



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA MOLECULAR

**Clonagem e expressão de fragmentos de anticorpos
(FABs) anti-HIV-1 em *Pichia pastoris***

KELLY CRISTINA RODRIGUES SIMI

Orientadora: Prof^a. Dra. Andrea Queiroz Maranhão
Co-Orientador: Prof. Dr. Marcelo de Macedo Brígido

Brasília – DF
Dezembro de 2009

Clonagem e expressão de fragmentos de anticorpos (FABs) anti-HIV-1 em *Pichia pastoris*

KELLY CRISTINA RODRIGUES SIMI

Orientadora: Prof^ª. Dra. Andrea Queiroz Maranhão

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

Universidade de Brasília

Faculdade de Medicina

Programa de Pós-graduação em Patologia Molecular

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia Molecular da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Patologia Molecular

Brasília – DF
Dezembro de 2009

Banca Examinadora

Dra. Lidia Maria Pepe Moraes – Externo - UnB

Dr. Márcio José Poças Fonseca – Externo - UnB

Dra. Andréa Queiroz Maranhão – Orientadora - UnB

Dr. Marcelo de Macedo Brigido – Orientador - UnB

Dra. Ildinete Silva Pereira – Suplente - UnB

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

*Dedico todo este trabalho aos meus pais, porque
sem eles nada disso seria possível!*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus por me fazer entender que na ciência (somente nela) não existem milagres e sim fatos comprovados e muitos dias trabalhados.

Aos meus orientadores, Andréa e Marcelo pela oportunidade e confiança em mim. Por me aceitarem mesmo vindo de longe, e sem ao menos conhecer meu potencial e dedicação. Espero não ter decepcionado vocês!

Aos meus colegas do Laboratório 1 e dos outros também, que me ajudaram no início, meio e fim...

A Izabel, pela mão estendida SEMPRE quando precisei (e mesmo quando não precisei...rsrsr). Por seu enorme coração e bondade, tenho certeza que coisas muito boas ainda virão. A Maryani que briga comigo o tempo todo, mas que me ama de coração (eu sei, pode confessar!), que já me ajudou, que já me atrapalhou, que me fez detestá-la quando entrei no laboratório (lembra do gel???? Eu não esqueço....rsrsrs), mas que aprendi a amar pelo seu “jeitinho” de ser... bem único, diga-se de passagem. À Barbarela, que admiro muito, com seu jeito de falar sem deixar duas interpretações, pela sua ajuda, conhecimento compartilhado, amizade! Ao Yuri, pela ajuda quando eu cheguei, e pela amizade até hoje! À Isabella, pelo companheirismo, sinceridade, coração grande... te adoro viu! À Luana, centrada, amiga, sempre disposta a ajudar! À Janaina, por ser amiga e hiper-mega-ultra divertida... você já me fez rir muito... mesmo quando você não estava no laboratório... “*Dios pire*”... é isso ai! Ao Paulo, pela atenção, disposição e amizade. A Fernandinha, claro... que sempre me ajudou. Obrigada pela amizade, pelas conversas jogadas fora, pelos subways compartilhados, pelas risadas juntas. Você sabe que te amo garota! As minhas queridas Tays, a que foi embora, mas sempre presente, e a sempre presente que não vai embora! Taissa....por tudo que passamos juntos, e Tayana, por tudo que ainda vamos passar! Obrigada pela companhia nos experimentos e pela amizade!

E claro, aos meus queridos amigos e “irmãos” de coração Victor e Rafinha... Puxa! É mais difícil que pensei escrever sobre vocês: amigos, colegas, irmãos, *brothers*...rsrsrs. Vocês não imaginam o quanto me ajudaram! Vocês foram e continuam sendo a minha alegria dentro do laboratório, não deixando a minha “peteca” cair. Rimos muito juntos, na verdade, já chorei de tanto rir! Também senti, quando vocês sentiram viú! Ah... foi um grande prazer ter vocês no momento mais feliz da minha vida... MEU CASÓRIO... *Caraca véi!* Vocês estavam lá mesmo!!! Cada um, com sua particularidade. E, embora sejam bastante parecidos, são únicos! Espero ter a amizade de vocês até ficarmos bem velhinhos... pra rirmos bastante ainda nesta vida! Amo vocês!

Aos demais colegas da biomol, Marciano, Eveline, Calli, Alex. Mariana, que não está mais no nosso laboratório, mas está sempre presente com sua amizade e alegria! Me divirto com seus “pitis”! A todos os professores da biomol: Lídia pelas dicas sobre *Pichia*, Ildinete pela sua infinita disposição em ajudar, com sua simpatia contagiante.

Aos meus pais, que nunca mediram esforços pra me ajudar, que acreditaram nos meus sonhos e financiaram todos eles. Vocês são indispensáveis para o meu sucesso! A toda a minha família, pela boa fé em mim! Aos meus irmãos, meus lindos sobrinhos... minha irmãzinha linda, Gabi... aposto todas as minhas fichas em você! E claro, a quem sempre me apoiou sem pedir nada em troca, que me ajudou quando me desesperei, que sempre me deu uma palavra boa, que aguentou meu estresse, meu desânimo, que nunca deixou eu desistir... se um dia eu tiver muito sucesso, ele será todo seu... por tudo que você é.. o meu muito obrigado... é bom te chamar de meu marido!

SUMÁRIO

Lista de Tabelas	x
Lista de Figuras	xi
Lista de Abreviações	xiii
Abstract	xv
Resumo	xvi
Introdução	1
Anticorpos	2
Anticorpos Recombinantes	9
O vírus HIV e a Síndrome da Imunodeficiência	12
Sistema de expressão em <i>P. pastoris</i>	19
Justificativa	25
Objetivos	27
Abordagem Experimental	29
Materiais e Métodos	31
Materiais	
1. Linhagens bacterianas	32
2. Plasmídios utilizados	32
3. Oligonucleotídeos utilizados para sequenciamento, clonagem e reações de PCR	33
4. Meios de Cultura e soluções para bactérias	35
5. Antibióticos	36
6. Meios de Cultura e soluções para <i>P. pastoris</i>	36
7. Soluções e material para preparo de células competentes e transformação – bactéria	40
8. Soluções para extração de DNA plasmidial	41

9. Tampões de endonucleases de restrição.....	42
10. Tampões de outras reações.....	43
11. Endonucleases de restrição.....	44
12. Outras enzimas.....	45
13. Soluções e reagentes para eletroforese em gel de agarose e de poliacrilamida.....	45
14. Soluções e materiais para os ensaios imunológicos.....	48
15. Materiais utilizados para concentração de sobrenadante.....	48
16. Marcadores moleculares para DNA e proteínas.....	49
17. Kits comerciais.....	49
18. Anticorpos utilizados nos ensaios <i>Western</i> , <i>Colony</i> e <i>Dot Blot</i>	50

Métodos

1. Preparação de DNA plasmidial.....	51
2. Digestões do DNA plasmidial com enzimas de restrição.....	53
3. Análise de DNA plasmidial em gel de agarose.....	53
4. Eluição de fragmentos de DNA de gel de agarose.....	53
5. Reação de Defosforilação com a fosfatase alcalina de camarão (SAP).....	54
6. Amplificação por PCR dos segmentos gênicos codificadores para as cadeias pesadas e leves do Fab.....	54
7. Ligação de fragmentos de DNA.....	55
8. Preparação de células competentes e transformação bacteriana.....	56
9. Sequenciamento automático de DNA e análise de sequências.....	57
10. Transformação de <i>P. pastoris</i>	58
11. Detecção de colônias produtoras por meio de <i>Colony Blot</i>	59
12. Crescimento e Indução de <i>P. pastoris</i>	60
13. Detecção das proteínas por meio de <i>Dot Blot</i>	60
14. Concentração do sobrenadante.....	61

15. Precipitação de proteína com TCA.....	61
16. Análise de proteínas em gel SDS-PAGE.....	62
17. Detecção das proteínas por meio de <i>Western Blot</i>	62
Resultado e Discussão	64
1. Amplificação por PCR dos fragmentos correspondentes aos Fabs selecionados.....	65
2. Construção do vetor de expressão pPIgLe Fab.....	69
a. Clonagem do Fab de referência, anti-Z-DNA (Burtet <i>et al.</i> , 2007) no vetor pPIgLe.....	69
b. Eliminação do sítio de <i>Xba</i> I na posição 3386 do vetor pPIgLe Fab.....	70
c. Eliminação do sítio de metilação na região do sítio de <i>Xba</i> I (posição 1580) do vetor pPIgLe Fab.....	74
3. Sub-clonagem dos fragmentos codificadores de V _H , V _L e C _κ no vetor pPIgLe Fab.....	78
a. Subclonagem dos segmentos gênicos codificadores dos domínios C _κ e V _L	78
b. Subclonagem do segmento gênico codificador da cadeia V _H	81
4. Expressão em <i>P. pastoris</i>	86
Conclusões e Perspectivas	92
Referências Bibliográficas	94

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Anticorpos Monoclonais aprovados pela FDA_____	11
Tabela 2 – Epitopos da gp41 de HIV que induz anticorpos neutralizantes_____	18
Tabela 3 – Oligonucleotídeos sintéticos utilizados_____	34
Tabela 4 – Sequências dos iniciadores desenhados para amplificação das cadeias variáveis leve e pesada (V_L e V_H) e da cadeia constante leve (C_k)_____	66
Tabela 5 – Sequência de aminoácidos deduzida correspondente as cadeias V_H e V_L dos Fabs 4C1, 5H7 e 5B8 e da cadeia C_k de 5B8_____	68
Tabela 6 – Iniciadores utilizados para eliminação do sítio de <i>Xba</i> I_____	71
Tabela 7 – Iniciadores utilizados para a amplificação da sequência codificadora da cadeia constante pesada (C_{H1})_____	74
Tabela 8 – Iniciadores utilizados para amplificação do segmento gênico codificador de V_H para inserção de sítio de <i>Sac</i> I_____	82
Tabela 9 – Sequência de aminoácidos deduzida correspondente ao pré-propeptídeo do fator alfa, sítio de reconhecimento de Kex e Ste13p e os Fabs de 5B8 e 5H7_____	87

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura de uma Imunoglobulina G (IgG)	3
Figura 2 – Regiões Determinantes de Complementariedade (CDRs)	4
Figura 3 – Rearranjo e expressão dos genes da cadeia leve κ	5
Figura 4 – Rearranjo e expressão dos genes da cadeia pesada μ ou δ	6
Figura 5 – Fragmentos de uma molécula de anticorpo	8
Figura 6 – Quadro estimativo de adultos e crianças infectadas por HIV em 2007	13
Figura 7 – Esquema geral do genoma do vírus HIV	14
Figura 8 – Estrutura do vírus HIV	15
Figura 9 – Estágios iniciais da infecção por HIV	16
Figura 10 – Sítio de clivagem da endoprotease Kex2	20
Figura 11 – Via metabólica da oxidação do metanol em formaldeído na levedura <i>P. pastoris</i>	21
Figura 12 – Substituição gênica por duplo <i>crossing over</i> no locus <i>AOX1</i> em <i>P. pastoris</i>	22
Figura 13 – Inserção gênica por simples <i>crossing over</i> no locus <i>his4</i> em <i>P. pastoris</i>	23
Figura 14 – Diferenças estruturais entre os vetores originais	66
Figura 15 – Obtenção por PCR dos segmentos gênicos codificadores dos domínios variáveis e do domínio C κ dos FABs selecionados	67
Figura 16 – Obtenção do vetor pPIgLe Fab	69
Figura 17 – Construção do vetor pPIgLeFab	70
Figura 18 – Estratégia para eliminação do sítio de <i>Xba I</i>	72
Figura 19 – Estratégia para eliminação do sítio de <i>Xba I</i> na posição 3386	73
Figura 20 – Clonagem do fragmento C $_H1$ Kex no vetor pGEM-T Easy	75

Figura 21 – Análise dos clones contendo a região codificadora do domínio C _{H1} Kex reamplificada_____	75
Figura 22 – Eliminação do sítio passível de metilação (<i>Xba</i> I)_____	76
Figura 23 – Obtenção do vetor pPIgLe scFvck_____	77
Figura 24 – Obtenção do vetor pPIgLe Fab sem sítio passível de metilação_____	78
Figura 25 – Clonagem do segmento gênico codificador da cadeia constante leve (C _k)_____	79
Figura 26 – Clonagem da cadeia VL no vetor pIg16 (com C _k)_____	80
Figura 27 – Clonagem dos segmentos gênicos V _L e C _k no vetor pPIgLe Fab_____	81
Figura 28 – Deleção da base nitrogenada Guanina do sítio de <i>Xma</i> I do vetor pPIgLe Fab_____	82
Figura 29 – Obtenção do vetor Intermediário_____	83
Figura 30 – Obtenção do vetor Intermediário_____	84
Figura 31 – Clonagem do segmento gênico da cadeia V _L de 4C1_____	85
Figura 32 – Anelamento dos iniciadores utilizados para sequenciamento do Fab_____	86
Figura 33 – Imunodeteção (do tipo <i>Dot Blot</i>) das proteínas produzidas nos diferentes tempos de indução de <i>P. pastoris</i> _____	89
Figura 37 – Análise por SDS-PAGE da expressão do Fab em <i>P. pastoris</i> _____	89
Figura 38 – Índice de Adaptação de Codon_____	91

LISTA DE ABREVIACOES

Amp^R	Gene de resistência à ampicilina (β -lactamase).
APS	Persulfato de Amnia.
AOXI, 2	Genes da álcool oxidase 1 e 2.
BCIP	5-Bromo-4-Cloro-indolil fosfato.
BSA	Albumina bovina sérica.
°C	Graus Celsius.
CDR	Regio determinante de complementaridade.
ColE1	Origem de replicao de <i>E. coli</i> .
C-terminal	Extremidade Carboxi-terminal.
Da	Dalton.
DNA	cido Desoxirribonuclico.
EDTA	cido Etilenodiaminotetractico.
Fab	Fragmento de anticorpo de ligao ao antígeno.
Fc	Fragmento cristalizvel de anticorpo (poro constante).
FR	Arcabouo (<i>Framework</i>).
Fv	Fragmento variável do anticorpo.
FvFc	Fragmento variável fusionado ao Fc
g	Gramas.
h	<i>Hora</i> .
HIS 4	<i>Gene histidinol desidrogenase</i> .
Ig	<i>Imunoglobulina</i> .
KCl	<i>Cloreto de potsio</i> .
kb	<i>Kilobase</i> .
kDa	<i>Kilodalton</i> .
L	<i>Litro</i> .
M	<i>Molar</i> .
µg	<i>Micrograma</i> .
µl	<i>Microlitro</i> .
µm	<i>Micrmetro</i> .
µM	<i>Micromolar</i> .
mA	<i>Miliamper</i> .
mg	<i>Miligrama</i> .
min	<i>Minutos</i> .
mL	<i>Mililitro</i> .
mM	<i>Milimolar</i> .
MgCl₂	<i>Cloreto de Magnsio</i> .
MgSO₄	<i>Sulfato de Magnsio</i> .
mL	<i>Mililitro</i> .
mM	<i>Milimolar</i> .
MM	<i>Massa molecular</i> .
NaCl	<i>Cloreto de Sdio</i> .
NaOH	<i>Hidrxido de Sdio</i> .
NBT	<i>Nitro Blue Tetrazole</i> .

ng	<i>Nanograma.</i>
OD600	<i>Densidade ótica a 600nm.</i>
OKT3	<i>Anticorpo monoclonal anti-CD3.</i>
Ori	<i>Origem de replicação.</i>
Pb	<i>Pares de base.</i>
PBS	<i>Tampão Fosfato - Salina.</i>
PCR	<i>Reação em cadeia da polimerase.</i>
pep 4	<i>Linhagem protease menos.</i>
pH	<i>Potencial hidrogeniônico.</i>
PMSF	<i>Fluoreto de fenilmetilsulfonato.</i>
p/v	<i>Peso/Volume.</i>
RNA	<i>Ácido Ribonucléico.</i>
RNAse	<i>Ribonuclease.</i>
rpm	<i>Rotações por minuto.</i>
scFv	<i>Fragmento variável de anticorpo cadeia única (Single chain Fragment Variable).</i>
SDS-PAGE	<i>Gel de poliacrilamida desnaturante (com SDS).</i>
TEMED	<i>N,N,N',N'- tetrametil etilenodimetilamina.</i>
Tris-Base	<i>Tris(hidroximetil)aminometano.</i>
U	<i>Unidade enzimática.</i>
UV	<i>Ultravioleta.</i>
v	<i>Volume.</i>
V_H	<i>Domínio variável da cadeia pesada de um anticorpo.</i>
V_L	<i>Domínio variável da cadeia leve de um anticorpo.</i>
v/v	<i>Volume/Volume.</i>
YNB	<i>Yeast Nitrogen Base.</i>

ABSTRACT

The Acquired Immunodeficiency Syndrome (AIDS) is a pandemic deficiency through out the continent. At the moment there is not an efficient vaccine against immunodeficiency virus (HIV) due the virus efficient escape of from the immune system. However, recent studies have used glycoprotein of HIV as a potential target to development a vaccine to inhibit the virus entry into host cells. Recently, our group selected antibody fragments (Fabs) from an antibody combinatorial library of osteosarcoma patients directed to a synthetic biotinilated peptide gp41 neutralizing epitope (576 to 619 amino acids residues). In this work, the Fabs anti-gp41-HIV into a *Pichia pastoris* were cloned into expression vector. Three Fabs were cloned into this vector with correct sequence. *Pichia pastoris* has been used extensively and successfully to express recombinant proteins. Unfortunately, the recombinant proteins were expressed in low levels. However, this Fabs showed to have a good codon adaptation index to be expressed in *Pichia pastoris*, thus adjustment in the protocol must be performed.

Key Words: HIV, gp41, Fab, *Pichia pastoris*

Supported by CNPq

RESUMO

A Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) é uma doença pandêmica que atinge diversos países no mundo todo. Atualmente, não existe uma vacina eficiente contra o vírus da imunodeficiência (HIV) devido a habilidade do vírus de escapar do sistema imune. Contudo, estudos recentes têm utilizado glicoproteínas do envelope do HIV como potencial alvo para o desenvolvimento de uma vacina capaz de inibir a entrada do vírus na célula hospedeira. Recentemente, nosso grupo selecionou fragmentos de anticorpos (Fabs) de uma biblioteca combinatória de anticorpos de pacientes com osteosarcoma direcionados para um peptídeo sintético de um epítipo neutralizante da gp41. No presente trabalho, foram clonados os Fabs anti-gp41-HIV em vetor de expressão de *Pichia pastoris*. Após a obtenção das clonagens dos Fabs nesse vetor as respectivas sequências foram confirmadas. A levedura *Pichia pastoris* tem sido largamente utilizada para a produção de proteínas recombinantes com sucesso. O nível de expressão obtido para os Fabs na levedura *Pichia pastoris* foi muito baixo. Esses Fabs demonstraram possuir um bom índice de adaptação de códon para a expressão em *Pichia pastoris*. Dessa forma, ajustes no protocolo de expressão deverão ser realizados.

Palavras-chave: *HIV, gp41, Fab, Pichia pastoris*

Apoio CNPq

Introdução

INTRODUÇÃO

ANTICORPOS

O sistema imune é um sistema de defesa versátil, responsável pela proteção de animais da invasão de microorganismos patogênicos, além da manutenção da homeostase, prevenindo eventos anormais como o câncer. Pode ser categorizado em imunidade inata e adquirida, componente menos específico e mais específico, respectivamente. A imunidade inata é a primeira linha de defesa contra os microorganismos e consiste de peptídeos antimicrobianos, fagócitos, células *killer* e sistema complemento, que agem rapidamente e têm um importante papel nas infecções virais. A imunidade adquirida consiste na resposta humoral e celular, mediadas por linfócitos B e T, respectivamente e é caracterizada pela grande especificidade para as distintas moléculas e a capacidade de responder vigorosamente a repetidas exposições ao mesmo antígeno.

Considerando-se a imunidade humoral, essa especificidade se deve à interação dos antígenos com os receptores presentes na membrana dos linfócitos B, que inicia uma cascata de sinalização culminando com o desenvolvimento destas células em plasmócitos, células produtoras de anticorpos, moléculas-chaves do reconhecimento antigênico.

Os anticorpos (Ac) ou imunoglobulinas (Ig) são glicoproteínas de elevada massa molecular, classificadas em imunoglobulina G, (IgG), M (IgM), A (IgA), D (IgD) e E (IgE), e representam cerca de 20% das proteínas do sangue. Além de possuírem grande especificidade pelo antígeno que os induz, os anticorpos são capazes de recrutar sistemas efetores para destruir esses antígenos. A molécula de anticorpo é de natureza tetramérica e sua estrutura é composta de duas cadeias pesadas (H), com massa molecular de 55 kDa e duas cadeias leves (L) idênticas com aproximadamente 25 kDa. As cadeias são unidas por pontes dissulfeto e por uma extensa rede de interações moleculares intra e inter-cadeias (Roitt, 1987). Cada cadeia leve e pesada de uma imunoglobulina apresenta regiões variáveis (V) e regiões constantes (C) nas extremidades amino- e carboxi-terminais (Figura 1). Sua região amino-terminal apresenta uma composição de aminoácidos diversificada capaz de gerar variabilidade superficial que possibilita o reconhecimento de diferentes moléculas. Por sua vez, a região carboxi-terminal é constante, com pouca variabilidade, sendo responsável pelo recrutamento dos sistemas efetores da resposta imune (Goldsby *et al.*, 2000).

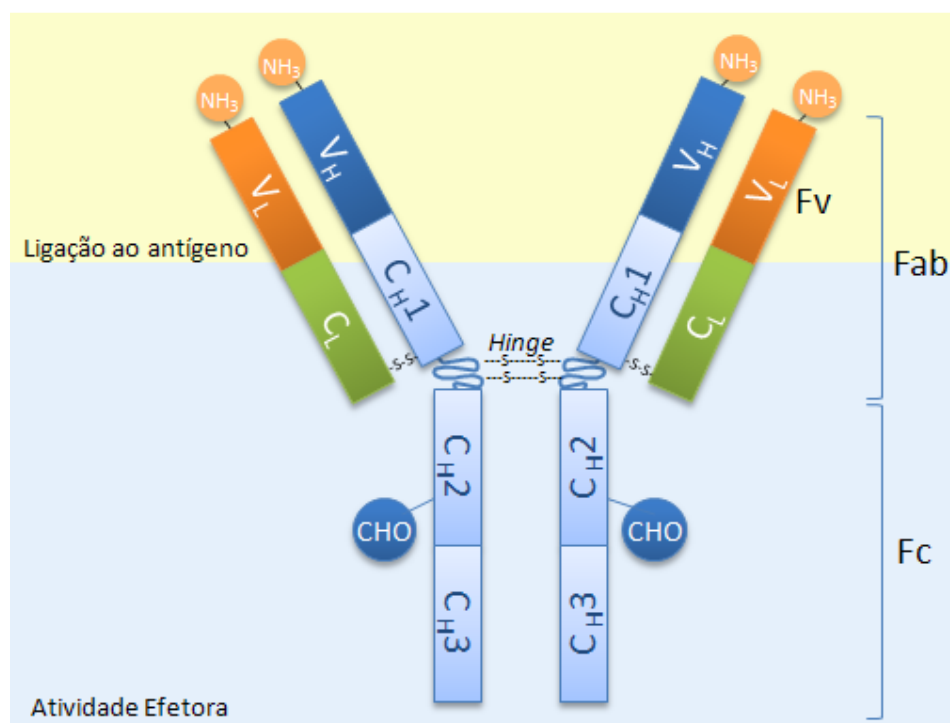


Figura 1 – Estrutura de uma Imunoglobulina G (IgG). As regiões de ligação aos antígenos são formadas pela justaposição dos domínios variáveis das cadeias leve (V_L) e pesada (V_H). As regiões que possuem atividade efetora (também conhecida como região Fc) são formadas pelas cadeias constantes pesadas e leves (C_H e C_L). A flexibilidade dos “braços” dos anticorpos (Fab) é dado pela região conhecida como *Hinge* ou dobradiça.

As regiões constantes das cadeias leve (C_L - *Constant Light*) podem apresentar dois tipos de domínio segundo suas sequências de aminoácidos. São designadas capa (κ) ou lâmbda (λ), e determinam o subtipo da cadeia leve. Já as regiões constantes das cadeias pesadas (C_H - *Constant Heavy*) são constituídas de três ou quatro domínios (C_{H1} , C_{H2} , C_{H3} e C_{H4}) agrupando-se em cinco padrões diferentes de sequências de aminoácidos designadas pelas letras do alfabeto grego α , δ , ϵ , γ e μ . A presença de um dos tipos de cadeias constantes é o critério determinante da classe ou isotipo ao qual o anticorpo pertence, podendo este ser IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, respectivamente correspondendo aos cinco tipos de região constante (Paul *et al*, 2003).

A região variável é denominada V_L (*variable light*) nas cadeias leves e V_H (*variable heavy*) nas cadeias pesadas. A superfície de ligação ao antígeno é formada pela justaposição dos domínios V_H e V_L , que juntos formam o fragmento variável (Fv).

Essa superfície é estruturalmente complementar a uma região de contato no antígeno, o epítipo, e é conhecida como região determinante de complementaridade (CDR). Por sua

complementaridade ao epitopo, essa superfície de contato é também conhecida como paratopo (Maynard e Georgiou, 2000). As CDRs foram inicialmente denominadas de regiões hipervariáveis devido a sua alta variabilidade. Essas regiões formam estrutura em voltas ou *loops* que conectam as folhas β dos domínios V_H e V_L . Cada um desses domínios possuem três CDRs (Figura 2-a). As regiões que exibem menos variabilidade são conhecidas como regiões de arcabouço, do inglês *frameworks* (FRs) e atuam como se fossem um andaime que suportam os três *loops* que constituem as CDRs (Goldsby, 2000).

A alta especificidade das moléculas de anticorpos é definida pelas CDRs que participam ativamente na ligação ao antígeno (Figura 2-b). Em geral, mais resíduos de aminoácidos das CDRs da cadeia pesada entram em contato com o antígeno, tornando esta cadeia dominante na interação anticorpo-antígeno.

A grande variabilidade dos anticorpos é devida ao rearranjo dos segmentos gênicos codificadores de cada cadeia. Essa dinâmica genética é capaz de gerar mais que 10^6 combinações diferentes e esse número pode exceder pelo menos três grandezas por meio de processos subsequentes ao rearranjo.

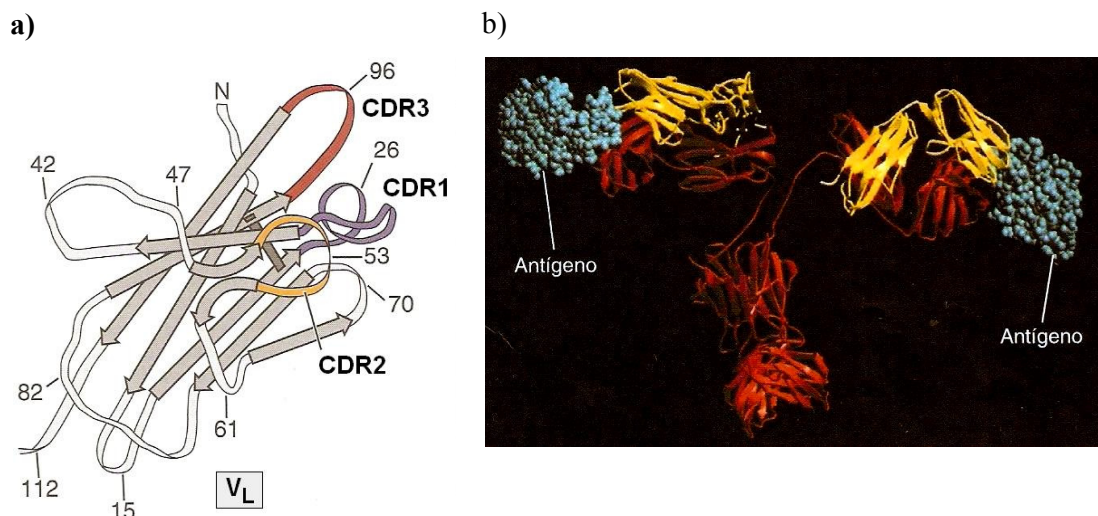


Figura 2 - Regiões Determinantes de Complementaridade (CDRs). a) Visão tridimensional das alças hipervariáveis CDR em um domínio variável (V) de uma cadeia leve. As alças que formam os *loops* da CDR1, CDR2 e CDR3 estão em azul, amarelo e vermelho respectivamente. As regiões menos variáveis que formam o *framework* estão em cinza. b) Modelo de cristalografia de um anticorpo ligando-se ao antígeno. As cadeias pesadas estão em vermelho e as leves em amarelo. O antígeno está representado em azul. (Adaptado de Abbas e Lichtman, 2005)

Os genes das imunoglobulinas estão organizados em famílias distintas. As famílias da cadeia leve κ ou λ contém os segmentos V, J e C. O rearranjo dos segmentos gênicos VJ codifica

a região variável das cadeias leves (Figura 3). A família da cadeia pesada contém os segmentos V, D, J e C. O rearranjo do segmento gênico VDJ codifica a região variável da cadeia pesada (Figura 4). Em cada família gênica o segmento C codifica as regiões constantes das cadeias. Cada segmento gênico V termina com um pequeno exon na extremidade 5' que codifica um pequeno peptídeo sinal que guia as cadeias pesada ou leve através do retículo endoplasmático. O peptídeo sinal é posteriormente clivado e as cadeias se associam para finalizar a molécula da imunoglobulina (Goldsby, 2000).

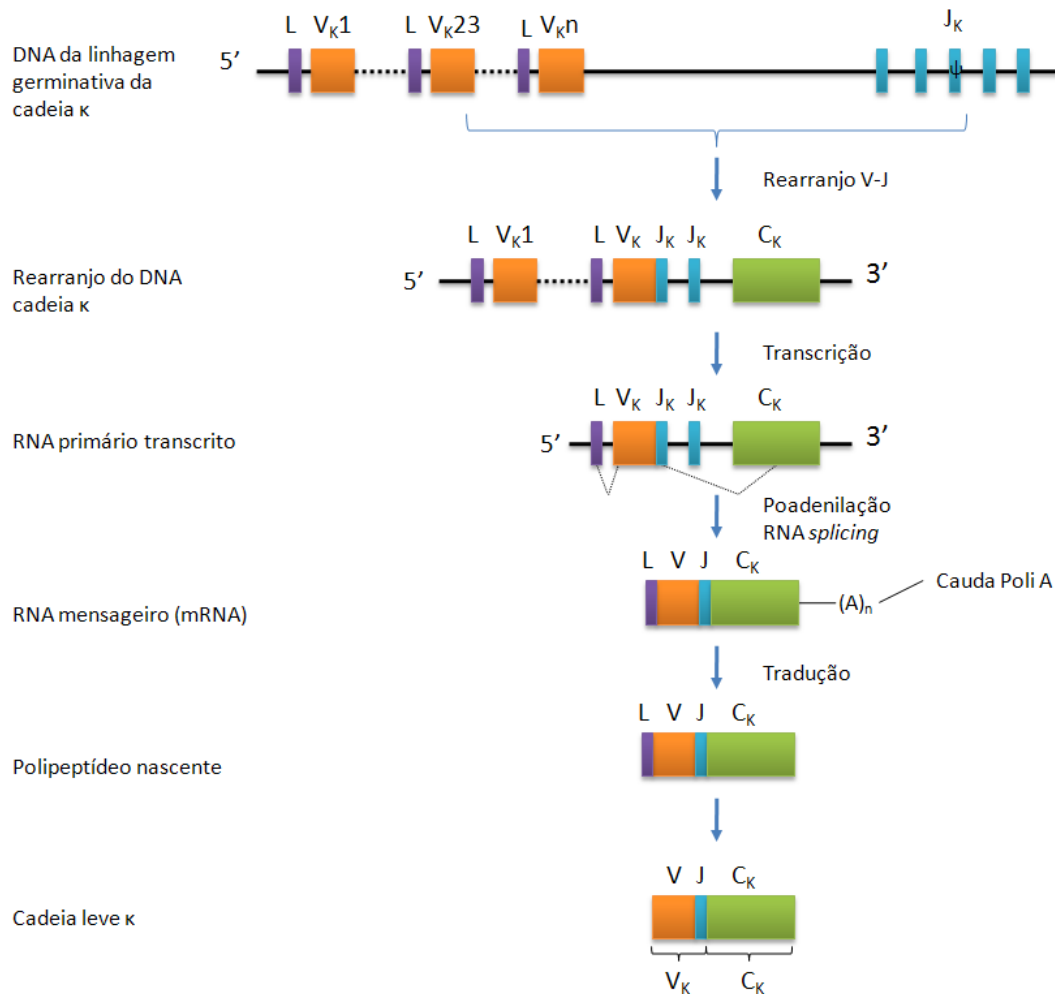


Figura 3 – Rearranjo e expressão dos genes da cadeia leve kappa. A recombinação do DNA começa na junção de V, J, um pequeno exon e a região constante C_k. As sequências rearranjadas da cadeia leve são transcritas pela RNA polimerase gerando um RNA primário transcrito. Os introns do transcrito primário são removidos resultando num RNAm da cadeia leve que será traduzido. O peptídeo sinal é removido e a cadeia leve é montada (Adaptado de Kuby, 2000).

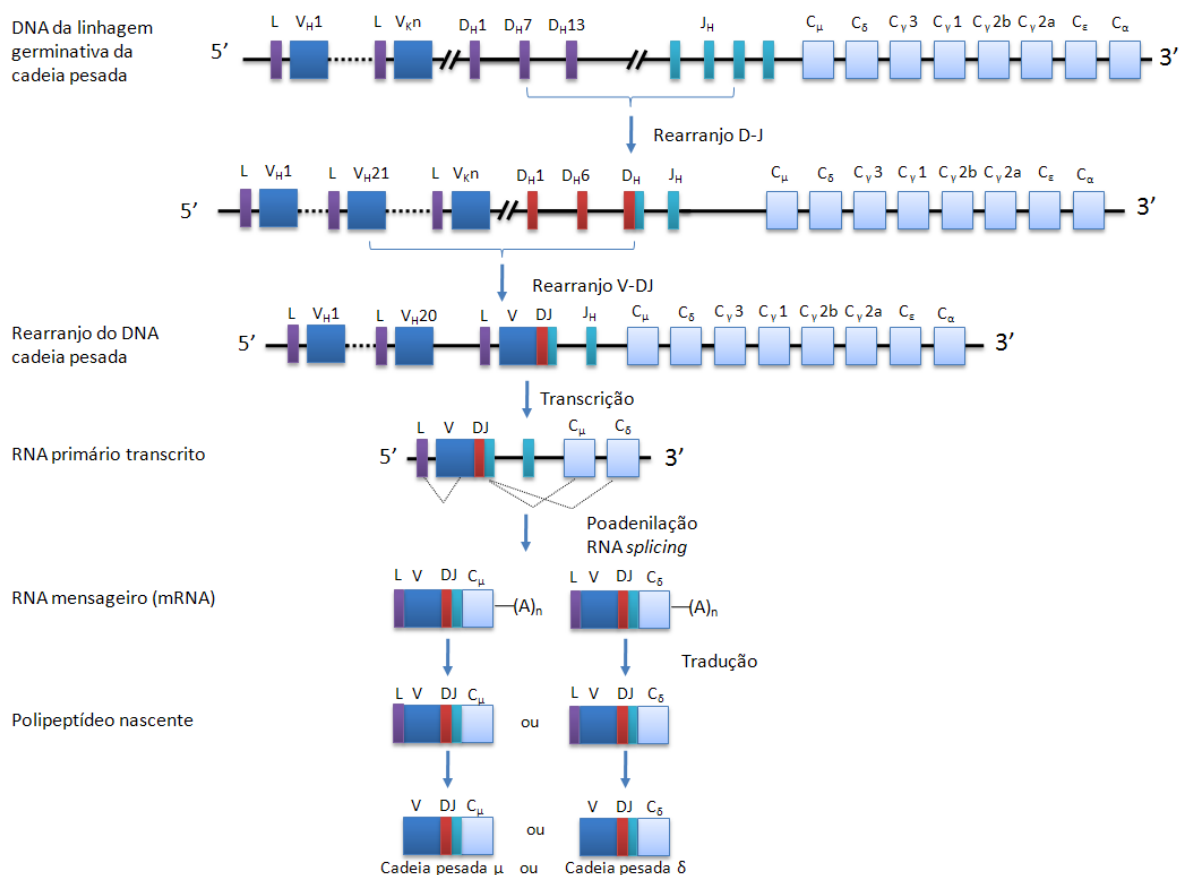


Figura 4 – Rearranjo e expressão dos genes da cadeia pesada μ ou δ . A recombinação do DNA começa na junção de D, J, um pequeno exon e a região constante pesada. As seqüências rearranjadas da cadeia pesada são transcritas pela RNA polimerase gerando um RNA primário transcrito. Os introns do transcrito primário são removidos resultando num RNAm da cadeia pesada que será traduzido. O peptídeo sinal é removido e a cadeia pesada é montada. (Adaptado de Kubly, 2000)

Além da função de ligação ao antígeno, a imunoglobulina possui vários outros papéis biológicos, que são determinados pelos domínios constantes. Os domínios C_{H1} e C_L servem para estender os “braços” do Fab da molécula do anticorpo, facilitando a interação com o antígeno aumentando ao máximo a superfície de contato, além de conferir uma estabilidade maior a essa região. A região *hinge* do anticorpo (Figura 1), encontrada apenas nas cadeias pesadas do tipo α , δ , e γ , é rica em resíduos de prolina e é flexível. Como resultado, os dois “braços” Fabs podem assumir diversos ângulos quando o antígeno está ligado ao anticorpo.

Os anticorpos geralmente não matam ou removem os patógenos somente pela sua ligação a eles. Para ser efetivo seu papel, os anticorpos não apenas reconhecem e se ligam aos

antígenos, mas também invocam respostas (funções efetoras) que resultam na remoção do antígeno e morte do patógeno.

Enquanto as regiões variáveis do anticorpo são apenas agentes de ligação, as regiões constantes pesadas (C_H) são responsáveis por uma variedade de interações em colaboração com outras proteínas, células, e tecidos que resultam em funções efetoras da imunidade humoral.

A molécula de anticorpo pode ser fragmentada proteoliticamente. Nas moléculas de IgG, a dobradiça entre C_{H1} e C_{H2} das cadeias pesadas é a região mais suscetível à clivagem proteolítica. Quando a IgG é tratada com a enzima papaína, a enzima age na região de dobradiça e cliva a IgG em três pedaços separados: dois Fabs inteiros, e a região Fc (Figura 5-a). Quando se usa pepsina para clivar a IgG, a proteólise é restrita à porção carboxiterminal da região de dobradiça, gerando um fragmento que liga ao antígeno (Fab) que contém a dobradiça e as pontes de dissulfeto entre as cadeias intactas. Fragmentos Fab que retêm a região da dobradiça são chamados de Fab', quando as pontes de dissulfeto entre as cadeias são preservadas, os dois fragmentos Fab' permanecem ligados em uma forma conhecida como $F(ab')_2$ (Figura 5-b).

Os fragmentos Fab e $F(ab)_2$ são ferramentas experimentais úteis, uma vez que podem se ligar ao antígeno sem ativar os mecanismos efetores dependentes do fragmento Fc (Vaz e Faria, 1993; Hayden *et al.*, 1997)

Outros fragmentos de anticorpos podem ser obtidos sem perder sua função biológica. O fragmento scFv (*single chain variable fragment*) composto pelas cadeias variáveis leve e pesada pode ser obtido na forma recombinante (Figura 5-c). Esse fragmento, assim como os dois tipos de Fab retêm a atividade ligante ao antígeno e não tem função efetora. Esses fragmentos têm sido a forma mais corrente e podem ser expressos em bactérias e em eucariotos inferiores (Choi *et al.*, 2004, Cunha *et al.*, 2004).

Outras variações de fragmentos também podem ser expressos em sistemas microbianos, como por exemplo, o FvFc, que constitui-se em um scFv unido aos domínios C_{H2} e C_{H3} de IgG (Figura 5-c), retendo a capacidade de ligação ao antígeno e atividade efetora. A afinidade desse fragmento é comparável com o anticorpo monoclonal parental (Andrade *et al.*, 2005; Andrade *et al.*, 2000; Maranhão e Brigido, 2000).

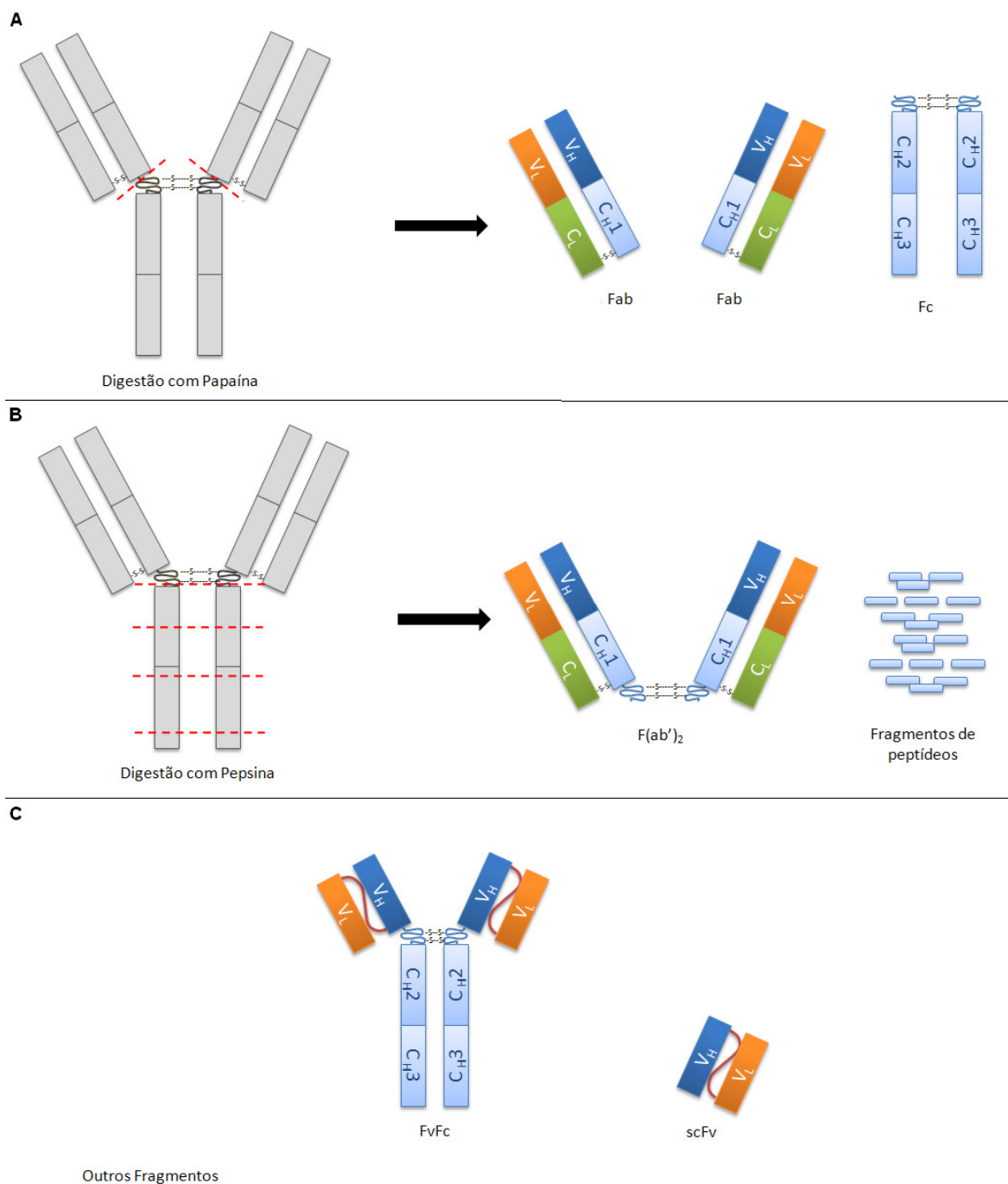


Figura 5 – Fragmentos de uma molécula de anticorpo. Moléculas de IgG são clivadas proteoliticamente pelas enzimas papaína (A) e pepsina (B) nos locais indicados pelas linhas tracejadas. A digestão com papaína permite a separação de dois fragmentos que se ligam ao antígeno (Fab) e de um fragmento efetor (Fc). A pepsina gera um único fragmento bivalente que liga ao antígeno, $F(ab')_2$. Em (C) está representado outros fragmentos que podem ser obtidos por engenharia de anticorpos. Um fragmento FvFc que possui a região de ligação ao antígeno e a efetora e o fragmento scFv de ligação ao antígeno. O fragmento scFv possui um peptídeo conector ou *linker* (em vermelho) que liga as cadeias variáveis leve e pesada.

ANTICORPOS RECOMBINANTES

O avanço na engenharia de anticorpos iniciou-se por volta dos anos 80 quando sistemas eficientes para clonagem e expressão de genes de anticorpos em bactéria foram desenvolvidos. A clonagem dos genes de anticorpos monoclonais de hibridomas murinos foi amplamente simplificada depois da descoberta da reação em cadeia da polimerase (PCR) e sistemas de expressão em bactéria permitiram a rápida e fácil produção de fragmentos funcionais de anticorpos recombinantes para análises (Maynard e Georgiou, 2000).

A partir daí, diversas técnicas para produção de anticorpos recombinantes foram introduzidas. Estas incluem ainda refinamentos na estrutura das moléculas produzidas como a conversão de anticorpos murinos em humanos por meio da humanização de anticorpos (Maranhão e Brigido, 2002).

A aplicação terapêutica de anticorpos murinos enfrenta alguns desafios, uma vez que o seu uso acarreta numa resposta imunológica conhecida como resposta HAMA (Human Anti-Mouse Antibodies). No pior caso essa resposta leva a uma hipersensibilidade alérgica séria conhecida como doença do soro. Para resolver esse problema, técnicas avançadas de humanização de anticorpos murinos têm sido bem sucedidas. Uma dessas técnicas consiste em substituir a porção Fc do anticorpo (principal responsável pela resposta HAMA) por um segmento Fc humano, mantendo a porção ligante de origem murina. O anticorpo gerado com essa técnica é conhecido como anticorpo quimérico, por ser metade murino e metade humano.

Contudo, esse anticorpo quimérico ainda se apresenta com certo grau de imunogenicidade. Desta forma, passou-se a transplantar apenas as CDRs murinas em um anticorpo totalmente humano (Silva *et al.*, 2009). Esse anticorpo quase 100% humano é praticamente invisível ao sistema imune, não invocando nenhum tipo de resposta.

Outra técnica bastante eficiente para a produção de anticorpos recombinantes humanos é a técnica de apresentação de anticorpos na superfície de fagos filamentosos, comumente conhecida como *Phage Display*. A técnica de *phage display* é uma técnica poderosa que permite a geração de milhões (ou até bilhões) de diferentes variantes de peptídeos ou proteínas. A aplicação mais bem sucedida desta técnica tem sido o isolamento de anticorpos monoclonais usando uma biblioteca de anticorpos bem representativa apresentada em fagos (Brigido e Maranhão, 2002). O princípio do *phage display* consiste na clonagem do DNA que codifica a(s) proteína(s) de interesse no genoma do fago fusionada(s) aos genes que expressam as proteínas

virais de superfície (pIII, pVI ou pVIII). Quando essas proteínas de superfície são expressas, é expressa juntamente com elas a(s) proteína(s) de interesse (Hoogenboom *et al.*, 1999). O repertório combinatório das proteínas gerado com essa técnica é muito alta, além disso, esse repertório fica acessível ao reconhecimento de um ligante, possibilitando a seleção dessas proteínas por meio de antígenos de interesse. No caso da geração de biblioteca combinatória de anticorpos ou fragmentos de anticorpos a aplicação terapêutica é ampla.

A produção de anticorpos recombinantes vem crescendo nos últimos anos e é de grande interesse biotecnológico. A possibilidade da utilização de anticorpos inteiros ou de fragmentos de anticorpos em terapias ou diagnósticos tem propulsionado a busca de métodos alternativos para a produção em larga escala.

Os anticorpos recombinantes e seus fragmentos agora representam mais de 30% das proteínas utilizadas em testes clínicos para diagnósticos e terapia. Diversos anticorpos já foram aprovados (Tabela 1) pelo órgão regulador americano FDA (*Food and Drug Administration*) para diversos fins terapêuticos. O primeiro anticorpo a ser aprovado pelo órgão foi em 1986, para uso em eventos de rejeição aguda de enxertos (Muronomab ou Orthoclone) (Cosimi *et al.*, 1981; Group, 1985). Esse anticorpo é específico para o antígeno CD3. Desenvolvido inicialmente como um marcador de linfócitos T (OKT3), este anticorpo se mostrou eficiente na depleção desses linfócitos em pacientes e, assim, passou a ser comercializado para uso em humanos.

Recentemente o grupo de Imunologia Molecular da Universidade de Brasília gerou uma biblioteca de Fab humano apresentada na superfície de fagos filamentosos que foi construída a partir do repertório imune de 11 pacientes com osteosarcoma (Dantas-Barbosa *et al.*, 2005). Essa biblioteca apresenta $1,45 \times 10^8$ formas diferentes de Fab e foi construída a partir da amplificação dos genes de domínios variáveis pesados de IgM e IgG e domínios variáveis leve de cadeias capa, a partir de cDNA de linfócitos periféricos desses pacientes. Os pares V_H-V_L foram clonados no fagomídeo pComb 3X (Andris-Whidhopf *et al.*, 2000). As análises de *fingerprinting* com enzimas de restrição e de sequências de nucleotídeos clones aleatórios revelam que a biblioteca apresenta grande diversidade (Dantas-Barbosa *et al.*, 2005). Essa biblioteca foi utilizada para selecionar Fab com capacidade de reconhecimento de células derivadas de tumores ósseos em cultura. Diversos anticorpos, reconhecendo diferentes antígenos dessas linhagens celulares foram selecionados (Barbosa *et al.*, 2005).

Tabela 1 – Anticorpos Monoclonais aprovados pelo FDA

ANTICORPO	NOME	APROVAÇÃO	TIPO	ALVO	INDICAÇÕES
Muronomab-CD3	Orthoclone OKT3	1986	Murino	Receptor CD3 de Célula T	Rejeição em transplante
Abciximab	ReoPro	1994	Quimérico	Inibição da glicoproteína IIb/IIIa	Doença cardiovascular
Rituximab	Rituxan, Mabthera	1997	Quimérico	CD20	Linfoma de <i>non-Hodgkin</i>
Daclizumab	Zenapax	1997	Humanizado	Receptor IL-2R α (CD25)	Rejeição em transplante
Basiliximab	Simulect	1998	Quimérico	Receptor IL-2R α (CD25)	Rejeição em transplante
Infliximab	Remicade	1998	Quimérico	Inibição da sinalização de TNF- α	Diversas desordens autoimunes
Palivizumab	Synagis	1998	Humanizado	Epitopo da proteína RSV F	Virus sincicial respiratório
Trastuzumab	Herceptin	1998	Humanizado	ErbB2	Câncer de mama
Gemtuzumab	Mylotarg	2000	Humanizado	CD33	Leucemia mielógena aguda (com caliqueamicina)
Alemtuzumab	Campath	2001	Humanizado	CD52	Leucemia Linfocítica Crônica (CLL)
Adalimumab	Humira	2002	Humano	TNF- α	Diversas desordens autoimunes
Efalizumab	Raptiva	2002	Humanizado	CD11a	Psoríases
Ibritumomab tiuxetan	Zevalin	2002	Murino	CD20	Linfoma de <i>non-Hodgkin</i> (com yttrium-90 ou indium-111)
Tositumomab	Bexxar	2003	Murino	CD20	Linfoma de <i>non-Hodgkin</i>
Bevacizumab	Avastin	2004	Humanizado	Fator de crescimento endotelial vascular (VEGF)	Câncer Colo-retal
Cetuximab	Erbix	2004	Quimérico	Receptor de fator de crescimento epidermal	Câncer Colo-retal, de cabeça e pescoço
Omalizumab	Xolair	2004	Humanizado	Imunoglobulina E (IgE)	Principalmente alergia relacionada a asma
Natalizumab	Tysabri	2006	Humanizado	Integrina α -4	Esclerose múltipla e doença de Crohn
Panitumumab	Vectibix	2006	Humano	Receptor de fator de crescimento epidermal	Câncer Colo-retal
Ranibizumab	Lucentis	2006	Humanizado	Fator de crescimento endotelial vascular A (VEGF-A)	Degeneração macular
Eculizumab	Soliris	2007	Humanizado	Proteína C5 do sistema complemento	Hemoglobinúria paroxismal noturna
Certolizumab pegol	Cimzia	2008	Humanizado	Inibição da sinalização de TNF- α	Doença de Crohn
Ofatumumab	Arzerra	2009	Humano	CD20	Leucemia Linfocítica Crônica (CLL)

Em outro trabalho de nosso grupo utilizamos essa biblioteca de Fab humano como uma fonte de anticorpos monoclonais capaz de reconhecer diferentes antígenos, dentre eles o peptídeo (GIKQLQARILAVEERYLKDQQLLG), correspondente aos resíduos 576 a 619 da porção extramembrana da proteína do envelope de HIV - 1 gp 41. Esse peptídeo tem sido caracterizado com um epitopo imunodominante (Zolla-Pasner, 2004) e neutralizante, imunogênico e protetor (Clerici *et al.*, 2002). O peptídeo é reconhecido por anticorpos, IgA em particular, de indivíduos refratários à infecção por HIV (indivíduos expostos, mas não infectados, como por exemplo indivíduos HIV negativo de casais discordantes) (Clerici *et al.*, 2002).

A capacidade de neutralização, em especial de prevenção da entrada do vírus através das mucosas, desempenhada por anticorpos tem sido sugerida como uma importante característica a ser buscada em anticorpos. Testes em macacas mostram que esses anticorpos poderiam ser incorporados em géis microbicidas e inibir a transmissão do vírus através de mucosas (vaginal) (Veazey *et al.*, 2003), prevenindo a disseminação da doença.

O VÍRUS HIV E A SÍNDROME DA IMUNODEFICIÊNCIA

A síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) é uma doença pandêmica que tem como agente etiológico o vírus HIV (Human Immunodeficiency Virus), um retrovírus pertencente à subfamília *Lentiviridae* (Peçanha *et al.*, 2002).

Em 1983, o vírus foi isolado pela primeira vez como agente etiológico da AIDS pelos pesquisadores Robert Gallo, nos Estados Unidos e Luc Montagnier, na França (Kuby, 2000) sendo que em 1986, um comitê internacional recomendou o termo HIV (vírus da imunodeficiência humana) para denominá-lo reconhecendo-o como capaz de infectar seres humanos.

Segundo o relatório da UNAIDS de 2007 cerca de 33 milhões de pessoas no mundo foram infectadas com o vírus HIV, e estima-se que aproximadamente 2 milhões de mortes ocorreram naquele ano. O continente africano ainda é o mais atingido pela doença e estima-se que 28 milhões de infectados estão nessa região. A África Sub-saariana é a mais atingida com mais de 22 milhões (Figura 6). Segundo o mesmo relatório, no Brasil o número de infectados ultrapassa 600 mil.

Somente dez anos depois da descoberta do vírus HIV como agente etiológico da AIDS, três drogas anti-virais entraram no mercado: AZT, ddl e ddC, todos eles atuando no nível da

transcriptase reversa. E mais de vinte anos depois, ainda não se obteve uma vacina segura e eficaz para a prevenção da infecção por HIV.

Atualmente, diversos esforços no sentido de prevenir a disseminação da doença têm sido a maneira mais eficaz para diminuir a prevalência do vírus. Contudo, em diversos países, principalmente os menos desenvolvidos, a doença tem sido implacável, tornando essas regiões vulneráveis.

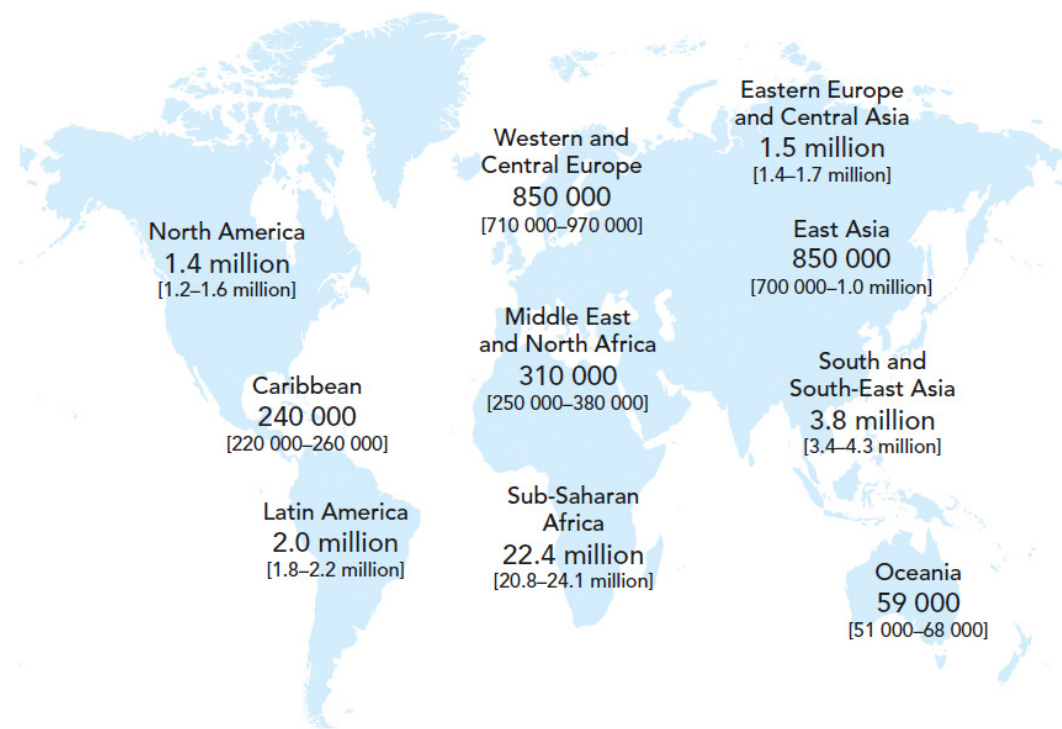


Figura 6 – Quadro estimativo de adultos e crianças infectados por HIV em 2007. (Adaptado do relatório Unaid www.unaids.org, 2009)

No que diz respeito à vacina contra o HIV, tem-se constatado que a dificuldade para a produção da mesma é devido à complexidade biológica do vírus HIV.

O genoma do vírus HIV é codificado por uma molécula simples de RNA de aproximadamente 10 kb de comprimento, que codifica 16 proteínas distintas. Estas proteínas são componentes estruturais e enzimáticos requeridos por todas as retrovíroses e derivam dos genes *gag* (*group-specific antigen*), *pol* (polimerase) e *env* (envelope) (Andrade *et al.*, 2001). A região **gag** codifica as proteínas estruturais internas p17, p24, p7 e p6; a região **pol** codifica a protease, transcriptase reversa e integrase; e, finalmente a região **env**, responsável pela codificação das proteínas do envoltório, gp120 e gp41 (Peçanha *et al.*, 2002). Além dessas, outras proteínas codificadas têm papel regulatório ou na maturação da partícula viral. O esquema da estrutura clássica de um genoma retroviral é: 5' LTR-*gag*-*pol*-*env*-LTR 3'. As regiões LTR (*long terminal*

repeats) representam as duas extremidades do genoma viral que estão ligadas ao DNA celular da célula hospedeira após a integração e que não codificam nenhuma proteína (Figura 7).

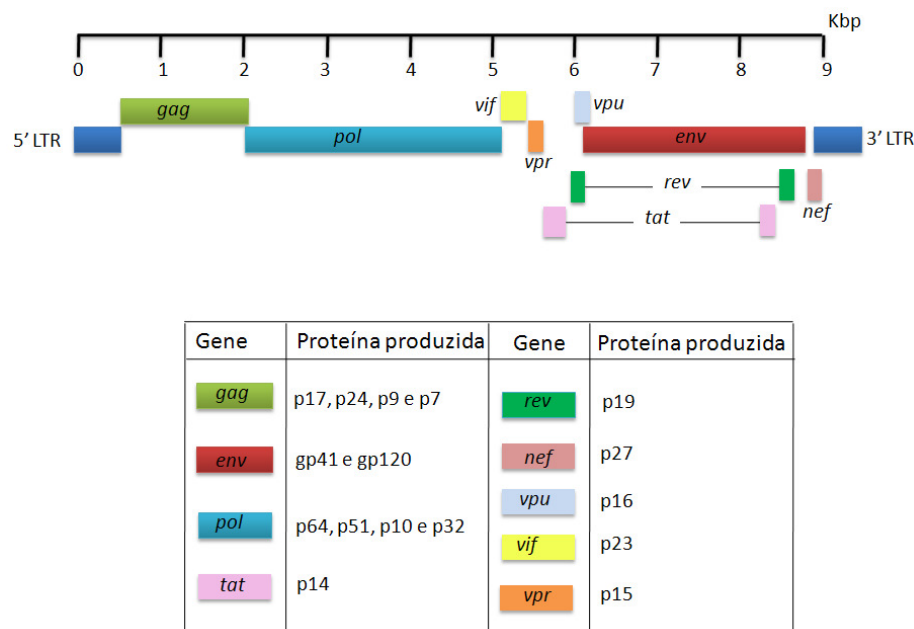


Figura 7 – Esquema geral do genoma do vírus HIV. Os três principais genes – *gag*, *pol* e *env* – codificam proteínas do nucleocapsídeo, enzimas requeridas para a replicação e proteínas do envelope viral. Dos outros seis genes, três (*tat*, *ver* e *nef*) codificam proteínas regulatórias que tem como papel principal o controle da expressão; duas (*vif* e *vpu*) codificam proteínas requeridas na maturação; e uma (*vpr*) codifica um ativador transcricional. A repetição longa terminal (LTR) 5' contém sequências na qual várias proteínas regulatórias se ligam (Adaptado de Kuby, 2000).

As partículas virais de HIV têm um diâmetro de 100nm e estão envoltas por uma membrana lipoprotéica. Cada partícula contém 72 complexos glicoprotéicos que estão integrados na membrana lipídica (Kuby, 2000).

A glicoproteína gp160 é sintetizada como um precursor, clivada por uma enzima similar a furina no transgolgi em subunidades gp120 e gp41 que se associam não-covalentemente e se reúnem em heterotrímeros (Feng *et al.*, 1996). A gp120 determina o tropismo viral pela ligação ao receptor da célula alvo, enquanto que a gp41 media a fusão das membranas viral e celular (Chan *et al.*, 1997). Durante o processo de formação de vesículas, o vírus também pode incorporar em sua bicamada lipídica algumas proteínas da célula hospedeira, como as proteínas MHC de classe I e II, ou outras proteínas de adesão, como a ICAM-1 que podem facilitar a adesão a outras células alvos.

O envelope viral, ou nucleocapsídeo, é composto por uma camada composta pela proteína p17 que é ancorada ao interior da membrana lipoproteica. Mais internamente, existe uma camada composta pela proteína p24. Essa duas camadas de proteínas protegem o genoma do vírus HIV, que consiste em duas cópias de fita simples de RNA, na qual estão associadas com duas moléculas de transcriptase reversa (p64) e proteínas nucleicas, p10, uma protease e p32, uma integrase (Figura 8).

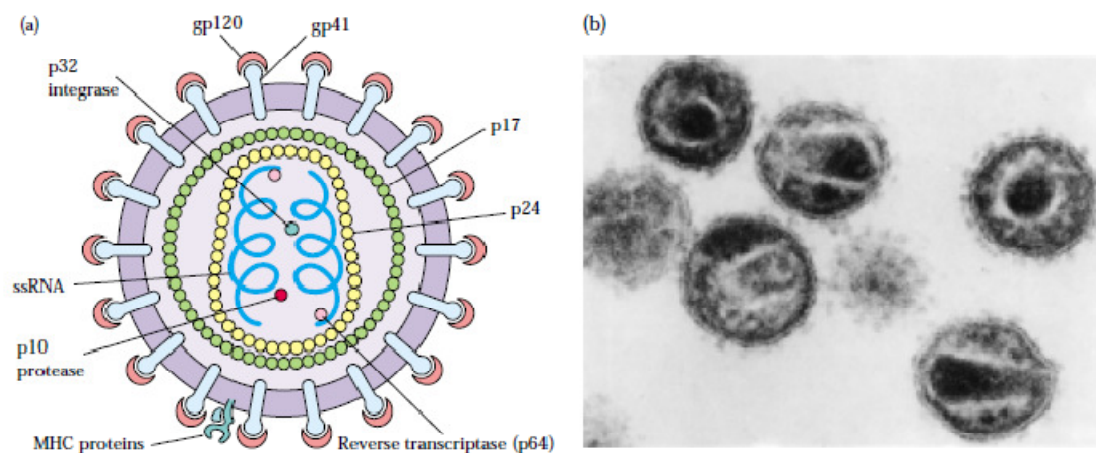


Figura 8 – Estrutura do vírus HIV. a) Diagrama esquemático do vírus HIV. A glicoproteína gp41 é uma proteína transmembrânica que se projeta até bicamada lipídica do envelope viral. A gp120 está associada com a gp41 e serve como um ligante ao receptor CD4 das células hospedeiras. O envelope viral é derivado da célula hospedeira e contém algumas proteínas da membrana celular do hospedeiro, incluindo moléculas MHC de classe I e II. Dentro do envelope está o núcleo viral, ou nucleocapsídeo, na qual inclui uma camada de composta pela proteína p17 e uma camada mais interna composta pela p24. O genoma do HIV consiste em duas cópias de fita simples de RNA, na qual estão associadas com duas moléculas de transcriptase reversa (p64) e proteínas nucleicas, p10, uma protease e p32, uma integrase. b) Micrografia eletrônica do vírus HIV num aumento de 200.000 vezes. (Adaptado de Kuby, 2000).

A etapa inicial da infecção por HIV é sua entrada no interior da célula. Esse processo envolve interações moleculares coordenadas que são fundamentais para iniciar o ciclo replicativo do vírus dentro da célula alvo.

Dentre os componentes moleculares responsáveis nesse processo destaca-se o complexo glicoprotéico do vírus, gp120/gp41 e, dois componentes do complexo receptor celular, o receptor CD4 e co-receptor de quimiocina. Essas interações resultam na entrada do vírus na célula devido à fusão da membrana viral com a celular e conseqüentemente a introdução da maquinaria replicativa do vírus. Esta fusão resulta da ligação da gp120 no receptor CD4 o que gera uma

mudança conformacional da gp41. Essa mudança desencadeia todo o processo de fusão celular (Figura 9). Um resíduo peptídico N-terminal hidrofóbico, rico em glicina, presente na gp41 parece iniciar a fusão, enquanto a região transmembrana é importante tanto para a fusão quanto para a ancoragem da proteína Env na membrana viral (Lu e Kim, 1997).

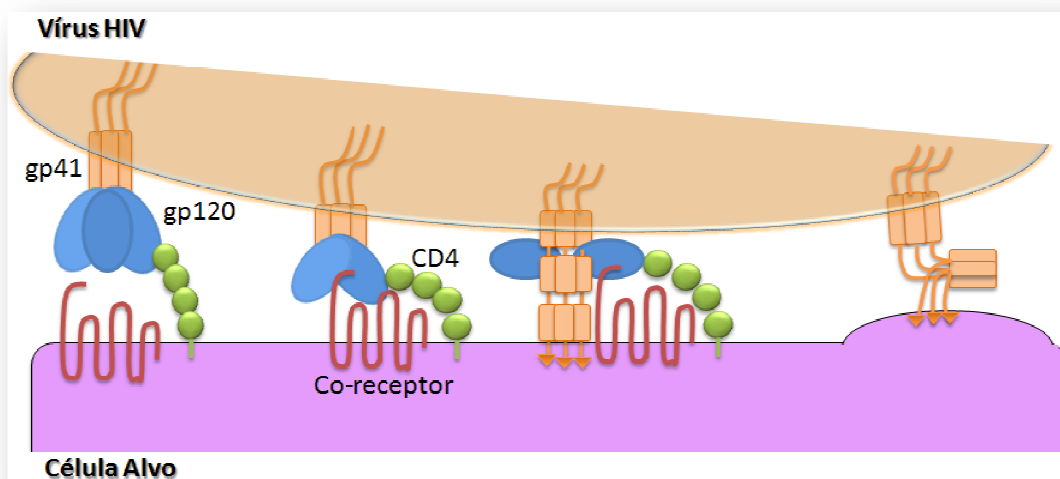


Figura 9 – Estágios iniciais da infecção por HIV. A infecção por HIV inicia-se com a ligação da gp120 ao receptor da célula alvo CD4, disparando uma mudança conformacional que expõe o sítio de ligação ao co-receptor. A gp120 liga-se ao co-receptor e uma nova mudança conformacional das proteínas do envelope acontece levando a inserção do peptídeo de fusão gp41 na membrana da célula alvo. A fusão da gp41 a membrana da célula alvo permite a entrada da maquinaria replicativa do vírus no interior da célula (Adaptado de Willey e Aasa-Chapman, .2008)

Existem duas grandes classes de vírus HIV-1 que diferem quanto ao seu tropismo celular. Essa seletividade é controlada pelo co-receptor que a gp120 se liga. A classe que apresenta tropismo por células T (T-tropismo) necessitam dos co-receptores de quimicima CXCR4 (R4) e as que apresentam tropismo por macrófagos (M-tropismo), utilizam-se do co-receptor CCR5 (R5) para a interação celular (Berger *et al.*, 1999). O alvo principal do vírus HIV durante a fase inicial da infecção é o linfócito T CD4+, o que resulta na depleção dessas células e uma imunodeficiência progressiva (Gandhi e Walker, 2002). Nesse estágio o sistema imune não é mais capaz de inibir a ação do vírus HIV.

Como a maioria dos patógenos, o vírus HIV induz a resposta de anticorpos policlonais para um vasto número de epítopos de diferentes proteínas virais. Atualmente, diversos estudos

estão sendo direcionados para a identificação de epítopos antigênicos que induz a geração de anticorpos com potencial neutralizantes para o vírus HIV (Zhou *et al.*, 2007, Scheid *et al.*, 2009).

Até hoje não se tem uma vacina eficiente contra o vírus por causa da habilidade do HIV-1 de escapar da neutralização natural mediada por anticorpos (Weiss *et al.*, 1985). Atualmente, diversos estudos têm focado o envelope glicoproteico para o desenvolvimento de novos agentes antivirais que tenham a capacidade de neutralizar a entrada do vírus HIV na célula de forma eficiente e ampla (Holl *et al.*, 2006, McCaffrey *et al.*, 2004, Park *et al.*, 2000). Anticorpos neutralizantes bloqueiam a entrada do vírus pelo reconhecimento de epítopos da gp41 ou gp120 que são fundamentais para a ligação com receptor, co-receptores ou fusão (Lee *et al.*, 2004).

Alguns anticorpos reconhecem regiões altamente conservadas da gp120. Uma dessas regiões encontra-se no domínio de ligação ao receptor CD4, domínio responsável pela interação do vírus HIV com a superfície das células-alvos. O anticorpo monoclonal b12 é uma IgG1 que têm a capacidade de se ligar a essa região e conseqüentemente neutralizar a entrada do vírus. Esse anticorpo foi capaz de neutralizar quase 75% dos isolados primários, possuindo ampla atividade neutralizante (Burton *et al.*, 1994). Outro anticorpo identificado que possui ampla atividade neutralizante é o anticorpo 2G12. Esse anticorpo reconhece carboidratos associados à superfície da gp120 (Scanlan *et al.*, 2002)

Outros epítopos que têm sido bastante estudados estão localizados na gp41. Essa glicoproteína possui uma região imunodominante que induz altos níveis de anticorpos não neutralizantes e uma região transmembrana proximal, bastante conservada. Vários anticorpos monoclonais específicos para a epítopos da gp41 têm sido identificados. Contudo, apenas uma pequena minoria apresentou atividade neutralizante. O anticorpo monoclonal humano, 2F5, mostrou ter uma atividade amplamente neutralizante para diversos isolados primários de HIV-1, reconhecendo um epítopo de seis aminoácidos (ELDKWA) localizados numa região relativamente conservada do ectodomínio da gp41 (Muster *et al.*, 1993). Outros dois anticorpos monoclonais humanos, 4E10 e Z13 também se destacam pela sua ampla atividade neutralizante. Esses anticorpos reconhecem uma seqüência específica da região transmembrana proximal da gp41, região bem próxima ao sítio de reconhecimento do anticorpo 2F5 (Tabela 2) (Zolla-Pazner, 2004).

Alguns estudos demonstram que a exposição desses epítopos é alterada pela mudança das proteínas do envelope induzida pela ligação ao receptor CD4 (Sattentau *et al.*, 1995). Esses determinantes antigênicos são expostos em um período limitado durante infecção viral e são

caracterizados como epitopos transacionais, um termo também aplicado para outros epitopos do envelope viral (Zolla-Pazner, 2004).

Tabela 2 – Epitopos da gp41 de HIV que induz anticorpos neutralizantes (Adaptado de Zolla-Pazner, 2004).

Epitopo	Anticorpos monoclonais humanos representativos	Características	Referências
Cluster I da gp41	Clone 3, 246-D	Epitopo altamente imunogênico, mas o clone 3 é apenas um dos muitos anticorpos monoclonais específicos para este epitopo e que tem atividade neutralizante	Cotropia <i>et al.</i> , 1996; Ferrantelli <i>et al.</i> , 2004; Hioe <i>et al.</i> , 1997.
Região transmembrana proximal da gp41	2F5, 4E10 e Z13	Pouco imunogênico, mas anticorpos para esta região é amplamente neutralizante	Trkola <i>et al.</i> , 1995; Zwick <i>et al.</i> , 2001; Muster <i>et al.</i> , 1993

O grande desafio para os anticorpos neutralizantes, além desses epitopos transacionais, é possuir a capacidade de neutralizar diversos isolados virais de diversos clados. Além de que não é inesperado que o vírus HIV possua múltiplos mecanismos para se proteger da ligação dos anticorpos. Logo, os anticorpos que apresentam resultados mais promissores são os que conseguem impedir a ligação ao receptor CD4 ou aos co-receptores, impossibilitando as alterações conformacionais dessas proteínas para que ocorra a entrada do vírus na célula alvo e, além disso, conseguem neutralizar diversos isolados virais.

SISTEMA DE EXPRESSÃO EM *P. pastoris*

A produção de anticorpos recombinantes em larga escala ainda não é um método trivial. Diversos sistemas de expressão de proteínas heterólogas têm sido utilizados.

Entre os sistemas alternativos de expressão de proteínas que apresentam vantagens sobre o sistema de expressão em bactérias ou em células de mamíferos destaca-se a levedura metilotrófica *P. pastoris*. Esta levedura é capaz de crescer em meio de cultura contendo metanol como única fonte de carbono, produzindo altos níveis protéicos (Cereghino e Cregg, 2000).

O promotor álcool oxidase (*AOXI*) controla a expressão do álcool oxidase na qual catalisa o primeiro passo do metabolismo do metanol. Tipicamente, 30% do total de proteína solúvel na indução das células por meio de metanol é álcool oxidase. Diversos vetores de expressão em *Pichia* utilizam do promotor forte *AOXI* e usa o metanol para induzir alto nível de expressão do gene de interesse.

Além disso, a levedura *P. pastoris* é capaz de realizar modificações pós-traducionais, tais como, processamento proteolítico, dobramento da molécula, formação de pontes dissulfeto e a glicosilação. Isso não é observado em sistemas de expressão em bactérias.

Freyre e colaboradores (2000) compararam a atividade ligante ao antígeno de scFv obtidos por expressão em *Escherichia coli* e em *P. pastoris* e demonstraram que o fragmento obtido por expressão em levedura apresentou uma atividade específica superior ao obtido por expressão em bactérias.

Outra vantagem do sistema de expressão em *P. pastoris* é a presença da endoprotease dependente de cálcio conhecida como Kex2. Essa protease é utilizada para o processamento do peptídeo sinal e, no caso deste trabalho, também da proteína heteróloga expressa. Esse sinal é responsável pelo transporte da pró-proteína pelo retículo endoplasmático e sua subsequente clivagem. A pró-proteína é clivada pela Kex2 liberando a proteína madura (Daly e Hearn, 2005). O processamento do peptídeo sinal envolve três passos. Primeiro, o pré-sinal é removido pela peptidase no retículo endoplasmático, em seguida, a endopeptidase Kex2 cliva após os resíduos de Lisina (K) e Arginina (R) na sequência pró-sinal da extremidade C-terminal (Figura 10). Por último, ocorre a clivagem da repetição dos resíduos de Glutamato (E) e Alanina (A) da extremidade N-terminal pela aminopeptidase Ste13 (Bevan *et al.*, 1998).

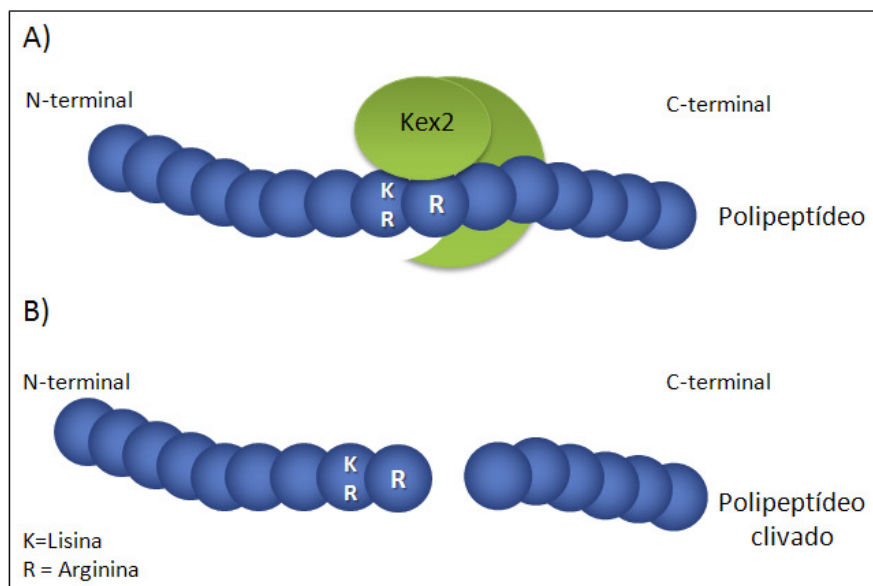


Figura 10 – Sítio de clivagem da endoprotease Kex2. A) A endopeptidase Kex2 reconhece os resíduos de Lisina (K) e Arginina (R) na sequência pró-sinal da extremidade C-terminal. B) Essa endopeptidase cliva entre após o resíduo de arginina e libera a proteína de interesse para a secreção.

As leveduras metilotróficas requerem a presença de metanol no seu metabolismo. Algumas enzimas participam da via metabólica do metanol no sistema de expressão em *P. pastoris*. A primeira enzima nesta via é a álcool oxidase (Aox), codificada por dois genes relacionados: *AOX1* e *AOX2*. O primeiro é responsável por cerca de 95% da atividade enzimática observada (Cregg *et al.*, 1989).

A enzima álcool oxidase (Aox) catalisa o primeiro passo na utilização de metanol da via (Figura 11). Essa reação requer oxigênio (O_2) e forma o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e formaldeído (HCHO). O H_2O_2 produzido pela reação da Aox é convertido em água pela Peroxissomo catalase. Parte do formaldeído gerado pela Aox deixa o peroxissomo e é oxidado por duas deidrogenases citoplasmáticas, formando o dióxido de carbono. Essa reação é fonte de energia para o crescimento celular na presença de metanol. A outra parte de formaldeído é assimilado para formar constituintes celulares por uma via cíclica que começa com a condensação de formaldeído com xilulose-5-monofosfato (Xu_5P), uma reação catalisada por uma terceira enzima peroxissomal, a dihidroxiacetona sintase (DHAS). (Cereghino e Cregg, 2000).

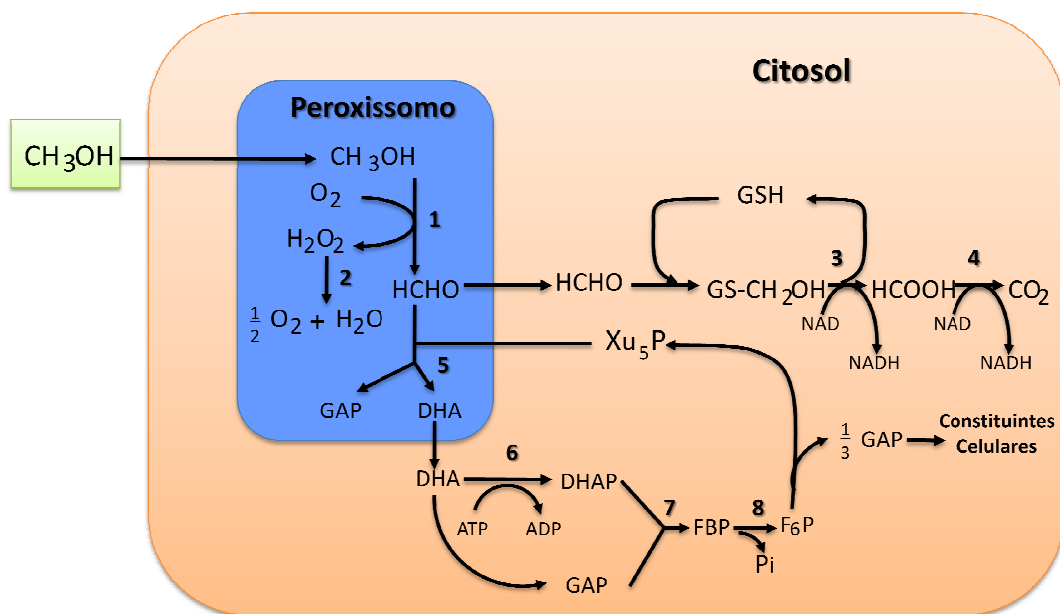


Figura 11 – Via metabólica da oxidação do metanol em formaldeído na levedura *P. pastoris*. Álcool oxidase (1); Catalase (2); Formaldeído deidrogenase (3); Formato deidrogenase (4); Diidroxiaçetona sintase (5); Diidroxiaçetona quinase (6); Frutose 1,6-Bifosfato adolase (7); Frutose 1,6-bifosfatase (8). (Adaptado de Cereghino e Cregg, 2000).

Diversas linhagens de *P. pastoris* possuem uma ou mais mutações auxotróficas que possibilita a seleção de clones recombinantes. A linhagem SMD1168 possui uma mutação no gene *HIS4* que inibe a síntese de histidina. Quando transformadas com plasmídios de expressão que carregam o gene *HIS4* para complementar o gene *his4-* da hospedeira, os transformantes podem ser facilmente selecionados pela habilidade de crescer em meio deficiente em histidina.

Para aumentar a estabilidade do sistema de expressão, os vetores comercialmente disponíveis possuem características que favorecem a recombinação homóloga e a integração do gene clonado ao genoma da levedura *P. pastoris* (Invitrogen). Esses vetores foram desenvolvidos tanto para a transformação em *E. coli* quanto em *P. pastoris*. Para manutenção em *E. coli*, os plasmídios contêm uma origem de replicação bacteriana e o gene de resistência a ampicilina. Possuem um cassete de expressão formado pelo promotor e pela região terminadora de transcrição do gene *AOX1* (Figura 12), além de uma marca de seleção, sendo a mais utilizada a de seleção auxotrófica pelo gene histidinol deidrogenase (*HIS4*), usada em combinação com linhagens *his4-*. Um dos vetores mais utilizados é o plasmídio pPIC9 (Invitrogen), que possui como sinal de secreção o peptídeo sinal do fator α de *S. cerevisiae* (Torres e Moraes, 2000).

A recombinação homóloga para a integração dos plasmídios pode ocorrer nos *locus HIS4* ou no *locus AOX1*. Quando a recombinação ocorre nos *locus AOX1* por meio de um duplo *crossing over* entre regiões do vetor e do genoma, a região codificadora *AOX1* é completamente removida (Figura 12). O fenótipo resultante Mut^s (*Methanol utilization slow*) é causado pela perda de atividade de álcool oxidase codificada pelo gene *AOX1*, restando apenas o *AOX2*. Isto resulta num fenótipo de crescimento lento em meio com metanol. Quando a recombinação homóloga ocorre através de um *crossing over* simples, levando à inserção gênica no *locus HIS4* ou no *locus AOX1*, o fenótipo resultante é Mut^+ (*Methanol utilization plus*). Este fenótipo se refere à habilidade de metabolizar metanol como única fonte de carbono comparável às linhagens selvagens (Figura 13). Algumas proteínas são melhores expressas em um tipo de fenótipo do que em outro (Mut^s ou Mut^+).

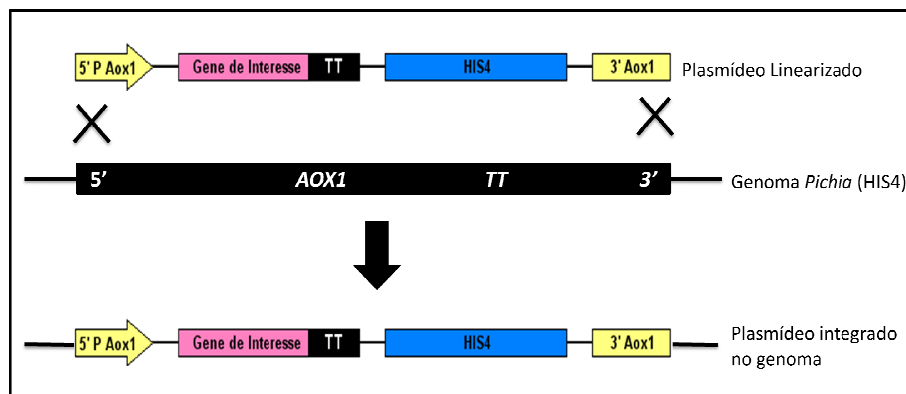


Figura 12. Substituição Gênica por duplo *crossing over* no *locus AOX1* em *P. pastoris*. A figura acima mostra a substituição gênica no *locus AOX1*. Numa cepa *his4* como a SMD1168, a substituição gênica (inserção ômega) é originada por um duplo *crossing over*, do promotor *AOX1* e da região $3' AOX1$, entre o vetor e o genoma. Isto resulta numa remoção completa da região codificadora do *AOX1* genômico. O fenótipo resultante é $His^+ Mut^s$. Os transformantes His^+ podem ser facilmente localizados pelo seu fenótipo e o Mut^s serve como indicador da integração via substituição do *locus AOX1*. O resultado deste tipo de substituição gênica é a perda do *locus AOX1* (Mut^s) e o ganho de um cassete de expressão contendo P_{AOX1} , o gene de interesse e *HIS4*. (adaptado do Manual do Kit de expressão em *Pichia*, Invitrogen, 2002)

Para a expressão de anticorpos recombinantes deve-se considerar cuidadosamente o vetor utilizado. Os vetores utilizados são normalmente plasmídios contendo um cassete de expressão

compatível com o tipo celular utilizado como hospedeiro. O vetor utilizado neste trabalho, foi inicialmente construído para posterior produção do fragmento de anticorpo de interesse. É um vetor na forma monocistrônica que possui um cassete de fragmento de anticorpo, contendo segmentos gênicos codificadores das cadeias pesadas e leves. Possui também o promotor AOX1 para o controle da expressão gênica da molécula de Fab de cadeia única. A molécula do Fab deve ser clivada separando as cadeias leve e pesada. Isso é conseguido com a utilização de um peptídeo conector contendo o sítio de processamento da endoprotease Kex do retículo endoplasmático, facilitando o processamento e montagem da molécula de Fab para sua posterior secreção (Burtet *et al.*, 2008).

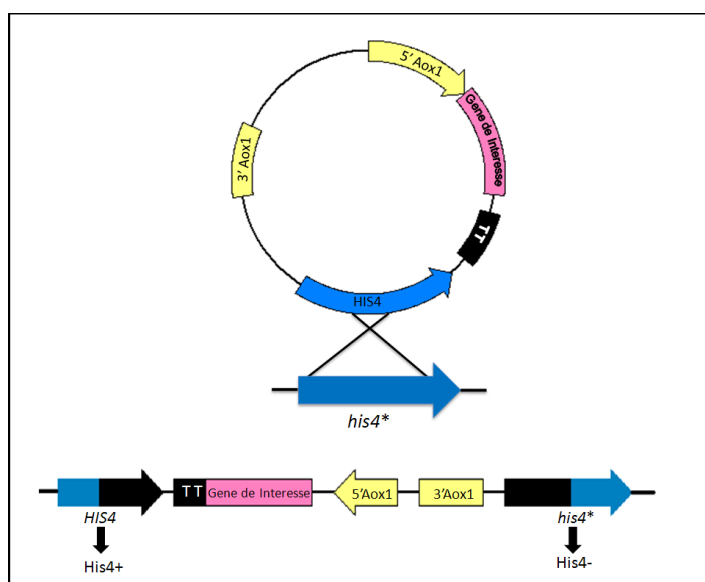


Figura 13 . Inserção Gênica por simples crossing over no locus *his4* em *P. pastoris*. A figura acima mostra o resultado da inserção de um plasmídeo, com uma cópia *HIS4*, no locus do gene *his4*, provocando a ruptura do mesmo e a reversão do fenótipo por complementação gênica. Tanto na cepa SMD1168 (Mut⁺) quanto KM71 (Mut^s), os eventos de inserção gênica no locus *his4* resultam do simples *crossing over* entre esse locus e do gene *HIS4* do vetor, culminando na inserção de uma ou mais cópias do vetor. Desde que o *AOX1* genômico ou os loci *aox::ARG4* não estejam envolvidos neste evento de recombinação, o fenótipo de cada transformante His⁺ será o mesmo fenótipo Mut da cepa original. Com a linearização do vetor recombinante em sítios de restrição enzimática localizados nos genes *HIS4*, os fenótipos Mut⁺ ou Mut^s podem ser convenientemente gerados dependendo da cepa hospedeira utilizada (adaptado do Manual do Kit de expressão em *Pichia*, Invitrogen, 2002).

Neste projeto o vetor de expressão pPIgLe Fab foi construído de forma a possibilitar a clonagem individual dos segmentos gênicos codificadores das cadeias pesadas e leves de cinco Fabs anti-HIV originados do vetor de expressão de bactéria pComb 3X. Esses Fabs foram selecionados contra o peptídeo correspondente aos resíduos 576 a 619 da região extramembrana da gp41 do envelope de HIV-1.

Justificativa

JUSTIFICATIVAS

Para uma melhor caracterização dos Fabs selecionados estamos propondo a modificação de um vetor de expressão em *P. pastoris* para a clonagem dos genes codificadores dos Fabs e sua futura expressão na levedura metilotrófica *P. pastoris*.

Com essa estratégia esperamos possibilitar a obtenção de maiores quantidades dessas proteínas recombinantes para a caracterização imunológica futura dos Fab selecionados quanto ao seu potencial ligante e neutralizante.

Esse projeto representa um esforço no sentido de encontrar alternativas para a prevenção da infecção de HIV-1.

Objetivos

OBJETIVOS

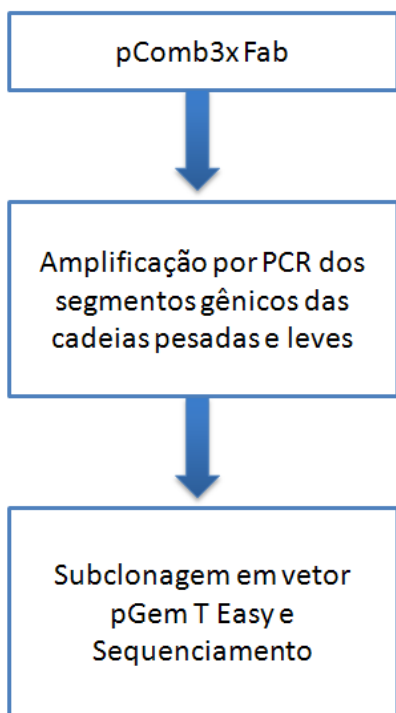
- Construir um vetor de expressão de *P. pastoris* para possibilitar a montagem dos genes codificadores de Fabs humanos selecionados contra o peptídeo sintético da gp41;
- Clonar os genes codificadores das cadeias leves e pesadas dos Fabs anti-HIV no vetor de expressão pPIgLe Fab;
- Expressar os Fabs humanos em *P. pastoris*.

Abordagem

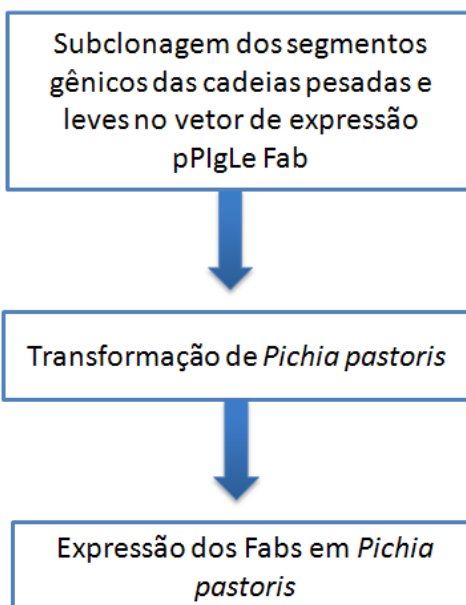
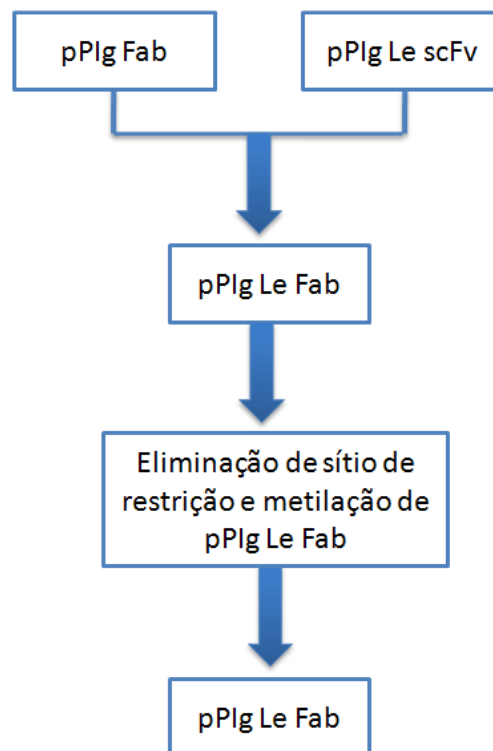
Experimental

ABORDAGEM EXPERIMENTAL

Obtenção dos segmentos gênicos dos Fabs anti-HIV



Construção do vetor de expressão



Materiais e Métodos

MATERIAIS

1) Linhagens Celulares

a) Bactérias

- **XL1-Blue (Stratagene)**® - *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacIqZ M15Tn10 (Tet^R)]* (Sambrook e Russel, 2001).

- **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.

- **DH5α (Invitrogen)**® – F- /*endA1 hsdR17(r_K⁻ m_K⁺) supE44 thi⁻¹ recA1 gyrA (Nal^r) relA1 D(lacIZYA-argF)U169 deoR (F80dlacD(lacZ)M15)*.

Essas linhagens foram utilizadas nos procedimentos de construção da versão Fab do anticorpo.

b) *P. pastoris*

- **SMD1168** → Δ*pep4*, *his4*. Fenótipo: His⁻, Mut⁺. Deficiente de protease. O gene *PEP4* codifica proteinase A, requerida para ativação de outras proteases vacuolar, tais como carboxipeptidase Y e proteinase B (Creeg *et al.*, 2000).

- **GS115** → *his4*. Fenótipo: His⁻, Mut⁺ (Creeg *et al.*, 2000).

Estas linhagem de *P. pastoris* foram utilizadas para a integração, no locus *HIS4* genômico do *plasmídeo* com o gene de interesse, para a expressão do Fab anti-HIV recombinante sob controle do promotor *AOX1*.

2) Plasmídios Utilizados

- **pComb3X** – f(-) – 4,5 kb, promotores *plac,ori ColE1, ori f1, Amp^R* e imediatamente após a região de clonagem, do gene do anticorpo (VH-CH1) possui uma região com seis histidinas (H6) para a purificação em coluna de níquel ou para a detecção com anticorpo monoclonal anti-His Tag. Esse vetor possui os Fabs anti-HIV clonados.

- **pPIgLe scFv Z22** – 8,95 kb, contém o fragmento scFv, múltiplos sítios de clonagem, ori ColE1, Amp^R, Aox1 5', 3' e 3' termination. Utilizado para a clonagem do Fab inteiro substituindo o scFv.

pPIg Fab – 9,32kb, contém o fragmento Fab, fragmentos 5' e 3' do promotor *AOX1*, sinal de secreção do fator α , múltiplos sítios de clonagem, fragmento 3' *AOX1* TT, *HIS4* ORF, ori ColE1, Amp^R, derivado do pIg16. Utilizado como doador do Fab inteiro para posterior clonagem no vetor pPIgLe scFv Z22.

- **pPIgLe Fab** – 9,38kb, contém o fragmento Fab, fragmentos 5' e 3' do promotor *AOX1*, sinal de secreção do fator α , múltiplos sítios de clonagem, fragmento 3' *AOX1* TT, *HIS4* ORF, ori ColE1, Amp^R. Utilizado para montagem do Fab anti-HIV-1.

- **pIg16 Z22** – 4,8kb, VH-Linker-VL-spA anti-zDNA (scFv conjugado a proteína A), múltiplos sítios de clonagem, , ori ColE1, Amp^R.

- **pGEM-T Easy (Promega)** – vetor comercial de 3,15 kb, constituído pelo promotor T7 e SP6, múltiplos sítios de clonagem, gene *α LacZ*, gene da β -lactamase, origem de replicação de fago (*f₁* ori) e origem de replicação plasmidial. Utilizado para a clonagem de produtos de PCR.

3) Oligonucleotídeos utilizados para sequenciamento, clonagem e reações de PCR

Os oligonucleotídeos foram fornecidos pela *Integrated DNA Technologies* - IDT® e solubilizados em água Mili-Q para concentração de uso de 10 μ moles/ μ L. A tabela 3 mostra as sequências e utilização de cada um dos oligonucleotídeos.

Tabela 3 – Oligonucleotídeos sintéticos utilizados.

Oligo	Seqüência	Utilização
M13 Universal	5' GTAAAACGACGGCCAGT 3'	Sequenciamento de fragmentos de PCR clonados no vetor pGEM T- Easy.
M13 Reverso	5' CAGGAAACAGCTATGAAC 3'	Sequenciamento de fragmentos de PCR clonados no vetor pGEM T- Easy.
P1	5'GCTACCGTGGCCAGCGGAGATCTGCTC 3'	Utilizado como iniciador de PCR para a amplificação da cadeia VL a partir da extremidade 5' e inserção do sítio de restrição para <i>Bgl</i> II.
P2	5' GAAGACAGCTCGAGGCGCACACAGT 3'	Utilizado como iniciador de PCR para a amplificação da cadeia VL a partir da extremidade 3' e inserção do sítio de restrição para <i>Xho</i> I.
P3	5' GTGGCTGCCCTCGAGCCAATCTGTC 3'	Utilizado como iniciador de PCR para a amplificação da cadeia Ck a partir da extremidade 5' e inserção do sítio de restrição para <i>Xho</i> I.
P4	5'TTTGAATTCCTCCTAATGGTGGTGGATGGTGATGACA CTCTCCCTG 3'	Utilizado como iniciador de PCR para a amplificação da cadeia ck com cauda de 6-His a partir da extremidade 3' e inserção do sítio de restrição para <i>EcoR</i> I.
P5	5' GTCGCCCAAGCCCGCCGAG 3'	Utilizado como iniciador de PCR para a amplificação da cadeia VH a partir da extremidade 5' e inserção do sítio de restrição para <i>Xma</i> I.
P6	5' GGAAGACCGATGGGCCCTTCTAGAGGC 3	Utilizado como iniciador de PCR para a amplificação da cadeia VH a partir da extremidade 3' e inserção do sítio de restrição para <i>Xba</i> I.
P7	5' GCAACTAGTCTTCAACAGCA 3'	Utilizado como iniciador de PCR para a amplificação da região de HIS 4 a partir da extremidade 5' e inserção do sítio de restrição para <i>Spe</i> I.
P8	5' CCAATTGTCGACAATGTTTCGT 3'	Utilizado como iniciador de PCR para a amplificação da região de HIS 4 a partir da extremidade 3' mantendo o sítio de restrição existente <i>Sal</i> I
P9	5' GTCCTCTAGAGCCTCCACCAAGGGC 3'	Utilizado como iniciador de PCR para a amplificação da cadeia CH1Kex a partir da extremidade 5' e inserção do sítio de restrição para <i>Bgl</i> II. E eliminação do sítio de metilação de <i>Xba</i> I
P10	TGGTCAATCTGGAGATCTGGAGCAC 3'	Utilizado como iniciador de PCR para a amplificação da cadeia CH1Kex a partir da extremidade 3' e inserção do sítio de restrição para <i>Bgl</i> II.
P11	5'AACCAGCCATGGAGCTGTCGAGCTG 3'	Utilizado como iniciador de PCR para a amplificação da cadeia VH a partir da extremidade 5' e inserção do sítio de restrição para <i>Sac</i> I.
5' Aox	GACTGGTCCAATTGACAAGC	Utilizado para sequenciamento do Fab no vetor pPigLe Fab
3' Aox	GCAAAATGGCATTTGACATCC	Utilizado para sequenciamento do Fab no vetor pPigLe Fab
Mmb4	GCTCCGCTCGTATGTTGT	Utilizado para sequenciamento do Fab no vetor pComb 3x
Mmb5	CGTTTGCCATCTTTCATAATC	Utilizado para sequenciamento do Fab no vetor pComb 3x

4) Meios de Cultura e soluções para bactérias

Meio LB (*Luria-Bertani*)

Peptona de caseína 1,0% (p/v)

Extrato de levedura 0,5% (p/v)

NaCl 1,0% (p/v)

Preparado em H₂O destilada para o volume necessário e autoclavado.

pH ajustado para 7,0.

Meio LB ágar

Meio LB adicionado de ágar bacteriológico a 1,4% (p/v).

Meio SB (*Super Broth*)

Peptona de caseína 3,0% (p/v)

Extrato de levedura 2,0% (p/v)

MOPS 1,0% (p/v)

Preparado em H₂O destilada para o volume necessário e autoclavado.

pH ajustado para 7,0.

Meio SOB

Bacto-triptona 2,0% (p/v)

Extrato de levedura 0,5% (p/v)

NaCl 0,06% (p/v)

KCl 0,002% (p/v)

Preparado em H₂O destilada para o volume necessário e autoclavado.

pH ajustado para 7,0.

Meio SOC

Meio SOB 98 mL

Solução estoque de Mg²⁺ 2 M 1 mL

Solução estoque de glicose 2 M 1 mL

Solução estoque de glicose 2 M

Preparada em H₂O destilada e filtrada. Solução conservada a 4°C.

Solução estoque de Mg 2 MMgCl₂ 1 MMgSO₄ 1 M

Preparada em H₂O destilada e filtrada. Solução conservada a 4°C.

A autoclavagem foi realizada durante 20 minutos a 120°C. A filtração foi realizada usando filtros da Millipore de 0,22µm.

5) 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.

6) Meios de Cultura e soluções para *P. pastoris***Meio YP 10x – Solução estoque**

Peptona de caseína 20% (p/v)

Extrato de levedura 10% (p/v)

Preparado em H₂O destilada para o volume de 100mL e autoclavado.

Meio YNB (*Yeast Nitrogen Base*) 10x – Solução estoque

YNB sem aminoácido e sem sulfato de amônio 3,4% (p/v)

Sulfato de amônio 10% (p/v)

Preparado em H₂O destilada para o volume de 100mL. Filtrado e conservado a 4°C com papel alumínio

Meio Ágar 2%

Ágar 4g

Preparado em H₂O destilada para o volume de 200mL e autoclavado.

Meio YPD

Meio YP 10% (v/v)

Glicose 2% (v/v)

Preparado em H₂O destilada estéril para o volume necessário.

Meio de Crescimento BMGY (*Buffered Glycerol Complex Medium*)

Meio YP 10%

Meio YNB 1,34% (p/v)

Tampão Fosfato pH 6,0 100mM

Biotina 4x10⁻⁵ % (p/v)

Glicerol 1% (v/v)

Preparado em H₂O destilada estéril para o volume necessário.

Meio de Indução BMMY (*Buffered Methanol Complex Medium*)

Meio YP 10%

Meio YNB 1,34% (p/v)

Tampão Fosfato pH 6,0 100mM

Biotina 4x10⁻⁵ % (p/v)

Metanol 1% (v/v)

EDTA 1mM

PMSF 1mM

Preparado em H₂O destilada estéril para o volume necessário.

Meio Mínimo MD (*Minimal Dextrose Medium*)

Meio YNB 1,34% (p/v)

Biotina 4x10⁻⁵ % (p/v)

Glicerol 1% (v/v)

Preparado em Ágar 2% estéril para o volume necessário.

Meio Mínimo MM (*Minimal Methanol Medium*)

Meio YNB	1,34% (p/v)
Biotina	4×10^{-5} % (p/v)
Metanol	1% (v/v)

Preparado em Ágar 2% estéril para o volume necessário.

Tampão Fosfato 1M pH 6,0

K ₂ HPO ₄	23g
KH ₂ PO ₄	118g

pH ajustado para 6,0 com KOH.

Preparado em H₂O destilada para o volume de 1L e autoclavado.

Glicerol 50%

Glicerol	50mL
----------	------

Preparado em H₂O destilada para o volume de 100mL e autoclavado

Glicose 20%

Glicose	20g
---------	-----

Preparado em H₂O destilada para o volume de 100mL e autoclavado.

Metanol 100%

Sorbitol 1M

D-Sorbitol	18,21g
------------	--------

Preparado em H₂O destilada para o volume 100mL e autoclavado.

DTT

Ditiotreitol	100mM
--------------	-------

Preparado em H₂O destilada para o volume necessário e filtrado.

Acetato de Lítio 1M

Acetato de Lítio	2,04g
------------------	-------

Preparado em H₂O destilado para o volume final de 20 mL e filtrado.

Tris-HCl 100mM pH 7,5

Tris 0,6g

Preparado em H₂O destilada para o volume final de 50 mL e filtrado.

pH ajustado com HCl para 7,5

Tampão de Pré-tratamento (TPT)

Acetato de Lítio 100mM

DTT 10mM

Sorbitol 0,6M

Tris-HCl pH 7,5 10mM

Preparado em H₂O estéril.

A autoclavagem foi realizada durante 20 minutos a 120°C. A filtração foi realizada usando filtros da Millipore de 0,22µm.

6) Soluções e tampões de uso geral

Azida Sódica – Solução estoque 100X

Azida sódica 5% (p/v)

Esta solução foi utilizada para a conservação dos tampões PBS e PBS-T e nas soluções estoque dos anticorpos em concentração final de 0,05% (p/v).

Tampão TE

Tris-HCl pH 8,0 10 mM

EDTA pH 8,0 1 mM

Tampão Tris

Tris-HCl pH 8,0 10mM

Glicogênio

Glicogênio 20mg/mL

Tampão PBS (*Phosphate-Buffered Saline*) 10X, pH 7,4

NaCl 1,5 M

Na₂HPO₄ 0,1 M

NaN₃ 0,02% (p/v)

Tampão PBST 1X, pH 7,4

PBS 1X acrescido de Tween 20 na concentração final de 0,1% (v/v)

PMSF (*Phenylmethylsulfonyl Fluoride*) 0,2M

Preparado em Isopropanol para o volume final de 100mL. Conservado a 4°C.

EDTA (Ácido Tetracético Etilenodiamina) 0,5M

Dissolvido em água em pH 8-9. Conservado a estocada a 4°C.

7) Soluções e material para preparo de células competentes e transformação – bactéria**Solução de CaCl₂**

CaCl₂ 50 mM

Preparada em H₂O destilada para o volume necessário e autoclavada. Solução conservada a 4°C.

Solução de CaCl₂ + 15% de Glicerol (v/v)

CaCl₂ 50 mM

Glicerol 15%

Preparada em H₂O destilada para o volume necessário e autoclavada. Solução conservada a 4°C.

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 μ m. Usada no meio de cultura na proporção de 1:1000.

Cubetas de eletroporação (BioAgency[®], n^o catálogo: 165-2086N)

8) Soluções para extração de DNA plasmidial**Solução I**

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

Solução II

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

Solução III

Acetato de potássio	3 M
Ácido Acético	2 M
pH ajustado para 4,8 - 5,0	

RNase A

RNase A (Invitrogen[®], n^o de catálogo 12091-021).

Clorofane

Fenol equilibrado em pH 7,6	1 v
Clorofórmio	1 v
B-hidroxiquinilona	0,05% (p/v)
Equilibrado com 0,1v de Tris-HCl 100 mM pH 7,6	

Clorofil

Clorofórmio	24 v
-------------	------

Álcool isoamílico 1 v
Equilibrado com 0,25 v de tampão TE

Etanol 100%

Etanol 100% (v/v)

Etanol 70%

Etanol 70% (v/v)

Isopropanol 100%

Isopropanol 100% (v/v)

Acetato de amônio 7,5 M

Utilizada para precipitação de DNA em preparação de larga escala.

9) Tampões de Endonucleases de Restrição

a. Fermentas[®] :

TangoTM (10X)

Tris-Acetato pH 7,9 33 mM

Acetato de Magnésio 10 mM

Acetato de Potássio 66 mM

BSA 0,1 mg/mL

b. New England Biolabs[®] :

NEBuffer 1 (1X)

Bis-Tris-propano-HCl pH 7,0 10 mM

MgCl₂ 10 mM

DTT 1 mM

NEBuffer 2 (1X)

Tris-HCl pH 7,9 10 mM
 MgCl₂ 10 mM
 DTT 1 mM

NEBuffer 3 (1X)

Tris-HCl pH 7,9 150 mM
 MgCl₂ 10 mM
 NaCl 100 mM
 DTT 1 mM

NEBuffer 4 (1X)

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

NEBuffer *EcoR* I (1X)

Tris-HCl pH 7,5 100 mM
 MgCl₂ 10 mM
 NaCl 50 mM
 Triton X-100 0,025% (v/v)

10) Tampões de outras reações

Tampão SAP (Fosfatase alcalina de camarão) (Promega[®])

Tris-HCl pH 9,0 500 mM
 MgCl₂ 100 mM

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 e e uma mistura de dNTPs com dGTP, dATP, dCTP e dTTP na concentração de 10 mM cada.

Tampão de Reação 5X da T4 DNA ligase (Invitrogen[®])

Tris-HCl 250 mM

MgCl₂ 50 mM

ATP 5 mM

DTT 5 mM

PEG-8000 25% (p/v)

pH 7,6

Tampão de Reação 10X da T4 DNA ligase (Biolabs[®])

Tris-HCl pH 7,5 500 mM

MgCl₂ 100 mM

DTT 100 mM

ATP 10 mM

11) Endonucleases de restrição

a. Fermentas[®] :

Bgl II (Catalogo nº FD0084 - Fast Digest)

*Cfr*⁹ I (Catalogo nº ER0172 – 10u/µL)

*Eco*R I (Catalogo nº FD0274 - Fast Digest)

Hind III (Catálogo nº FD0504 – Fast Digest)

Not I (Catalogo nº FD0594 - Fast Digest)

Psi I (Catalogo nº FD2064 - Fast Digest)

Pst I (Catalogo nº ER0611 – 3u/ µL)

Sal I (Catálogo nº FD0648 – Fast Digest)

Sbf I (Catalogo nº ER1191 – 10u/ µL)

Sma I (Catalogo nº FD0668 - Fast Digest)

Xba I (Catálogo nº ER0685 - 3u/ µL)

Xho I (Catálogo nº FD0694 - Fast Digest)

b. New England Biolabs[®] :

*Bam*H I (20U/ μ L)

Bgl II (10U/ μ L)

*Eco*R I (20U/ μ L)

Hind III (20U/ μ L)

Mfe I (10U/ μ L)

Nco I (10U/ μ L)

Nde I (20U/ μ L)

Not I (2,5U/ μ L)

Pvu II (5U/ μ L)

Sac I (20U/ μ L)

Sfi I (20U/ μ L)

Spe I (10U/ μ L)

Sma I (20U/ μ L)

Xba I (20U/ μ L)

Xho I (20U/ μ L)

Xma I (10U/ μ L)

12) Outras enzimas

T4 DNA Ligase (1U/ μ L) (Invitrogen[®])

T4 DNA Ligase (1U/ μ L) (New England Biolabs[®])

Taq DNA polimerase (2U/ μ L) (Cenbiot/RS[®])

13) Soluções e reagentes para eletroforese em gel de agarose e de poliacrilamida

Tampão de corrida TEB 10X

Trizma base 0,89 M

Ácido Bórico 0,89 M

EDTA pH 8,0 0,02 M

dH₂O q.s.p. 1 L

Tampão de corrida TAE 50X

Tampão Tris-Acetato	2 M
Trizma-base	242 g
Ácido Acético Glacial	57,10 mL
EDTA pH 8,0	0,05 M
dH ₂ O q.s.p.	1 L

Tampão de amostra para gel de agarose 10X

Tampão de corrida TEB 20X	50% (v/v)
Glicerol	50% (v/v)
Azul de Bromofenol	0,1% (p/v)
Xileno Cianol	0,1% (p/v)

Solução de brometo de etídeo 20.000X

Brometo de etídeo	10 mg/mL
-------------------	----------

Tampão de corrida para SDS-PAGE 5X

Trizma base	125 M
Glicina	125 mM
SDS	0,5% (p/v)

Tampão de amostra 5X para SDS-PAGE

Tris-HCl pH 6,8	250 mM
SDS	10% (p/v)
Glicerol	50% (v/v)
β-mercaptoetanol	10% (v/v)
Azul de bromofenol	0,5% (p/v)

Acrilamida 30% (29:1)

Acrilamida	145 g
Bis-acrilamida	5 g
dH ₂ O q.s.p.	500 mL

Estocar a 4°C ao abrigo da luz.

Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8

Tris 36,34 g
dH₂O q.s.p. 200 mL

Tris-HCl 0,5M, pH 6,8

Tris 12,11 g
dH₂O q.s.p. 200 mL

SDS 10%

SDS 10 g
dH₂O q.s.p. 100 mL

APS 10% (p/v)

Persulfato de amônio 100 mg/mL de água

TEMED (N,N,N',N'- tetrametil etilenodimetilamina)**Gel Concentrador SDS-PAGE**

Solução Acrilamida/Bis-acrilamida (29:1)	4% (p/v)
Tris-HCl pH 6,8	125 mM
SDS	0,1% (p/v)
APS	0,1% (p/v)
TEMED	0,01% (p/v)

Gel Separador SDS-PAGE

Solução Acrilamida/Bis-acrilamida (29:1)	10% (p/v)
Tris-HCl pH 8,8	400 mM
SDS	0,1% (p/v)
APS	0,1% (p/v)
TEMED	0,01% (p/v)

14) Soluções e materiais para os ensaios imunológicos (*Western, Colony e Dot blotting*)

Tampão de Fosfatase Alcalina (APB)

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

Tampão para Transferência Semi-Seca de Proteínas

Trizma-base	48 mM
Glicina	39 mM
SDS	0,037% (p/v)
Metanol	20% (v/v)

Solução de Bloqueio

Leite em pó desnatado 5% (p/v)
Dissolvido em PBST 1X

Solução Reveladora para *Western, Colony e Dot blot*

O NBT (Nitro Blue Tetrazole) e o BCIP (5-Bromo-4-Cloro-indolil fosfato) foram preparados numa solução estoque de 50 mg/mL. O NBT solubilizado em N,N-dimetil formamida e o BCIP, em água. Para preparar 10 mL da solução reveladora, 66 µL do estoque de NBT foram adicionados em 10 mL de APB e em seguida 33 µL do estoque de BCIP. Esta ordem deve ser respeitada para se evitar a precipitação dos reagentes.

Membrana de Nitrocelulose

Hybond-C Extra (Amersham[®] Bioscience n.º. catálogo. RPN 303E)

15) Materiais utilizados para concentração de sobrenadantes de cultura e

Concentradores Amicon[®] Bioseparations:

- Centricon YM-10
- Centriprep YM-30

16) Marcadores moleculares para DNA e proteína

1 kb plus DNA Ladder – (Invitrogen[®] n.º catálogo. 10787-026)

Fragmentos de DNA em pb: 100; 200; 300; 400; 500; 650; 850; 1.000; 1.650; 2.000; 3.000; 4.000; 5.000; 6.000; 7.000; 8.000; 9.000; 10.000; 11.000; 12.000.

Low Mass DNA Ladder (Invitrogen[®] n.º catálogo. 10068-013)

Mistura equimolar de fragmentos de DNA em pb de 2.000; 1.200; 800; 400; 200 e 100. Utilizando 2 μ L do marcador, corresponde a massa de 100; 60; 40; 20; 10 e 5 ng, respectivamente.

High Mass DNA Ladder (Invitrogen[®] n.º catálogo 10496-016)

Mistura equimolar de fragmentos de DNA em pb de 10.000; 6.000; 4.000; 3.000; 2.000 e 1.000. Utilizando 2 μ L do marcador, corresponde a massa de 100; 60; 40; 30; 20 e 10 ng, respectivamente.

Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder (Fermentas[®] n.º catálogo SM1842)

Fragmentos de proteínas em kDa: 260; 140; 100; 70; 50; 40; 35; 25; 15 e 10.

17) Kits comerciais

QIAGEN Plasmid Midi Kit 100 – Para preparação plasmidial em escala intermediária (Qiagen[®], n.º catálogo 12145).

QIAprep Spin Miniprep Kit (250) - Para preparação plasmidial em pequena escala (Qiagen[®], n.º catálogo 27106).

Qiaquick Gel Extraction kit 50 – Para extração de DNA de gel de agarose (Qiagen[®], n.º catálogo 28704).

Invisorb Fragment CleanUp - Para extração de DNA de gel de agarose (Invitrogen[®], n.º catálogo 10203002).

Qiaquick PCR purification kit 50 – Para purificação de DNA para sequenciamento (Qiagen[®], n.º. catálogo 28104).

Colunas para extração de DNA de gel de agarose por Freeze Squeeze – Ultrafree DA Centrifugal Unit (Millipore[®], n.º. catálogo 42600).

PlusOne Silver Staining kit Protein. Para coloração de géis de poliacrilamida com prata. (GE lifescience, n.º. catálogo. 17-1150-01).

18) Anticorpos utilizados nos ensaios de *Western, Colony e Dot Blot*

Anti – IgG humana (Ck específico) feito em cabra (Pierce[®] n.º catálogo: A9544)

Concentração: 1 mg/mL - Titulação de uso: 1:3.000

Anti – IgG de cabra feito em coelho conjugado com fosfatase alcalina (Sigma[®] n.º catálogo: A-4187)

Concentração: 1 mg/mL - Titulação de uso: 1:5.000

MÉTODOS

1) Preparação de DNA plasmidial

a. Em pequena escala (adaptado de Sambrook e Russel, 2001).

- 1) Três mililitros de cultura de células de *E. coli*, transformadas com o plasmídeo de interesse, crescidas em meio LB/Amp (150 µg/mL) durante 16 horas a 37°C, foram coletados por meio de duas centrifugações de 5 min a 5.000 rpm em microtubos de 1,5 mL, sendo o sobrenadante desprezado a cada centrifugação.
- 2) O sedimento foi ressuscitado em 200 µL de Solução I. Incubou-se as amostras no gelo por 5 min.
- 3) Foram adicionados 400 µL de Solução II e as amostras foram homogeneizadas, por meio de inversão do tubo várias vezes, e estas foram incubadas à temperatura ambiente por 5 min.
- 4) Foram adicionados 300 µL de Solução III, o mesmo procedimento de homogeneização foi repetido, e as amostras foram incubadas no gelo por 10 min.
- 5) As amostras foram centrifugadas a 12.000 rpm por 15 min a 4°C.
- 6) Ao sobrenadante foram adicionados 5 µL de RNase A e incubou-se por 1 hora a 37°C.
- 7) Foram adicionados 300 µL de clorofane e, após forte homogeneização, as amostras foram centrifugadas por 5 min a 5.000 x g à temperatura ambiente, a fase aquosa foi coletada para outro tubo.
- 8) Foram adicionados 300 µL de clorofil e o mesmo procedimento anterior de homogeneização, centrifugação e coleta foram repetidos.
- 9) Foram adicionados 2v de etanol absoluto gelado e as amostras foram incubadas a -20°C por no mínimo 2 horas.
- 10) As amostras foram centrifugadas a 12.000 rpm por 45 min a 4°C. O sobrenadante foi desprezado.
- 11) Foi adicionado 1 mL de etanol 70% gelado e as amostras foram novamente centrifugadas a 12.000 rpm por 15 min a 4°C. O sobrenadante foi desprezado.
- 12) O sedimento foi seco a vácuo ou por simples exposição ao ar.
- 13) O sedimento foi ressuscitado em 50 µL de TE. E as amostras conservadas a -20°C.

b. Em larga escala (adaptado de Sambrook e Russel, 2001).

- 1) Duzentos mililitros de cultura de células de *E. coli*, transformadas com o plasmídeo de interesse, crescidas em meio LB/Amp (150 µg/mL) durante 16 horas a 37°C, foram coletados por meio de centrifugação de 15 min a 3.000 x g, desprezando-se o sobrenadante.
- 2) O sedimento foi ressuspensionado em 5 mL de Solução I sob forte agitação. As amostras foram incubadas no gelo por 10 min.
- 3) Foram adicionados 10 mL de Solução II e as amostras foram homogeneizadas, por meio de inversão do tubo várias vezes. Estas foram incubadas à temperatura ambiente por 5 min.
- 4) Foram adicionados 7,5 mL de Solução III, o mesmo procedimento de homogeneização foi repetido, e as amostras foram incubadas no gelo por 10 min.
- 5) As amostras foram centrifugadas a 10.000 x g por 30 min a 4°C.
- 6) O sobrenadante foi filtrado em papel de filtro e ao sobrenadante foram adicionados 0,6v de isopropanol. Após uma incubação de 5 min à temperatura ambiente, as amostras foram centrifugadas a 12.000 x g por 20 min a temperatura ambiente.
- 7) O sobrenadante foi descartado e, após a secagem por exposição ao ar, o sedimento foi ressuspensionado em 500 µL de TE ao qual foram adicionados 10 µL de RNase A. As amostras foram incubadas por 1 hora a 37°C.
- 8) Foram adicionado 1v de clorofane e, após forte homogeneização e centrifugação de 5 min a 5.000 x g à temperatura ambiente, a fase aquosa foi coletada para outro tubo.
- 9) O passo anterior foi repetido mais uma vez.
- 10) Foi adicionado então 1v de clorofil e o mesmo procedimento anterior de homogeneização, centrifugação e coleta foram repetidos.
- 11) Foram adicionados 0,5v de acetato de amônio 7,5M e 2,0v de etanol 100% gelado e as amostras foram incubadas por, no mínimo 2 horas a -20°C.
- 12) As amostras foram centrifugadas a 12.000 rpm por 45 min a 4°C. O sobrenadante foi desprezado.
- 13) Foi adicionado 1 mL de etanol 70% gelado e as amostras foram novamente centrifugadas a 12.000 rpm por 15 min a 4°C. O sobrenadante foi desprezado.
- 14) O sedimento foi seco a vácuo ou por simples exposição ao ar.
- 15) O sedimento foi ressuspensionado em 200 µL de TE. E as amostras conservadas a -20°C.

2) Digestão do DNA plasmidial com enzimas de restrição.

As digestões dos plasmídios utilizados com enzimas de restrição foram realizadas conforme instruções dos fabricantes. O tempo de incubação e a quantidade de material a ser digerido variavam de acordo com o interesse do experimento realizado.

3) Análise de DNA plasmidial em gel de agarose (Sambrook e Russel, 2001).

A agarose foi preparada numa concentração de 0,7 a 1,2% dependendo da amostra em tampão TEB 1X ou TAE 1X com 0,5 µg/mL de brometo de etídeo. As amostras de DNA foram aplicadas com tampão de amostra para gel de agarose no gel e foram submetidas à eletroforese em tampão TEB ou TAE 0,5X, como descrito por (Sambrook e Russel, 2001). Para visualização do DNA luz ultravioleta foram incididas no gel utilizando um transluminador (UVP-Upland[®]) e a imagem foi digitalizada em aparato de fotodocumentação.

4) Eluição de fragmentos de DNA de gel de agarose

As bandas contendo os fragmentos de DNA eluídos por meio de eletroforese foram cortadas do gel de agarose. A extração do DNA do gel procedia por meio do kit Qiaquick Gel Extraction kit, Qiagen[®] ou Invisorb Fragment CleanUp, Invitex[®] conforme instruções do fabricante ou por meio de freeze-squeeze. Este último procedimento foi feito da seguinte forma: A banda do DNA cortada do gel foi transferida para uma bolsa feita utilizando um pedaço de Parafilm[®]. A bolsa contendo o fragmento foi congelada a -40^o C. Após o total congelamento, a banda foi macerada até o gel se liquefazer. O líquido e parte do gel foram transferidos para colunas Ultrafree DA Centrifugal Unit (Millipore[®]). O material foi centrifugado por 5 minutos a 12.000 x g a temperatura ambiente. Após a centrifugação o material foi precipitado com a adição de 0,5 v de acetato de amônio 7,5M, 60 µg de glicogênio e 2,5v etanol 100% (v/v) gelado. As amostras foram incubadas a -20°C durante a noite. Após a incubação procedia-se a sedimentação do DNA por meio de centrifugação durante 45 minutos a 12.000 rpm, seguida de lavagem do pellet com 300µL de Etanol 70% (v/v) gelado. O sedimento foi centrifugado novamente por 15 minutos a 12.000 rpm e secado a temperatura ambiente. O DNA foi ressuspendido em H₂O destilada ou TE.

72°C 2 min
 4) 72°C 10 min

Para amplificação dos demais fragmentos

1) 94°C 3 min
 2) 30 ciclos : 94°C 1 min
 60°C 1 min 30 seg
 72°C 2 min
 4) 72°C 10 min

7) Ligação de fragmentos de DNA

a) Ligação do produto de PCR no vetor pGemT Easy

Para a ligação dos segmentos gênicos obtidos por PCR utilizava-se 25ng do inserto, 5µL do tampão da promega 2x, 1 µL do vetor pGEM-T Easy e 1 µL da enzima T4 DNA Ligase (Promega). O volume do sistema foi completado para 10 µL quando necessário com H₂O MilliQ. O sistema foi incubado durante 16 horas a 4°C. Após este período, o sistema foi transformado em células competentes de *E. coli*.

b) Ligação de vetor e inserto das clonagens

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 1:3 a 1:5, aplicando-se a seguinte fórmula:

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

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. Após este período, o sistema foi transformado em células competentes de *E. coli*.

8) Preparação de células competentes e transformação bacteriana

a. Quimiocompetente (adaptado de Maranhão, 2003).

- 1) Foram inoculados 500 μ L de um pré-inóculo, feito a partir de uma colônia isolada da célula de interesse, em 50 mL de meio LB. O inóculo foi incubado a 37°C a 220 rpm até a cultura atingir uma densidade óptica a 600nm (OD_{600nm}) de 0,1 a 0,3.
- 2) O inóculo foi centrifugado a 3.000 x g por 15 min a 4°C, o sobrenadante foi desprezado. (Após essa etapa é importante que em todas as etapas subsequentes as células sejam mantidas resfriadas para evitar uma perda de eficiência).
- 3) O sedimento foi ressuspendido em 10 mL de solução de $CaCl_2$ 50mM estéril gelada, com movimentos suaves.
- 4) Foi feita uma centrifugação a 3.000 x g por 15 min a 4°C, o sobrenadante foi desprezado.
- 5) O sedimento foi ressuspendido em 1 mL de solução de $CaCl_2$ 50mM estéril gelada, com movimentos suaves.
- 6) Após incubação de 1 hora em banho de água/gelo, as células foram aliqüotadas e estas podiam ser utilizadas por um período máximo de 24 horas.
- 7) Foram incubados de 100 a 200 μ L de célula competente com o plasmídio de interesse a ser transformado em banho de água/gelo por 30 min.
- 8) O choque térmico foi realizado por meio de incubação do sistema de transformação em banho a 42°C por 3 min.
- 9) Foi adicionado imediatamente 1 mL de meio LB e o sistema foi incubado por 1 h a 37°C.
- 10) Foram semeadas quantidades variáveis do sistema de transformação em placas contendo meio LB-ágar contendo ampicilina a 150 μ g/mL. As placas foram mantidas na estufa a 37°C por 16 horas.

b. Por eletroporação (adaptado de Maranhão, 2003).

- 1) Uma colônia isolada da célula de interesse foi inoculada em 10 mL de meio SB contendo o antibiótico de interesse. Esse pré-inóculo foi mantido a 37° sob agitação de 220 rpm por 16 horas.
- 2) Foi inoculado 1 mL do pré-inóculo em 500 mL de meio SB contendo 2,5 mL da solução estoque de glicose 2M e 2,5 mL da solução estoque de Mg 2M. O inóculo foi incubado a

- 37°C a 220 rpm até a cultura atingir uma OD_{600nm} de 0,7 a 0,9.
- 3) O inóculo foi centrifugado a 3.000 x g por 20 min a 4°C, o sobrenadante foi desprezado e a célula foi mantida sempre gelada a partir desse momento.
 - 4) O sedimento foi ressuscitado em 25 mL de glicerol 10% estéril gelado e a seguir foram adicionados mais 75 mL de glicerol 10% gelado.
 - 5) Foi feita outra centrifugação a 3.000 x g por 20 min a 4°C, repetindo a etapa anterior.
 - 6) O sedimento foi ressuscitado em 25 mL de Glicerol 10% estéril gelado e submetido a última centrifugação a 3.000 x g por 20 min a 4°C.
 - 7) O sedimento final foi ressuscitado em 1 a 2 mL de glicerol 10% e as células foram aliqüotadas, congeladas em banho de gelo seco com etanol e armazenadas imediatamente a -80°C.
 - 8) Para a transformação, o plasmídeo foi adicionado, já em um tubo resfriado previamente, à célula competente e imediatamente colocado na cubeta de eletroporação (BioAgency[®]) também já resfriada.
 - 9) A eletroporação foi feita seguindo os seguintes parâmetros elétricos: 2,5 kV, 25 µF e 200 Ω, no aparelho Gene Pulser com Pulser Controller da BioRad. O τ esperado nessas condições é de 4,0 a 5,0 milissegundos.
 - 10) Imediatamente após o choque a cubeta foi lavada com 3 mL de meio SOC e o meio foi recolhido para um tubo de centrifugação de 50 mL.
 - 11) Após uma incubação de 1 h a 37°C e 220 rpm, diluições da transformação foram semeadas em placas contendo ampicilina a 200 µg/mL. As placas foram mantidas na estufa a 37°C por 16 horas.

9) Sequenciamento automático de DNA e análise de sequências.

Após ter sido realizada uma análise de restrição, os plasmídios foram sequenciados utilizando o sequenciador automático MegaBACE 500 plus (Molecular Dynamics[®]). foram utilizadas de 150 a 250 ng do vetor, 5 picomoles do oligonucleotídeo apropriado e o kit “DyeEnamic ET DYE Terminator Cycle Sequencing”.

As sequências obtidas por meio do sequenciamento automático foram analisadas utilizando ferramentas de bioinformática: Phred e CAP3 disponíveis na página: www.biomol.unb.br. Depois da análise de qualidade, as sequências foram submetidas à

ferramenta de procura de alinhamentos básicos locais (BLAST, do inglês, Basic Local Alignment Search Tool, www.ncbi.nlm.nih.gov/blast) para análise de identidade com sequências já depositadas no GenBank. As sequências também foram manipuladas e analisadas com sequências, depositadas em um banco de dados pessoal, utilizando o programa BioEdit Sequence Alignment Editor (Hall, 2007).

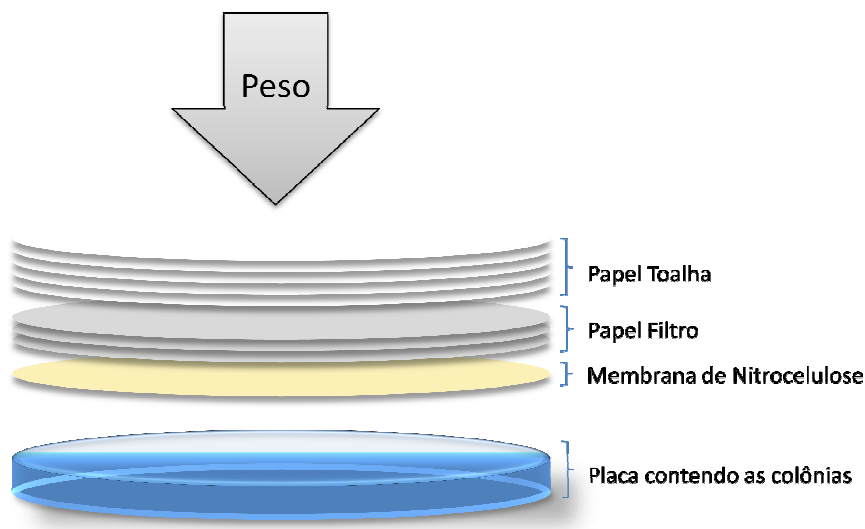
10) Transformação de *P. pastoris*

Esta é uma versão modificada do protocolo descrito por Wu e Letchworth, 2004.

- 1) Inoculou-se uma colônia da linhagem GS115 ou SMD1168 de *P. pastoris* em 10mL de meio YPD e incubou-se durante a noite no shaker 200rpm a 30°C.
- 2) Diluiu-se o pré-inóculo crescido a noite em 100mL de meio YPD para uma OD₆₀₀ inicial de 0,3. Incubou-se no shaker 200rpm a 30°C até atingir uma OD₆₀₀ de 1,3-1,5.
- 3) Centrifugou-se a cultura a 3.000x g por 10 minutos a temperatura ambiente.
- 4) Ressuspendeu-se o pellet com 8 mL do tampão de pré-tratamento (TPT). Incubou-se por 30 minutos a temperatura ambiente.
- 5) Centrifugou-se a cultura a 3.000x g por 10 minutos a 4°C.
- 6) Ressuspendeu-se o pellet com 1,5 mL de Sorbitol 1M e centrifugou-se a cultura a 3.000x g por 10 minutos.
- 7) Procedeu-se o passo seis por três vezes.
- 8) Ressuspendeu-se o pellet com sorbitol 1M deixando as células numa concentração de 10⁸⁻¹⁰.
- 9) Procedeu-se a transformação por eletroporação das células preparadas.
- 10) Incubou-se de 5 a 10µg de DNA linearizado com 80µL de células em cubeta de eletroporação (BioAgency[®]) previamente resfriada durante 5 minutos.
- 11) A eletroporação foi feita seguindo os seguintes parâmetros elétricos: 1,5 kV, 25 µF e 200 Ω, no aparelho Gene Pulser com Pulser Controller da BioRad.
- 12) Placas contendo meio MD foram semeadas com 100µL da diluição de 1:10 e 1:100 das células eletroporadas.
- 13) As placas foram incubadas em estufa a 30°C até o aparecimento de colônias.

11) Detecção de colônias produtoras por meio de *Colony Blot*

- 1) As colônias crescidas na placa MD da transformação por eletroporação foram estriadas em placas contendo meio MD e meio MM.
- 2) As placas foram incubadas em estufa a 30°C durante 48 horas. Procedia-se a adição de 200 µL de metanol 100% nas tampas das placas MM depois de 24 horas.
- 3) Após 48 horas as placas MD foram reservadas a 4°C e procedia-se a detecção das colônias produtoras por meio de *Colony Blot*.
- 4) As placas MM foram “chapadas” com um sanduíche contendo 1 membrana de nitrocelulose em contato com as colônias, 3 folhas de papel filtro e 5 folhas de papel toalha conforme o figura 14 abaixo. As placas foram incubas na estufa 37°C com um peso em cima durante 1 hora e 30 minutos.



- 5) A membrana de nitrocelulose foi lavada com PBST 1x para retirar o excesso de colônias.
- 6) A membrana foi incubada com a solução de bloqueio contendo Molico 3% durante 2 horas ou durante a noite.
- 7) Lavou-se a membrana com PBST 1x 3 vezes e incubou-se com o anticorpo primário Anti – IgG humana (Ck específico) feito em cabra na titulação de 1:3.000 durante 1 hora e 30 minutos.
- 8) Lavou-se a membrana com PBST 1x 3 vezes e incubou-se com o anticorpo secundário Anti Anti – IgG de cabra feito em coelho conjugado com fosfatase alcalina na titulação de 1:3.000 durante 1 hora e 30 minutos.
- 9) Lavou-se a membrana com PBST 1x 3 vezes e uma vez com APB.
- 10) A membrana foi revelada com NBT/BCIP.

12) Crescimento e Indução de *P. pastoris*

- 1) Inoculou-se uma colônia produtora em 5 mL de meio BMGY em falcon de 50mL novo e estéril e incubou-se durante a noite no shaker 200rpm a 30°C.
- 2) Inoculou-se 1% do pré-inóculo crescido durante a noite em 200mL de meio BMGY e incubou-se durante 18-24 horas no shaker 200rpm a 30°C.
- 3) Centrifugou-se a cultura e coletou-se o pellet e 20mL do sobrenadante foi reservado para compor o tempo 0 h de indução. Ressuspendeu-se em o pellet em meio BMMY com o inibidor PMSF na concentração final de 10mM e incubou-se durante a noite no shaker 200rpm a 30°.
- 4) Depois de 24 horas 50% da amostra (100mL) foi coletada e reservada. Com os outros 50% (100mL da amostra) procedeu-se a adição de 1% de metanol e incubou-se por mais 24 horas no shaker 200rpm a 30°.
- 5) Os cem mililitros da amostra da coleta de 24 horas foram centrifugados a 3000x g a 4°C e o sobrenadante foi filtrado em membrana de 0,45µm. O sobrenadante foi conservado a 4°C com PMSF na concentração final de 10mM e EDTA na concentração final de 5mM.
- 6) Depois de 48 horas de indução coletou-se os cem mililitros restantes por centrifugação a 3000x g a 4°C. O sobrenadante foi filtrado em membrana de 0,45µm e conservado a 4°C com PMSF na concentração final de 10mM e EDTA na concentração final de 5mM.
- 7) Com os sobrenadantes procedeu-se a detecção das proteínas recombinantes por meio de *Dot Blot e Western Blot*.

13) Detecção das proteínas por meio de *Dot Blot*

- 1) Depois da indução e filtração dos sobrenadantes dos tempos obtidos, 5µL de cada sobrenadante foi aplicado na membrana de nitrocelulose.
- 2) A membrana foi incubada com a solução de bloqueio contendo Molico 3% durante 2 horas ou durante a noite.
- 3) A membrana de nitrocelulose foi lavada com PBST para retirar o excesso de solução de bloqueio.
- 4) Incubou-se com o anticorpo primário Anti – IgG humana (Ck específico) feito em cabra na titulação de 1:3.000 durante 1 hora e 30 minutos.

- 5) Lavou-se a membrana com PBST 3 vezes e incubou-se com o anticorpo secundário Anti Anti – IgG de cabra feito em coelho conjugado com fosfatase alcalina na titulação de 1:3.000 durante 1 hora e 30 minutos.
- 6) Lavou-se a membrana com PBST 3 vezes e uma vez com APB.
- 7) A membrana foi revelada com NBT/BCIP.

14) Concentração do sobrenadante

- 1) O sobrenadante de cultura foi concentrado utilizando-se coluna da Amicon Centriprep YM-30 com capacidade de 15 mL.
- 2) A coluna contendo o sobrenadante foi submetida a centrifugação durante 30 minutos a 1500 x g a 4°C. As proteínas que tinham uma massa molecular acima de 30 kDa ficavam mantida abaixo da membrana e atravessava a membrana somente as proteínas menores.
- 3) O sobrenadante retido abaixo da coluna foi coletado e dialisado com PBS 1x. O volume final retido com esse procedimento foi de 4 mL.
- 4) Para obter um volume menor, as amostras dialisadas foram transferidas para a coluna da Amicon centricon YM-10. Essa coluna foi submetida a centrifugação por 30 minutos a 5000 x g a 4°C. foi coletado a amostra que ficava retida na membrana. O volume final obtido variava de 400 a 600µL. A utilização dessa coluna foi somente para diminuir o volume, já que não existiam mais proteínas abaixo de 10 kDa.

15) Precipitação de proteína com TCA

- 1) Os sobrenadantes foram transferidos para tubos do tipo *ependorf*. Adicionou-se TCA para uma concentração final de 10% e incubou-se no gelo por pelo menos 30 minutos.
- 2) Centrifugou-se a 13.000rpm por 15 minutos a 4°C em microcentrífuga.
- 3) Os sobrenadantes foram descartados e os sedimentos foram gentilmente lavados com 1 mL de acetona gelada. Deixava-se em repouso no gelo por pelo menos 15 minutos.
- 4) Repetia-se o passo três por mais duas vezes.
- 5) A acetona foi finalmente descartada e os tubos foram deixados em repouso por aproximadamente 15 minutos para secar o sedimento. Os sedimentos foram ressuspensos em 50µL de tampão de amostra para SDS-PAGE e analisados em gel de poliacrilamida.

16) Análise de proteínas em gel SDS-PAGE

- 1) As amostras obtidas dos sobrenadantes e precipitadas com TCA foram analisadas por eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida.
- 2) Preparou-se o gel separador a 12% (p/v), sendo a polimerização catalisada pela adição de 0,045% (p/v) de persulfato de amônio (APS) e 0,2% (v/v) de TEMED.
- 3) Após a polimerização do gel separador, verteu-se o gel concentrador preparado na concentração de 4% (p/v), sendo a polimerização catalisada pela adição de 0,12% (p/v) de APS e 0,2% (v/v) de TEMED.
- 4) Uma vez vertido o gel concentrador, introduziu-se o pente para permitir a formação dos poços.
- 5) O gel foi acoplado no aparato de eletroforese. Antes da aplicação das amostras os poços foram lavados com tampão de corrida.
- 6) As amostras foram imediatamente fervidas durante 10 minutos a 100°C antes da aplicação.
- 7) Após a corrida do gel a 25mA, o mesmo foi submetido a transferência para a realização do experimento de detecção por meio de *Western Blot*.

17) Detecção das proteínas por meio de *Western Blot*

- 1) Após a corrida, o gel de poliacrilamida foi transferido para membrana de nitrocelulose utilizando-se o sistema de transferência semi-seca com eletrodos grafite (Pharmacia-LKB).
- 2) Conforme instruções do fabricante, fazia-se um “sanduíche” de papéis filtro, previamente embebidos com o tampão de transferência e tendo internamente a membrana e o gel.
- 3) O sanduíche foi montado entre os dois eletrodos de grafite e foi submetido a uma corrente elétrica de 0,8mA/cm² de membrana por 1 hora e 45 minutos.
- 4) A membrana contendo as proteínas transferidas foi bloqueada em solução de molico 5% durante 1 hora ou por 16 a 20 horas em temperatura ambiente sob agitação branda.
- 5) Lavou-se a membrana 3 vezes com PBST para retirar o excesso da solução de bloqueio.
- 8) Incubou-se a membrana com o anticorpo primário Anti – IgG humana (Ck específico) feito em cabra na titulação de 1:3000 durante 1 hora e 30 minutos.

- 9) Lavou-se a membrana com PBST 3 vezes e incubou-se com o anticorpo secundário Anti Anti – IgG de cabra feito em coelho conjugado com fosfatase alcalina na titulação de 1:3000 durante 1 hora e 30 minutos.
- 10) Lavou-se a membrana com PBST 3 vezes e uma vez com APB.
- 11) A membrana foi revelada com NBT/BCIP.