RAQUEL DE MELLO E PINHO

Uso do silenciamento gênico mediado por RNA de interferência e de *TAL effector nucleases* para aumento de eventos *gene targeting* em células de cão

São Paulo

2014

RAQUEL DE MELLO E PINHO

Uso do silenciamento gênico mediado por RNA de interferência e de *TAL effector nucleases* para aumento de eventos *gene targeting* em células de cão

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Departamento:

Cirurgia

Área de Concentração:

Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientador:

Prof. Dr. Carlos Eduardo Ambrósio

Coorientadora:

Prof^a. Luciana Relly Bertolini

São Paulo

2014

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.3007
FMVZ

Pinho, Raquel de Mello e

Uso do silenciamento gênico mediado por RNA de interferência e de *TAL effector nucleases* para aumento de eventos *gene targeting* em células de cão / Raquel de Mello e Pinho. -- 2014.
76 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento Cirurgia, São Paulo, 2014.

Programa de Pós-Graduação: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Eduardo Ambrósio.

1. Gene targeting. 2. Recombinação homóloga. 3. RNAi. 4. TALENs. I. Título.

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Uso do silenciamento gênico mediado por RNA de interferência e de TAL effector nucleases para aumento de eventos gene targeting em células de cão", protocolado sob o nº 2558/2012, utilizando amostras biológicas de cães, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Carlos Eduardo Ambrósio, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 15/2/2012.

We certify that the Research "Use of RNAi-mediated gene silencing and TAL effector nucleases to enhance gene targeting events in dog cells", protocol number 2558/2012, utilizing biological samples from dogs, under the responsibility Prof. Dr. Carlos Eduardo Ambrósio, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 2/15/2012.

São Paulo, 22 de julho de 2014.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: PINHO, Raquel de Mello e

Título: **Uso do silenciamento gênico mediado por RNA de interferência e de *TAL effector nucleases* para aumento de eventos *gene targeting* em células de cão**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: ____/____/2014

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Agradecimentos

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha mãe, Julia, e ao meu pai, Ernani. Aos meus irmãos e sobrinhas. Ao meu namorado, José Eduardo (Zé). E a toda minha família pelo apoio e paciência.

Gostaria de agradecer a Profa. Dra. Luciana Bertolini e ao Prof. Dr. Marcelo Bertolini, por todas as oportunidades e todos os conhecimentos passados. Ao Prof. Dr. Carlos Eduardo Ambrósio, por me receber como orientanda e me permitir fazer parte da sua equipe.

A toda equipe do Laboratório de Biologia Molecular e do Desenvolvimento (LBMD) da Universidade de Fortaleza (UNIFOR-CE): Minha Amiga e companheira de Laboratório Cícera Lazzarotto, Leonardo Tondello, Saul Gaudêncio, Luís Henrique, Carlos Mendez, Igor Sá, Victor Hugo, Arthus, Xavier, André e Eder. Em especial, Kaio Tavares que desempenhou papel fundamental no andamento do meu projeto, e por isto serei eternamente grata.

Agradeço, também, ao Prof.Dr. Daniel F, Voytas do Instituto Roslin da Universidade de Edimburgo, Escócia, pela colaboração nas construções das TALENS.

A minha grande amiga Débora Rios. E aos meus colegas da USP, Thiago, Antenor, Luciana, Thais e João.

Agradeço ao Prof. Dr. James Murray e à Prof. Dra. Elizabeth Maga pelo apoio e por me permitirem fazer parte do projeto no departamento de *Animal Science* da *University of Califórnia*, Davis. Agradeço a todos que me receberam tão bem em minha estadia em Davis. Adilla, Lidia, Erika, Jeni, Barbara, Merrit e Janet. Ao Prof. Dr. Pablo Ross pelo fornecimento das células MDCK I.

À Profa. Dra. Maria Angélica.

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pelo suporte financeiro sob processo nº 133168/2012-3.

*"Conquistar é transpor barreiras, vencer desafios e
alcançar a vitória almejada na luta do dia a dia."*

Islanda Braxão

RESUMO

PINHO, R. M. **Uso do silenciamento gênico mediado por RNA de interferência e de *TAL effector nucleases* para aumento de eventos *gene targeting* em células de cão.** [Use of RNAi-mediated gene silencing and Tal effector nucleases to enhance gene targeting events in dog cells.]. 2014. 76 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

A inserção de DNA exógeno no genoma hospedeiro é conseguida principalmente através da utilização de vias de reparo como a junção de pontas não homólogas, que possui caráter aleatório, e a recombinação homóloga, que possibilita o gene targeting. Algumas ferramentas como as TAL Effector Nucleases (TALENs) e o RNA interferência (RNAi) podem ser utilizadas para aumentar a taxa de integração específica e assim melhorar a eficiência e o direcionamento da edição gênica. Nesse trabalho utilizamos o silenciamento gênico mediano por short interference RNA (siRNA) para inibição temporária dos genes ATF7IP uma metiltransferase, EP300 uma acetiltransferase e KU70 (NHEJ) e um par de TALENs complementares a uma região do gene da distrofina canina. Células Caninas MDCK I foram transfectadas por lipofectamina 2000 (Invitrogen) com 320pmol de siRNAs para ATF7IP e Ep300; e 64 pmol do SiRNA para KU70 em diferentes grupos, 40 horas depois as células foram transfectadas com 15 µg vetor molde derivado do pEGFP-N1 (Clontech) e com 10 µg dos RNAm das TALENs. A seleção se deu em meio DMEM high com 600µg/ mL de G418 (Lonza) por 14-16 dias. As colônias coletadas através de biópsias foram analisadas por Polimerase Chain Reaction e sequenciamento gênico. Três pares de primers foram utilizados; um controle endógeno (GAPDH), um controle interno do inserto (Neo qPCR) e um para confirmação da recombinação homóloga (DMD3). Os grupos apresentaram grande variação na taxa de mortalidade celular e consequentemente no número de colônias: Com o grupo ATF7IP+Vetor (648c) apresentando maior número de colônias e o grupo EP300+Ku70+Vetor+TALENs o menor (1c). A maior taxa de recombinação ocorreu nos grupos no grupo ATF7IP +Ku70+Vetor+TALENs com 40% das células positivas para neomicina apresentado o evento gene targeting, um aumento considerável na taxa de recombinação quando comparada a porcentagem de 3,1% do controle transfectado somente com o vetor molde. Mostrando que o uso conjunto das TALENs com siRNAs foi um sucesso para o aumento de eventos de edição gênica direcionada.

Palavras-chave: *Gene targeting*. Recombinação homóloga. RNAi. TALENs.

ABSTRACT

PINHO, R. M. **Use of RNAi-mediated gene silencing and TAL effector nucleases to enhance gene targeting events in dog cells.** [Uso do silenciamento gênico mediado por RNA de interferência e de *Tal effector nucleases* para aumento de eventos *gene targeting* em células de cão.]. 2014. 76 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

The insertion of exogenous DNA into a host genome is achieved primarily through the use of DNA repair pathways such as Non-Homologous End Joining (NHEJ) and the Homologous Recombination (HR). The integration by NHEJ has a random feature and is much more common than HR insertions, which are more likely to produce gene targeting events. TAL effector nucleases (TALENs) and RNA interference (RNAi) can be used to increase the rate of specific integration and thus improving the efficiency of gene editing. In this work, we used short interference RNA (siRNA)-mediated gene silencing for transient inhibition of genes ATF7IP (implicated in histone methylation), EP300 (acetyltransferase) and Ku70 (essential to NHEJ) and a pair of TALENs RNAs complementary to canine muscle dystrophin (DMD) gene. MDCK I Canine Cells were transfected by lipofectamine 2000 (Invitrogen) with 320 pmol of siRNAs for ATF7IP and EP300; and 64 pmol of siRNA for Ku70 in different groups. After 40 hours cells were transfected with 15 µg of a vector derived from pEGFP- N1 (Clontech) containing two regions homologous to the canine DMD gene (left arm length: 873 bp and right arm length: 1370 bp) and 10 µg of TALEN mRNA. The cell selection was achieved with DMEM high glucose with 600µg/ml G418 for 14-16 days. The colonies collected through biopsies were analyzed by polymerase chain reaction and gene sequencing. Three pairs of primers were used; an endogenous control (GAPDH), an internal control of the insert (Neo qPCR) and a primer set to confirm the occurrence of homologous recombination events (DMD3). Groups showed great variation in cell death rate and consequently in the number of colonies: ATF7IP+Vector had highest number of colonies (648c) and the group EP300+Ku70+Vetor+TALENs the lowest one (1c) The highest rate of homologous recombination was in ATF7IP +Ku70+Vetor+TALENs group that had 40% of the neomycin positives cells confirmed as gene targeting events, a considerable increase in the recombination rate compared to the 3.1% in the control group transfected only with the template vector. That shows that the combined use of siRNAs and TALENs was a success for increasing directed gene editing events.

Keywords: Gene targeting. Homologous recombination. RNAi. TALENs.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Seringa adaptada utilizada na biópsia das colônias.....	43
Figura 2 -	Análise da clonagem do braço esquerdo no vetor TOPO e das digestões do BE e do vetor BD-GFP.....	46
Figura 3 -	Confirmação da ligação do braço esquerdo no vetor molde.....	47
Figura 4 -	Análise da digestão final do vetor molde.....	47
Figura 5 -	Análise da PCR dos exons 5 e 13 do gene da proteína Ku70.....	48
Figura 6 -	Eletroforese do dsRNA e do siRNA do exon 5 do gene Ku70.....	48
Figura 7 -	Digestão e linearização dos plasmídeos das TALENs DMD-R e DMD – L.....	49
Figura 8 -	Eletroforese dos RNA mensageiros das TALENs DMD.....	49
Figura 9 -	Análise do silenciamento gênico mediado por RNAi.....	50
Figura 10 -	Fotomicrografias das células transfectadas com o vetor pmaxGFP	51
Figura 11 -	Fotomicrografias das células transfectadas com o Block-iT fluorescente oligo.....	52
Figura 12 -	Fotomicrografias das células transfectadas com 160 pmol de oligo fluorescente.....	53
Figura 13 -	Fotomicrografias das células do grupo controle transfectadas com o vetor pmaxGFP.....	53
Figura 14 -	Fotomicrografias de colônias antes e depois da biópsia.....	54
Figura 15 -	Colônias celulares morfologicamente alteradas.....	55

Figura 16 -	Biopsia da única colônia EP300 + Ku70 + Vetor + TALENs.....	57
Figura 17 -	Eletroforese da PCR para o controle endógeno GAPDH.....	57
Figura 18 -	Eletroforese das PCRs para o gene neomicina.....	58
Figura 19 -	Eletroforese das PCRs com iniciadores DMD3.....	58
Figura 20:	Confirmação da clonagem das bandas reamplificadas no vetor TOPO.....	58
Figura 21:	Resultado do sequenciamento	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Iniciadores utilizados no projeto.....	35
Tabela 2 -	Composição dos tampões utilizados na eletroforese em gel de agarose-formaldeído.....	38
Tabela 3 -	Quantidade de placas e de células por placa durante a seleção dos grupos transfectados.....	43
Tabela 4 -	Contabilidade do número de células pós-transfecção e colônias totais e biopsiadas.....	56
Tabela 5 -	Contabilidade do número de amostras positivas para GAPDH, neomicina e DMD3.....	59

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 -	Descrição dos grupos para padronização da transfecção de células MDCK I com lipofectamina 2000.....	41
Quadro 2 -	Descrição das transfecções com os siRNAs, com o vetor molde e com os RNAm para TALENs nos diferentes grupos.....	42

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	16
2 JUSTIFICATIVA.....	18
3 OBJETIVOS.....	20
3.1 Gerais.....	21
3.2 Específicos.....	21
4 REVISÃO DE LITERATURA.....	22
4.1 Recombinação Homóloga	23
4.2 Modificações de cromatina	26
4.3 RNA de interferência	29
4.4 Transcription Activator-Like EffectorNucleases	31
5 MATERIAL E MÉTODOS.....	33
5.1 Obtenção das Células	34
5.2 Cultivo e expansão celular	34
5.3 Construção do vetor molde para recombinação homóloga.....	34
5.4 Produção de short interference RNA para o gene Ku70.....	36
5.5 Construção e Transcrição das TAL- Effector Nucleases	37
5.5.1 Construção e Purificação do DNA plasmidial.....	37
5.5.2 Transcrição e Poliadenilação do RNAm	38
5.6 Confirmação da Inibição gênica mediada por siRNA	39
5.6.1 Transfecção Celular	39
5.6.2 Extração das Proteínas.....	39
5.6.3 Western Blot	39
5.7 Padronização da transfecção das células MDCK com Lipofectamina 2000.....	40

5.8 Transfecção com siRNAs, TALENS e vetor molde para recombinação homóloga.....	41
5.8.1 Transfecção celular.....	41
5.8.2 Seleção e biópsia das células transfectadas.....	42
5.8.3 Extração do DNA das colônias biopsadas.....	44
5.8.4 PCR e Sequenciamento para análise do DNA extraído e da taxa de RH.....	44
6 RESULTADOS.....	45
6.1 Construção do vetor molde para recombinação homóloga.....	46
6.2 Produção de siRNA para o gene Ku70 canino.....	48
6.3. TAL- Effector Nucleases	49
6.4 Inibição gênica mediada por siRNA.....	50
6.5 Padronização da transfecção de células MDCKI por lipofectamina2000	50
6.6 Transfecção siRNA, TALENs e vetor molde	53
6.7 PCR e sequenciamento do DNA extraído das colônias biopsiadas.....	57
7 DISCUSSÃO.....	61
8 CONCLUSÕES.....	66
REFERÊNCIAS.....	68

Introdução

1 INTRODUÇÃO

A eficiência da edição gênica está diretamente relacionada ao fato de inserir ou modificar um gene de interesse sem que haja danos ou modificações em outros loci ou regiões do DNA hospedeiro ou que o inserto venha a se localizar em uma região que impossibilite a sua expressão (GERSBACH et al., 2011).

Para guiar as mudanças desejadas e aumentar o número de eventos *gene targeting*, ou seja, a integração específica de um DNA exógeno em um DNA hospedeiro, necessita-se da estimulação da via de reparo de quebra de dupla fita (QDF) por recombinação homóloga (RH). A RH utiliza um molde para reconstrução do DNA danificado, criando uma oportunidade para que a inserção, deleção ou até substituição de um locus seja estabelecida de acordo com o molde utilizado (BERTOLINI et al., 2009).

A integração é favorecida por regiões contendo QDF por isso as vias de reparo influenciam no direcionamento da inserção. A recombinação ocorre em taxa de 1.000 a 10.000 vezes menor do que a Junção de Pontas Não Homólogas, que não utiliza molde e por tanto possui caráter randômico. Alguns estudos comprovaram que o silenciamento de alguns genes podem levar as células a preferirem a RH em detrimento da mais frequente JPNH (DELACOTÊ et al, 2011). O RNA de interferência é uma técnica bastante utilizada para esse objetivo, já que proporciona grande inibição da tradução gênica por período limitado (BARBOSA; LIN, 2004; BERTONILI et al., 2009), permitido que o *gene targeting* seja facilitado, mas evitando possíveis efeitos deletérios da inibição prolongada.

Além disso, a necessidade de quebras bifilamentares no DNA para inserção do DNA exógeno possibilita o uso de *TAL- Effector Nucleases*. As TALENs são proteínas DNA-ligantes complementares a regiões específicas e que possuem uma endonuclease inespecífica que após a dimerização corta a dupla fita do DNA. A utilização das TALENs direciona as vias de reparo para a região de interesse e facilita a integração do inserto no local do corte (OUSTEROUT et al., 2013).

O objetivo desse estudo foi aumentar a taxa de eventos de *gene targeting*, unindo o silenciamento gênico mediado por RNAi e as TALENs com vistas a avaliar a influência de cada um dos fatores no aumento da recombinação homóloga.

Justificativa

2 JUSTIFICATIVA

Uma das grandes dificuldades da utilização do gene *targeting* como terapia gênica é a baixa frequência de eventos de recombinação homóloga em células de mamíferos e também os efeitos indesejados da edição gênica não direcionada, ou seja, a integração *off target* ou randômica.

Portadores de doenças congênitas monogenéticas de caráter pontual, onde a mutação causadora é a mudança de um ou poucos pares de bases em um locus único podem se beneficiar com o desenvolvimento de terapias baseadas no gene *targeting* onde ocorre a substituição permanente do locus mutante, possibilitando a correção cromossomal e, consequentemente, a produção normal da proteína. Quanto maior a proximidade com o ambiente ideal para a realização da integração específica de DNA, maior a taxa de eventos recombinantes e mais viáveis se tornam as terapias que utiliza essa técnica.

O maior conhecimento das vias de reparo de danos no DNA e das proteínas que constituem essas vias pode esclarecer como tornar o ambiente celular mais favorável e facilitar a implementação da integração de DNA exógeno por recombinação homóloga como terapia. Os mecanismos de reparo de quebra de dupla fita já foram comprovadamente relacionados com proteínas de outras vias celulares, como por exemplo, a de regulação do ciclo celular. A relação e a influência das proteínas de remodelação de cromatina com os mecanismos de reparo pode aprofundar o conhecimento sobre a inter-relação entre esses processos celulares.

Além disso, essa técnica pode permitir o direcionamento da inserção de um gene exógeno em uma região conhecida ou pré-estabelecida, evitando a sua integração em locais não desejados como os de alta metilação, que impossibilitaria a sua expressão.

Objetivos

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar a influência do silenciamento mediado por RNA de interferência dos genes KU70, ATF7IP e EP300 e das *TAL effector nucleases* na taxa de eventos de recombinação homóloga em células de cachorro.

3.2 Específicos

- Padronizar protocolo para transfecção das células MDCKI por lipofectamina 2000 (Invitrogen®)
- Produzir siRNA específicos para o gene KU70 canino.
- Comprovar a inibição da tradução dos genes ATF7IP, EP300 e KU70 nas células transfectadas com os respectivos siRNAs.
- Produzir o RNA mensageiro das TALENs complementares a região do gene da distrofia canina.
- Transfectar células com os siRNAs para ATEF7IP, EP300 e KU70, além do RNAm para as TALENS e do vetor molde contendo regiões homologas ao gene da distrofia canina.
- Avaliar, através de técnicas de PCR e sequenciamento, a taxa de frequência de recombinação homóloga nos diferentes grupos transfectados.

Revisão de Literatura

4 REVISÃO DE LITERATURA

4.1 *Recombinação Homóloga*

As células dispõem de sistemas de reparo para corrigir trechos de DNA defeituosos ou alterados em processos patológicos ou fisiológicos. Quando existe, por exemplo, uma quebra das duas fitas de DNA do mesmo cromossomo, denominada quebra bifilamentar (QB) ou quebra de dupla fita, os sistemas de reparo celular mais utilizados são a junção de pontas não homólogas (JPNH) e a recombinação homóloga (RH).

A QDF ocorre em processos celulares normais, como durante o *crossing over*, na meiose, e na geração de anticorpos nas células do sistema imune, e em processos patológicos, através de radiação ionizante, luz ultravioleta, uso de medicação usada no tratamento do câncer, em resposta ao oxigênio reativo (ALBERTS et al., 2008; WANG et al., 2013) e por radicais livres. Esse tipo de mutação favorece a hibridização gênica devido a arranjos cromossômicos, gerando anomalias genéticas, que se não são fatais para a célula, podem levar a uma pré-disposição cancerígena (LODISH et al., 2005; GRIFFITHS et al., 2006). Sua correção é, portanto, essencial para a estabilidade e vida celular.

A JPNH é o principal mecanismo de reparo em células somáticas de organismo multicelulares, como, por exemplo, em mamíferos, apesar de ser passível de erros por permitir a deleção de trechos de DNA durante o reparo (GRIFFITHS et al., 2006; ALBERTS et al., 2008), sendo frequentemente mutagênica. O que ocorre é a união de duas pontas de DNA, que não apresentam nenhuma homologia entre si, sem a utilização de fitas moldes para o reparo das fitas danificadas (BERTONILI et al., 2009; OGIWARA et al., 2011).

Várias proteínas estão relacionadas ao funcionamento da JPNH, entre elas estão a Proteína Quinase Dependente de DNA (DNA-PK_{cs}), o heterodímero Ku70-Ku80, o cofator XRCC4 e a enzima DNA Ligase 4 (BERTOLINI et al., 2009; DELACOTÊ et al., 2011; OGIWARA; KOHNO, 2011; OGIWARA et al., 2011). Após a QB o complexo Ku70-Ku80 reconhece as pontas livres do DNA lesionado, se ligando a elas e aproximando-as. Nucleases como a Artemis, a DNA-PK (unidade catalítica), as polimerases μ e λ processam as pontas danificadas, preparando-as para a ligação pela DNALigase 4 (OGIWARA; KOHNO, 2011; LANGERAK; RUSSELL, 2011). O reparo por junção de pontas sem homologia acontece

durante todas as fases do ciclo celular com preferencia em G₁ e início da fase S (HUERTAS; JACKSON, 2009; WANG et al., 2013).

A recombinação homóloga, por utilizar a cromátide-irmã como molde, ocorre durante o processo de replicação gênica, na mitose e na meiose (ALBERTS et al., 2008) e nas células germinativas (MICKLOS; FREYER; CROTTY, 2005). Também é o método mais comum em células eucariotas não evoluídas e em organismos unicelulares. É um sistema de reparo livre de erros (GRIFFITHS et al., 2006; ALBERTS et al., 2008).

No início do reparo pela via da RH o complexo proteico MRN (Mre11-Rad50-Nbs/Xrs2) se liga as pontas livres danificadas, ocorre, então, o aparo das fitas no sentido 5' → 3' para permitir a ação da enzima RPA (*Replication Protein A*) (POWELL; KACHNIC, 2003; LANGERAK; RUSSELL, 2011). Outras proteínas como a BRCA-1 e BRCA-2, estão envolvidas no processo da RH e possivelmente, também, na regulação do ciclo celular (POWELL; KACHNIC, 2003). Por utilizar a cromátide-irmã como molde a recombinação homóloga ocorre principalmente na fase S, onde há a replicação do DNA e no início da fase G₂, onde a cromátide-irmã continua acessível (LANGERAK; RUSSELL, 2011; DELACOTÊ et al., 2011).

Trocas de sinalizações entre as CDKs (Ciclin-dependent Kinases) e as proteínas dos mecanismos de reparo podem explicar a influência do ciclo celular na escolha entre a JPNH e a RH e também, a parada do ciclo celular quando o reparo do DNA ainda não estiver concluído (POWELL; KACHNIC, 2003; LANGERAK; RUSSELL, 2011). Além disso, é atribuída as CDKs o aparo das pontas nas regiões de quebra bifilamentar durante a replicação do DNA (HUERTAS; JACKSON, 2009), já que elas fosforilizam a proteína CtIP (*CtBP-interacting protein*) que interage com o complexo MRN, ativando a sua porção nucleasse, e com a proteína BRCA1, que vão por sua vez mediar o reparo da QDF (WANG et al., 2013).

O que também pode elucidar esse reparo limitado por fase é que durante a interfase, a condensação do DNA e a estrutura cromatina-histona dificultaria a procura por regiões de homologia e a ligação de proteínas relacionadas à recombinação homóloga (LANGERAK; RUSSELL, 2011).

A inserção de um fragmento de DNA exógeno pode ocorrer por recombinação homóloga, sendo inserido em um locus específico do gene-alvo, ou por inserção não homóloga, a fusão, assim, ocorrendo de forma aleatória no genoma hospedeiro (BERTOLINI et al., 2009; OUSTEROUT et al., 2013). Nas células de mamíferos a integração gênica em um gene-alvo é de difícil controle já que a integração randômica é de 1.000 a 10.000 vezes mais frequente do que a integração por recombinação homóloga. (BERTOLINI et al., 2009).

Isso acontece porque a inserção de um DNA externo é mais provável de ocorrer em decorrência de quebras bifilamentares, permitindo que as pontas livres de DNA se tornem substratos para o reparo gênico. E como já foi comentado, em células de mamíferos, o principal processo de reparo desse tipo de mutação é a junção de terminação não homóloga (BERTOLINI et al., 2009).

“*Gene targeting*” é a utilização do sistema de reparo da RH, utilizando como molde um DNA exógeno e objetivando a alteração de um gene específico. Essa técnica tem um potencial terapêutico promissor por permitir a manipulação seletiva de um locus do genoma celular, possibilitando a correção de mutações pontuais.

Entre as doenças monogênicas de caráter pontual que poderiam se beneficiar, podemos citar a doença de Gaucher (DAHL et al., 1990), fibrose cística (KEREM et al., 1989) e a distrofia muscular de Duchenne (DMD), Esta última acomete cerca de 1 em cada 3.500 nascidos vivos do sexo masculino (MURUGAN; CHANDRAMOHAN; LAKSHMI, 2010) e é uma doença genética recessiva ligada ao sexo. A Distrofia Muscular de Golden Retriever (DMGR) é a distrofia canina mais profundamente estudada e bem caracterizada (WANG et al., 2009) Assim como na DMD, na DMGR a proteína distrofina está ausente, devido à mutação genética pontual no gene localizado no braço curto do cromossomo X.

Um dos grandes obstáculos para realização “*gene targeting*” como tratamento está em gerar eventos suficientes para que a terapia gênica seja viável (BERTOLINI et al, 2009; DELACOTÊ et al, 2011). A quebra de dupla fita por endonucleases específicas como *zinc-finger nucleases* - ZFNs e *transcription activator-like effector nucleases* - TALENs (URNOV et al., 2005; CERMAK et al., 2011), a sincronização do ciclo celular na fase S-G₂ (POWELL; KACHNIC, 2003; DELACOTÊ et al., 2011; OGIWARA; KOHNO, 2011), a superexpressão de proteínas responsáveis pela via de reparo RH (DELACOTÊ et al, 2011) e a inibição de proteínas ligadas a JPNH (BERTOLINI et al, 2009; DELACOTÊ et al, 2011; OGIWARA; KOHNO, 2011) são táticas que podem aumentar a efetividade do “*gene targeting*”.

Atualmente, as pesquisas abrangem um maior número de proteínas e cofatores que não estavam aparentemente relacionados com nenhum mecanismo de reparo, mas que influenciam a taxa de frequência de eventos de RH. Entre eles estão os transcritos dos genes *E1A Binding Protein p300* - EP300 e o *Activating Transcription Factor 7 Interacting Protein* -ATF7IP (DELACOTÊ et al., 2011) e TIP60 (OGIWARA; KOHNO, 2011), responsáveis pela remodelação da cromatina, o que corrobora a ideia de que mudanças estruturais que facilitam as comparações de homologia e a ação de proteínas de reparo.

A remodelação de cromatina, em específico a acetilação das histonas no local da QB, é um fator crucial para o reparo do DNA (OGIWARA; KOHNO et al., 2011; OIKE et al., 2013). As alterações da conformação da cromatina e sua relação com alguns processos celulares (incluindo reparo do DNA) serão comentadas no tópico seguinte.

4.2 Modificações de cromatina

A estrutura octomérica formada pelas histonas canônicas (H4, H3, H2A e H2B) e pela histona de ligação H1 é envolvida por 147 pb de DNA formando a unidade básica do filamento de cromatina, o nucleossomo. O empacotamento do DNA em cromatina regula o acesso a informação genética contida na sequência de dNTPs (SINGH et al., 2010) e funciona como regulação gênica e proteção contra danos ao DNA (VEMPATI et al., 2010).

As histonas são proteínas essenciais para a viabilidade celular e o balanço entre a produção de histonas e a replicação do DNA tem que ser mantido dentro da célula. O excesso de proteínas histonas é citotóxico por múltiplos mecanismos, assim como sua escassez (SINGH et al., 2010). As histonas canônicas são principalmente expressas durante a fase S do ciclo celular e são indispensáveis para agregação em cromatina do DNA recém-sintetizado (HE et al., 2011).

As modificações pós-transcricionais das histonas, assim como as enzimas responsáveis por essas modificações, são potenciais moduladores da expressão gênica, além de influenciar processos metabólicos que carecem do contato direto com o DNA como, por exemplo, reparo a danos no DNA, replicação e recombinação gênica.

O empacotamento do material genético pode significar uma barreira para as proteínas executoras desses processos (VEMPATI et al., 2010; SINGH et al., 2010). Essas modificações ajudam a controlar os padrões de expressão dos diferentes tipos celulares e regular respostas a mudanças no meio (GREER; SHI 2014) sendo extremamente importante para o desenvolvimento e a diferenciação celular (LINGER; TYLER 2007).

Uma dessas modificações é a acetilação das caudas N-Terminais das histonas. Ela contribui para o relaxamento do filamento de cromatina através da diminuição da carga positiva das histonas e está correlacionada ao aumento da transcrição gênica, com histonas acetiladas possivelmente presentes nas regiões promotoras de genes ativamente transcritos (HE et al., 2011).

Enzimas histonas deacetilases e acetiltransferases trabalham como sinalizadoras de lesão de quebra de dupla fita (AJENDRAN et al., 2011) e podem atuar diretamente no processo de reparo do DNA. A acetilação das histonas localizados no local do dano é crucial para o reparo do DNA. As acetiltransferases de histonas (HAT) CBP e p300 são recrutadas para o local de QDF e sua repressão impede a acetilação de resíduos de lisina da H3K18 e H4K5, 8, 12 e 16, o que impede o alistamento de proteínas essenciais para a NHEJ (OGIWARA et al., 2011).

Essas HAT também interagem diretamente com proteínas de reparo como a BRCA1 e ATR e DDB (*Damaged DNA binding protein*), acetilam as DNA glicosilases que iniciam o reparo de trocas G/T e G/U no DNA e que são responsáveis pelo reparo de lesões mutagênicas (HE et al., 2011). Além disso, CBP/p300 acetilam a lisina 56 da H3, que é essencial para a formação da cromatina após a replicação do DNA, essa acetilação chega ao seu pico durante a fase S.(VEMPATI et al., 2010).

A proteína EP300 é homóloga á CBP (CREB binding protein) e ambas possuem atividade de acetiltransferase, e compõem a família KAT3 de histonas- acetiltransferases. A CREB está envolvida com a sinalização do AMP que é o maior mediador da expressão gênica estimulada pelo cAMP (BERGHE et al.1999). Tanto a CBP, como a P300 agem como cofatores e coativadores da transcrição gênica (BEDFORD; BRINDLE, 2012). Funcionam, por exemplo, como ativadores da transcrição de fatores essenciais para a via de reparo de recombinação homóloga RAD51 e BRCA1 (OGIWARA; KOHNO, 2012).

O co-ativador p300 tem sua atividade de acetiltransferase estimulada pela ciclina E/cdk2 e se associa aos promotores dos genes das histonas canônicas e é essencial para expressão ótima de histonas durante a fase S (HE et al, 2011). A diminuição da produção dessas histonas pararia o ciclo celular nessa fase, onde a recombinação homóloga é preferencialmente usada pela célula. OGIWARA et al., 2011 também comprovou que os cofatores CBP/p300 funcionam como acetiltrasferases nos locais de QDF e que a repressão genica dessas proteínas impediu o reparo pela NHEJ das QB geradas por radiação ionizante.

Outra modificação pós-transcricional importante sofrida pela cromatina é a metilação de histonas. Esse tipo de alteração ocorre em todos os residuos básicos das histonas e podem ocorrer na forma de monometilação, dimetilação e trimetilação. Os sítios de metilação mais estudados incluem os localizados nos resíduos de lisina da H3 (GREER; SHI 2012).

A reversibilidade da metilação de histonas ocorre de maneira mais lenta do que das outras modificações pós-transcricionais e ela era considerada irreversível até a descoberta de histonas demetilases (SHI et al.,2004) E esse tipo de modificação não está necessariamente

ligada a repressão gênica, com algumas marcações, por exemplo a H3K4me3, associada a ativação gênica (GREER; SHI 2014) e a trimetilação de H3K36, que facilita elongação para transcrição (DU; FINGERMAN; BRIGGS, 2008).

Há participação da metilação do DNA no direcionamento da metilação de histonas e vice-versa, com esse dois marcadores de reforçando para formar um repressão gênica a longo prazo (FUKS, 2005). Longos e curtos RNA não-codificantes também parecem direcionar a metilação de histonas e mudanças na conformação da cromatina. Em *C. Elegans*, por exemplo, o siRNA gera a diminuição da transcrição de gene específico e aumenta o nível de trimetilação da H3K9 no promotor do gene alvo em um processo denominado de remodelação de cromatina desencadeada por RNA (GU et al., 2013).

A proteína ATF7IP, também conhecida como MCAF1 (*MBD1- containing chromatin-associated fator*) e hAM1(*human ATFa-associated modulator*), é um cofator transcricional que se associa a diferentes fatores de transcrição, à polimerase II a ao ativador de transcrição Sp-1(Specificity protein 1) na manutenção da atividade telomerase em células cancerígenas e sua repressão causa uma diminuição das enzimas essenciais (TERT e TERC) para a atividade da telomerase pela saída de fatores transcricionais e da polimerase II da região promotora desses genes. O complexo MCAF1/Sp-1 também foi encontrado na região promotora do gene BRCA1 (LIU et al., 2009).

Ela também interage com a proteína MBD1 (*Methyl CpG binding protein 1*) e recruta a H3K9 metiltransferase SETDB1 (*SET domain bifurcated 1*) para o silenciamento gênico através da formação de heterocromatina em regiões de metilação do DNA (WANG et al 2003; ICHIMURA et al., 2005; UCHUMURA et al., 2006). A MCAF1 está, portanto, envolvida com a inibição transcricional dependente da MBD1 e não possui nenhum domínio para se ligar diretamente ao DNA (LIU et al., 2009). Podendo, consequentemente, funcionar como ativador ou repressor da transcrição gênica dependendo das proteínas com as quais ela interage (SASAI et al., 2014).

A conversão do estado dimetilado para o trimetilado dos resíduos de lisina 9 das Histonas 3 (H3-K9) é facilitado e estimulado pela associação da ATF7IP com as proteínas que possuem o domínio SET, os diferentes níveis de metilação nesse resíduo influenciam formação de heterocromatina e na inativação do cromossomo X (WANG et al., 2003). A repressão gênica da AM suprime a expressão de genes ligados ao ciclo celular e causa uma diminuição da presença RNAm e das proteínas das histonas canônicas e da ligante H1 nas células (SASAI et al., 2014).

A relação entre a remodelação da cromatina e os mecanismos de reparo cromossomal é cada vez mais estudada, principalmente para a busca de terapias contra o câncer (RAJENDRAN et al., 2011; OGIWARA; KOHNO et al., 2011; OIKE et al., 2013).

4.3 RNA de interferência

RNA interferência (RNAi) é um mecanismo de silenciamento gênico através de RNA dupla fita (dsRNA). Foi descoberto no nematelminto *Caenorhabditis elegans* e hoje já foi observado em plantas, fungos, protozoários, insetos e mamíferos (FIRE et al 1998; HUNTER, 1999; BARBOSA; LIN, 2004; LUO et al., 2012), ocorrendo somente em células eucarióticas. Entre as funções biológicas do silenciamento mediado por RNA podemos citar a proteção contra infecções virais, RNA anormais e transposons endógenos (ZAMORE et al., 2000; PELLETIER; CARON; PUYMIRAT, 2006). O RNA curtos não-codificantes também influenciam outros processo celulares, direcionando a herança da conformação da heterocromatina através da mitose durante a fase S do ciclo celular, guiando modificações na cromatina (ZARATIEGUI et al., 2011).

A inibição da expressão gênica ocorre após a clivagem do dsRNA em fragmentos de 21-23 nt pela enzima Dicer. Esses shRNA (*short hairpin RNA*) se ligam então ao complexo RISC (*RNA induced silencing complex*) onde as suas fitas são separadas e a fita anti-sense se liga ao RNAm complementar presente no citoplasma. A proteína Argonata 2 degrada então o RNAm impedindo sua tradução (BARBOSA; LIN, 2004; PELLETIER; CARON; PUYMIRAT, 2006). RNAi é, por tanto, um mecanismo pós-transcricional de silenciamento gênico e por isso, a utilização de sequências complementares à regiões programadoras (éxons) é essencial (HUNTER, 1999; BARBOSA; LIN, 2004).

Em células de mamíferos, dsRNA maiores do que 30 nt causam uma reação de proteção celular que estimula a produção de interferons e da proteína quinase dependente de RNA (PKR), que se liga aos longos dsRNA, inibe a tradução e a produção geral de proteínas, levando a apoptose celular (BARBOSA; LIN, 2004; WHITEHEAD; LANGER; ANDERSON, 2009).

Em tipos celulares de mamíferos, a inibição da expressão deve ser feita por siRNA (*small interfering RNA*) com 21-25nt. Outra característica do silenciamento por RNAi em células de mamíferos é a transitoriedade (BERTONILI et al., 2009; WHITEHEAD;

LANGER; ANDERSON, 2009), com a inibição perdurando por 3 a 5 ciclos de replicação celular (BARBOSA; LIN, 2004) com a sua duração variando de acordo com o ritmo de divisão celular (WHITEHEAD; LANGER; ANDERSON, 2009).

O mecanismo de RNA interferência, por gerar fenótipo de perda-de-função, vem sendo bastante utilizado em estudos de função e identificação gênica (HUNTER, 1999; BARBOSA; LIN, 2004; LIU et al., 2009;). Pesquisas com doenças hereditárias de caráter dominante, principalmente doenças neurodegenerativas (PELLETIER; CARON; PUYMIRAT, 2006; DENOVAR-WRIGHT; DAVIDSON, 2006), infecções virais crônicas como HIV, Hepatites B e C (PELLETIER; CARON; PUYMIRAT, 2006), retinopatia diabética (ROY et al., 2011), hipercolesterolemia (FRANK-KAMENETSKY et al., 2008) e câncer (OGIWARA et al., 2011; ZUBER et al., 2012) apontam a RNAi como uma possibilidade de terapia. Sendo o transporte *in vivo* um dos desafios do uso do silenciamento gênico mediado por RNAi como tratamento (FRANK-KAMENETSKY et al., 2008; COHEN; XIONG, 2009; WHITEHEAD; LANGER; ANDERSON 2009).

Também é estudada a utilização do siRNA para o aumento da taxa de frequência do *gene targeting*, possibilitando caminhos que visam viabilizar a terapia gênica de patologias até hoje sem cura. Bertolini et al, 2009, utilizou siRNA complementares aos RNAm da Ku70 e do cofator Xrcc4 gerando um aumento de 33 vezes nos eventos de recombinação homóloga.

Outros estudos optaram pelo silenciamento gênico via RNA interferência de outros genes relacionados com a via de reparo por junção de pontas não homólogas como, por exemplo, a DNA Ligase 4 (DELACOTÊ et al., 2011, OGIWARA; KOHNO, 2011) , a Ku80, a Artemmis e as polimerases μ e λ (OGIWARA; KOHNO, 2011).

Novas pesquisas que relacionam a RNA interferência e os mecanismos de reparo de quebra de dupla fita abrem uma tendência de analisar a influência de genes que não estão aparentemente relacionados ao reparo gênico, mas que influenciam a escolha do modo de reparo. Delacotê et al., em 2011, utilizou siRNA complementares a 64 genes que atuam em diferentes processo celulares para avaliar o aumento do gene targeting relacionado ao silenciamento desses genes.

4.4 *Transcription Activator-Like Effector Nucleases*

As proteínas efetoras DNA-ligantes TAL (*Transcription activator like*) foram primeiro observadas em bactérias gram-negativas fitopatogênicas do gênero *Xanthomonas* e agem como importantes fatores de virulência manipulando a maquinaria genética da célula hospedeira em benefício da infecção bacteriana (SCHOLZE; BOCH, 2010; WICKY; STENTA; PERARO, 2013).

Elas são constituídas pela região terminal -C, responsável pela pelo domínio de ativação de transcrição e localização nuclear; terminal -N, responsável pelo sistema de secreção e translocação; e pelo tandem de repetição, estrutura central, responsável pela especificidade da ligação da proteína efetora com a molécula de DNA (BOCH; BONAS 2010; LIANG et al., 2014).

As repetições são praticamente idênticas entre si, variando somente nos aminoácidos 12 e 13, chamados de resíduos hipervariáveis ou direíduos variáveis (RVds). Eles são responsáveis pelo direcionamento da ligação na molécula de DNA, cada RVD se ligando a uma base nitrogenada específica. Os efetores TAL se ligam 40 a 60 pares de base antes da região promotora regulando, na maioria das vezes ativando, a transcrição gênica. De modo parecido com TATA box (KAY et al., 2007; RÖMER; RECHT; LAHAYE, 2009; SCHOLZE; BOCH, 2010; LIANG et al., 2014).

A eficiência de efetores tal em células humanas foi testada em alguns estudos, com sua capacidade de modulador gênico comprovada (ZHANG et al., 2011) mas é dependente, em células de mamíferos, do posicionamento da região de ligação tanto em relação ao promotor como em relação a fita de DNA codificante (UHDE-STONE; CHEUNG; LU, 2013)

O que despertou a atenção sobre os efetores TAL é a região ligante ao DNA que permite uma ligação extremamente específica e direta à dupla fita (LANGE; BINDER; LAHAYE, 2014). Seguindo o exemplo das *zinc finger*, também uma proteína DNA ligante, as TAL foram ligadas a endonucleases inespecíficas, normalmente a Fok I (enzima de restrição tipo IIs), para promover não a regulação, mas a edição gênica (SCHOLZE; BOCH, 2010).

A construção das *zinc finger* nucleases (ZFN) possuem desvantagens em relação à produção de TALENS, já que cada domínio zinc finger se liga de 3 a 4 pares de bases, sendo necessária a combinação de três módulos para formação de uma sequência única (16- 20 pb) (SMITH et al., 2000; SCHOLZE; BOCH, 2010). Existe a dependência dessa combinação para determinação da sequência a qual a *zinc finger* irá se ligar, sendo laborioso o processo de

planejamento da conformação de domínios e de previsão de efeitos *off target* (SCHOLZE; BOCH, 2010; PATTANAYAK et al., 2011; SAKUMA et al., 2013). Atualmente existem vários kits comerciais e técnicas para construção de Tal e TALENS disponíveis. A produção normalmente é mais fácil e não existem restrições às sequências de RVDs, só que deve se iniciar com uma Timina na região 5' (CERMAK et al., 2011). Sua especificidade é extremamente sensível a mudanças no sítio de ligação (SCHOLZE; BOCH, 2010).

A endonuclease inespecífica Fok I exige dimerização para produção de quebra de dupla fita. Sendo necessárias duas TALENS adjacentes, distantes por alguns pares de base (até 30pb), para seu correto funcionamento (CHRISTIAN et al., 2010; LANGE; BINDER; LAHAYE, 2014). A necessidade de se ter par de ZFN ou TALENS aumenta a especificidade da região do corte (SMITH et al., 2000). E seu uso alavancou trabalhos de edição gênica, seja para indução de Knockout ou de inserções em espécies que são naturalmente resistentes ao processo de edição gênica como, por exemplo, vertebrados e mamíferos (SAKUMA et al., 2013; LANGE; BINDER; LAHAYE, 2014).

A maioria dos trabalhos nesse tipo de espécies produzem knockouts em loci específico. Técnica bastante eficaz para produção de modelos animais e para estudos de fenótipos patológicos. A introdução de um par de TALENs produz uma quebra de dupla fita estimulando as vias de reparo HR e NHEJ (CERMAK et al., 2011; RAMIREZ et al., 2012; LANGE; BINDER; LAHAYE, 2014) e permitindo a formação de pequenas inserções ou deleções gênicas ou a substituição de um locus do DNA por meio do gene targeting (SCHOLZE; BOCH, 2010; CHRISTIAN et al., 2010; GERSBACH et al., 2011; RAMIREZ et al., 2012).

A produção de knockout pela Tal nuclease já foram realizadas *in vitro* em diversas linhagens celulares e *in vivo* em insetos (LIU et al., 2012; MA et al., 2012), sapos (SAKUMA et al., 2013), peixes (OTA et al., 2013), nematódeos (WOOD et al., 2011), porcos, bovinos (CARLSON et al., 2012) e camundongos (PANDA et al., 2013). Já a inserção de material genético em genoma celular tem menor número de casos de sucesso (HOSOI et al., 2014). Neste tipo de estudo, concomitantemente a injeção ou transfecção das TALENS há a transfecção de vetor ou oligo doador com regiões homólogas a região do corte ou adjacências (CHRISTIAN et al., 2010; RAMIREZ et al., 2012; PANDA et al., 2013).

Materiais e Métodos

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Obtenção das Células

Este experimento foi julgado e aprovado pelo comitê de ética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, pelo protocolo número 2558/2012.

As células MDCK (*Madin-darbin canine kidney*) I, na 20ª passagem, foram obtidas do banco de células do colaborador Prof. Dr. Pablo Ross da Universidade da Califórnia, Davis. Nenhum animal foi utilizado, por tanto, durante o trabalho para aquisição das amostras.

5.2 Cultivo e expansão celular

As células renais caninas MDCK I foram descongeladas e centrifugadas a 1200 xg por 5 minutos. Depois de retirado o meio de congelamento, as células foram ressuspensas e cultivadas em meio Dulbecco's Modified Eagle Medium - DMEM high glucose contendo piruvato de sódio (Sigma), 10% de soro fetal bovino (GIBCO), 1% solução antibiótica: antimicótica (Sigma) e incubadas a 37°C em atmosfera umidificada com 5% de CO₂. As células foram expandidas para 10 placas de 100 mm e a menor passagem obtida após expansão foi p23, que foi a utilizada.

5.3 Construção do vetor molde para recombinação homóloga

Foram amplificadas por PCR duas regiões do gene da distrofina canina (GenBank: 606758), para formarem os braços direito e esquerdo do vetor molde. Os iniciadores utilizados para o braço direito (BD) foram o RL3-Foward e o RR4-Reverse e para o braço esquerdo (BE), BE-Foward e BE-Reverse (Tabela 1). Em cada reação foram utilizados 1 mM de dNTPs; 1X do tampão de reação; 1 µM de cada iniciador e 1 U de Taq Polimerase. Os ciclos

de amplificação foram: desnaturação inicial a 95°C por 2 minutos; desnaturação a 95°C por 40 segundos; anelamento de 40 segundos a 55°C (BD) ou 58°C (BE); extensão a 72°C por 45 segundos e extensão final de 10 minutos a 72°C. Os amplicons foram ligados ao vetor pCR™ 2.1-TOPO® do Kit TOPO TA Cloning® (Invitrogen) seguindo orientações do fabricante e clonados em bactérias *Escherichia Coli* DH5α transformadas por eletroporação (Bacterial Program 1-nucleofector, Lonza, Alemanha), no caso do vetor TOPO + BD.

Tabela 1 – Iniciadores utilizados no projeto

Primers	Sequência	Amplicon
RL3 – F	5'TACGTATGGAGAAGCAGTGTTCAGTGG3'	1380 pb
RR4 – R	5'TTATGCTAGCCCTAACACACCGGCAGAAAT3'	
BE – F	5'TGGCTGGCATTCAAATTTCT3'	889 pb
BE – R	5'AACCATTCAATGGAGGATTTCCCCCAGAG3'	
GAPDH Z – F	5'GATTGTCAGCAATGCCTCCT3'	200 pb
GAPDH Z – R	5'AAGCAGGGATGATGTTCTGG3'	
Neo qPCR – F	5'CGGCTGCATACGCTTGATCC3'	301 pb
Neo qPCR – R	5'CTATGTCCTGATAGCGGTCC3'	
DMD3 – F	5'CAGAAGCTACCTAGGCCTGTT3'	1600 pb
DMD3 – R	5'GCTTTCCCCGTCAAGCTCTA3'	
M13 – F	5'GTAAAACGACGCCAGG3'	-
M13 – R	5'CAGGAAACAGCTATGAC3'	
Ku70ex 5 Dog – F	5'TAATCCAGGTGCTAAACGAGTGC3'	164 pb
Ku70ex 5 Dog – R	5'CATTGGTGAACAGCATGATCC3'	
Ku70ex 13 Dog – F	5'CTGAGGGCCCATGTCAAC3'	250 pb
Ku70ex 13 Dog – R	5'TGGCTTTTATCAGGCAGACTC3'	

Fonte: (PINHO, R. M., 2014).

Para o braço esquerdo, foram utilizados 4 µL da ligação vetor TOPO + BE para 100 µL de *E. Coli* DH5α e a transformação foi por choque térmico (incubação de 30 min. no gelo, 1:30 min. a 42° C e voltando por 2 min. ao gelo) as bactérias foram plaqueadas em placas de LB ágar (Invitrogen) com ampicilina 25mg/ mL e X-Gal (Ludwig). Os plasmídeos extraídos com o Kit Illustra™ plasmidPrep Midi Flow (GEHealthcare) foram digeridos com 1U das enzimas *FastDigest* SnaBI e *FastDigest* NheI para liberação do braço direito e com 1U das enzimas *FastDigest* DraIII e *FastDigest* NotI para retirada do braço esquerdo.

O vetor pEGFP-N1 (Clontech laboratories, Inc.) foi digerido com as enzimas *FastDigest* SnaBI e *FastDigest* NheI e ligado ao BD em uma razão inserto;vetor de 3:1, utilizando 400U da enzima T4 DNA ligase (Promega). O vetor BD-EGFP (500ng), depois de passar por processo semelhante ao do braço direito (transformação, seleção e extração), foi

digerido com as enzimas *FastDigest* DraIII e *FastDigest* NotI para subsequente ligação com o BE seguindo os mesmos parâmetros da ligação anterior.

Para confirmação da inserção dos braços nos vetores TOPO ou EGFP, foram realizados PCR com os *primers* M13-F e M13-R (para o vetor TOPO) ou *primers* específicos para o braço esquerdo (para o pEGFP), além de digestões com as enzimas de restrição com sítios limítrofes aos braços e do sequenciamento gênico.

Para linearização final e exposição dos braços homólogos foi feita digestão utilizando as enzimas *FastDigest* NheI e *FastDigest* NotI. Todas as enzimas de restrição utilizadas na construção do vetor são produzidas pela Fermentas. Detalhes sobre as reações de PCR, de ligação e de digestão podem ser encontrados na dissertação PINHO, Raquel M, 2011.

5.4 Produção de short interference RNA para o gene Ku70

Foram amplificadas por PCR regiões do éxons 5 e 13 do gene da Ku70 canina. Os pares de *primers* utilizados foram Ku70ex5 Dog - F e Ku70ex5 Dog - R, Ku70ex13 Dog - F e Ku70ex13 Dog - R respectivamente (todos os iniciadores estão descritos na Tabela 1). Para reação contendo 0,2 mM de cada dNTP, 30-40 ng de DNA genômico de cachorro, 1X tampão da Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen), 2U de Platinum Taq DNA Polymerase (invitrogen), 1,5 mM de MgCl₂, 100nM de cada primer em um volume final de 50 µL. Os ciclos de amplificação foram: desnaturação inicial a 95°C por 2 min.; desnaturação a 95°C por 40 seg.; anelamento de 40 seg. a 55°C; extensão a 72°C por 45 seg. e extensão final de 10 min. a 72°C.

A reação em cadeia da polimerase foi então corrida em gel de agarose 0,8% em TAE, e os produtos de PCR, posteriormente, purificados seguindo o protocolo do QIAquick Extraction Kit (Qiagen).

Os amplicons (100 ng) foram ligados ao BLOCK-iT T7-TOPO Linker seguindo as reações do BLOCK-iT RNAi TOPO Transcription Kit (invitrogen), que foi empregado para produzir os dsRNA complementares às regiões dos éxons 5 e 13 amplificadas. Para a formação do siRNA foram aplicados 15 µg de dsRNA de cada éxon em reações separadas, contendo cada uma 20 U RNase III (Ambion) e 1X o buffer da enzima (Ambion) em volume final de 100 µL. Ao fim de cada etapa, os RNAs foram analisados em gel de TAE com 2% de agarose.

5.5 Construção e Transcrição das TAL- Effector Nucleases

5.5.1 Construção e Purificação do DNA plasmidial

Todas as enzimas utilizadas neste tópico, quando não referenciadas, são comercializadas pela New England Biolabs. As TALENs utilizadas no projeto foram desenhadas e os plasmídeos construídos pelo método Golden Gate seguindo o modelo de Cermak et al., 2011, que utiliza enzimas de restrição do tipo HS e a T4 DNA ligase em reações simultâneas de digestão e ligação.

Os vetores utilizados estão disponíveis no site da Addgene (<https://www.addgene.org/TALeffector/goldengateV2/>). As proteínas efetoras foram desenhadas complementares às regiões DMD-R - TTCATCATTATCTCTGGT e DMD-L - TAATCCATGTATCTGGA do gene da distrofina canina e as sequências de RVDs foram, respectivamente, (NG1-NG2-HD3-NI4-NG5-HD6-NI7-NG8-NG9-NI1- NG1-HD2-NG3-HD4-NG5-NN6-NN7) e (NG1-NI2-NI3-NG4-HD5-HD6-NI7-NG8-NN9-NG10-NI1-NG2-HD3-NG4-NN5-NN6-NI7). Essas sequências foram ligadas ao vetor RCIscript-GoldyTalen (Addgene # 38142) que possui promotor T3.

Os vetores completos foram clonados em *E.Coli* DH5α transformadas por protocolo de choque térmico anteriormente mencionado. Colônias selecionadas foram cultivadas em 5 ml de meio Luria Broth Base (LB) (invitrogen) contendo 25 mg/ml de ampicilina (sigma) por 16 horas a 37° C. Após extração de DNA plasmidial com QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) foi feita a digestão com as enzimas BspEI (5U) que corta nos RVDs HD Sac I (20U), que lineariza o vetor, e BstAPI (2,5U) e AatII (10U) que liberam o tandem de RVDs.

As colônias positivas foram novamente inoculadas em LB caldo contendo ampicilina e o DNA plasmidial foi extraído como descrito no paragrafo acima. Assim, 5 µg dos plasmídeos contendo as sequencias das TALENs foram linearizados com a enzima SacI (40U) em uma reação com volume final de 100 µl. Depois da digestão, o DNA foi tratado com RNA-secure reagente (Ambion) de acordo com as instruções do fabricante.

Posteriormente fez-se a purificação com protocolo modificado do QIAquick gel extraction Kit: foram adicionados 500 µl do Buffer QG à digestão, depois foi acrescentado 1 volume de isopropanol (600µl). O mix QG + digestão + isopropanol foi então colocado na coluna do kit e o protocolo comercial original, continuado.

5.5.2 Transcrição e Poliadenilação do RNAm

Foram transcritos 500 ng de cada TALEN com o Kit mMESSAGE mMACHINE T3 (Ambion), contendo na reação 1 µg de DNA, já que as transcrições do par de nucleases foram realizadas concomitantemente e por isso 10 µg de transcrito é considerado como tendo 5 µg de cada RNA. Prontamente, foi adicionada ao RNA mensageiro uma cauda de poliadenina com o Kit Comercial Poly(A) Tailing kit (Ambion) de acordo com as recomendações do fabricante.

Após a poliadenilação, a purificação do RNAm foi realizada com Kit MegaClear purification (Ambion). O RNA resultante foi analisado em gel de agarose-folmaldeído (1,2% agarose, 1,8% folmaldeído). A composição tampão base para o gel, do tampão de corrida e Tampão de amostra está descrita na Tabela 2.

Tabela 2 – Composição dos tampões utilizados na eletroforese com gel de agarose- formaldeído.

10X Tampão de gel agarose-formaldeído (TAF)		
Componente	Concentração final	Para 500 mL
MOPS (Sigma)	200 mM	20,92 g
Acetato de Sódio (Sigma)	50 mM	2,05 g
EDTA (Invitrogen)	10 mM	1,86 g
pH7	-	-
1X Tampão de corrida		
Componente	Concentração final	Para 1 L
TAF	1X	100 ml
Formaldeído a 37% (Reatec)	246 mM	20 ml
5X Tampão de amostra		
Componente	Concentração final	Para 10 mL
Sol. Saturada de Bromofenol (Amresco)	-	16 µL
EDTA 500mM pH 8	4 mM	80 µL
Glicerol (Vetec)	2%	2 mL
Folmaldeído	885 nM	720 µL
Formamida	3%	3,084 mL
TAF	4X	4 mL

Fonte: (PINHO, R. M., 2014).

5.6 Confirmação da Inibição gênica mediada por siRNA

5.6.1 Transfecção Celular

Para as transfecções foram utilizados os reagentes Amaxa Cell Line Nucleofector Kit L (Lonza) seguindo as recomendações do fabricante por eletroporação no aparelho nucleofector (Lonza) programa A-024. Células MDCK I (5×10^6) foram transfectadas com o 60 pmols de siRNA para os genes ATF7IP (sc-96134 - Santa Cruz), EP300 (Santa Cruz), siRNA controle (sc- 37007 - Santa Cruz) e 64 pmols de pool de siRNA para o exon 5 do gene Ku70 e com 2 μ g do vetor pmaxGFP Vector (Lonza).

Depois da transfecção, cada reação foi passada para três poços de uma placa contendo 12 poços. As células foram cultivadas em meio DMEM semelhante ao da expansão celular. Após 24, 48 e 72 horas as células foram coletadas aplicando 200 μ l Tryple Express Enzyme (Gibco) sobre a cultura sem meio e incubando por 6 min a 37°C. Terminada a incubação, inibiu-se a enzima com 1 mL de meio de cultivo e as células soltas foram então centrifugadas em tubos de 1,5 mL por 5 min a 800 xg. Retirado o sobrenadante as células foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C.

5.6.2 Extração das Proteínas

As proteínas totais das células transfectadas foram extraídas através do kit Allprep RNA/Protein (Qiagen) com algumas mudanças do protocolo original: o pellet celular foi levemente descongelado e ressuspenso em 200 μ L de tampão APL e a coluna de proteína foi equilibrada com 500 μ L de água milli-Q ultra-pura seguida de 500 μ L de PBS (tampão fosfato salino). As proteínas totais foram então quantificadas no Nanodrop (Thermo Scientific).

5.6.3 Western Blot

O western blot seguiu o protocolo de Tavares, et al, 2012 , com algumas modificações: foram aplicados aproximadamente 4 μ g de cada amostra juntamente com tampão 6X SDS -

PAGE. As proteínas foram transferidas para membranas de PVDF (Invitrolon™ PVDF/Filter Paper Sandwich- Invitrogen). Após o bloqueio, as membranas foram sondadas por 16 horas com os anticorpos primários monoclonais para as proteínas GAPDH (sc 166574 – Santa Cruz) 1:3000, Ku70 (sc 5309 – Santa Cruz) 1: 800 e policlonais anti- EP300 (sc 8981 - Santa Cruz) 1: 800 e anti - ATF7IP (sc 19765-R Santa Cruz) 1:1000 anti – GAPDH (sc 25778 Santa Cruz) 1:3000.

Após três lavagens com TBS-T (25 mM Tris-HCl pH 7,6, 25 mM NaCl, 0,25% Tween-20), as membranas foram incubadas em anticorpo secundário anti-mouse (membranas sondadas para Ku70) ou anti-rabbit ECL horseradish conjugados com peroxidase (GE Healthcare). A revelação se deu com o Amersham ECL Prime Western Blotting detection Reagent(GE Healthcare). Filmes de raio - X (Kodak) foram expostos por 1-5 min as membranas e revelados em reveladora automática de raio-X (Macrotec mX-2).

5.7 Padronização da transfecção das células MDCK com Lipofectamina 2000 (Invitrogen)

Células MDCK I foram cultivadas em placas de 12 poços com meio semelhante ao mencionado no item 5.2, mas sem solução antibiótica: antimicótica, até alcançarem confluência de 80%. As células foram divididas em grupos que seriam transfectadas somente com meio de transfecção (Opti-MEM, GIBCO e lipofectamina 2000, Invitrogen) e outras que em o Opti-MEM e a lipofectamina seriam adicionadas ao meio sem antibiótico. Dentro dessa divisão houve ainda variação da razão DNA ou Oligo/lipofectamina. As quantidades de pmaxGFP Vector, Block iT fluorescente Oligo (Invitrogen) e lipofectamina nos diferentes grupos estão descritas na Quadro 1.

A transfecção das células em meio de cultivo seguiu o protocolo do fabricante da lipofectamina 2000, com incubação de 16 horas a 37°C. Para as células que foram incubadas somente em meio de transfecção, o procedimento foi o mesmo, mas o meio de cultivo foi retirado antes do Opt-MEM + lipofectamina ser aplicado nos poços. A incubação foi por 5 horas a 37°C. Depois desse período, meio de cultivo sem antibiótico foi adicionado ao meio de transfecção e a incubação continuou por mais 11 horas.

Para análise das taxas de transfecções, as células foram fotografadas, 24 horas após o procedimento, no microscópio de epifluorescência invertido (Nikon Eclipse Ti) com o filtro azul (λ 400–446 nm) com aumento de 40x e 100x.

Quadro 1: Descrição dos grupos para padronização da transfecção com lipofectamina 2000

Grupo	Lipofectamina 2000	DNA/ Oligo	Meio s/ antibiótico
Grupo 1	1 µL	1,5 µg pmaxGFP Vector	Sim
Grupo 2			-
Grupo 3	2 µL		Sim
Grupo 4			-
Grupo 5	3µL		Sim
Grupo 6			-
Grupo 7	1 µL	3 µg pmaxGFP Vector	Sim
Grupo 8			-
Grupo 9	2 µL		Sim
Grupo 10			-
Grupo 11	3 µL		Sim
Grupo 12			-
Grupo 13	0,5 µL	80pmol Block iT fluorescente Oligo	Sim
Grupo 14			-
Grupo 15	1 µL		Sim
Grupo 16			-
Grupo 17	2 µL		Sim
Grupo 18			-
Grupo 19	0,5 µL	160pmol Block iT fluorescente Oligo	Sim
Grupo 20			-
Grupo 21	1 µL		Sim
Grupo 22			-
Grupo 23	2 µL		Sim
Grupo 24			-

Fonte: (PINHO, R. M., 2014).

5.8 Transfecção com siRNAs, TALENS e vetor molde para recombinação homóloga

5.8.1 Transfecção celular

Células MDCK I foram descongeladas como mencionado no item 5.2, foram contadas em contador automático (Invitrogen) e 1×10^5 células foram cultivadas em placas de 60mm com meio de cultivo sem antibiótico até alcançarem confluência de 50%. Com esse porcentagem alcançada, as células foram transfectadas com os siRNA para o exon 5 da Ku70,

ATF7IP e EP300 separadamente ou em pares. Também foram transfectados grupos controles, somente com o vetor molde, com o vetor pmaxGFP, e com o vetor molde acompanhado dos RNAm para as TALENs.

Quadro 2 – Descrição das transfecções com os siRNAs, com o vetor molde e com os RNAm para Talens nos diferentes grupos

Grupos	Lipofectamina		siRNA (pmol)		Vetor Molde		RNAm-Talens	
GFP	20 µL		-		15 µg pmaxGFP		-	
Só Vetor Molde	20 µL		-		15 µg		-	
Vetor + Talen	20 µL		-		15 µg		5µg cada (10 µg)	
ATF7IP + Vetor	15 µL	20 µL	320	-	-	15 µg	-	-
EP300 + Vetor	15 µL	20 µL	320	-	-	15 µg	-	-
Ku70 + Vetor	15 µL	20 µL	64	-	-	15 µg	-	-
ATF7IP + Vetor + Talen	15 µL	20 µL	320	-	-	15 µg	-	10 µg
EP300 + Vetor + Talen	15 µL	20 µL	320	-	-	15 µg	-	10 µg
Ku70 + Vetor + Talen	15 µL	20 µL	64	-	-	15 µg	-	10 µg
ATF7IP+EP300+Vetor+Talen	20 µL	20 µL	A-250 E-250	-	-	15 µg	-	10 µg
ATF7IP+Ku70+Vetor+Talen	20 µL	20 µL	A-250 Ku-64	-	-	15 µg	-	10 µg
EP300+Ku70+Vetor+Talen	20 µL	20 µL	E-250 Ku-64	-	-	15 µg	-	10 µg

Fonte: (PINHO, R. M., 2014).

Para as primeiras transfecções (com os RNA de interferência) ou transfecções únicas (grupos controles) o meio de cultivo foi retirado e a procedimento seguiu com o mix Opt-MEM + lipofectamina sendo adicionados diretamente às células seguindo protocolo do item 5.7. Os grupos com siRNAs foram transfectados uma segunda vez, 40 horas após a primeira, para transfecção das TALENs (RNAm) e/ou do vetor molde. Para cada reação foram utilizados 1 mL de Opti-MEM. As descrições dos grupos transfectados estão relacionadas no Quadro 2. Após a transfecção as células foram incubadas por 3 dias a 30°C em atmosfera úmida com 5% de CO₂

5.8.2 Seleção e biópsia das células transfectadas

Depois de 24 horas da transfecção final ou única (controles), as células foram tripsinizadas usando 1 mL de tripsina (GIBCO) deixando incubadas por 6 minutos a 37°C Depois de inativar a tripsina com 2 mL de meio de cultivo as células foram centrifugadas a 800 xg por 10 min e ressuspensas em meio de seleção, meio de cultivo (item 5.2) contendo

600 µg de G418 (Lonza). Foram, então, contadas no contador automático e plaqueadas de acordo com a Tabela 3 e cultivadas em meio de seleção (trocado a cada 3 dias) por 14-16 dias. Durante os primeiros dois dias as células foram mantidas a 30°C e os dias restantes a 37°C. A atmosfera úmida com 5% de CO₂ foi mantida durante toda incubação.

Tabela 3 – Quantidade de placas e de células por placa durante a seleção dos grupos transfectados

Grupos	Células/placa de 90 mm	Número de placas
Só Vektor Molde	3 x 10⁴	20
Vetor+Talens	1 x 10⁴	20
ATF7IP+Vetor	3 x 10⁴	20
EP300+Vetor	3 x 10⁴	20
Ku70+Vetor	1 x 10⁴	20
ATF7IP+Vetor+Talens	1 x 10⁴	20
EP300+Vetor+Talens	1 x 10⁴	20
Ku70+Vetor+Talens	1 x 10⁴	20
ATF7IP+EP300+Vetor+Talens	1 x 10⁴	20
ATF7IP+Ku70+Vetor+Talens	1 x 10⁴	17
EP300+Ku70+Vetor+Talens	1 x 10⁴	10

Fonte: (PINHO, R. M., 2014).

Após 14-16 dias as colônias celulares foram contadas, fotografadas (microscópio Nikon Eclipse Ti) e a biopsia realizada com o uso de uma seringa hipodérmica sem agulha (BD plastpak) de 1 mL acoplada a ponteiras de polipropileno para micropipetas de 1000 e 200 µL (Figura 1). As células biopsiadas foram cultivadas em placas de 96 poços em meio e condições similares ao item 5.2. Depois de três dias, o meio de cultivo foi retirado e as placas congeladas a -20°C. Todas as colônias dos grupos foram biopsiadas, com exceção dos grupos que tinham grande número de colônias. Nesses grupos foram biopsiadas cerca de 250 colônias e a contagem total de foi realizada com a coração das placas com solução de 0,2% de azul de tripano em solução fisiológica.

Figura 1 – Seringa adaptada utilizada na biópsia das colônias

Fonte: (PINHO, R. M., 2014).

5.8.3 Extração do DNA das colônias biopsiadas

As placas congeladas foram apoiadas sobre gelo reciclável durante todo o processo de extração de DNA. Primeiramente foram adicionados 10 µL de NaOH (Vetec) 200 mM aos poços das placas de 96, o lisado foi homogenizado por pipetagem e transferido para microtubos de 0,2 mL. Em seguida, os tubos foram aquecidos a 68°C por 10 min e esfriados a temperatura ambiente. Depois de frio, foi adicionado 10 µL de Tris-HCl (invitrogen) 100 mM pH 7,4. As amostras foram estocadas a 4°C.

5.8.4 PCR e Sequenciamento para análise do DNA extraído

Foram realizadas PCRs (Reação em Cadeia da Polimerase - *Polimerase Chain Reaction*) com os iniciadores GAPDHZ - F e GAPDHZ - R para controle endógeno, Neo qPCR - F e Neo qPCR - R para controle interno do vetor (controle de transfecção) e DMD3 - F e DMD3 - R para detecção de eventos de recombinação. Os ciclos de amplificação para os iniciadores DMD3 e Neo qPCR foram: desnaturação inicial a 95°C por 5 min.; desnaturação a 95°C por 40 seg.; anelamento de 30 seg. a 56°C; extensão a 72°C por 45 seg. e extensão final de 10 min. a 72°C. Para o par GAPDHZ a temperatura de anelamento foi de 55°C. As reações de amplificações continham 13,4 µL de Mix PCR Convencional (Quatro G), 200 nM de cada primer e 1 µL do lisado.

As reações foram analisadas em gel de agarose a 1% (DMD3), 1,5% (GAPDH) e 2% (Neo qPCR) em TAE e fotografadas com o Flash Gel Camera e Capture Software (Lonza) enquanto exposto a luz ultravioleta. Bandas presentes nos géis DMD3 foram purificadas usando o QIAquick gel extraction Kit e reamplificadas em reações semelhantes às descritas no paragrafo anterior. O produto PCR foi clonado no vetor pCRTM 2.1-TOPO[®], seguindo protocolo de ligação, de transfecção e seleção das bactérias *E.Coli* DH5α semelhantes ao usado para o braço esquerdo descrito no item 5.2. Foi realizado PCR (14,4 µL de Mix PCR, 200 nM de cada iniciador) com os *primers* DMD3 para identificação das colônias positivas. Destas foi extraído DNA plasmidial com o QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen).

Tanto o produto PCR da reamplificação, como o plasmídeo extraído, foram enviados para o sequenciamento com os iniciadores DMD3 e M13. Todos os *primers* citados estão descritos na Tabela 1.

Resultados

6 RESULTADOS

6.1 Construção de vetor molde para recombinação homóloga

Os resultados que mostram a ligação do braço direito no vetor pCR™ 2.1-TOPO e no vetor pEGFP-N1 estão apresentados em PINHO RM , 2011. O PCR do braço esquerdo e as digestões do BE e do vetor BD-GFP com as enzimas DRA III e Not I, assim como os DNA purificados após a digestão, foram analisadas em gel de agarose a 1,5% (Figura 2).

Figura 2 – Análise da clonagem do braço esquerdo no vetor TOPO e das digestões do BE e do vetor BD-GFP

Fonte: (PINHO, R. M., 2014). Legenda: Geis de agarose 1,5 %, M- marcador 100 pb (Ludwig), M2- marcador 1kb (Ludwig), C- -controle negativo. A. PCR de colônias TOPO+BE com iniciadores M13. As colunas apresentando banda de ~ 900 pb são positivas e as que apresentaram bandas de 210 pb, negativas. B. Digestão do minipreps das colônias TOPO+BE com as enzimas DraIII e NotI. Colonias positivas apresentaram banda de 890 pb. Coluna 11 é o controle não digerido. C. Braço esquerdo purificado após digestão com DraIII e NotI (coluna 4). D. Digestão do vetor BD- GFP com as enzimas DraIII e NotI. E. Vetor BD-GFP linearizado após purificação.

Após a ligação do BE com o BD-GFP purificado, da clonagem e do plaqueamento, três colônias brancas foram analisadas por PCR (Figura 3). Com a extração do DNA plasmidial também foram realizadas digestões para a verificação da presença dos BD e BE

(Figura 3). Todas as colônias foram positivas para a presença do BD, mas somente uma colônia possuía o BE.

Figura 3 – Confirmação da ligação do braço esquerdo no vetor BD-GFP

Fonte: (PINHO, R. M., 2014). Legenda: Geis de agarose 1%, M- marcador 1kb (Ludwig), C- controle negativo, C+ - controle positivo. A. PCR de colônias BD-GFP+BE. As colunas 2, 3 e 4 apresentaram banda de 890 pb e são positivas. B. Digestão do minipreps das colônias BD-GFP+BE com as enzimas DraIII e NotI nas colunas (2, 3 e 4) e com as enzimas SnaBI e NheI (colunas 7, 8 e 9). A s colunas 11, 12 e 13 são os plasmideos não digeridos. Somente a colônia da coluna 4 apresentou a presença do BE (destaque) nas digestões.

A colônia positiva foi então pré-inoculada para realização do Midi-prep (Figura 4), que a presença de ambos os braços foi confirmada por sequenciamento. Após confirmação, o vetor BD-GFP-BE foi então digerido com as enzimas NheI e Not I para linearização e exposição dos braços homólogos (Figura 4).

Figura 4 – Análise da digestão final do vetor molde

Fonte: (PINHO, R. M., 2014). Legenda: Geis de agarose 1%, M- marcador 1kb (Ludwig). A. Colunas 2 e 3, digestão do midi BD-GFP-BE com as enzimas NheI e NotI. Coluna 4, vetor não digerido. B. Vetor BD-GFP-BE linearizado e puficicado.

6.2 Produção de siRNA para o gene *Ku70* canino

A reação de amplificação das regiões dos éxons 5 e 13 do gene da *Ku70* canina foram analisadas por gel de agarose a 2% (Figura 5). Os amplicons foram então ligados ao BLOCK-iT T7-TOPO Linker, e foi realizada separadamente a amplificação das fitas sense e anti-sense de cada região amplificada (Figura 5).

Figura 5 – Análise da PCR dos éxons 5 e 13 do gene da proteína *Ku70*

Fonte: (PINHO, R. M., 2014). Legenda: Geis de agarose 1%, M- marcador 100 pb (Ludwig). A) PCR para o exons 5 (colunas 2 e 3) e para o exon 13 (colunas 4 e 5). B) Coluna 2, fita sense da região amplificada T7 + exon 5 e coluna 3, fita anti-sense o T7 + exon 5. C) Colunas 2 e 3 fita sense da ligação T7+ exon 13. D) Coluna 2, amplicon exon 13; coluna 4 fita anti-sense ligação T7-exon 13.

As regiões dos éxons foram então transcritas e aneladas para a formação de dsRNA, que depois foi digerido pela RNase III para formação de siRNAs (Figura 6), que foi analisado em gel de agarose a 2%.

Figura 6 – dsRNA e siRNA para o exon 5 do gene da *ku70*

Fonte: (PINHO, R. M., 2014). Legenda: M- marcador 100 pb (Ludwig). Coluna 3: dsRNA da região amplificada do exon 5. Coluna 4: siRNA para o exon 5; Coluna 5 - produto PCR da região do exon 5.

6.3 TAL- Effector Nucleases

A construção do par de TALENs foi testada com a corrida em gel de eletroforese das digestões simultâneas dos minipreps com as enzimas BstAPI e AatII e da digestão com a enzima BspEI (Figura 7). Eram positivas as DMD - L que apresentavam bandas de 200, 300 e 600 pb, e as DMD - R com bandas de 700 pb.

Figura 7: Digestão e linearização dos plasmídeos das TALENs DMD - R e DMD - L

Fonte: (PINHO, R. M., 2014). Legenda: M – marcador 100 pb (Ludwig). A) Colunas 1, 2, 3, 7, 8 e 9: minipreps da TALEN DMD - R digeridos com BstAPI e AatII. Colunas 4, 5, 6, 10, 11 e 12: a mesma digestão com os minipreps da TALEN DMD - L. B) Colunas 2 e 4: minipreps para DMD - L não digeridos. Colunas 3 e 5: minipreps DMD - L digeridos com BspEI. Colunas 6 e 7: minipreps TALENS DMD - R digeridos com BspEI. Coluna 8: miniprep TALEN DMD - R não digerido.

A digestão com a enzima SacI foi realizada para linearização do vetor (Figura 8). Os plasmídeos linearizados, tratados com RNase secure e purificados foram transcritos e o RNAm gerado adicionado ou não de cauda de poliadenina foi analisado em eletroforese denaturante em gel de agarose-folmaldeído 1,2%, e eletroforese normal em gel de agarose 1% (Figura 8).

Figura 8 – Eletroforese dos RNA mensageiros das TALENs DMD

Fonte: (PINHO, R. M., 2014). Legenda: M - marcador 100 pb (Ludwig). A) Colunas 1, 2, 3, 7, 8 e 9: linearização dos minipreps da TALEN DMD - R com a enzima SacI. Colunas 4, 5, 6, 10, 11 e 12: a mesma reação com a TALEN DMD - L. B) Eletroforese denaturante dos RNAm das TALENs DMD sem cauda de poliadenina (coluna 2) e com cauda de poliA (coluna 3). C) Eletroforese em gel de agarose 1% do RNAm TALENs DMD sem poliA (coluna 1) e com poliA (coluna 2).

6.4 Inibição gênica mediada por siRNA

As proteínas totais extraídas 24 e 48 horas após a transfecção dos siRNAs foram analisadas em SDS-PAGE 12%. Os resultados dos *western blots* estão dispostos na Figura 9. A expressão do GAPDH foi alterada com a inibição do gene ATF7IP e do gene da Ku70. O controle inespecífico também diminuiu a expressão do GAPDH e, bem levemente, do ATF7IP. Foi observada a completa depleção da tradução dos genes ATF7IP, EP300 e Ku70 24 horas após a transfecção com siRNA.

Figura 9 – Análise do silenciamento gênico mediado por RNAi

Fonte: (PINHO, R. M., 2014). Legenda: Western blot em gel de 12% acrilamida. NT: controle não transfectado. Ci: controle siRNA não específico. A) É mostrado a depleção da proteína ATF7IP 24 horas após a transfecção. B) Detecção das proteínas GAPDH, EP300 e Ku70 no controle não transfectado, e nas células 24 e 48 horas após a transfecção do RNAi. Fonte: Autoria própria.

6.5 Padronização da transfecção de células MDCKI por lipofectamina2000

As células foram analisadas através de fotomicrografias em microscópio Nikon Eclipse Ti com o filtro azul com λ de 400-426 nm em aumento de 40x. As fotografias foram tiradas 24 horas após a transfecção com o vetor pmaxGFP (Figura 10) para comparação da taxa de transfecção de acordo com fluorescência observada. Os grupos transfectados com o oligo fluorescente foram analisados de maneira semelhante. Devido à fluorescência do oligo, que é bem mais sutil do que a gerada pelo GFP, o aumento utilizado foi de 100x.

A taxa de transfecção, do vetor foi melhor na maioria dos grupos (com exceção do grupo transfectado com 1,5 μ g de DNA e 4 μ L de lipofectamina) cujas células receberam o meio de transfecção diretamente, ou seja, o meio de cultivo foi retirado antes que o Opti-MEM, adicionado da lipofectamina e do DNA, fosse aplicado ao poço de cultura celular.

Figura 10 – Fotomicrografia das células transfectadas com o vetor pmaxGFP

Fonte: (PINHO, R. M., 2014). Legenda: Fotomicrografia com microscopia de fluorescência, aumento de 40x, mostrando as células expressando a proteína GFP. CM: células transfectadas com o meio de transfecção adicionado ao meio de cultivo sem antibiótico. SM: células transfectadas com o meio de transfecção adicionado diretamente às células, sem o meio de cultivo. Linha 1) células transfectadas com 1 µL de Lipofectamina2000. Linha 2) células transfectadas com 2 µL de Lipofectamina. Linha 3) células transfectadas com 4 µL de Lipofectamina.

Não foi observada diferença relevante na maioria dos grupos transfectados com oligo fluorescente (Figura 11), sendo a taxa de transfecção baixa, independente da aplicação do meio de transfecção. O grupo transfectado com 2 µL de lipofectamina e 40 pmol de oligo em transfecção sem meio de cultivo (grupo 2L40PMSM) apresentou maior pontos de fluorescência do que os demais, mas a maioria fluorescência provinha de lipossomos e não de células transfectadas (Figura 11).

Devido a esse resultado foi realizada outra transfecção, de oligos fluorescentes com Opt-MEM adicionado diretamente às células. Essa transfecção seguiu mesmos parâmetros e protocolo descritos na metodologia, mas utilizando uma maior quantidade de oligo (160 pmol) e de lipofectamina (4 µL) (grupo 4L160PM). A taxa de transfecção e a visualização foram bem melhores, como pode ser observado, em aumento de 40x e 100x, na Figura 12.

Figura 11 – Fotomicrogrografias das células transfectadas com o Block- iT fluorescente oligo

Fonte: (PINHO, R. M., 2014). Legenda: Células transfectadas com o Block-iT fluorescente oligo, aumento de 40x. CM: células transfectadas com o meio de transfecção adicionado ao meio de cultivo sem antibiótico. SM: células transfectadas com o meio de transfecção adicionado diretamente às células, sem o meio de cultivo. A) Linha 1: células transfectadas com 0,5µL de Lipofectamina2000. Linha 2: células transfectadas com 1 µL de lipofectamina. Linha 3: células transfectadas com 2 µL de lipofectamina. B) Sobreposição das fotos, em aumento de 100x, com filtro e sem filtro do grupo transfectado com 2 µL de lipofectamina e 40 pmol de oligo. Setas mostrando lisossomos fluorescentes e as células transfectadas estão circuladas.

Figura 12 – Fotomicrografias das células transfectadas com 160 pmol de oligo fluorescente

Fonte: (PINHO, R. M., 2014). Legenda: Fotomicrografias com microscopia (aumento de 100x e de 40x) de fluorescência mostrando as células transfectadas com 160 pmol de Block-iT fluorescente oligo e 4 µL de lipofectamina. CF: microscopia com filtro azul. SF: microscopia sem filtro azul. Fonte: Autoria própria.

Foi escolhida a razão DNA (µg)/Lipofectamina2000 (µL) de 3:4. Para ter uma boa taxa de transfecção e probabilidade de morte celular mais baixa, já que os siRNA transfectados inibem genes essenciais, foi utilizada a razão de oligo (pmol)/Lipofectamina2000 (µL) de 22:1, meio termo entre as dos grupos 2L40PM e 4L160PMSM.

6.6 Transfecção siRNA, TALENs e vetor molde

As células foram transfectadas primeiramente com os siRNA e posteriormente com os RNAm para talens e/ou vetor molde. O grupo controle foi transfectado com pmáxGFP e fotografado 24 e 48 horas após a transfecção (Figura13). A mortalidade celular foi avaliada através do número de células após a transfecção celular (Tabela 4). Esse número limitou o número de placas para seleção de colônias dos grupos ATF7IP+Ku70+Vetor+Talens (grupo A+K+V+T - 17 placas) e EP300+Ku70+Vetor+Talens (grupo E+K+V+T - 10 placas).

Figura 13– Fotomicrografias das células controle transfectadas com o vetor pmáxGFP

Fonte: (PINHO, R. M., 2014). Legenda: Fotomicrografias com microscopia de fluorescência das células do grupo controle. A) Em aumento de 100x, 24 horas após a transfecção. B) Em aumento de 40x, 48 horas após a transfecção.

Após seleção em meio contendo G418, as colônias foram fotografadas, contadas e biopsiadas (Figura 14) para que se pudesse extrair o DNA celular. As microfotografias revelaram diferenças grandes na morfologia das células e colônias (Figura 15). A disparidade morfológica não foi exclusiva de nenhum grupo, e todos apresentaram colônias morfológicamente diferentes às células MDCKI. O número de colônias morfológicamente discrepantes e o número total de colônias estão descritos na Tabela 4.

Figura 14–Fotomicrografias de colônias antes e depois da biopsia

Fonte: (PINHO, R. M., 2014). Legenda: Fotomicrografias em aumento de 40x. A) Colônia do grupo ATF7IP+Vetor antes da biopsia. B) Mesma colônia do grupo ATF7IP após biopsia. C) Colônia do grupo EP300+Vetor antes da biopsia. D) Mesma colônia do grupo EP300 após a biopsia.

Somente os grupos SÓ VETOR (9p), ATF7IP + Vetor (10p) e EP300 + Vetor (10p) tiveram mais de 200 colônias biopsiadas em aproximadamente metade das placas. A contagem total, nesses grupos, foi finalizada com a pigmentação das placas com solução de azul de tripano (Figura 15). O grupo Vetor + TALENs também obteve mais de duzentas biopsias, mas foi necessário biopsiar as colônias de todas as placas para alcançar esse número.

Pode-se observar uma grande toxicidade celular dos siRNA da Ku70, que foram os únicos produzidos através do BLOCK-iT RNAi TOPO Transcription Kit. Essa citotoxicidade aumentou quando este foi transfectado juntamente com outro siRNA. O número de células pós - transfecção desses grupos foram os menores e a pior taxa de sobrevivência foi do grupo

EP300+Ku70+Vetor+TALENs com aproximadamente 1×10^5 células após a segunda transfecção (Tabela 4).

Figura 15– Colônias celulares morfologicamente alteradas

Fonte: (PINHO, R. M., 2014). Legenda: Fotomicrografias em aumento de 40X. A) Colônia do grupo ATF7IP+ EP300+Vetor+TALENs. B) Colônia do grupo Ku70+Vetor. C) Colônia do grupo EP300+Vetor. D) Colônia do grupo ATF7IP+Vetor. E) Placa do grupo EP300+Vetor corada com solução de azul de tripano. F) Células MDCKI não transfectadas.

As TALENs provaram-se bastante citotóxicas. O grupo V+T apresentou maior número de colônias (208c) entre os grupos transfectados com os RNAm. Esse número não alcança

nem a metade da quantidade de colônias contabilizadas no grupo E+V que, com exceção do K+V (89c), apresentou a mais baixa contagem dos grupos transfectados só com o vetor.

Tabela 4 – Contabilidade do número de células pós-transfecção e colônias totais e biopsiadas

Grupos*	Nº de células** pós-transfecção	Nº total de colônias	Nº total de biopsias	Morfologia alterada***
Vetor Molde	9,2 x 10⁶	551	248	69 (27,8%)
A+V	9,2 x 10⁶	648	265	73 (27,5%)
E+V	6,4 x 10⁶	491	232	70 (30%)
K+V	2,6 x 10⁵	89	89	35 (39,3%)
V+T	5,2 x 10⁵	208	208	56 (26,9 %)
A+V+T	1,3 x 10⁶	82	82	-
E+V+T	6,7 x 10⁵	73	73	22 (30,1%)
K+V+T	4,5 x 10⁵	17	14	-
A+E+V+T	2 x 10⁶	94	94	41 (43,6%)
A+K+V+T	1,7 x 10⁵	14	11	6 (54,5%)
E+K+V+T	1 x 10⁵	1	1	1 (100%)

Fonte: (PINHO, R. M., 2014)* Os nomes dos grupos foram simplificados com a utilização das iniciais dos siRNA, do vetor ou das talens. A para o siRNA ATF7IP, E para o siRNA EP300, K para o siRNA Ku70, V para o vetor molde e T para o RNAm das TALENs. ** O número de células vivas após a transfecção única para os grupos Vetor molde e V+T ou após a segunda transfecção nos demais grupos. *** foram contabilizadas as colônias biopsiadas com morfologia distinta da morfologia normal das células MDCK I. Os grupos A+V+T e E+V+T não tiveram as colônias alteradas contabilizadas.

A inibição do gene ATF7IP aparentemente não influenciou na mortalidade celular, já que o número de células vivas após a transfecção ATF7IP+Vetor foi igual ao grupo transfectado somente com o vetor molde.

Além disso, ela contrabalanceou os efeitos negativos das TALENs nos grupos A+V+T e A+E+V+T, que foram os únicos transfectados com os RNAm que obtiveram número de células na faixa de 10⁶. Apesar disso, os números de colônias desses grupos não foram muito maiores que o do grupo E+V+T.

O número de células com alteração morfológica foi parecido entre os grupos não transfectados com TALENs, (~30%) com exceção do K+V com 39,5% das células biopsiadas, alteradas.

Os grupos transfectados com dois siRNAs apresentaram maiores porcentagens de colônias distintas. Com destaque para a o grupo E+K+V+T apresentou grande taxa mortalidade durante a seleção com G418. Neste grupo só uma colônia, que apresentava morfologia bastante alterada e com poucas células, foi encontrada e biopsiada (Figura 16).

Figura 16– Biopsia da única colônia EP300+Ku70+Vetor+Talens

Fonte: (PINHO, R. M., 2014). Legenda: Fotomicrografias em aumento de 40x. A) Antes da biopsia. B) Depois da Biopsia.

6.7 PCR e sequenciamento do DNA extraído das colônias biopsiadas

Foram realizadas as PCR para o controle endógeno GAPDH para identificação e exclusão das amostras em que o número de células não foi suficiente para realização da reação de amplificação. As reações em cadeia da polimerase foram submetidas à eletroforese em gel de agarose a 1,5% (Figura 17).

Figura 17– Eletroforese das PCRs para o controle endógeno GAPDH

Fonte: (PINHO, R. M., 2014). Legenda: M: marcador 100 pb (Ludwig). C-: controle negativo. Colunas ímpares até a 29: bandas de amplificação para o GAPDH em amostras do grupo EP300 + Vetor + Talens. Coluna 31: amostra onde não ocorreu a amplificação do controle endógeno.

Depois da análise dos géis, foram realizadas as PCR para o controle interno do vetor, neomicina, somente nas amostras com controle endógeno positivo. As amplificações foram analisadas em gel de agarose a 2% (Figura 18).

As PCRs para identificação da recombinação homóloga, com o iniciador DMD3, foram realizadas somente nas amostras que apresentaram a amplificação do GAPDH e da Neomicina. Elas foram submetidas à corrida de eletroforese em gel de agarose a 1% (Figura 19).

Figura 18– Eletroforese das PCRs para o gene neomicina

Fonte: (PINHO, R. M., 2014). Legenda: M: marcador 100 pb (Ludwig). C-: controle negativo. Colunas 7, 20, 29 e 31: amostras do grupo transfectado somente com vetor molde negativas para neomicina. O restante das colunas, que apresentam banda de 300 pb, são positivas para o controle interno do vetor.

O número total das colônias GAPDH, Neomicina e DMD3 positivas foram sumarizados na Tabela 5. Na corrida de eletroforese das PCR com os iniciadores DMD 3 apareceram bandas de aproximadamente 200 e 300 pb. Essas bandas foram reamplificadas, clonadas (Figura 20) e enviadas para o sequenciamento para identificação de possíveis eventos de recombinação ou efeitos *off target*.

Figura 19– Eletroforese das PCRs com iniciadores DMD3

Fonte: (PINHO, R. M., 2014). Legenda: PCRs de amostras do grupo ATF7IP + Vetor. M: marcador 100 pb (Ludwig). C-: controle negativo. A) Colunas 6 e 25 apresentando bandas de 200 e 300 pb. Colunas 9, 10, 11, 14, 24, 30 e 32 apresentando banda única de ~ 200 pb. B) Amostras negativas para recombinação homóloga.

Figura 20– Confirmação da clonagem das bandas reamplificadas no vetor TOPO

Fonte: (PINHO, R. M., 2014). Legenda: PCRs realizados com iniciadores M13 em miniprep de bactérias clonadas com vetor TOPO + banda de 200 pb ou 300 pb reamplificadas com *primers* DMD3. M: marcador 100 pb (Ludwig). C-: controle negativo. Colunas 2, 4, 6, 8-14: positivas para banda de 200 pb. Colunas 1, 3, 5 e 7: apresentando banda 300 pb. Colunas 15: negativa.

Tabela 5 – Contabilidade do número de amostras positivas para GAPDH, neomicina e DMD3

Grupos*	Nº total de biopsias	GAPDH+	Neomicina +**	DMD 3 +***	
				200 pb	300 pb
Vetor Molde	248	207 (84,6%)	155 (74,8%)	43 (45%)	3 (3,1%)
A+V	265	167 (73,5%)	121 (72,4%)	16 (16,8%)	2 (2,1%)
E+V	232	206 (88,7%)	195 (94,6%)	31 (32,9%)	6 (6,3%)
K+V	89	47 (52,8%)	36 (76,5%)	2 (5,5%)	0 (0%)
V+T	208	153 (73%)	123 (80,3%)	29 (30,5%)	3 (3,1%)
A+V+T	82	36 (43,9%)	34 (94,4%)	2 (5,8%)	0 (0%)
E+V+T	73	56 (76,7%)	46 (82,1%)	8 (17,3%)	1 (2,1%)
K+V+T	14	12 (85%)	11 (91,6%)	0 (0%)	0 (0%)
A+E+V+T	94	52(55,3%)	47 (90,3%)	11 (23,4%)	2 (4,2%)
A+K+V+T	11	5 (45,4%)	5 (100%)	2 (40%)	2 (40%)
E+K+V+T	1	0	0	0 (0%)	

Fonte: (PINHO, R. M., 2014). * Os nomes dos grupos foram simplificados com a utilização das iniciais dos siRNA, do vetor ou das talens. A para o siRNA ATF7IP, E para o siRNA EP300, K para o siRNA Ku70, V para o vetor molde e T para o RNAm das talens. ** A porcentagem de amostras positivas para neomicina que são positivas para GAPDH. *** Porcentagem de amostras positivas para DMD 3. A porcentagem foi em relação ao número de amostras analisadas, que diferiu da quantidade de amostras positivas para neomicina somente nos grupos A+V, E+V, V+T e transfectado só com vetor molde. Para esses grupos, foram analisadas 94 amostras para a presença de recombinação homóloga.

Pode-se observar na Tabela 5, que a proporção e bandas baixas, com 200 pb, foi mais alta no grupo transfectado somente com o vetor molde, já a banda de 300 pb obteve maior porcentagem nos grupo E+V, A+E+V+T e A+K+V+T esse último apresentando 40% as células positivas para neomicina sendo positivas também para o vetor DMD3.

O resultado dos sequenciamentos mostraram que todas as bandas de 200 pb e a maioria das bandas de 300 pb eram compatíveis com o gene do receptor olfatório 5b12 do cão (NCBI Reference Sequence: NC_006600.3), evidenciando uma possível ligação inespecífica do dos *primers* (Figura 21), apesar do número de amostras positivas para essa banda ser somente 18,6% do total de amostras confirmadas com neomicina.

Somente duas amostras, uma do grupo E+V e outra do grupo E+V+T, mostraram sequências de homologia com o vetor molde, apesar da presença de disparidades na conformação da sequência (Figura 21).

Figura 21– Resultado do sequenciamento

Legenda: A) Fonte: (PINHO, R. M., 2014). Receptor 5B12: parte da sequência do gene do receptor olfativo do cão. As outras 3 sequências são os resultados do sequenciamento gênico de amostras das colônias dos grupos E+V, A+E+V+T e do grupo transfectado somente com o vetor molde. B) Fonte: Nucleotide BLAST result. Resultado do alinhamento utilizando o programa BLAST. Query: representa o vetor molde. E+V 5 representa a sequência conseguida através do sequenciamento de uma amostra do grupo E+V.

Discussão

7 DISCUSSÃO

A inibição das proteínas por RNAi foi um sucesso como pode ser observado no item 6.4 dos resultados. A proteína ATF7IP está presente em maior quantidade nas células MDCK I quando comparada as proteínas Ku70 e Ep300. 24h e 48 h após a transfecção com os *short interference* RNAs não foram detectadas nenhuma das três proteínas na análise do *western blot*, mostrando que a depleção de proteínas mediada por RNAi foi um sucesso.

Diferente do observado por BERTOLINI et al., 2009, que relatou um maior knockdown de Ku70 em células HCT116 48h após a transfecção, para as células MDCK I as proteínas apresentaram depleção constante 24 e 48 horas depois da eletroporação. O que demonstra que os níveis dessas proteínas continuavam baixos durante a transfecção das TALENs e/ou do vetor molde, que foi realizada 40 horas após a transfecção com os siRNAs.

A taxa de transfecção do vetor molde foi estimada em aproximadamente 70% tendo como base as fotomicrografias do grupo controle transfectado com o vetor pmaxGFP (Figura 12). Essa taxa foi menor que a esperada após a padronização das transfecções, já que o grupo que continha a mesma razão DNA/Lipofectamina 2000 (3 µg de DNA/ 4 µL de lipofectamina) apresentou taxa de transfecção superior a 90% (Figura 10). Mesmo assim a taxa de transfecção foi boa e permitiu as análises posteriores.

A grande maioria dos trabalhos que utilizam as TALENs na forma de RNAm visa a edição gênica ainda no estágio embrionário para o desenvolvimento de organismos com genoma modificado. E ao invés da transfecção, a microinjeção é o método mais utilizado (CARLSON et al., 2012; MA et al., 2012). Já na edição gênica de linhagens celulares, as TALENs são inseridas, principalmente, na forma plasmidial e o modo de transfecção é, normalmente, a eletroporação (CHRISTIAN et al., 2010; HOSOI et al., 2014; SAKUMA et al., 2013). Recentemente, Berdien et al., 2014, apresentou bons resultados com a utilização do RNAm para TALENs em comparação com plasmídeos codificantes das proteínas efetoras. Ainda perceberam uma menor citotoxicidade e ressaltaram os benefícios da transitoriedade do RNAm, o que permite uma maior estabilidade celular, impedindo a expressão permanente das endonucleases.

Nossos resultados demonstraram alta mortalidade após transfecção com o RNAm para TALENs. Essa toxicidade pode ser proveniente de uma resposta celular de defesa antiviral

desencadeada pelo RNAm (BACKES et al., 2013). Apesar da adição da cauda de poliadenina aos RNAm que foram transfectados.

A cauda de poli(A) é essencial para a estabilidade do RNAm além de aumentar a eficiência da tradução (LAISHRAM, 2014), sendo importante para a validade dos RNA mensageiros, possibilitaria uma maior sobrevivência do RNAm das TALENs dentro da célula e permitiria a sua transcrição pela maquinaria hospedeira. Pode-se supor que cauda de poli(A) de 100 pb adicionada aos RNAm das TALENs não tenha sido suficiente para driblar as defesas celulares. Estudos utilizando RNA mensageiros como *delivery* para as TALENs podem permitir maior comparação entre os RNAm e os plasmídeos como meios de transporte das proteínas efectoras.

Outro possível motivo da baixa sobrevivência dos grupos com TALENs são os efeitos *off targets*. Apesar de serem consideradas muito mais seguras e menos prejudiciais à célula do que as *zinc finger nucleases*, as TALENs ainda podem gerar cortes em lugares inespecíficos do genoma hospedeiro (SCHOLZE; BOCH, 2010; GRAU; BOCH; POSCH, 2013; MUSSOLINO et al., 2014).

Esses cortes podem se tornar ainda mais danoso em quando acompanhados da inibição das vias de reparo do DNA (TAKATA et al., 1998). Que foi o que aconteceu nos grupos transfectados com o siRNA para a proteína Ku70, que tiveram a via de junção de pontas não homólogas dificultada. E isso explicaria o baixíssimo número de colônias dos grupos ATF7IP+Ku70+Vetor+TALENs, Ku70+Vetor+TALENs e EP300+Ku70+Vetor+TALENs.

Mesmo sem as TALENs, os grupos que tiveram a NHEJ inibida apresentaram grande dificuldade de recuperação e sobrevivência celular durante o período de seleção com G418. Por ser o único produzido pela digestão de produto PCR, o que gera um pool de siRNAs com 21-23 pb, existe a possibilidade da presença de efeitos *off targets*, com algum dos siRNAs resultantes inibindo outros genes (Invitrogen, 2004). Além disso, a depleção gênica da Ku70 por si só, já causa grande mortalidade celular (TAKATA et al., 1998).

A inibição dos genes ATF7IP e EP300 não apresentaram grandes diferenças em relação ao número de colônias comparado ao grupo controle transfectado com o vetor molde. Somente quando acompanhados às TALENs apresentaram uma queda considerável no número de colônias em comparação com o grupo Vetor+TALENs. Isso pode ser explicado pela influência que as duas proteínas exercem nas vias de reparo do DNA, tanto como possível co-fator de transcrição de proteínas essenciais para RH, no caso da ATF7IP, como também sendo essencial para o recrutamento e ligação das proteínas da via NHEJ nos locais de QB, no caso da EP300 (LIU et al., 2009; HE et al., 2011; OGIWARA et al., 2011).

Além disso, era de se esperar alguma diferença na resposta celular com a inibição desses dois genes, já que eles estão relacionados à regulação gênica de maneira quase que opostas: o EP300 relacionado à acetilação de histonas e o ATF7IP à metilação.

Em relação à morfologia celular alterada os grupos com maior porcentagem foram os transfectados com dois siRNAs. Alterações epigenéticas estão diretamente relacionadas com a diferenciação celular (SPIN; QUERTERMOUS; TSAO, 2010; BOLAND; NAZOR; LORING, 2014) e talvez fosse de se esperar que os grupos com as proteínas EP300 e ATF7IP tivessem uma proporção maior de células morfologicamente distintas. Apesar disso, entre os grupos sem TALENs, o grupo com a proteína Ku70 foi o que apresentou maior proporção de células alteradas.

O PCR para o controle endógeno GAPDH demonstrou uma grande quantidade de colônias que não sobreviveram à biopsia. O método de coleta das colônias por biopsia devido a grande quantidade de placas e de amostras e também pela possibilidade de recuperação de colônias pequenas que foram cultivadas ainda por 3-4 dias em placa de 96 poços. O uso de cones iria aumentar muito o custo do processo, já que seriam necessárias grandes quantidades de agarose e tripsina, além de aumentar o risco de não se conseguir isolar muito bem as colônias dependendo do tamanho do cone e da proximidade das colônias (MATHUPALA e SLOAN, 2010).

Já o PCR para neomicina provou que das células sobreviventes grande porcentagem continha o vetor molde, com os grupos com menor porcentagem de colônias neomicina positivas alcançando mais do que 70%. Esses grupos (só Vetor e ATF7IP+Vetor) foram os que apresentaram maior número de colônias isso possibilitaria uma maior proteção das colônias negativas pelas colônias resistentes (SASAKI et al., 1992). E isso comprova que a seleção com o G418 foi eficiente.

O PCR com os iniciadores DMD3 mostraram que a proporção de recombinação foi similar entre os grupos, com a transfecção do RNAm das TALENs não influenciando no número de eventos. O grupo transfectado somente com o vetor molde obteve a mesma proporção de eventos que o grupo Vetor+TALENs. Isso contradiz as principais literaturas sobre edição gênica em linhagem celular, lembrando que a maioria delas utilizou o plasmídeo e não o RNAm para a transfecção das TALENs (ZHANG et al., 2011; CERMAK et al., 2011; HOSOI et al., 2014; TONG et al., 2012; BERDIEN et al., 2014;).

Os grupos que apresentaram maior proporção foram EP300+Vetor, 6,3% e AT77IP+Ku70+Vetor+TALENs, com impressionantes 40% das células neomicinas+ apresentando banda de 300 pb na amplificação DMD3 mesmo tendo o segundo menor

número de colônias totais (11c). O grupo E+V apresentou o maior número de colônias DMD3 positivas (6c) e considerando o número inicial de células antes da transfecção apresentou, portanto, a maior taxa de eventos por quantidade inicial de células, ou seja, um evento para cada 17.000 células. Em contrapartida, os grupos Ku70+Vetor e Ku70+Vetor+TALENs não apresentaram nenhum evento de recombinação.

Esses resultados se opõem a estudos que relataram aumentos consideráveis na taxa de recombinação homóloga em consequência da depleção da tradução das proteínas Ku70, ATF7IP e EP300. Bertolini et al., 2009, por exemplo, observou um aumento de 33 vezes na taxa de recombinação homóloga em células transfectadas com o siRNA para a proteína Ku70. Katada et al., 2012, conseguiu um aumento de 2,7 vezes com o silenciamento do mesmo gene.

Os genes ATF7IP e EP300 foram considerados bastante eficientes no aumento da taxa de *gene target* por Delacôte e colaboradores, 2011, elevando a taxa de recombinação a 3,5 vezes e 1,5 vezes, respectivamente. Esses resultados diferem bastante do que observamos, já que os grupos transfectados com siRNA para a proteína ATF7IP tiveram taxas de recombinação menores dos que as transfectadas somente com o vetor: A+V: 1 evento para cada 50.000 células iniciais; V: 1 evento para cada 33.000 células. Não observamos nenhum evento no grupo A+V+T.

Conclusões

8 CONCLUSÕES

O silenciamento gênico mediado por RNA de interferência foi considerado de sucesso, com a depleção da tradução das proteínas Ku70, EP300 e ATF7IP tanto 24 horas, como 48 h após a transfecção celular. A padronização da transfecção se mostrou, também, efetiva, com a taxa de transfecção controle alcançando 70%.

Contrariando a literatura, o RNA mensageiro para as TALENs se mostrou bastante deletério, diminuindo bastante o número de colônias sobreviventes após a seleção e não sendo efetivo para o aumento da taxa de recombinação homóloga. A taxa de mortalidade celular pós-transfecção, também foi alta nas células transfectadas com o siRNA para a depleção da proteína Ku70 e essas não apresentaram nenhum evento *gene targeting*.

Mesmo assim, a utilização dos siRNA para aumento da taxa de recombinação foi um sucesso, já que no grupo transfectado com os siRNA para ATF7IP e Ku70 a porcentagem de colônias apresentando evento de recombinação foi de 40% das células positivas para neomicina e o grupo EP300+Vetor apresentou maior taxa de recombinação, levando em consideração o número inicial de células, com 1 evento para 17.000 células, demonstrando um aumento considerável na taxa da edição gênica direcionada como, também, a diminuição de eventos de integração de DNA aleatórios.

Referências

REFERÊNCIAS

- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K., WALTER, P. **Biologia Molecular da Célula**. 5. ed. Porto Alegre: ArtMed, 2010. 1396 p.
- BACKES, S. SHAPIRO, J. S.; SABIN, L. R. PHAM, A. M.; REYES, I.; MOSS, B.; CHERRY, S.; BENJAMIN, R. Degradation of host microRNAs by poxvirus poly(A) polymerase reveals terminal RNA methylation as a protective antiviral mechanism. **Cell Host Microbe**, v. 12, n. 2, p. 200–210, 2012.
- BARBOSA, A. S.; LIN, C. J. Silenciamento de genes com RNA interferência : Um Novo Instrumento Para Investigação da Fisiologia e fisiopatologia do córtex adrenal. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 48, n. 5, p. 612–619, 2004.
- BEDFORD, D. C.; BRINDLE, P. K. Is histone acetylation the most important physiological function for CBP and p300? **Aging**, v. 4, n. 4, p. 247–55, abr. 2012.
- BERDIEN, B.; MOCK, U.; ATANACKOVIC, D.; FEHSE, B. TALEN-mediated editing of endogenous T-cell receptors facilitates efficient reprogramming of T lymphocytes by lentiviral gene transfer. **Gene therapy**, v. 21, n. 6, p. 539–548, 27 mar. 2014.
- BERGHE, W. V.; BOSSCHER, K.; BOONE, E.; PLAISANCE, S.; HAEGEMAN, G. The nuclear factor-kappaB engages CBP/p300 and histone acetyltransferase activity for transcriptional activation of the interleukin-6 gene promoter. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 45, p. 32091–8, 5 nov. 1999
- BERTOLINI, L. R.; BERTOLINI, M.; MAGA, E.A.; MADDEN, K. R.; MURRAY, J.D. Increased gene targeting in Ku70 and Xrcc4 transiently deficient human somatic cells. **Molecular Biotechnology**, v. 41, n. 2, p. 106–14, fev. 2009.
- BOCH, J.; BONAS, U. Xanthomonas AvrBs3 family-type III effectors: discovery and function. **Annual Review of Phytopathology**, v. 48, p. 419–436, 2010.
- BOLAND, M. J.; NAZOR, K. L.; LORING, J. F. Epigenetic Regulation of Pluripotency and Differentiation. **Circulation Research**, v. 115, n. 2, p. 311–324, 7 jul. 2014
- CARLSON, D. F.; TAN, W.; LILICO, S. G.; STVERAKOVA, D.; PROUDFOOT, C.; CHRISTIAN, M. Efficient TALEN-mediated gene knockout in livestock. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 43, p. 1–6, 2012.
- CERMAK, T.; DOYLE, E. L.; CHRISTIAN, M.; WANG, L.; ZHANG, Y.; SCHMIDT, C.; BALLER, J. A.; SOMIA, N. V.; BOGDANOVE, A. J.; VOYTAS, D. F. Efficient design and assembly of custom TALEN and other TAL effector-based constructs for DNA targeting. **Nucleic Acids Research**, v. 39, n. 12, p. e82, jul. 2011.

CHRISTIAN, M.; CERMAK, T.; DOYLE, E. L.; SCHMIDT, C.; ZHANG, F.; HUMMEL, A.; BOGDANOVE, A. J.; VOYTAS, D. F. Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases. **Genetics**, v. 186, n. 2, p. 757–61, out. 2010.

COHEN, H. C.; XIONG, M. P. Non-cell-autonomous RNA interference in mammalian cells: Implications for in vivo cell-based RNAi delivery. **Journal of RNAi and Gene Silencing: an International Journal of RNA and Gene Targeting Research**, v. 7, p. 456–63, jan. 2011.

DAHL, N.; LAGERSTRÖM, M.; ERIKSON, A.; PETTERSSON, U. Gaucher disease type III (Norrbotnian type) is caused by a single mutation in exon 10 of the glucocerebrosidase gene. **American Journal of Human Genetics**, v. 47, n. 2, p. 275–8, ago. 1990.

DELACÔTE, F.; PEREZ, C.; GUYOT, V.; MIKONIO, C.; POTREL, P.; CABANIOLS, J. P.; DELEND, C.; PÂQUES, F.; DUCHATEAU, P. Identification of genes regulating gene targeting by a high-throughput screening approach. **Journal of Nucleic Acids**, v. 2011, p. 947212, jan. 2011.

DENOVAN-WRIGHT, E. M.; DAVIDSON, B. L. RNAi: a potential therapy for the dominantly inherited nucleotide repeat diseases. **Gene Therapy**, v. 13, n. 6, p. 525–31, mar. 2006.

DU, H.; FINGERMAN, I. M.; BRIGGS, S. D. Histone H3 K36 methylation is mediated by a trans -histone methylation pathway involving an interaction between Set2 and histone H4. **Genes & Development**, v. 22, p. 2786–2798, 2008.

FIRE, A.; XU, S.; MONTGOMERY, M.; KOSTAS, S.; DRIVER, S.; MELLO, C. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. **Nature**, v. 391, n. February, p. 806–811, 1998.

FRANK-KAMENETSKY, M.; GREFFHORST, A.; ANDERSON, N. N.; RACIE, T.S.; BRAMLAGE, B.; AKINC, A.; BUTLER, D.; CHARISSE, K.; DORKIN, R.; FAN, Y.; GAMBA-VITALO, C.; HADWIGER, P.; JAYARAMAN, M.; JOHN, M.; JAYAPRAKASH, K. N.; MAIER, M.; NECHEV, L.; RAJEEV, K. G.; READ, T.; RÖHL, I.; SOUTSCHEK, J.; TAN, P.; WONG, J.; WANG, G.; ZIMMERMANN, T.; DE FOUGEROLLES, A.; VORNLOCHER, H. P.; LANGER, R.; ANDERSON, D. G.; MANOHARAN, M.; KOTELIANSKY, V.; HORTON, J. D.; FITZGERALD, K. Therapeutic RNAi targeting PCSK9 acutely lowers plasma cholesterol in rodents and LDL cholesterol in nonhuman primates. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 33, p. 11915–20, 19 ago. 2008.

FUKS, F. DNA methylation and histone modifications: teaming up to silence genes. **Current Opinion in Genetics & Development**, v. 15, n. 5, p. 490–5, out. 2005.

GERSBACH, C. A.; GAJ, T.; GORDLEY, R. M.; MERCER, A. C.; BARBAS, C. F. Targeted plasmid integration into the human genome by an engineered zinc-finger recombinase. **Nucleic Acids Research**, v. 39, n. 17, p. 7868–78, 1 set. 2011.

GRAU, J.; BOCH, J.; POSCH, S. TALENoffer : genome-wide TALEN off-target prediction. **Bioinformatics Applications Note**, v. 29, n. 22, p. 2931–2932, 2013

GREER, E.; SHI, Y. Histone methylation: a dynamic mark in health, disease and inheritance. **Nature Reviews Genetics**, v. 13, n. 5, p. 343–357, 2014.

GRIFFITHS, A.J.F. ; WESSLER, S. R.; LEWONTIN, R.C.; GELBART, W.M., SUZUKI, D.T. **Introdução à Genética**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. 743 p.

GU, S. G.; FIRE, A.; PAK, J.; GUANG, S.; MANIAR, J.; KENNEDY, S. A transgenerational impact of siRNA on chromatin: siRNA amplification in *Caenorhabditis elegans* generates a homology- targeted footprint of H3K9 methylated nucleosomes. **Nature Genetics**, v. 44, n. 2, 2013.

HE, H.; YU, F.X.; SUN, C.; LUO, Y. CBP/p300 and SIRT1 are involved in transcriptional regulation of S-phase specific histone genes. **PloS One**, v. 6, n. 7, p. e22088, jan. 2011.

HOSOI, S.; SAKUMA, T.; SAKAMOTO, N.; YAMAMOTO, T. Targeted mutagenesis in sea urchin embryos using TALENs. **Development, Growth & Differentiation**, v. 56, n. 1, p. 92–7, jan. 2014.

HUERTAS, P.; JACKSON, S. P. Human CtIP mediates cell cycle control of DNA end resection and double strand break repair. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 14, p. 9558–65, 3 abr. 2009.

HUNTER CP. Genetics: A touch of elegance with RNAi. **Current Biology**, v. 9. p. 440-442, 1999.

ICHIMURA, T.; WATANABE, S.; SAKAMOTO, Y.; AOTO, T.; FUJITA, N.; NAKAO, M. Transcriptional repression and heterochromatin formation by MBD1 and MCAF/AM family proteins. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 14, p. 13928–35, 8 abr. 2005.

KATADA, H ; HARUMOTO, T.; SHIGI, N.; KOMIYAMA, M. Chemical and biological approaches to improve the efficiency of homologous recombination in human cells mediated by artificial restriction DNA cutter. **Nucleic Acids Research**, v. 40, n. 11, p. e81, jun. 2012.

KAY, S.; HAHN, S.; MAROIS, E.; HAUSE, G.; BONAS, U. A bacterial effector acts as a plant transcription factor and induces a cell size regulator. **Science (New York, N.Y.)**, v. 318, n. 5850, p. 648–51, 26 out. 2007.

KEREM, A. B. KEREM, B.S.; ROMMENS, J. M.; BUCHANAN, J. A.; MARKIEWICZ, D.; COX, T.; CHAKRAVARTI, A.; BUCHWALD, M.; TSUI, L.C. Identification of the Genetic Cystic Fibrosis Analysis Gene : **American Association for the Advancement of Science**, v. 245, n. 4922, p. 1073–1080, 1989.

LAISHRAM, R. S. Poly(A) polymerase (PAP) diversity in gene expression - Star-PAP vs canonical PAP. **FEBS letters**, v. 588, n. 14, p. 2185–2197, 27 jun. 2014

LANGERAK, P.; RUSSELL, P. Regulatory networks integrating cell cycle control with DNA damage checkpoints and double-strand break repair. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences**, v. 366, n. 1584, p. 3562–71, 27 dez. 2011.

LIANG, Z.; ZHANG, K.; CHEN, K.; GAO, C. Targeted mutagenesis in *Zea mays* using TALENs and the CRISPR/Cas system. **Journal of Genetics and Genomics**, v. 41, n. 2, p. 63–8, 20 fev. 2014.

LINGER, J. G.; TYLER, J. K. Chromatin Disassembly and Reassembly During DNA Repair. **Mutation Research**, v. 618, n. 1-2, p. 52–64, 2007.

LIU, L.; ISHIHARA, K.; ICHIMURA, T.; FUJITA, N.; HINO, S.; TOMITA, S.; WATANABE, S.; SAITOH, N.; ITO, T.; NAKAO, M. MCAF1/AM is involved in Sp1-mediated maintenance of cancer-associated telomerase activity. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 8, p. 5165–74, 20 fev. 2009.

LODISH, H.; DARNELL J. E.; BALTIMORE, D. **Biologia Celular e Molecular**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 1054 p

LUO, Y. WANG, X.; YU, D.; KANG, L. The SID-1 double-stranded RNA transporter is not required for systemic RNAi in the migratory locust. **RNA Biology**, v. 9, n. 5, p. 1–9, 2012.

MA, S.; ZHANG, S.; WANG, F.; LIU, Y.; LIU, Y.; XU, H.; LIU, C.; LIN, Y.; ZHAO, P.; XIA, Q. Highly efficient and specific genome editing in silkworm using custom TALENs. **PloS One**, v. 7, n. 9, p. e45035, jan. 2012.

MASHIMO, T.; KANEKO, T.; SAKUMA, T.; KOBAYASHI, J.; KUNIHIRO, Y.; VOIGT, B.; YAMAMOTO, T.; SERIKAWA, T. Efficient gene targeting by TAL effector nucleases coinjected with exonucleases. **Scientific Reports**, v. 3, n. 1253, p. 1–6, 2013.

MATHUPALA, S. P.; SLOAN, A. E. An agarose-based cloning-ring anchoring method for isolation of viable cell clones. **Biotechniques**, v. 46, n. 4, p. 305–307, 2010.

MICKLOS, D. A.; FREYER, G.A.; CROTTY, D. A.. **A Ciência do DNA**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 575 p

MURUGAN, S.; CHANDRAMOHAN, A.; LAKSHMI, B. R. Use of multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) for Duchenne muscular dystrophy (DMD) gene mutation analysis. **The Indian Journal of Medical Research**, v. 132, n. September, p. 303–11, set. 2010.

MUSSOLINO, C.; ALZUBI, J.; FINE, E. J.; MORBITZER, R.; CRADICK, T. J.; LAHAYE, T.; BAO, G.; CATHOMEN, T. TALENs facilitate targeted genome editing in human cells with high specificity and low cytotoxicity. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. 10, p. 6762–73, jan. 2014.

OIKE, T.; OGIWARA, H.; NAKANO, T.; KOHNO, T. Histone Acetyltransferases (HATs) Involved in Non-Homologous End Joining as a Target for Radiosensitization. In: KATARIA, T (Ed). **Frontiers in Radiation Oncology**. Rijeka: InTech, 2013. p. 3-12

OGIWARA, H.; UI, A.; OTSUKA, A.; SATOH, H.; YOKOMI, I.; NAKAJIMA, S.; YASUI, A.; YOKOTA, J.; KOHNO, T. Histone acetylation by CBP and p300 at double-strand break sites facilitates SWI/SNF chromatin remodeling and the recruitment of non-homologous end joining factors. **Oncogene**, v. 30, n. 18, p. 2135–2146, 2011.

- OGIWARA, H.; KOHNO, T. Essential factors for incompatible DNA end joining at chromosomal DNA double strand breaks in vivo. **PloS One**, v. 6, n. 12, p. e28756, jan. 2011.
- OGIWARA, H.; KOHNO, T. CBP and p300 histone acetyltransferases contribute to homologous recombination by transcriptionally activating the BRCA1 and RAD51 genes. **PloS One**, v. 7, n. 12, p. e52810, jan. 2012.
- OUSTEROUT, D. G.; PEREZ-PINERA, P.; THAKORE, P. I.; KABADI, A. M.; BROWN, M. T.; QIN, X.; FEDRIGO, O.; MOULY, V.; TREMBLAY, J. P.; GERSBACH, C. Reading frame correction by targeted genome editing restores dystrophin expression in cells from Duchenne muscular dystrophy patients. **Molecular Therapy: the Journal of the American Society of Gene Therapy**, v. 21, n. 9, p. 1718–26, set. 2013.
- PANDA, S. K.; WEFERS, B.; ORTIZ, O.; FLOSS, T.; SCHMID, B.; HAASS, C.; WURST, W.; KÜHN, R. Highly efficient targeted mutagenesis in mice using TALENs. **Genetics**, v. 195, n. 3, p. 703–13, 2013.
- PATTANAYAK, V.; RAMIREZ, C. L.; JOUNG, J. K.; LIU, D. Revealing off-target cleavage specificities of zinc-finger nucleases by in vitro selection. **Nature Methods**, v. 8, n. 9, p. 765–70, set. 2011.
- PELLETIER, R.; CARON, S. O. P.; PUYMIRAT, J. RNA based gene therapy for dominantly inherited diseases. **Current Gene Therapy**, v. 6, n. 1, p. 131–146, 2006.
- POWELL, S. N.; KACHNIC, L. A. Roles of BRCA1 and BRCA2 in homologous recombination, DNA replication fidelity and the cellular response to ionizing radiation. **Oncogene**, v. 22, n. 37, p. 5784–91, 1 set. 2003.
- RAJENDRAN, P.; HO, E.; WILLIAMS, D. E.; DASHWOOD, R. H. Dietary phytochemicals, HDAC inhibition, and DNA damage/repair defects in cancer cells. **Clinical Epigenetics**, v. 3, n. 1, p. 4, jan. 2011.
- RAMIREZ, C. L.; CERTO, M. T.; MUSSOLINO, C.; GOODWIN, M. J.; CRADICK, T. J.; MCCAFFREY, A. P.; CATHOMEN, T.; SCHARENBERG, A. M.; JOUNG, J. K. Engineered zinc finger nickases induce homology-directed repair with reduced mutagenic effects. **Nucleic Acids Research**, v. 40, n. 12, p. 5560–8, jul. 2012.
- RÖMER, P.; RECHT, S.; LAHAYE, T. A single plant resistance gene promoter engineered to recognize multiple TAL effectors from disparate pathogens. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 48, p. 20526–31, 1 dez. 2009.
- ROY, S.; NASSER, S.; YEE, M.; GRAVES, D. T.; ROY, S. A long-term siRNA strategy regulates fibronectin overexpression and improves vascular lesions in retinas of diabetic rats. **Molecular Vision**, v. 17, n. May, p. 3166–74, jan. 2011.
- SAKUMA, T.; HOSOI, S.; WOLTJEN, K.; SUZUKI, K. I.; KASHIWAGI, K.; WADA, H.; OCHIAI, H.; MIYAMOTO, T.; KAWAI, N.; SASAKURA, Y.; MATSUURA, S.; OKADA, Y.; KAWAHARA, A.; HAYASHI, S.; YAMAMOTO, T. Efficient TALEN construction and

evaluation methods for human cell and animal applications. **Genes to Cells**, v. 18, n. 4, p. 315–26, abr. 2013

SASAI, N.; SAITOH, N.; SAITOH, H.; NAKAO, M. The transcriptional cofactor MCAF1/ATF7IP is involved in histone gene expression and cellular senescence. **PloS One**, v. 8, n. 7, p. e68478, jan. 2013.

SASAKI, K.; MIZUSAWA, H.; ISHIDATE, M.; TANAKA, N et al. Regulation of G418 selection efficiency by cell-cell interaction in transfection. **Somatic Cell and Molecular Genetics**, v. 18, n. 6, p. 517–27, nov. 1992.

SCHOLZE, H.; BOCH, J. TAL effector-DNA specificity. **Virulence**, v. 1, n. 5, p. 428–432, 2010.

SHI, Y.; LAN, F.; MATSON, C.; MULLIGAN, P.; WHETSTINE, J. R.; COLE, P. A.; CASERO, R. A.; SHI, Y. Histone Demethylation Mediated by the Nuclear Amine Oxidase Homolog LSD1 77 Avenue Louis Pasteur. **Cell**, v. 119, p. 941–953, 2004.

SINGH, R. K.; LIANG, D.; GAJJALAHVARI, U. R.; KABBAJ, M. H. M.; PAIK, J.; GUNJAN, A. Excess histone levels mediate cytotoxicity via multiple mechanisms. **Cell Cycle**, v. 9, n. 20, p. 4236–4244, 15 out. 2010.

SMITH, J.; BIBIKOVA, M.; WHITBY, F. G.; REDDY, A. R.; CHANDRASEGARAN, S.; CARROLL, D. Requirements for double-strand cleavage by chimeric restriction enzymes with zinc finger DNA-recognition domains. **Nucleic Acids Research**, v. 28, n. 17, p. 3361–9, 1 set. 2000.

SPIN, J. M.; QUERTERMOUS, T.; TSAO, P. S. Chromatin remodeling pathways in smooth muscle cell differentiation, and evidence for an integral role for p300. **PloS One**, v. 5, n. 12, p. e14301, jan. 2010.

TAKATA, M.; SASAKI, M. S.; SONODA, E.; MORRISON, C.; HASHIMOTO, M.; UTSUMI, H.; YAMAGUCHI-IWAI, Y.; SHINOHARA, A.; TAKEDA, S. Homologous recombination and non-homologous end-joining pathways of DNA double-strand break repair have overlapping roles in the maintenance of chromosomal integrity in vertebrate cells. **The EMBO Journal**, v. 17, n. 18, p. 5497–508, 15 set. 1998. .

TAO, Y.F.; PANG, L.; DU, X. J.; SUN, L. C.; HU, S. Y.; LU, J.; CAO, L.; ZHAO, W.L.; FENG, X.; WANG, J.; WU, D.; WANG, N.; NI, J.; PAN, J. Differential mRNA expression levels of human histone-modifying enzymes in normal karyotype B cell pediatric acute lymphoblastic leukemia. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 2, p. 3376–94, jan. 2013.

TAVARES, K. C. S.; PINHO, R. M.; CARNEIRO, I. S.; AGUIAR, L.H.; MENDEZ, C. E. M.; MARTINS, L. T. AMBRÓSIO, C.E.; MAGA, E. A.; BERTOLINI, M.; MURRAY, J. D.; BERTOLINI, L. R. Efficient RNAi-induced Protein Knockdown in Somatic Cells Using Diced or Chemically Produced Small Interfering RNAs (siRNA). **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 40, n. 3, p. 19–23, 2012.

UCHIMURA, Y.; ICHIMURA, T.; UWADA, J.; TACHIBANA, T.; SUGAHARA, S.; NAKAO, M.; SAITOH, H. Involvement of SUMO modification in MBD1- and MCAF1-mediated heterochromatin formation. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 32, p. 23180–90, 11 ago. 2006.

UHDE-STONE, C.; CHEUNG, E.; LU, B. TALE activators regulate gene expression in a position- and strand-dependent manner in mammalian cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 443, n. 4, p. 1189–94, 24 jan. 2014.

URNOV, F. D.; MILLER, J. C.; LEE, Y. L.; BEAUSEJOUR, C. M.; ROCK, J. M.; AUGUSTUS, S.; JAMIESON, A. C.; PORTEUS, M. H.; GREGORY, P. D.; HOLMES, M. C. Highly efficient endogenous human gene correction using designed zinc-finger nucleases. **Nature**, v. 435, n. 7042, p. 646–51, 2 jun. 2005.

VEMPATI, R. K.; JAYANI, R. S.; NOTANI, D.; SENGUPTA, A.; GALANDE, S.; HALDAR, D. p300-mediated acetylation of histone H3 lysine 56 functions in DNA damage response in mammals. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 37, p. 28553–64, 10 set. 2010.

WANG, H.; AN, W.; CAO, R.; XIA, L.; ERDJUMENT-BROMAGE, H.; CHATTON, B.; TEMPST, P.; ROEDER, R. G.; ZHANG, Y. mAM Facilitates Conversion by ESET of Dimethyl to Trimethyl Lysine 9 of Histone H3 to Cause Transcriptional Repression University of North Carolina at Chapel Hill. **Molecular Cell**, v. 12, p. 475–487, 2003.

WANG, H.; SHI, L. Z.; WONG, C. C. L.; HAN, X.; HWANG, P. Y. H.; TRUONG, L. N.; ZHU, Q.; SHAO, Z.; CHEN, D. J.; BERNIS, M. W.; YATES, J. R.; CHEN, L.; WU, X. The Interaction of CtIP and Nbs1 Connects CDK and ATM to Regulate HR-Mediated Double-Strand Break Repair. **PLoS Genetics**, v. 9, n. 2, p. e1003277, fev. 2013.

WHITEHEAD, K. A.; LANGER, R.; ANDERSON, D. G. Knocking down barriers: advances in siRNA delivery. **Nature Reviews. Drug Discovery**, v. 8, n. 2, p. 129–38, fev. 2009.

WICKY, B. I. M.; STENTA, M.; DAL PERARO, M. TAL effectors specificity stems from negative discrimination. **PloS One**, v. 8, n. 11, p. e80261, jan. 2013.

ZAMORE, P. D.; TUSCHL, T.; SHARP, P. A.; BARTEL, D. P. RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. **Cell**, v. 101, n. 1, p. 25–33, 31 mar. 2000.

ZARATIEGUI, M.; CASTEL, S. E.; IRVINE, D. V.; KLOC, A.; REN, J.; LI, F.; DE CASTRO, E.; MARÍN, L.; CHANG, A. Y.; GOTO, D.; CANDE, W. Z.; ANTEQUERA, F.; ARCANGIOLI, B.; MARTIENSSEN, R. A. RNAi promotes heterochromatic silencing through replication-coupled release of RNA Pol II. **Nature**, v. 479, n. 7371, p. 135–8, 3 nov. 2011.

ZHANG, F.; CONG, L.; LODATO, S.; KOSURI, S.; CHURCH, G. M.; ARLOTTA, P. Programmable Sequence-Specific Transcriptional Regulation of Mammalian Genome Using Designer TAL Effectors. **Nature Biotechnology**, v. 29, n. 2, p. 149–153, 2011.

ZHANG, F.; CONG, L.; LODATO, S.; KOSURI, S.; CHURCH, G. M.; ARLOTTA, P. Efficient construction of sequence-specific TAL effectors for modulating mammalian transcription. **Nature Biotechnology**, v. 29, n. 2, p. 149–153, 2011

ZUBER, J.; SHI, J.; WANG, E.; RAPPAPORT, A. R.; HERRMANN, H.; SISON, E. A.; MAGOON, D.; QI, J.; BLATT, K.; WUNDERLICH, M.; TAYLOR, J.; JOHNS, C.; CHICAS, A.; MULLOY, J. C.; KOGAN, S. C.; BROWN, P.; VALENT, P.; BRADNER, J. E.; LOWE, S. W.; CHRISTOPHER, R. RNAi screen identifies Brd4 as a therapeutic target in acute myeloid leukaemia. **Nature**, v. 478, n. 7370, p. 524–528, 2012.