importante ressaltar também que a transfecção da construção com o anticorpo Z22 e NLS não alterou a atividade da luciferase no clone estável de Z5, que é um controle cuja seqüência não induz a formação de Z-DNA.

Da mesma forma que Oh e colaboradores (2002) demonstraram para a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, sugerimos neste trabalho que para a linhagem celular CHO-

K1, a clonagem de uma seqüência indutora de Z-DNA próxima a um promotor pode melhorar a expressão do gene associado. Também há indícios de que esta seqüência demonstre esse efeito por induzir efetivamente a conformação Z no DNA adjacente ao promotor, já que a adição de um elemento em *trans* nesse sistema proporcionou um aumento ainda maior na atividade da luciferase em clones estáveis. A fim de verificar se o aumento da atividade da luciferase com a adição da seqüência Z3 a montante do promotor de CMV se deve ao aumento da taxa de transcrição, e conseqüentemente dos níveis de mRNA, deve ser realizado um experimento de RT-qPCR, da mesma forma que foi feito para as construções com deleções no intron A. Dessa forma, estaríamos correlacionando diretamente o aumento da atividade da enzima com aumentos dos níveis de expressão do transcrito.

5. Conclusões e perspectivas

No presente trabalho foi avaliado o potencial do intron A e de seqüências indutoras de Z-DNA em melhorar a atividade da luciferase, que foi o modelo de estudo para o teste das construções realizadas. Verificou-se que o intron A inteiro promove um aumento significativo da atividade da luciferase em todas as linhagens celulares estudadas, sendo que este aumento varia de 100 a quase 1000 vezes, este último para a linhagem HEK-293. Este resultado é corroborado pelo aumento nos níveis de expressão do transcrito da luciferase de vaga-lume, como visto nos experimentos de RT-qPCR. Foram construídas versões do intron A deletado ainda não descritas na literatura, sendo que a versão com deleção de 600 pb pode ser considerada um intron A mínimo funcional, tendo em vista que a atividade da luciferase se manteve praticamente inalterada nas linhagens de células de mamífero analisadas. A construção com deleção de 200 pb também apresentou aumentos de 2 a 7 vezes na atividade da luciferase, dependendo da linhagem celular utilizada, sendo que esta foi a melhor construção dentre todas. Os dados do experimento de RT-qPCR também confirmam que há uma relação entre a atividade da luciferase observada nas construções com deleção de 600 e 200 pb com os níveis de expressão do mRNA. Foi também mostrado que o *splicing* nas construções em que foi deletado o sítio 3' acceptor (pGLCMV Δ 400 e pGLCMV Δ 600) não ocorre normalmente como na construção com intron A selvagem e deletado em 200 pb. Nestas construções o sítio acceptor permaneceu inalterado. Como os níveis da atividade da luciferase na construção pGLCMV Δ 600 são tão bons quanto ou melhores do que os da versão com intron A inteiro, pode-se inferir que o *splicing* nesta região entre o exon 1 e 2 não é crítico para que haja melhora da expressão gênica. Com isso, pode ser que o mRNA híbrido de luciferase com a região 5'UTR do gene IE1 de CMV seja funcional, produzindo a proteína biologicamente ativa.

Foi demonstrado também que a seqüência indutora de Z-DNA Z3 foi capaz de aumentar em aproximadamente 2,5 vezes a atividade da luciferase em comparação com a construção Z5. Os valores um pouco menores da atividade da luciferase da construção Z3 em comparação com a construção selvagem (pGLCMV) são explicados pela deleção da região 5' do promotor/*enhancer* de CMV entre os sítios de restrição de *Ssp* I. Esta região ao contrário do que foi descrito na literatura, tem uma importância significativa para a expressão gênica, visto que sua remoção das construções com seqüências

indutoras de Z-DNA diminuíram pela metade a atividade da luciferase em CHO-K1 e em COS-7. Com a utilização do fragmento de anticorpo scFv Z22 com NLS foi possível demonstrar, em clones estáveis de Z3 e Z5 em CHO-K1, que há grandes indícios de que a seqüência Z3 exerça a sua atividade moduladora por meio da formação de Z-DNA, visto que a transfecção transiente desta construção nos clones estáveis aumentou significativamente a atividade da luciferase em Z3, e não em Z5, o controle.

Com isso, este trabalho mostrou a influência de elementos em *cis* (introns e seqüências indutoras de Z-DNA) e em *trans* (fragmento de anticorpo anti-Z-DNA) na atividade da luciferase. Estes elementos têm o potencial de otimizar a expressão gênica em várias linhagens de células de mamífero, sendo alvos interessantes para o estudo mais aprofundado e posterior construção de vetores para expressão de proteínas heterólogas de interesse comercial.

Dentre as perspectivas futuras para este trabalho, que terá continuidade por mais quatro anos como um projeto de Doutorado, estão:

- clonagem e seqüenciamento dos fragmentos de DNA obtidos nas reações de RT-PCR para o estudo do *splicing* nas construções com deleções no intron A.
- restauração do sítio acceptor de *splicing* na construção pGLCMV Δ 600, por meio de PCR.
- estabelecimento de novos clones estáveis em CHO-K1 das construções com os oligonucleotídeos Z12, Z3 e Z5 para estudos dos padrões de metilação no promotor de CMV por meio de seqüenciamento bissulfito e tratamento com 5-azacitidina.
- imunofluorescência e imunoprecipitação de cromatina nos clones estáveis de Z3 e Z5, utilizando o anticorpo construído neste trabalho (scFvZ22 NLS), a fim de comprovar a formação de Z-DNA na região adjacente ao promotor.
- monitorar os níveis de expressão do gene da luciferase de vaga-lume por RT-qPCR nas construções com a seqüência Z3, na presença e na ausência do scFvZ22 NLS.
- construção de um novo vetor para expressão de proteínas de interesse em células de mamífero contendo uma associação dos elementos que mostraram resultados positivos para o gene repórter da luciferase. Em outras palavras, em um novo vetor seria testado o

intron A (e versões deletadas) em conjunto com o elemento Z3 e restaurando-se a região 5' do promotor de CMV, na expressão estável de uma proteína de interesse comercial. Nesse sistema estaria incluso também a expressão transiente do scFvZ22 NLS. Na figura 30 é mostrado um esquema de como funcionariam os elementos estudados se estivessem em um mesmo vetor para expressão heteróloga de uma proteína de interesse comercial. Na figura é possível verificar como todos os elementos estudados neste trabalho podem agir de forma cooperativa para melhorar a expressão de uma proteína de interesse.

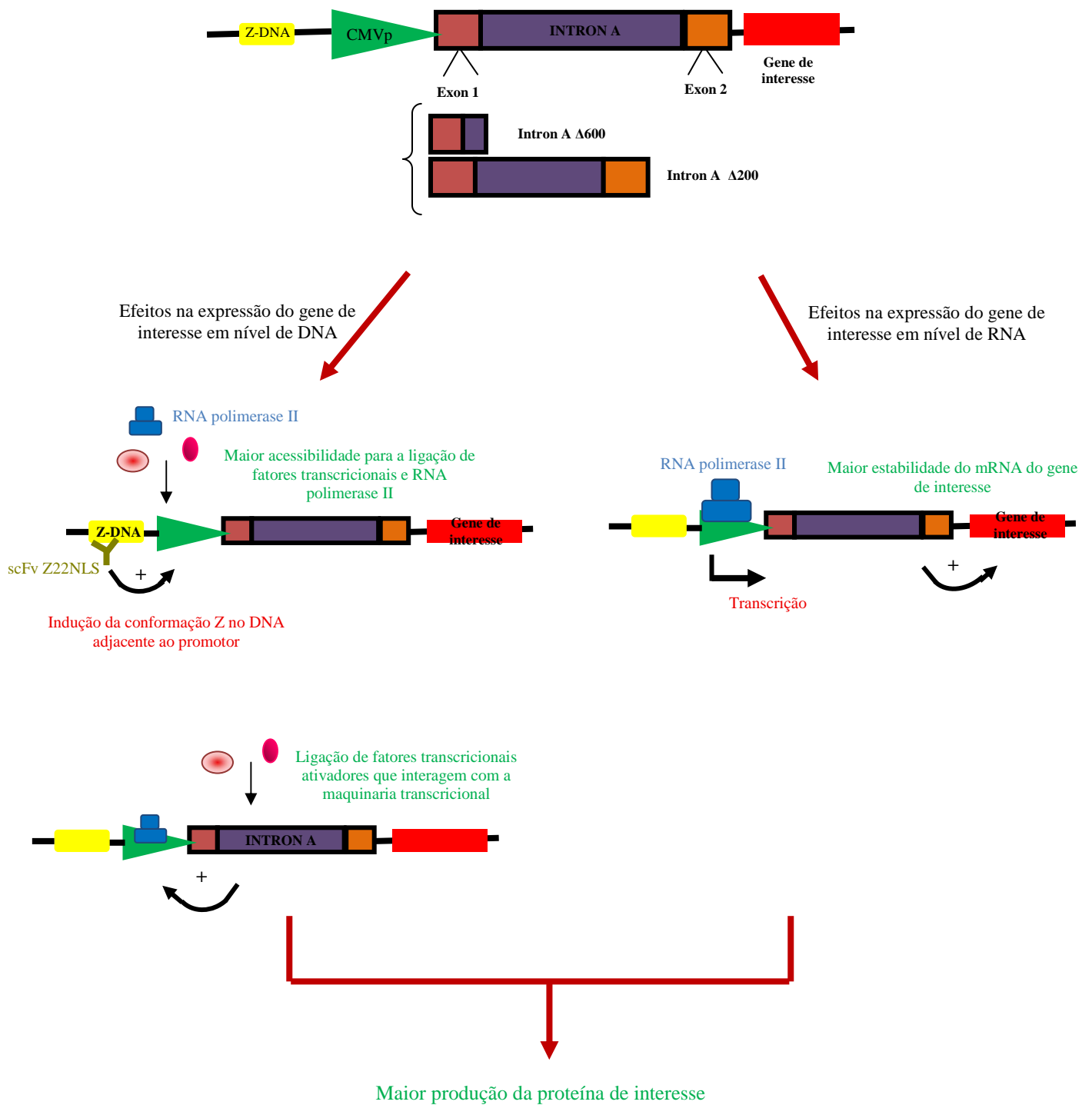


Figura 30. Mecanismos que ocasionarão aumentos na expressão de um gene de interesse quando os elementos são colocados em um mesmo vetor para expressão heteróloga. Na figura observa-se o esquema de um vetor que contém os elementos estudados neste trabalho (seqüências indutoras de Z-DNA e intron A), além do promotor de CMV dirigindo a expressão de um gene de interesse qualquer. Os mecanismos mostrados agiriam de forma sinérgica, proporcionando um aumento global da produção da proteína de interesse.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adams, M. D. *et al.* **The genome sequence of *Drosophila melanogaster*.** *Science*. 2000; 287, 2185–2195.

Andrade, E.V.; Albuquerque, F.C.; Moraes, L.M.; Brigido, M.M. e Santos-Silva, M.A. **Single-chain Fv with Fc fragment of the human IgG1-tag: construction, *Pichia pastoris* expression and antigen binding characterization.** *Journal of Biochemistry (Tokyo)*. 2000; 128(6): 891-5.

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

Awasthi, S.; Isler, J. A. e Alwine, J. C. **Analysis of splice variants of the Immediate-Early 1 Region of Human Cytomegalovirus.** *Journal of Virology*. 2004; 78(15): 8191-200.

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.

Baltimore, D. **Our genome unveiled.** *Nature*. 2001; 409: 814–816.

Barbas III, C.F.; Burton, D. R.; Scott, J. K. e Silverman, G. J. **Phage display: a Laboratory Manual.** 2001. 1ª edição. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA.

Berdoz, J.; Blanc, C. T.; Reinhardt, M.; Kraehenbuhl, J. P. e Corthésy, B. **In vitro comparison of the antigen-binding and stability properties of the various molecular forms of IgA antibodies assembled and produced in CHO cells.** *PNAS*. 1999; 96: 3029-34.

Bhatia, P.; Taylor, W. R.; Greenberg, A. H. e Wright J. A. **Comparison of glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase and 28S-ribosomal RNA gene expression as RNA loading controls for northern blot analysis of cell lines of vary malignant potential.** *Analytical Biochemistry*. 1994; 216: 223-6.

Blackburn, G.M. e Gait, M. G. **Nucleic Acids in chemistry and biology.** 1995; Segunda Edição, Oxford, UK.

Blencowe, B. J.; Issner, R.; Nickerson, J. A. e Sharp, P. A. **A coactivator of pre-mRNA splicing.** *Genes & 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.

Brígido, M. M. e Stollar, B. D. **Two induced anti-Z-DNA monoclonal antibodies use VH gene segments related to those of anti-DNA autoantibodies.** *The Journal of Immunology*. 1991; 146(6): 2005-9.

Brígido, M.M.; Polimenis, M. e Stellar, B.D. **Role of mouse VH10 and VL segments in the specific binding of antibody to Z-DNA, analyzed with recombinant single chain Fv molecules.** *Journal of Immunology*. 1993; 150: 469-75.

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.

Burtet, R. T.; Santos-Silva, M. A.; Buss, G. A.; Moraes, L. M.; Maranhão, A. Q. e Brígido, M. M. **Production of recombinant Fab in *Pichia pastoris* from a monocistronic expression vector.** *Journal of Biochemistry*. 2007. A ser publicado.

Bustin, S. A.; Benes, V.; Nolan, T. e Pfaffl, M. W. **Quantitative real-time RT-PCR – a perspective.** *Journal of Molecular Endocrinology*. 2005; 34: 597-601.

Bustin, S. A.; Gyselman, V.G.; Williams, N. S. e Dorudi, S. **Detection of cytokeratins 19/20 and guanylyl cyclase C in peripheral blood of colorectal cancer patients.** *British Journal of Cancer*. 1999; 79: 1813–20.

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, no prelo.

Chan, C. C.; Dostie, J.; Diem, M. D.; Feng, W.; Mann, M.; Rappsilber, J. e Dreyfuss, G. **eIF4A3 is a novel component of the exon junction complex.** *RNA*. 2004; 10(2): 200-9.

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.

Chen, R. W.; Saunders, P. A.; Wei, H.; Li, Z.; Seth, P. e Chuang, D. M. **Involvement of glyceraldehyde-3-phosphatedehydrogenase (GAPDH) and p53 in neuronal**

apoptosis: evidence that GAPDH is upregulated by p53. *Journal of Neuroscience*. 1999; 19: 9654–62.

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.

Chomczynski, P. e Sacchi, N. **Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium-thiocyanate-phenol-chloroform extraction.** *Analytical Biochemistry*. 1987; 162(1): 156-9.

Chung, K. H.; Kim, K. S. e Kim, J. H. **N-Acetylcysteine increases the biosynthesis of recombinant EPO in apoptotic Chinese hamster ovary cells.** *Free Radical Research*. 1999; 64: 108-19.

Ciafrè, S. A.; Rinaldi, M.; Vespignani, I.; Parrella, P.; Seripa, D.; Signori, E.; Ria, F.; Farace, M. G. e Fazio, V. M. **A plasmid family containing two different expression cassettes suitable for immunomodulation and genetic immunization.** *Plasmid*. 1998; 40 (1): 84-9.

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.

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.

Durocher, Y.; Perret, S. e Kamen, A. **High-level and high-throughput recombinant protein production by transient transfection of suspension-growing human 293-EBNA1 cells.** *Nucleic Acid Research*. 2002; 30 (2): E9.

Ewing, B.; Hilier, L.; Wendl, M. e Green, P. **Basecalling of automated sequencer traces using phred I – Accuracy assessment.** *Genome Research*. 1998; 8: 175-85.

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.

Goldberg, M. L. **Sequence analysis of *Drosophila* histone genes.** *Dissertação de Doutorado*. 1979. Stanford University, Califórnia.

Goossens, K.; Poucke, M. V.; Soom, A. V.; Vandesompele, J.; Zeveren, A. V.; Peelman, L. J. **Selection of reference genes for quantitative real-time PCR in bovine preimplantation embryos.** *BMC Developmental Biology*. 2005; 5 (27): 1-9.

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.

[Gruh, I.](#); [Wunderlich, S.](#); [Winkler, M.](#); [Schwanke, K.](#); [Heinke, J.](#); [Blömer, U.](#); [Ruhparwar, A.](#); [Rohde, B.](#); [Li, R. K.](#); [Haverich, A.](#); e [Martin, U.](#) **Human CMV immediate-early enhancer: a useful tool to enhance cell-type-specific expression from lentiviral vectors.** *Journal of Gene Medicine.* 2008; 10(1): 21-32.

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.

Hammarskjöld, M-L.; Heimer, J.; Hammarskjöld, 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.

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.

Herbert, A. e Rich, A. **The biology of left-handed Z-DNA.** *The Journal of Biological Chemistry.* 1996; 271(20): 11595-8.

Iosef, C.; Gkourasas, T.; Jia, C. Y. H.; Li, S. S. C. e Han, V. K. M. **A functional nuclear localization signal in insulin-like growth factor binding protein-6 mediates its nuclear import.** *Endocrinology.* 2007; a ser publicado.

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

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.

Kaufman, J. e Smale, S. T. **Direct recognition of initiator elements by a component of the transcription factor IID complex.** *Genes and Development*. 1994; 8: 821-9.

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.

Klysik, J.; Stirdivant, S.M. e Wells, S.M. Left-handed DNA. **Cloning, characterization, and instability of inserts containing different lengths of (dC-dG) in *Escherichia coli*.** *The Journal of Biological Chemistry*. 1982; 257(17): 10152-8.

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.

Lander, E. S. *et al.* **Initial sequencing and analysis of the human genome.** *Nature* 409, 860–921 (2001).

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 & 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.

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

Li, Y. P.; Bang, D. D.; Handberg, K. J.; Jorgensen, P. H. e Zhang, M. F. **Evaluation of the suitability of six host genes as internal control in real-time RT-PCR assays in chicken embryo cell cultures infected with infectious bursal disease virus.** *Veterinary Microbiology*. 2005; 110(3-4): 155-65.

Lim, W. e Feng, Y. P. **The stretched intermediate model of B-Z DNA transition.** *Biophysical Journal*. 2005; 88: 1593-607.

Liu, H.; Mulholland, N.; Fu, H. e Zhao, K. **Cooperative activity of BRG1 and Z-DNA formation in chromatin remodeling.** *Molecular and Cellular Biology*. 2006; 26(7): 2550-9.

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.

Liu, L.F. e Wang, J.C. **Supercoiling of the DNA template during transcription.** *PNAS*. 1987; 84: 7024-27.

Liu, X-N.; Zhang, C-Y.; Jin, X-D.; Li, Y-Z.; Zheng, X-Z.; Li, L. **Inhibitory effect of schisandrin B on gastric cancer cells *in vitro*.** *World Journal of Gastroenterology*. 2007; 13(48): 6506-11.

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.

Mansur, N. R.; Meyer-Siegler, K.; Wurzer, J. C. e Sirover, M. A. **Cell cycle regulation of the glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase/uracil DNA glycosylase gene in normal human cells.** *Nucleic Acid Research*. 1993; 21: 993-8.

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.

McClellan, J.A.; Palecek, E. e Lilley, D.M.J. **(A-T)_n tracts embedded in random sequence DNA – formation of a structure which is chemically reactive and torsionally deformable.** *Nucleic Acids Research*. 1986; 14(23): 9291-309.

McLean, G. R.; Nakouzi, A.; Casadeval, A. e Green, N.S. **Human and Murine immunoglobulin expression vector cassettes.** *Molecular Immunology*. 2000; 37(14): 837-45.

McLean, M.J. e Wells, R.D. **The role of DNA sequence in the formation of Z-DNA versus cruciforms in plasmids.** *The Journal of Biological Chemistry.* 1988; 263(15): 7370-7.

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 nº JP 2007506443-A, de 22 de março de 2007.

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.

Ogawa, R.; Kagiya, G.; Kodaki, T.; Fuduka, S. e Yamamoto, K. **Construction of strong mammalian promoters by random *cis*-acting element elongation.** *Biotechniques.* 2007; 42: 628-33.

Oh, D.B.; Kim, Y.G. e Rich, A. **Z-DNA binding proteins can act as potent effectors of gene expression *in vivo*.** *PNAS.* 2002; 99(26): 16666-71.

Papagatsias, T.; Rozis, G.; Athanasopoulos, T.; Gotch, F.; Dickson, G. e Patterson, S. **Activity of different vaccine-associated promoter elements in human dendritic cells.** *Immunology Letters.* 2007; a ser publicado.

Peck, L.J.; Norheim, A.; Rich, A. e Wang, J.C. **Flipping of cloned d(pCpG)_n-d(pCpG)_n DNA sequences from right-to-left handed helical structure by salt, Co(III), or negative supercoiling.** *PNAS.* 1982; 79: 4560-64.

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 (epub ahead of print).

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.

Restelli, V.; Wang, M.D.; Huzel, N.; Ethier, M.; Perreault, H. e Butler, M. **The effect of dissolved oxygen on the production and the glycosylation profile of recombinant human erythropoietin produced from CHO cells.** *Biotechnology and Bioengineering.* 2006; 94(3): 481-94

Roy, A. L.; Meisterernst, M.; Pognonec, P. e Roeder, R. G. **Cooperative interaction of an iniciator-binding transcription initiation factor and the helix-loop-helix activator USF.** *Nature.* 1991; 354: 245-8.

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.

Ruvkun, G. e Hobert, O. **The taxonomy of developmental control in *Caenorhabditis elegans*.** *Science.* 1998; 282: 2033–41.

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

Sanford, D. G. e Stollar, B. D. **Characterization of anti-Z-DNA antibody binding sites on Z-DNA by nuclear magnetic resonance spectroscopy**. *The Journal of Biological Chemistry*. 1990, 265(30): 18608-14.

Schade, M.; Turner, C. J.; Kuhne, R.; Schmieder, P.; Lowenhaupt, K.; Herbert, A.; Rich, A. e Oschkinat, H. **The solution structure of the Z_α domain of the human RNA editing enzyme ADAR1 reveals a prepositioned binding surface for Z-DNA**. *PNAS*. 1999; 96(22): 12465-70.

Schiedner, G.; Hertel, S.; Johnston, M.; Biermann, V.; Dries, V.; Kochanek, S. **Variable affecting *in vivo* performance of high-capacity adenovirus vectors**. *Journal of Virology*. 2002; 76(4): 1600-9.

Schoroth, G.P.; Chou, J.P. e Ho, P.S. **Mapping Z-DNA in the Human Genome**. *The Journal of Biological Chemistry*. 1992; 267(17): 11846-55.

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.

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.

Smale, S. T. e Kadonaga, J. T. **The RNA polimerase II core promoter**. *Annual Review of Biochemistry*. 2003; 72: 449-79.

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 addiction to serum-free suspension culture of bcl-2-overexpressing CHO cells**. *Biotechnology Progress*. 2005; 21(1): 50-7.

Szabo, A.; Perou, C. M.; Karaca, M.; Perreard, L.; Quackenbush, J. F. e Bernard, P. S. **Statistical modeling for selecting housekeeper genes**. *Genome Biology*. 2004; 5(8): R59.

[Thanaketsarn, O.](#); [Nishikawa, M.](#); [Okabe, T.](#); [Yamashita, F.](#); e [Hashida, M.](#) **Insertion of nuclear factor-kappaB binding sequence into plasmid DNA for increase transgene expression in colon carcinoma cells**. *Journal of Biotechnology*. 2008; 133(1): 36-41.

Tripathy, S. K.; Svensson, E. C.; Black, H. B.; Goldwasser, E.; Margalith, M.; Hobart, P. M. e Leiden, J. M. **Long-term expression of erythropoietin in the systemic circulation of mice after intramuscular injection of a plasmid DNA vector**. *PNAS*. 1996; 93: 10876-80.

Vascotto, S. G.; Beug, S.; Liversage, R. A. e Tsilfidis, C. **Nv β -actin and NvGAPDH as normalization factors for gene expression analysis in limb regenerates and cultured blastema cells of the adult newt, *Notophthalmus viridescens***. *International Journal of Developmental Biology*. 2005; 49: 833-42.

Vaz de Andrade, E.; Freitas, S. M.; Ventura, M. M.; Maranhão, A. Q. e Brígido, M. M. **Thermodynamic basis for antibody binding to Z-DNA: comparison of a monoclonal antibody and its recombinant derivatives.** *Biochemical et Biophysical Acta.* 2005; 1726(3): 293-301.

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 iniciator-binding-proteins.** *Molecular Cell Biology.* 1997; 17: 2973-84.

Winer, J.; Jung, C. K.; Shackel, I. e Williams, P. M. **Development and validation of real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction for monitoring gene expression in cardiac myocytes *in vitro*.** *Analytical Biochemistry.* 1999; 270(1): 41-9.

Wofl, S.; Martinez, C.; Rich, A. e Majzoub, J. A. **Transcription of the human corticotrophin-release hormone gene in NPLC cells is correlated with Z-DNA formation.** *PNAS.* 1996; 93: 3664-8.

Wofl, S.; Vahrson, W. e Herbert, A. **Capítulo 4 em: DNA and Nucleoprotein Structure *in vivo*.** 1995; Volume 1, H.P.Saluz e K.Wiebauer editors. R.G. Landes, Austin, TX 137.

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.

Yonemura, H.; Sugawara, K.; Nakashima, K.; Nakahara, Y.; Hamamoto, T.; Mimaki, I.; Yokomizo, K.; Tajima, Y.; Masuda, K.; Imaizumi, A.; *et al.* **Efficient production of recombinant human factor VIII by co-expression of the heavy and light chains.** *Protein Engineering*. 1993; 6(6): 669-74.

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

Zorio, D. A. R e Bentley, D. L. **The link between mRNA processing and transcription: communication works in both ways.** *Experimental Cell Research*. 2004; 296: 91-7.