**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
FUNDAÇÃO HEMOCENTRO DE RIBEIRÃO PRETO**

NAIARA CRISTINA PULZI SAITO VEDOVÉLI

Construção e análise funcional de vetores lentivirais de interesse biotecnológico

RIBEIRÃO PRETO

2016

NAIARA CRISTINA PULZI SAITO VEDOVELI

Construção e análise funcional de vetores lentivirais de interesse biotecnológico

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Mestrado Profissional em
Hemoterapia e Biotecnologia para obtenção do
título de Mestre em Ciências

Área de concentração: Biotecnologia

Orientadora: Dr^a Virgínia Picanço e Castro

RIBEIRÃO PRETO

2016

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Saito-Vedoveli, Naiara Cristina Pulzi

Construção e análise funcional de vetores lentivirais de interesse biotecnológico. Ribeirão Preto, 2016

151 p. : il. ; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Biotecnologia.

Orientadora: Picanço-Castro, Virgínia.

1. vetores lentivirais. 2. vetores SIN. 3. lentivírus. 4. HIV-1. 5. clonagem molecular. 6. tecnologia do DNA recombinante. 7. Runx1. 8. diferenciação hematopoética. 9. promotores específicos. 10. ITGA2b. 11. Megacariócitos. 12. Plaquetas.

Nome: SAITO-VEDOVELI, Naiara Cristina Pulzi

Título: Construção e análise funcional de vetores lentivirais de interesse biotecnológico

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Mestrado Profissional em
Hemoterapia e Biotecnologia para obtenção do
título de Mestre em Ciências

Área de concentração: Biotecnologia

Aprovado em:

Banca Examinadora

Profª Drª _____ Instituição _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Profª Drª _____ Instituição _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Drª _____ Instituição _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Dedico esse trabalho a pessoas que, ao longo de suas vidas, dedicaram muito de si próprias a mim, ajudando a construir meu caráter, valores e futuro: DEDICO:

à minha mãe, Silvia, que devotou parte de sua vida e de seu tempo ensinando-me como trilhar meus próprios caminhos e com amor incondicional ajudou a me recuperar de cada queda e me proporcionou forças para conquistar meus objetivos;

aos meus avós Sebastiana e Armando (*in memoriam*), cujos valores carregarei sempre comigo e que apoiaram com carinho, devoção e compreensão cada um de meus passos;

e ao meu marido Flávio, que escolheu partilhar sua vida comigo, construindo seus sonhos junto aos meus.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que contribuíram de forma direta ou indireta na realização desse trabalho, através de ensinamentos, auxílio na realização dos experimentos, contribuições para discussões e interpretações e aporte técnico, em especial:

À minha orientadora **Dr^a Virginia Picanço e Castro**, pela confiança depositada, pela compreensão, auxílio e orientação durante o desenvolvimento de todo o trabalho e principalmente pelos inúmeros ensinamentos, os quais contribuíram para minha formação científica e profissional;

Ao **Hemocentro de Ribeirão Preto**, pela estrutura fornecida e apoio financeiro;

À **Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP** e ao **Programa de Mestrado Profissional em Hemoterapia e Biotecnologia** pela oportunidade e pelo conhecimento adquirido ao longo da pós-graduação;

Aos **coordenadores dos laboratórios de pesquisa** do Hemocentro, Maristela, Patrícia, Simone, Kamilla e Wilson, por fornecerem estrutura para realização do trabalho;

Às companheiras de laboratório **Aline, Lilian, Marcela, Luiza e Olívia**, pelos ensinamentos e apoio na execução de cada etapa do trabalho e pelo conhecimento construído que permitiu me tornar uma profissional melhor;

À **Annemarie e Adriana**, pelo auxílio na execução e interpretação do sequenciamento;

Ao **Mário**, pela ajuda na execução do ensaio de ELISA;

À **Carmen**, por ser sempre atenciosa e solícita;

À **Raquel e Adriana**, secretárias do programa de Mestrado Profissional em Hematologia e Biotecnologia pela ajuda com as questões burocráticas;

À **Sandra Navarro**, pela disposição e auxílio na diagramação das imagens;

À **Marjory**, pelo auxílio técnico na publicação do Manual de Construção de Vetores de Expressão;

À todos **funcionários do Hemocentro**, que contribuíram de forma direta ou indireta no desenvolvimento do trabalho;

Aos membros da banca examinadora, **Prof^a Dr^a Elisa Maria de Souza Russo** e **Dr^a Marcela Cristina Correa de Freitas**, pelo aceite, críticas construtivas e valiosas contribuições para o trabalho.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Agradeço imensamente à **minha família**, que representam a base do que sou e que estão presentes em todos momentos de minha vida, oferecendo apoio, incentivo e carinho; em especial:

À minha mãe, **Silvia**, meu exemplo, meu ídolo, minha fortaleza e meu amor; que sempre valorizou cada pequeno gesto e cada pequena conquista minha, que me ensinou valores que carrego até hoje; que foi mãe quando necessário, e amiga em todas as horas e que, sem saber, foi a principal responsável pelo caminho que trilhei para chegar até aqui;

À minha avó, **Sebastiana**, minha segunda mãe, a mulher mais prestativa que conheço, sempre disposta a atender as solicitações de seus queridos, proporcionando carinho e conforto e que esteve sempre presente, cobrando minhas responsabilidades e comemorando as conquistas; e ao meu avô **Armando** (*in memorian*), que esteve presente desde meus primeiros passos até o início deste trabalho, ao qual sempre procurei para pedir os conselhos mais sinceros e me deu broncas e apoio na medida certa;

Aos meus avós **Irene e Jorge**, que sempre torceram pelo meu sucesso e comemoraram minhas conquistas; pelos abraços apertados de saudade e cheios de carinho, pelos ensinamentos ao longo da vida, por entenderem a ausência quando necessária, mas estarem sempre disponíveis para o que fosse preciso;

E ao meu marido, **Flávio**, meu melhor amigo e companheiro, que ao escolher viver sua vida ao meu lado escolheu também passar por todas alegrias e dificuldades junto a mim; por ser paciente e estar sempre ao meu lado me incentivando, apoiando e principalmente me cobrando para que pudesse concluir cada etapa.

Agradeço às amigas de longa data, **Priscila, Bruna, Natália e Juliana**, por tantos anos de amizade, conselhos, companheirismo e confidências.

Agradeço a todos queridos **amigos do Hemocentro**, que proporcionaram anos de um convívio leve e harmonioso. Em especial:

Às queridas amigas do laboratório de biotecnologia, **Aline, Lilian, Luiza, Marcela e Olívia**, pela amizade construída ao longo desses anos, pelos dias alegres e divertidos e pelas conversas, conselhos e comilanças e por serem uma família pra mim nesses anos;

Aos queridos companheiros **Everton, Amanda, Ângelo, Júlia e Rafael**, pelo convívio harmonioso, pelas tardes divertidas, pelo companheirismo e por proporcionarem um ambiente de trabalho mais leve e divertido;

Aos demais colegas do Hemocentro, em especial aos colegas dos laboratórios de **Biologia Molecular, Terapia Celular e Biologia Celular**, pelo convívio e companheirismo;

À **Fernanda**, minha amiga e companheira de viagem em todos esses anos, por compartilhar das alegrias e angústias da jornada;

À todos aqueles que contribuíram de alguma maneira para a realização deste trabalho e para minha formação acadêmica e pessoal, **meus agradecimentos**.

*“Eu posso não ter ido para onde eu pretendia
ir, mas acho que acabei terminando onde eu
pretendia estar.”*

Douglas Adams

RESUMO

SAITO-VEDOVELI, N. C. P. **Construção e análise funcional de vetores lentivirais de interesse biotecnológico**. 2016. 151f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

Vetores lentivirais são ferramentas fundamentais para modificação celular. Sua utilização ganhou destaque devido à capacidade desses em integrar ao genoma de células que estão ou não em divisão. Grande parte dos vetores desenvolvidos são derivados do genoma do Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV-1), portanto, modificações foram necessárias a fim de evitar a formação de Partículas Competentes em Replicação (RCLs) e garantir uma utilização segura. Com as modificações, foram produzidos os vetores lentivirais de terceira geração utilizados atualmente. Esses vetores podem ser usados para expressão constitutiva de genes, produção de proteínas recombinantes, produção de animais transgênicos e terapia gênica. Com isso, torna-se necessário o desenvolvimento de vetores lentivirais para aplicação em pesquisa básica e ensaios clínicos. Dessa forma, o presente estudo teve por objetivo a construção de vetores de expressão lentivirais aplicáveis à: 1- expressão constitutiva de genes de interesse e 2- vetores com promotores específicos para expressão de proteínas em megacariócitos. Esse trabalho descreve a construção desses vetores, sua importância e discute suas possíveis aplicações. As sequências selecionadas para produção dos vetores foram: os genes *Runx1C* e *VkorC1* e os promotores proPF4 e proITGA2b. Todas as sequências encontram-se clonadas em vetor de clonagem e estoques de bactérias com esses vetores congeladas em glicerol foram confeccionados. Para a confecção dos vetores lentivirais, o gene *Runx1C* foi subclonado no vetor lentiviral base p1054-CIGWS sob controle do promotor forte CMV, enquanto o promotor proITGA2b foi subclonado no vetor base p1054-FVIII, em substituição ao promotor CMV, de forma a controlar a expressão de FVIII. Os dois vetores produzidos apresentam ainda o gene para proteína verde GFP precedida do sítio de ligação do ribossomo IRES, com expressão controlada pelo mesmo promotor interno do vetor. O trabalho possibilitou, portanto, a produção de dois vetores lentivirais bi-citrônicos: p1054-Runx1C e pL-proITGA2b-FVIII. A construção p1054-Runx1C ainda não foi sequenciada, mas foi confirmada por restrição enzimática e apresenta potencial para aplicação em estudos de diferenciação hematopoética. Já a construção pL-proITGA2b-FVIII foi sequenciada, porém sem confirmação da região de ligação do proITGA2b ao vetor. Reações de PCR e de restrição enzimática confirmaram a ligação e sequenciamento mostrou 67% de similaridade entre a região sequenciada e o promotor ITGA2b depositado no banco de dados. Análise funcional foi realizada através da transfecção desse vetor em células HEK-293T. As células transfectadas apresentaram expressão positiva para GFP e secreção de FVIII no sobrenadante celular, evidenciando que o promotor proITGA2b clonado no vetor encontra-se ativo. Esse vetor apresenta potencial para aplicação em terapia gênica para hemofilias, pois apresenta expressão do fator de coagulação direcionado a megacariócitos e plaquetas, células que estão diretamente relacionadas ao processo de coagulação, representando grandes veículos para secreção desses fatores. Ainda, os dois vetores lentivirais gerados apresentam segurança e eficiência elevadas, pois são vetores de terceira geração auto-inativantes (SIN) e apresentam elementos regulatórios que melhoram o transporte e integração do DNA ao genoma hospedeiro.

Palavras-chave: vetores lentivirais, vetores SIN, lentivírus, HIV-1, clonagem molecular, tecnologia do DNA recombinante, *Runx1*, diferenciação hematopoética, promotores específicos, ITGA2b, megacariócitos, plaquetas

ABSTRACT

SAITO-VEDOVELI, N. C. P. **Construction and functional analysis of lentiviral vectors for biotechnological purposes.** 2016. 151f. Dissertation (Master Degree). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

Lentiviral vectors are fundamental tools for cell modification that gained prominence due to their ability to integrate the genome of non-dividing cells. Most of developed lentiviral vectors are derived from the genome of Human Immunodeficiency Virus (HIV-1), so modifications were necessary in order to avoid the formation of Competent Replication Particles (RCLs) and ensure safer operations. The modifications led to development of third generation lentiviral vectors currently used. These vectors can be used for constitutive gene expression, production of recombinant protein, production of transgenic animals and gene therapy. It's evident the need to develop lentiviral vectors for application in basic research and clinical trials. Thus this study aimed to construct lentiviral expression vectors applicable to: 1- constitutive expression of genes of interest and 2-vectors with specific promoters for expression of proteins in megakaryocytes and platelets. This paper describes the construction of these vectors, their importance and discuss their possible applications. Sequences were selected for production of the vectors: genes *Runx1C* and *VkorC1* and proPF4 and proITGA2b promoters. All four sequences are cloned into cloning vectors and stocks of bacteria with these vectors frozen in glycerol were prepared. Lentiviral vectors were engineered from subcloning the sequence *Runx1C* into the basic lentiviral vector p1054-CIGWS under control of the strong CMV promoter, and from subcloning proITGA2b promoter into p1054-FVIII basic vector, replacing the CMV promoter in order to control the expression of FVIII. Both vectors exhibit the green fluorescence protein GFP gene preceded by a ribosome binding site IRES under control of vector's internal promoter. Therefore, this work resulted in the production of two bi-cistronic lentiviral vectors: p1054-Runx1C and pL-proITGA2b-FVIII. The p1054-Runx1C construction has not yet been sequenced, but it was confirmed by digestion and has potential for use in hematopoietic differentiation studies. Though, pL-proITGA2b-FVIII construct was sequenced, but the technique didn't allow to confirm the binding region between proITGA2b and the vector. Although PCR reaction and digestion confirmed the construction. Sequence analysis showed 67% similarity between the sequenced region and ITGA2b promoter deposited in the database. Functional analysis was performed by transfection of this vector in HEK-293T cells. The transfected cells showed positive expression of GFP and FVIII secretion in cell supernatant, indicating that the proITGA2b promoter cloned into the vector is active. This vector has potential usage in gene therapy for hemophilia, since it can be used to express coagulation factors in megakaryocytes and platelets and these cells are directly related to the clotting process, representing great vehicles for secretion of these factors. Even more, the two lentiviral vectors generated have higher safety and efficiency, as they are self-inactivating (SIN) third-generation vectors and have regulatory elements that enhance transport and integration of DNA into the host genome.

Key words: lentiviral vectors, SIN vectors, lentivirus, HIV-1, molecular cloning, recombinant DNA technology, *Runx1*, hematopoietic differentiation, specific promoters, ITGA2b, megakaryocytes, platelets

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Estrutura viral de um virion da família <i>Retroviridae</i>	21
Figura 2 -	Representação esquemática do genoma do provirus do HIV-1.....	23
Figura 3 -	Esquema simplificado do ciclo de vida de um lentivírus.....	23
Figura 4 -	Representação esquemática das gerações de vetores lentivirais construídas.....	28
Figura 5 -	Representação esquemática do ciclo da vitamina K.....	35
Figura 6 -	Fluxograma da metodologia empregada no trabalho.....	41
Figura 7 -	Mapa dos vetores de clonagem utilizados para clonagem dos fragmentos.....	50
Figura 8 -	Contig da porção inicial e final do sequenciamento para a sequência <i>Runx1C</i> clonada em vetor pUC57.....	52
Figura 9 -	Mapa dos vetores lentivirais bicistrônicos utilizados para construção lentiviral do trabalho.....	53
Figura 10 -	Curva padrão de cinco pontos para relação entre absorbância (405nm) e concentração da amostra de FVIII, em ng/mL.....	59
Figura 11 -	Região CDS do gene <i>Runx1C</i> utilizada para clonagem e produção de vetor lentiviral.....	62
Figura 12 -	Região CDS do gene <i>VkorC1</i> amplificada.....	63
Figura 13 -	Região promotora do gene <i>ITGA2b</i> amplificada para clonagem e produção de vetor lentiviral.....	64
Figura 14 -	Região promotora do gene <i>PF4</i> amplificada para clonagem e produção de vetor lentiviral.....	65
Figura 15 -	Amplificações por PCR das sequências selecionadas.....	67
Figura 16 -	Amostras de vetor e inserto submetidas à clonagem.....	68
Figura 17 -	Confirmação por PCR da clonagem das sequências em vetor pGem T- easy®.....	69
Figura 18 -	Confirmação por restrição enzimática da clonagem das sequências em vetor pGem T-easy®.....	70
Figura 19 -	Mapa da clonagem da sequência do gene <i>Runx1C</i> sintetizada pela empresa GenScript.....	70

Figura 20 -	Confirmação por restrição enzimática da clonagem da sequência <i>Runx1C</i> em vetor pUC57®.....	71
Figura 21 -	Eletroforese em gel de agarose 1% do vetor p1054-CIGWS linearizado e desfosforilado e do inserto <i>Runx1C</i> utilizado.....	72
Figura 22 -	Amplificação da sequência IRES-GFP por PCR nas colônias transformadas com a construção p1054-Runx1C.....	73
Figura 23 -	Análise de restrição da construção p1054-Runx1C.....	74
Figura 24 -	Restrição enzimática da ligação p1054-Runx1C, realizada para os materiais obtidos a partir das colônias 3A, 4A, 5C e 5D com as enzimas BamHI e BstXI.....	75
Figura 25 -	Restrição enzimática do vetor pL-proITGA2b-FVIII com enzima XhoI.....	76
Figura 26 -	Eletroforese em gel de agarose 1% do vetor pL-proITGA2b-FVIII digerido com a enzima XhoI e inserto proITGA2b purificado.....	76
Figura 27 -	Amplificação da sequência proITGA2b por PCR nas colônias transformadas com a construção pL-proITGA2b-FVIII.....	77
Figura 28 -	Confirmação por restrição enzimática da construção pL-proITGA2b-FVIII.....	78
Figura 29 -	Amplificação por PCR para sequenciamento das construções pL-proITGA2b-FVIII.....	79
Figura 30 -	Sequenciamento da construção pL-proITGA2b-FVIII.....	80
Figura 31 -	Alinhamento do contig com a base de dados nucleotídicas depositada.....	81
Figura 32 -	Fotografias das células HEK-293 transfectadas com vetor pL-proITGA2b-FVIII.....	82
Figura 33 -	Análise da expressão de GFP por citometria de fluxo das células HEK-293T transfectadas com vetor pL-proITGA2b-FVIII.....	82
Figura 34 -	Quantidade de publicações sobre vetores lentivirais publicadas no bando de dados “PubMed” (NCBI), de 2006 a 2015.....	87

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Resumo das principais características dos vetores virais mais utilizados.....	25
Tabela 2 -	Relação e características dos <i>primers</i> utilizados para amplificação das sequências alvo.....	45
Tabela 3 -	Relação e características dos <i>primers</i> utilizados para amplificação do gene endógeno <i>β-actina</i>	46
Tabela 4 -	Relação e características das enzimas utilizadas para digestão dos vetores e fragmentos para ligação.....	54
Tabela 5 -	Relação e características dos <i>primers</i> utilizados para a sequência IRES-GFP dos vetores lentivirais.....	56
Tabela 6 -	Absorbâncias e respectivas concentrações apresentadas pelas amostras de sobrenadante das células transfectadas com pL-proITGA2b-FVIII em ensaio ELISA.....	83
Tabela 7 -	Resumo das atividades e resultados obtidos no trabalho.....	86

LISTA DE ABRAVIATURAS E SIGLAS

5'/3' UTR – *Untranslated Transcription Region* – Região gênica não transcrita 5' e 3'

Amp^r – gene de resistência a ampicilina

ATCC – *American Type Culture Collection*

cDNA – DNA complementar

CDS – *Coding DNA Sequence* (Região Codificante do DNA)

CMV – promotor do citomegalovírus humano

cPPT/CTS – *central polypurine do HIV-1/central termination sequence*

ddNTP – dideoxirribonucleotídeos trifosfatos

DMEM – Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Meio de cultura)

dNTP – deoxirribonucleotídeos trifosfatos

EGFP – *enhanced green fluorescence protein* (proteína fluorescente verde melhorada)

FIX – Fator IX de coagulação sanguínea

FVII – Fator VII de coagulação sanguínea

FVIII – Fator VIII de coagulação sanguínea

gDNA – DNA genômico

IPTG – isopropylthio- β -galactoside

IRES – *internal ribosome entry site* (sítio de ligação interna do ribossomo)

Lac-Z – gene da enzima β -galactosidase

LB – Luria-Bertani (meio de cultura)

MCS – *multiple cloning site* (Sítio de Múltipla Clonagem)

mRNA – RNA mensageiro

ORI – Origem de replicação

PBMC – células mononucleadas de sangue periférico

PCR – *Polimerase Chain Reaction* (Reação em Cadeia da Polimerase)

q.s.p – quantidade suficiente para

SFB – Soro Fetal Bovino

SOC – Super Optimal broth with Catabolite repression

TAE – Tris base, Ácido acético e EDTA (tampão)

WPRE – *woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element* (elemento regulatório pós transcricional do vírus da hepatite da marmota)

x-Gal – Composto orgânico de galactose

ϕ X – 174 RF DNA/HaeIII Fragments (marcador de peso molecular)

LISTA DE SÍMBOLOS E UNIDADES

Ψ – Psi

γ – gama

[®] – marca registrada

°C – graus Celsius

μg – micrograma

pb – pares de base

μL – microlitro

ng – nanograma

μM – micromolar

mM – milimolar

U – Unidade

min. – minutos

% – porcentagem

g – grama

mL – mililitro

mmol/L – milimol por litro

$\mu\text{g/mL}$ – micrograma por mililitro

V – volts

Kb – kililobase

L – litro

β – beta

TM – Trending Market

h – horas

nm – nanômetro

rpm – rotações por minuto

seg. – segundos

$\text{ng}/\mu\text{L}$ – nanograma por microlitro

cm – centímetro

UI/mL – unidade internacional por mililitro

α – alfa

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
1.1 Lentivírus e ciclo de vida	20
1.2 Vetores lentivirais – a conversão de um lentivírus em um vetor lentiviral	24
1.2.1 Vetores lentivirais de 1ª Geração	28
1.2.2 Vetores lentivirais de 2ª Geração	29
1.2.3 Vetores lentivirais de 3ª Geração	30
1.3 Aplicações dos Vetores Lentivirais	31
1.3.1 Construção de vetores lentivirais para expressão constitutiva de genes	32
1.3.1.1 Gene <i>Runx1</i>	33
1.3.1.2 gene <i>VkorC1</i>	34
1.3.2 Construção de vetores lentivirais contendo promotores específicos	36
1.3.2.1 Promotores proPF4 e proITGA2b para guiar expressão de proteínas em megacariócitos	36
2 OBJETIVOS	39
2.1 Objetivo geral	39
2.2 Objetivos específicos	39
3 MATERIAL & MÉTODOS	41
3.1 Fluxograma	41
3.2 Sequências a serem clonadas na construção dos vetores lentivirais	42
3.2.1 Seleção das sequências	42
3.2.2 Análise das sequências no GenBank® (NIH)	42
3.3 Preparo das amostras utilizadas para amplificação	43
3.3.1 Amostras utilizadas	43
3.3.2 Extração de RNA	43
3.3.3 Extração de gDNA	43
3.3.4 Preparo de cDNA por RT-PCR	44

3.4 Amplificação das sequências	44
3.4.1 <i>Desenho dos primers</i>	44
3.4.2 <i>Amplificação por PCR</i>	46
3.4.3 <i>Determinação da integridade do material genético</i>	46
3.5 Eletroforese	47
3.5.1 <i>Separação de fragmentos de DNA por eletroforese em gel de agarose</i>	47
3.5.2 <i>Purificação de fragmentos de DNA de gel de agarose</i>	47
3.6 Cultivo de bactérias	47
3.6.1 <i>Meio de cultivo para bactéria</i>	47
3.6.2 <i>Linhagens de bactérias</i>	48
3.6.3 <i>Preparo de bactérias competentes</i>	48
3.6.4 <i>Transformação bacteriana</i>	49
3.6.5 <i>Extração de DNA plasmidial – miniprep</i>	49
3.6.6 <i>Confecção de estoques em bactéria</i>	49
3.7 Clonagem	50
3.7.1 <i>Vetores de clonagem utilizados</i>	50
3.7.2 <i>Clonagem em vetor pGem T-easy® e seleção de colônias positivas</i>	51
3.7.3 <i>Síntese do gene Runx1C</i>	51
3.8 Ligação em vetor lentiviral – subclonagem	53
3.8.1 <i>Vetores lentivirais utilizados</i>	53
3.8.2 <i>Restrição enzimática</i>	54
3.8.3 <i>Defosforilação do vetor</i>	55
3.8.4 <i>Reação de ligação em vetor lentiviral</i>	55
3.9 Confirmação da construção	55
3.9.1 <i>Confirmação por PCR</i>	55
3.9.2 <i>Confirmação por restrição enzimática</i>	56
3.9.3 <i>Sequenciamento</i>	56
3.10 Transfecção em célula animal	57
3.10.1 <i>Linhagem HEK-293T e condições de cultura</i>	57
3.10.2 <i>Transfecção por Polyethylenimine (PEI)</i>	57
3.10.3 <i>Quantificação de células GFP positivas por citometria de fluxo</i>	58
3.10.4 <i>Quantificação de produção de FVIII por ensaio de ELISA</i>	58

4 RESULTADOS	61
4.1 Análise das sequências a serem clonadas	61
4.2 Amplificação das sequências a serem clonadas	66
4.3 Clonagem das sequências amplificadas em vetor pGem T-easy®	68
4.4 Síntese e clonagem do gene <i>Runx1C</i> pela empresa GenScript®	70
4.5 Subclonagem das sequências nos vetores lentivirais	71
4.5.1 Subclonagem de <i>Runx1C</i> no vetor lentiviral p1054-CIGWS	71
4.5.2 Subclonagem do promotor <i>proITGA2b</i> no vetor p1054-FVIII	75
4.6 Sequenciamento	78
4.7 Avaliação funcional do vetor pL-proITGA2b-FVIII	81
4.7.1 Análise das células HEK-293T transfectadas	81
4.7.2 Análise de produção de FVIII por ELISA	83
4.8 Elaboração de manual de construção de vetores de expressão	85
5 DISCUSSÃO	87
6 CONCLUSÃO	97
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	99
APÊNDICE	108
Apêndice A – Manual de Construção de Vetores de Expressão	108

Introdução

1 INTRODUÇÃO

1.1 Lentivírus e ciclo de vida

Os Lentivírus compreendem espécies da família *Retroviridae*, que inclui o Vírus da Imunodeficiência Símia (SIV), Vírus da Imunodeficiência Felina (FIV), alguns vírus que infectam ungulados, como o vírus da imunodeficiência bovina, vírus da anemia infecciosa equina, vírus da artrite-encefalite caprina e Maedni-Visna vírus, além dos vírus patogênicos humanos Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV-1 e HIV-2) (ICTV – *International Committee on Taxonomy of Viruses*).

A família *Retroviridae* compreende uma família de pequenos vírus esféricos (com tamanho entre 80 – 120nm) que apresentam como material genético duas fitas-positivas de RNA fita simples (*single-stranded* RNA – ssRNA). Apresentam como característica marcante a capacidade de retrotranscrever o RNA viral em uma molécula de DNA complementar (cDNA) capaz de se integrar de forma estável ao genoma da célula-alvo (ESCORS et al., 2012). A estrutura viral dos virions (partículas virais infectantes) dessa família está representada na Figura 1. O núcleo viral é formado pelo material genético e proteínas estruturais e enzimáticas (proteínas do nucleocapsídeo - NC, transcriptase reversa - RT, integrase - IN e protease - PR), delimitados pela camada de proteínas do capsídeo (CA). Externo ao núcleo, proteínas da matriz (MA) viral formam outro invólucro que interage com o núcleo viral e com o envelope do virion. O envelope compõe a camada mais externa e consiste em uma membrana lipoproteica derivada da célula com proteínas virais adicionais. As glicoproteínas do envelope apresentam uma unidade transmembrana (TM), responsável pelo ancoramento da glicoproteína na membrana lipídica, e uma unidade de superfície (SU), que reconhece os receptores celulares da célula-alvo durante a infecção (ESCORS; BRECKPOT, 2010; JONES; MORIKAWA, 1998).

Figura 1. Estrutura viral de um virion da família *Retroviridae*. O virion de forma esférica é composto por um núcleo viral (estrutura cônica) formado pelo complexo de proteínas do nucleocapsídeo (NC) que envolve as duas fitas de material genético (ssRNA), integrase (IN), protease (PR), transcriptase reversa (RT) e capsídeo (CA). A matriz (MA) interage com o núcleo e com o envelope. A glicoproteína do envelope (ENV) é formada pela unidade de superfície (SU) ligada não-covalentemente à unidade transmembrana (TM), que ancora a glicoproteína no envelope (adaptado de ESCORS et al., 2012).

Quanto ao genoma, os retrovírus podem ser divididos em simples ou complexos, de acordo com sua organização. Retrovírus de genoma complexo, como os lentivírus, apresentam além da organização básica, vários genes acessórios e regulatórios. Para fins de caracterização do genoma lentiviral, tomaremos por base o genoma do vírus HIV-1 (figura 2), por se um vírus altamente estudado e caracterizado e do qual são derivados a maior parte dos vetores lentivirais. O genoma do HIV-1 é organizado em elementos *cis-acting* e *trans-acting*. Elementos regulatórios *cis-acting* são sequências não-codificantes essenciais para a integração e transcrição viral que devem, necessariamente, estar presente no cDNA a ser integrado. Essas sequências interagem ou fornecem sítios de ligação para proteínas codificadas pelos elementos *trans-acting*, que incluem nove genes responsáveis pela codificação de proteínas estruturais e acessórios da partícula viral, como os genes *gag*, *pol* e *env* (PLUTA; KACPRZAK, 2009; STEVENSON, 2002).

Entre as sequências *trans-acting*, o gene *gag* é responsável pela codificação de uma poliproteína que é posteriormente clivada nas proteínas estruturais da matriz (MA), do capsídeo (CA), do nucleocapsídeo (NC) e a proteína acessória p6; o gene *env* codifica a glicoproteína precursora do envelope viral, que é clivada nas glicoproteínas transmembrana (TM) e de superfície (SU) do envelope viral; e o gene *pol* codifica as enzimas transcriptase reversa (RT), protease (PR) e integrase (IN) que acompanham o

ssRNA do virion. A enzima transcriptase reversa promove a retrotranscrição das fitas de ssRNA viral em uma única molécula de cDNA, que se integra ao genoma hospedeiro. A integração é catalisada pela enzima integrase, e o DNA integrado é denominado DNA proviral ou provírus. A enzima protease é responsável pela clivagem das poliproteínas Gag e Pol, e consequente maturação dos virions recém-formados (ESCORS; BRECKPOT, 2010; KATZ, 1994). Duas proteínas regulatórias também são transcritas: tat (*transcriptional transactivator*), que é responsável pela ativação do promotor LTR, e rev (*regulator of virion gene expression*) que regula o transporte do RNA mensageiro (mRNA) transcrito do núcleo para o citoplasma. Além dessas proteínas, o genoma do HIV-1 ainda codifica quatro proteínas acessórias: nef (*negative effector*), vif (*viral infectivity factor*), vpr (*viral protein r*) e vpu (*viral protein u*), consideradas acessórias por estarem relacionadas à patogenicidade do vírus, mas não essenciais à expressão e replicação (CHINNASAMY et al., 2000; FRANKEL et al., 1998).

O DNA proviral do HIV-1 apresenta ainda diversos elementos *cis-acting*, como as sequências 5' e 3' LTR (*Long Terminal Repetitive Sequences*), que abrigam as regiões funcionais U3, U5 e R. A região U3 corresponde ao promotor do vírus e contém regiões *enhancers* e TATA box; a região U5 está relacionada com a transcrição do RNA e contém a região PBS (*primer binding site*), que dá início à transcrição reversa; e as regiões R marcam o início da transcrição (ESCORS et al., 2012). A região 5'LTR apresenta ainda a sequência TAR (*transactivation response element*) na qual a proteína tat se liga para ativar o promotor, e a região 3'LTR apresenta uma sequência de poliadenilação (polyA), marcando o final da transcrição. Outros elementos *cis-acting* importantes são o sinal de empacotamento (psi ou Ψ) que sinaliza às proteínas virais para realizar o empacotamento apenas do RNA viral transcrito, a região cPPT/CTS (*central polypurine tract/central termination sequence*), a sequência PPT (*polypurine tract*), que corresponde ao sítio de início da síntese de fitas de DNA positivas durante a transcrição reversa, e o elemento RRE (*rev response element*) (CHARNEAU et al., 1992; PLUTA; KACPRZAK, 2009; RATTRAY; CHAMPOUX, 1989; WATANABE; TEMIN, 1982).

Figura 2. Representação esquemática do genoma do provírus do HIV-1. O genoma é flanqueado pelas regiões 5' e 3' LTR, que controlam a expressão dos genes virais. Os elementos *trans-acting* correspondem aos nove genes (em caixas). Gag, pol e env codificam proteínas estruturais e enzimas, tat e rev codificam proteínas regulatórias e vif, vpr, vpu e nef proteínas acessórias. Os elementos cis-acting (TAR, PBS, cPPT/CTS, RRE, PPT e polyA) regulam a atividade promotora, transcrição e integração (adaptado de MAIER et al, 2010)

No ciclo de vida dos lentivírus (figura 3) o fluxo gênico ocorre da molécula de RNA do virion para uma molécula de cDNA, que se integra ao núcleo e transcreve em RNA novamente.

Figura 3. Esquema simplificado do ciclo de vida de um lentivírus. O receptor de membrana da célula alvo reconhece a glicoproteína do envelope do virion, mediando a fusão. O núcleo viral liberado dentro da célula forma um complexo de integração, formado por algumas proteínas do núcleo e pelo material genético. O RNA é retrotranscrito e o cDNA se integra ao genoma da célula, onde utiliza a maquinaria celular para transcrição e processamento de RNA. O RNA transportado ao núcleo é usado na montagem de novas partículas virais. Apenas as fitas ssRNA do vírus são empacotadas na formação dos virions devido ao sinal de empacotamento. No brotamento, os virions adquirem a membrana lipídica e glicoproteínas do envelope. A maturação se dá pela ação da enzima protease (adaptado de SAKUMA et al, 2012).

Na infecção, as glicoproteínas do envelope interagem com receptores da membrana da célula-alvo. A interação promove alterações conformacionais no envelope, expondo o peptídeo de fusão presente no domínio transmembrana da glicoproteína e permitindo a fusão do virion à membrana celular. O tipo de glicoproteína determina o receptor e, conseqüentemente, o tipo celular que o vírus é capaz de infectar, estando diretamente relacionado ao seu tropismo. A fusão leva à interiorização do núcleo viral no citoplasma. Segue-se um processo denominado “*uncoating*”, no qual as proteínas do núcleo viral se reorganizam, algumas delas permanecem no complexo com o material genético do virion, outras são liberadas no citoplasma e algumas podem permanecer ligadas à membrana no sítio de fusão. A reorganização leva à formação de complexo de transcrição reversa, denominado complexo pré-integração, no qual ocorre a retrotranscrição do RNA viral em cDNA, mediado pela enzima transcriptase reversa do complexo. As duas fitas de ssRNA são transcritas em uma única fita dupla de DNA (*double-stranded* DNA – dsDNA). O complexo é transportado ao núcleo através do poro nuclear e integra-se ao genoma da célula hospedeira pela ação da enzima integrase do complexo, originando o provírus. Nos lentivírus, diferente de outros retrovírus como nos gammaretrovírus, o transporte do complexo pré-integração ao núcleo se dá de forma ativa, o que permite que o vírus se integre em células quiescentes (BUKRINSKY et al., 1993). Nos gammaretrovírus, é essencial que a célula esteja em processo de divisão, momento no qual a membrana nuclear desaparece e o complexo integra-se ao genoma alvo (LEWIS; EMERMAN, 1994). Integrado ao genoma, o DNA viral é transcrito e processado pela maquinaria celular, transportado ao citoplasma, onde é traduzido nas proteínas virais. As duas fitas de ssRNA não processadas recebem o sinal de empacotamento que é reconhecida por proteínas Gag e Pol recém traduzidas e ocorre a montagem dos virions. Os novos virions são liberados por brotamento através da membrana celular, onde incorporam a camada lipídica e as glicoproteínas do envelope. Depois de liberado, ocorre a maturação dos virions pela ação da enzima protease, que cliva as poliproteínas Gag e Pol, formando as proteínas necessárias à organização do virion (ESCORS et al., 2012; STEVENSON, 2002).

1.2 Vetores lentivirais – a conversão de um lentivírus em um vetor lentiviral

O uso de retrovírus para construção de vetores foi introduzido apenas nos anos 80 (MANN et al, 1983). Desde então, vários vetores virais foram construídos como estratégia

para modificação celular, como os vetores adenovirais (revisado por VOLPERS; KOCHANKEK, 2004), vetores adenoassociados (revisado por DAYA; BERNS, 2008), gammaretrovirais (revisado por MAETZIG et al., 2011) e os vetores lentivirais (revisado por ESCORS et al., 2012). Entre esses, os vetores lentivirais ganharam destaque para aplicações em pesquisa e ensaios clínicos devido à sua capacidade de se integrar de forma estável ao genoma da célula hospedeira, garantindo uma expressão estável e duradoura do transgene, e por serem capazes de transduzir células que não estão em divisão (NALDINI et al., 1996a, 1996b). Além disso, os vetores lentivirais, em comparação aos vetores gammaretrovirais, possuem menor taxa de inserção dos fragmentos em locais potencialmente cancerígenos (HEMATTI et al., 2004; MODLICH et al., 2009).

Essas e várias características dos vetores lentivirais os tornaram a escolha de muitos centros de pesquisa. A tabela 1 apresenta resumidamente as características dos veículos virais mais utilizados:

Tabela1. Resumo das principais características dos vetores virais mais utilizados

	VETORES LENTIVIRAIS	VETORES GAMMARETROVIRAIS	VETORES ADENOVIRAIS	VETORES ADENOASSOCIADOS
Genoma	ssRNA	ssRNA	dsDNA	ssDNA
Capacidade de empacotamento*	18kb	7-7,5kb	37kb	4,9kb
Transdução de células quiescentes	Sim	Não	Sim	Sim
Integração ao genoma	Sim	Sim	Não	Raramente
Duração da expressão	Duradoura	Duradoura	Transiente	Transiente
Título viral**	10^6 - 10^7	10^6 - 10^7	10^{11} - 10^{12}	10^6 - 10^8
Respostas imunológicas	Pouca	Pouca	Extensa	Pouca
Questões de biossegurança	Mutação por inserção	Mutação por inserção	Resposta inflamatória/ toxicidade	Resposta inflamatória

*Tamanho do transgene que pode ser empacotado. **Título viral dado em unidades transduzidas/mL de linhagem celular em cultura, para vírus coletado diretamente do meio das células empacotadoras. O título viral de vetores retrovirais pode ser aumentado por outros métodos de purificação (MAIER et al., 2010; MILLER, 1997)

Grande parte dos vetores lentivirais utilizados são derivados do vírus HIV-1. Para tanto foram necessárias diversas modificações no genoma retroviral a fim de tornar a utilização desses vetores eficiente e segura. A estratégia geral para produção de vetores

lentivirais seguros é separação dos elementos essenciais à integração e transcrição do transgene (elementos *cis-acting*) daqueles usados para produção das proteínas que formam a partícula viral (elementos *trans-acting*) (ESCORS; BRECKPOT, 2010). No genoma do HIV-1, todos esses elementos são encontrados juntos no provírus, o que permite que, quando integrado à célula hospedeira, o provírus possa gerar virions completos, capazes de infectar outras células. Na produção do vetor lentiviral, esses elementos são separados em diferentes plasmídeos (vetores). Um plasmídeo, denominado vetor de expressão lentiviral, carrega o transgene e os elementos *cis-acting* para que esse seja integrado à célula-alvo. Esse vetor fornece o cDNA que será usado como molde para a produção do RNA do vetor lentiviral durante a produção do vírus. Separadamente, um ou mais plasmídeos acessórios carregam os elementos *trans-acting* que produzirão as proteínas estruturais do capsídeo e envelope durante a formação das partículas virais (PICANÇO-CASTRO et al., 2008).

Para a produção dos vírus que serão utilizados na transdução da célula-alvo os plasmídeos são co-transfectados em uma célula produtora, normalmente a célula HEK-293T (NALDINI et al., 1996a). Nesse processo, a célula produtora possui todos os elementos necessários para formação de partículas virais, porém na montagem das partículas somente o vetor de expressão é empacotado e quando os vírus formados são transfectados nas células-alvo, entregam a essa apenas o vetor de expressão. Assim, o transgene é integrado e expresso na célula-alvo devido à presença dos elementos *cis-acting*, porém a célula transduzida não é capaz de gerar RCLs (em inglês, *Replicant Competent Lentivirus* – Lentivírus Competentes em Replicação), aumentando a biossegurança do vetor utilizado. A divisão do genoma em diferentes plasmídeos dificulta ainda a formação de RCLs por recombinação entre os vetores na célula produtora (SAKUMA et al, 2012; PICANÇO-CASTRO et al, 2008).

Outra modificação realizada foi a substituição do gene *env* que codifica a glicoproteína do envelope do HIV-1 pelo gene para a Glicoproteína do envelope do Vírus da Estomatite Vesicular (VSV-G) (COIL; MILLER, 2004). Esse processo apresenta duas vantagens para a formação de vírus como veículos virais: 1) a glicoproteína de envelope original do HIV-1 é reconhecida por receptores de células CD4 (linfócitos T), limitando o tipo celular que o vírus é capaz de infectar, enquanto a glicoproteína VSV-G é reconhecida por resíduos comuns de fosfatidilserina presente na membrana de uma grande variedade de células; a substituição aumenta o tropismo do vírus e faz com que ele seja capaz de transduzir um número muito maior de células, incluindo células que não sejam

de mamíferos; 2) o VSV-G é substancialmente mais estável que a glicoproteína do envelope do HIV-1, possibilitando a purificação dos vírus formados por ultracentrifugação e obtenção de títulos virais maiores (BURNS et al., 1993). A substituição também dificulta a formação de RCLs por recombinação, uma vez que diminui a homologia existente entre o gene VSV-G e vestígios do gene *env* do HIV-1 presente no vetor do capsídeo.

De acordo com as modificações adicionais que foram realizadas, os vetores lentivirais podem ser divididos em três gerações. Os vetores de 1ª geração apresentam grande parte do genoma original do HIV-1 presente no vetor do capsídeo e é composto por três plasmídeos. Para a 2ª geração, os genes acessórios relacionados à patogenicidade do HIV-1 foram removidos do vetor do capsídeo, para aumento da biossegurança. Nos vetores lentivirais de 3ª geração a biossegurança foi aumentada através da remoção do gene *tat* do vetor do capsídeo e da modificação das sequências LTRs do vetor de expressão e adição de um promotor para regular a expressão do RNA do vetor, normalmente o promotor do citomegalovírus (CMV). A figura 4 apresenta uma as três gerações de vetores lentivirais.

Figura 4. Representação esquemática das gerações de vetores lentivirais construídas. (A) Na primeira geração o vetor do capsídeo apresenta quase todos os genes do DNA proviral do HIV-1, com exceção do gene *env* para o envelope. O gene VSV-G é codificado por um vetor diferente e o vetor de expressão apresenta as sequências LTRs e expressão do transgene regulado por um promotor interno (CMV). (B) Na segunda geração de vetores lentivirais foram removidos os genes acessórios *vif*, *vpr*, *vpu* e *nef* responsáveis pela patogenicidade do vírus. (C) Na terceira geração os gene *tat* foi removido do vetor do capsídeo e o gene *rev* é expresso a partir de um vetor separado. A deleção do promotor U3 das sequências LTR e adição do promotor forte CMV aumenta a biossegurança, gerando vetores auto-inativantes (SIN, do inglês Self Inactivated) (Adaptado de SAKUMA et al., 2012).

1.2.1 Vetores lentivirais de 1ª Geração

Os vetores lentivirais de primeira geração apresentam três plasmídeos: o vetor do capsídeo, responsável pela codificação das proteínas estruturais do capsídeo e matriz e das enzimas virais; um vetor do envelope com o gene original *env* substituído pelo VSV-G e um vetor de expressão com a construção desejada (figura 4A). O vetor do capsídeo apresenta os genes originais do HIV-1 de codificação das proteínas estruturais e enzimas *gag* e *pol*, os genes regulatórios *tat* e *env* e os genes acessórios *vif*, *vpr*, *vpu*, *nef*, com remoção parcial apenas do gene *env*. O envelope é codificado pelo gene VSV-G presente no vetor do envelope. Esses dois vetores são desprovidos de sinal de empacotamento (Ψ) e

das sequências LTR regulatórias do HIV-1, a fim de evitar a formação de RCLs. A expressão desses vetores na célula produtora é regulada pelo promotor CMV ou RSV (promotor do Vírus do Sarcoma de Rous). As sequências LTR e Ψ estão presentes apenas no vetor de expressão, portanto apenas o mRNA desse vetor é empacotado na formação dos vírus. O vetor de expressão apresenta ainda a sequência RRE e um promotor interno para regular a expressão do transgene (SAKUMA et al, 2012).

Essa primeira geração de vetores lentivirais foi especialmente desenvolvida de forma a evitar a formação de RCLs, com aumento da biossegurança na sua utilização. Entretanto, a presença das sequências LTR no vetor de expressão, que possuem a sequência U3 promotora do HIV-1, poderiam ativar proto-oncogenes quando inseridos no genoma da célula-alvo. Além disso, os elementos *vif*, *vpr*, *vpu* e *nef* estão relacionado à patogenicidade do vírus e apresentam ação citostática e citotóxica (COCKRELL; KAFRI, 2007; DELEND, 2004). A identificação dos elementos dispensáveis à ação integrativa do vetor foi essencial para o desenvolvimento de vetores de 2ª geração, com segurança aumentada.

1.2.2 Vetores lentivirais de 2ª Geração

Para os vetores de 2ª geração houve a remoção dos genes acessórios *vpr*, *vif*, *vpu* e *nef* do cassete do capsídeo, que foi composto, portanto, apenas pelos genes *gag*, *pol*, *tat* e *rev*. Os demais vetores permanecerem inalterados (figura 4B).

Os genes *vpr*, *vif*, *vpu* e *nef* são importantes para a replicação do HIV-1 em células primárias *in vivo*. O HIV-1 desprovido de *vif* não apresenta replicação quando infectados em linfócitos, pois a proteína *vif* é necessária para inativar alguns fatores antivirais da célula hospedeira (FOUCHIER et al., 1996; HARRIS et al., 2003). Sabe-se também que a proteína *vpu* age de forma semelhante, neutralizando o agente antiviral Tetherina da célula infectada (NEIL et al, 2008; SAKUMA et al., 2009). Além dessas, a proteína *nef* promove a degradação de proteínas do hospedeiro, como as proteínas MHC de classe I e CD4, promovendo uma evasão do sistema imune e maior produção de vírus (COLLINS et al., 1998). Apesar de serem importantes para a infecção do HIV-1, a remoção desses genes do vetor lentiviral não afeta sua atividade (ZUFFEREY et al., 1997).

A segurança nesses vetores foi melhorada com a múltipla atenuação dos genes virais, entretanto a possibilidade de ativação de proto-oncogenes adjacentes ao local de inserção do vetor de expressão pelo promotor U3 presente na sequência LTR ainda é

possível. Essas e outras modificações foram necessárias nos vetores de 3ª geração para construção de vetores mais seguros.

1.2.3 Vetores lentivirais de 3ª Geração

Nos vetores de 3ª geração, modificações foram realizadas no vetor do capsídeo e de expressão. No vetor do capsídeo houve a remoção do gene *tat* e separação do gene *rev* em um quarto plasmídeo, aumentando a dificuldade de recombinação dos plasmídeos e formação de RCLs. No vetor de expressão, a sequência 3'LTR foi modificada para produção de vetores auto-inativantes (SIN – do inglês *Self-inactivating*) e o promotor U3 da região 5'LTR foi substituído por um promotor forte (CMV ou RSV) para regular a expressão do vetor (figura 4C).

O gene *tat* é indispensável para transcrição do provírus integrado ao genoma no ciclo de infecção do HIV-1. Ele reconhece o sítio TAR presente na região 5'LTR, regulando a região promotora U3, que ativa a transcrição do genoma. A remoção do gene *tat* foi possível devido à substituição do promotor U3 5'LTR no vetor de expressão. A ação promove a independência de *tat* na transcrição do vetor, sem afetar a eficiência de produção (DULL et al., 1998; KIM et al., 1998).

A construção de vetores SIN já havia sido bem sucedida para vetores baseados em MLV e a mesma abordagem foi realizada para os vetores baseados em HIV-1 (YU et al., 1986). O vetor SIN é construído pela remoção de parte do U3 (Δ U3) na região 3'LTR, o que promove a inativação da atividade promotora e *enhancer* presente nessa sequência. No ciclo normal do HIV-1, as regiões LTR das extremidades 5' e 3' do provírus são igualmente compostas pelas regiões U3, R e U5. Enquanto a região 5' U3 age como promotor, a região 3' R funciona como sítio polyA que sinaliza o final da transcrição, que ocorre de 5'R a 3'R. O mRNA produzido na transcrição do vetor não possui portanto região 5'U3 promotora. Essa região é produzida por duplicação da 3'U3 durante a transcrição reversa no complexo de integração, portanto uma exclusão da sequência 3'U3 do material a ser integrado leva à mesma exclusão na sequência 5'U3 duplicada durante a inserção. Nos vetores SIN, a transcrição do mRNA do vetor de expressão na célula produtora é regulada por um promotor diferente do 5'U3 e toda região consecutiva ao promotor é transcrita. O sinal de empacotamento presente no mRNA do vetor de expressão faz com que esse seja corretamente empacotado na formação das partículas virais. Quando as partículas virais são transduzidas na célula-alvo, a deleção 3'U3 é

transferida por duplicação para a região 5'LTR, formando um vetor integrado incapaz de se replicar. A expressão da construção gênica desejada é regulada pelo promotor interno e os mRNAs gerados não possuem o sinal de empacotamento (GINN et al., 2003; MIYOSHI et al., 1998; ZUFFEREY et al., 1998).

A produção de vetores SIN aumenta a segurança dos vetores lentivirais de 3ª geração por diversos motivos: 1) a formação de RCLs é pouco provável, visto que a região promotora original do vírus está desligada no material integrado; 2) a ativação de proto-oncogenes adjacentes ao local da inserção por atividade promotora da região 3'U3 é evitada ; 3) a translocação da construção inserida por empacotamento da mesma após infecção por um tipo selvagem de vírus é reduzida pois o mRNA transcrito no vetor integrado não apresenta sinal de empacotamento e 4) a interferência transcricional pelas sequências LTR é reduzida (SAKUMA et al, 2012; PIKANÇO-CASTRO, 2008).

Outras modificações foram feitas no vetor de expressão para melhorar sua eficiência. As sequências cPPT e CTS foram adicionadas para melhorar a importação do complexo de integração para o núcleo (SIRVEN et al., 2000) e a adição do elemento regulatório da transcrição do vírus da hepatite de marmota (WPRE) aumenta a estabilidade de transcrito e a expressão (ZUFFEREY et al., 1999).

1.3 Aplicações dos Vetores Lentivirais

Vetores lentivirais têm sido usados eficientemente na transdução de grande variedade de tipos celulares, em tanto em células em divisão, quanto estacionárias, como: células hematopoéticas, células dendríticas e neurônios (DEMAISON et al., 2002; DULL et al., 1998; NALDINI et al., 1996b; POESCHLA et al, 1998). O interesse em sua utilização reside-se no fato desses vetores serem capazes de infectar células em divisão e estacionárias e ainda por integrar o DNA no genoma hospedeiro. Nesses vetores, o DNA clonado no vetor de expressão é integrado ao genoma e expresso pela maquinaria celular. A expressão é guiada pelo promotor interno da construção gênica do vetor de expressão, que também é integrado ao genoma. Por estar integrada, a construção é ainda replicada durante a divisão celular, gerando células descendentes que também expressam o gene (MILLER, 1997).

Os vetores de expressão lentivirais podem ser construídos com estruturas gênicas complexas, para produção de uma ou mais proteínas pela célula. Para isso, são produzidos vetores multigênicos, nos quais a mesma construção gênica guia a produção de duas ou mais

proteínas. Esse processo pode ser feito através da inserção de mais de um cassete de expressão no vetor, no qual cada proteína é expressa independentemente, cada qual guiada por um promotor diferente (YU et al., 2003), ou através da construção de vetores policistrônicos, no qual a expressão dos genes é regulada por um mesmo promotor interno. Na construção de vetores policistrônicos, as sequências gênicas são ligadas por um componente IRES (Sítio interno de ligação do ribossomo), que possibilita a expressão de duas proteínas independentes transcritas pelo mesmo promotor (ZHU, 2001) ou pela adição do peptídeo 2A, que cliva a poliproteína produzida em proteínas independentes (SZYMCZAK et al., 2004).

Sendo assim, os vetores lentivirais podem ser utilizados para expressão de diversas construções gênicas de forma duradoura nas células de interesse. A utilização de promotores internos específicos a determinadas linhagens celulares na construção lentiviral a ser transduzida pode ser uma alternativa para expressão direcionada de genes. As construções podem ser transduzidas com o objetivo de se expressar genes constitutivos para análise do desenvolvimento celular ou para produção de proteínas recombinantes, incluindo produção de fatores de coagulação como o FVIII (DA ROSA et al., 2012; KOOTSTRA et al., 2003). Vetores lentivirais também podem ainda ser usados para produção de animais transgênicos (MCGREW et al., 2004), para regulação da expressão gênica na célula-alvo, através do fornecimento a essa de fatores para regulação transcricional ou pós-transcricional (MILLER, 1997) e para reprogramação celular através da expressão de fatores de transcrição específicos (PICANÇO-CASTRO et al., 2011).

Além desses, o uso de vetores lentivirais em terapia gênica tem ganhado cada vez mais adeptos. Até o ano de 2015, aproximadamente 114 ensaios clínicos para terapia gênica utilizando vetores lentivirais foram aprovados (<http://www.wiley.com/legacy/wileychi/genmed/clinical/>).

Neste projeto visamos o desenvolvimento de vetores lentivirais para: 1) expressão constitutiva de genes, sendo os genes *Runx1C* e *VkorC1* selecionados para esse fim e 2) vetores contendo promotores específicos, para expressão direcionada de genes, sendo os promotores dos genes *PF4* e *ITGA2b* (proPF4 e proITGA2b) selecionados.

1.3.1 Construção de vetores lentivirais para expressão constitutiva de genes

Os vetores lentivirais podem ser usados para expressão de construções gênicas em células ou organismos-alvos de forma constitutiva, a fim de guiar seu desenvolvimento ou melhorar algum processo celular. Como o vetor lentiviral apresenta integração, a expressão se

dá de forma duradoura. Para isso, o gene (ou genes) de interesse devem ser transduzidos na célula e seu desenvolvimento deve ser monitorado. Os genes *Runx1C* e *VkorC1* foram selecionados nesse trabalho devido às suas características e aplicações.

1.3.1.1 Gene *Runx1*

O gene *Runx1* (em inglês, *runt-related transcription factor-1*), também conhecido por AML-1 (acute myelogenous leukemia-1), foi inicialmente relacionado com translocações no cromossomo 21, as quais têm importante papel em processos que levam ao desenvolvimento de leucemias mielóides agudas (MIYOSHI et al., 1991; NUCIFORA; ROWLEY, 1995). Esse gene codifica a transcrição da subunidade de ligação ao DNA da proteína heterodimérica CBF (Core binding-factor), também conhecida por PEBP2 (*polyomavirus enhancer binding protein 2*), participando, portanto, diretamente na regulação da transcrição de diversos genes (OGAWA et al., 1993; WANG et al., 1993).

Já em 1996, Okuda e colaboradores demonstraram o papel desse gene na diferenciação hematopoética, através do desenvolvimento de camundongos transgênicos deficientes em *Runx1*. Esses camundongos apresentaram morte durante o desenvolvimento fetal devido à insuficiência de produção de células hemetopoéticas no fígado, demonstrando que esse gene, ou os genes regulados por ele, é essencial para o estabelecimento da hematopoese durante a embriogenese (OKUDA et al., 1996).

Foi demonstrado também que a expressão desse gene é fundamental para que Células-tronco Hematopoéticas (CTHs) possam emergir durante o desenvolvimento embrionário no sítio de produção de células hematopoéticas conhecido como região Aorta-Gônada-Mesonefros (AGM), na qual células endoteliais do chamado Endotélio Hemogênico (EH) originam células hematopoéticas que constituem os sítios de produção definitiva de células hematopoéticas na medula óssea. As células do EH, células hematopoéticas recém-formadas e todas CTHs funcionais apresentam expressão do gene *Runx1*, demonstrando seu papel fundamental na produção das CTHs definitivas em camundongos (CHEN et al., 2009; NORTH et al., 1999; NORTH et al., 2002).

O gene *Runx1* apresenta três isoformas, denominadas *Runx1A* (variante 3), *Runx1B* (variante 2) e *Runx1C* (variante 1), determinadas pela expressão diferencial do gene através da ativação de diferentes promotores, e pelo processamento pós-transcricional do gene (MARKOVA et al., 2012). Estudos realizados por Challen & Goodell (2010) mostraram que a isoforma C somente é expressa durante a formação de CTHs definitivas, demonstrando que o

papel na determinação funcional de CTHs está relacionada principalmente com essa isoforma. A expressão dessa isoforma em CTEs mostrou capacidade elevada na formação de CTHs definitivas a partir das células transduzidas (REAL et al., 2013).

Os estudos mostram que o gene *Runx1* participa diretamente da diferenciação hematopoética durante a fase embrionária e é essencial para a produção de CTHs, responsáveis pela produção de células hematopoéticas adultas funcionais, e que a isoforma C é a principal relacionada com essa função. Assim sendo, um vetor lentiviral com esse gene pode ser usado na transdução de células pluripotentes para estudos de diferenciação hematopoética e para a produção de células hematopoéticas definitivas.

1.3.1.2 gene *VkorC1*

O gene *VkorC1* compreende o gene chave do complexo enzimático VKOR (Vitamin K epoxide reductase), que atua diretamente no ciclo da vitamina K, reduzindo o epóxido K_{2,3} da vitamina K (KO) para a forma nativa da vitamina K. A vitamina K é essencial na carboxilação de resíduos de ácido glutâmico em algumas proteínas, denominadas proteínas dependentes de vitamina K, como os fatores de coagulação sanguínea VII e IX (FVII e FIX) (OLDENBURG et al., 2006).

No processo de carboxilação dessas proteínas, a enzima gamma-glutamil carboxilase (GGCX) utiliza a forma reduzida da vitamina K (KH₂) para conversão do ácido glutâmico (Glu) em γ -carboxiglutamato (Gla). Se a carboxilação não é corretamente realizada, as proteínas resultantes não apresentam estrutura conformacional adequada, apresentando perda de função. Ao ser utilizada na carboxilação, a KH₂ é convertida novamente a KO, que retorna ao ciclo da vitamina da vitamina K, no qual o complexo VKOR age (figura 5) (TIE; STAFFORD, 2016).

Figura 5. Representação esquemática do ciclo da vitamina K. O complexo VKOR age no ciclo convertendo o epóxido K_{2,3} da vitamina K (KO) em vitamina K nativa, que é reduzida a KH₂. A forma reduzida KH₂ é utilizada pela enzima gamma-carboxil carboxilase (GGCX) para a conversão de resíduos de ácido glutâmico (glu) em γ-carboxilglutamato (gla), sendo convertida em KO novamente (TIE; STAFFORD, 2016).

Assim, o gene *VkorC1* tem importante papel na produção de proteínas de coagulação carboxiladas e biologicamente ativas. A produção de proteínas de coagulação sanguínea dependentes de vitamina K é de grande interesse comercial, visto que drogas baseadas nesses fatores de coagulação são utilizadas para o tratamento de diversas desordens de coagulação, como a hemofilia B. Um grande problema na produção de fatores de coagulação é a insuficiência da carboxilação dessas proteínas, gerando proteínas não ativas (OLDENBURG et al., 2007). A suplementação de vitamina K aos meios de cultura das células produtoras de fatores de coagulação é uma estratégia bastante utilizada para aumentar a quantidade de proteínas ativas secretadas. Entretanto, o acúmulo do epóxido K_{2,3} da vitamina K é potencialmente citotóxico, levando à morte e diminuição das células.

Outra estratégia utilizada para melhora na carboxilação e produção desses fatores de coagulação é a co-expressão de genes relacionados à carboxilação. A expressão da enzima GGCX foi realizada em células CHO produtoras de FIX, porém não houve melhora significativa na carboxilação dessas proteínas (REHEMTULLA et al., 1993). Isso se dá pois a carboxilação depende diretamente da reciclagem da vitamina K, realizada pelo complexo VKOR. O gene *VkorC1* se mostra como elemento chave e limitante da carboxilação dessas proteínas.

Assim, a expressão de *VkorC1* em células produtoras de proteínas dependentes de vitamina K pode levar à melhora na carboxilação através da reciclagem da vitamina K, diminuindo a necessidade de acréscimo dessa ao meio de cultura e evitando o acúmulo do

epóxido K_{2,3} da vitamina K, que aumenta a citotoxicidade (LIU et al., 2014). Sendo assim, a construção de um vetor lentiviral com esse gene apresenta grande aplicação na produção de proteínas gamma-carboxiladas, incluindo os fatores de transcrição sanguíneos.

1.3.2 Construção de vetores lentivirais contendo promotores específicos

A expressão direcionada da construção pode ser conseguida através da utilização de promotores específicos. Promotores são sequências de DNA reguladoras, que ativam a transcrição do gene, situados na região 5' UTR do mesmo. A vantagem da utilização de promotores célula- ou tecido-específicos é que esses apresentam menores chances de inativação pela célula ou ativação da maquinaria de defesa da célula, promovendo uma expressão estável e duradoura (LIU et al., 2004), além de serem ativos somente na célula-alvo, evitando uma superexpressão da construção desejada e aumentando a segurança do vetor utilizado. Vários vetores com expressão direcionada já foram produzidos, incluindo vetores para linhagem eritróide (MOREAU-GAUDRY et al., 2001), endotelial (DE PALMA et al., 2003) e nervosa (GASCÓN et al., 2008; GREENBERG et al., 2007; KURODA et al., 2008).

Para este trabalho, duas regiões promotoras foram escolhidas para serem clonadas em vetor lentiviral contendo o gene do fator VIII, com intenção de expressão direcionada em megacariócitos: promotor do gene PF4 (proPF4) e promotor do gene ITGA2b (proITGA2b)

1.3.2.1 Promotores proPF4 e proITGA2b para guiar expressão de proteínas em megacariócitos

O gene PF4 (Platelet factor 4) codifica a produção de uma proteína da família das quimiocinas, que é liberada a partir de plaquetas ativas. Essa proteína tem uma conformação homotetramétrica com alta afinidade por heparina, sendo responsável pela agregação plaquetária durante a coagulação (ZUCKER; KATZ, 1991). Já o gene ITGA2b (Integrin subunit alpha 2b), também conhecido por CD41, codifica a produção da cadeia alfa-2b da proteína integrina, uma proteína transmembrana de cadeia heterodimérica responsável por mediar a adesão entre as células e entre a célula e matriz extracelular, estando relacionada à adesão entre plaquetas durante a coagulação sanguínea (HOLTKOTTER et al., 2002).

Estando intimamente relacionados à coagulação sanguínea, os dois genes encontram-se especificamente expressos em megacariócitos e plaquetas. Os promotores específicos desses dois genes apresentam, portanto, aplicações em terapias que visem a expressão

direcionada de genes nesses tipos celulares. Terapias gênicas que têm como instrumento a utilização de megacariócitos e seus precursores têm se tornado uma grande alternativa para tratamento de desordens de coagulação, principalmente para tratamento da deficiência de produção do Fator VIII de coagulação sanguínea (hemofilia A) (WILCOX, 2016).

Estudos de terapia gênica para tratamento da hemofilia A têm utilizado como célula alvo megacariócitos e plaquetas. Essas células participam na resposta primária a injúrias vasculares, ligando-se à região próxima e liberando proteínas biologicamente ativas que agem na coagulação (LESLIE, 2010). Sendo assim, essas células podem funcionar como excelentes produtoras do FVIII em pacientes com hemofilia A que apresentam deficiência na produção dessa proteína, liberando-a diretamente no local de coagulação e promovendo uma coagulação local contínua (WILCOX, 2016).

Essa estratégia já foi usada com sucesso na correção de hemofilia A em ratos (SHI et al., 2006) e em cães (DU et al., 2013), com transdução de vetores lentivirais com expressão de FVIII regulada pelo promotor ITGA2b. O promotor PF4 também foi utilizado pra guiar a expressão de FVIII em um vetor HAC (human artificial chromosome) transfectado em células iPS posteriormente diferenciadas em megacariócitos, experimento que resultou na produção de FVIII ativo (YAKURA et al., 2013). A produção de FVIII guiada pelo vetor PF4 não foi, entretanto, testada *in vivo*.

Esses estudos demonstram que o desenvolvimento de estratégias que visem a utilização de megacariócitos e plaquetas no tratamento específico de hemofilia A apresentam grande potencial. Sendo assim, o desenvolvimento de vetores lentivirais que guiem a expressão de FVIII através de promotores megacariócitos específicos mostra-se como uma importante e inovadora estratégia para terapia gênica da hemofilia A.

A construção de vetores lentivirais através de modificações moleculares ou inserção de transgenes de interesse é importante para diversas aplicações em biotecnologia. Entre os vetores virais disponíveis para transferência gênica, os vetores lentivirais foram escolhidos devido sua capacidade de se inserir no genoma da célula hospedeira e de transduzir células que não estão em divisão. Os genes e sequências promotoras selecionadas para as construções lentivirais são importantes para o desenvolvimento de trabalhos de diferenciação hematopoética (*Runx1C*), produção de fatores de coagulação sanguíneos (*VkorC1*) e expressão de genes direcionadas a megacariócitos (proPF4 e proITGA2b), justificando-se a necessidade de construções lentivirais com essas características.

Objetivos

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- Construir vetores lentivirais para expressão constitutiva de genes com potencial para aplicações biotecnológicas e vetores lentivirais com promotores tecido-específicos para expressão gênica restrita a um tipo celular, e realizar a caracterização funcional dos vetores produzidos.

2.2 Objetivos específicos

- Identificar e amplificar as regiões codificantes (CDS – *Coding DNA Sequence*) dos genes *VkorC1* e *Runx1C*;
- Identificar e amplificar a região promotora ativa dos promotores proPF4 e proITGA2b;
- Realizar a clonagem das sequências em vetor de clonagem e produzir estoques estáveis dos vetores contendo as sequências selecionadas;
- Subclonar as sequências *Runx1C* e *VkorC1* em vetores lentivirais bicistrônicos de 3ª geração, capazes de expressar os genes nas células-alvo;
- Substituir o promotor interno de vetor lentiviral bicistrônico que codifica o gene do FatorVIII (FVIII) pelos promotores proPF4 e proITGA2b;
- Analisar a funcionalidade dos vetores lentivirais construídos;
- Elaborar um manual de construção de vetores de expressão.

Material & Métodos

3 MATERIAL & MÉTODOS

3.1 Fluxograma

O trabalho foi desenvolvido seguindo as etapas descritas no fluxograma abaixo:

Figura 6. Fluxograma da metodologia empregada no trabalho

3.2 Sequências a serem clonadas na construção dos vetores lentivirais

3.2.1 Seleção das sequências

As sequências a serem recombinadas na construção do vetor lentiviral foram selecionadas de acordo com as linhas de pesquisa da instituição e baseado em consulta a literatura pertinente. Quatro sequências foram selecionadas, sendo elas:

- Gene *Runx1* (isoforma C): gene envolvido na diferenciação hematopoética e formação de progenitores hematopoéticos definitivos;
- Gene *VkorC1*: gene central do complexo enzimático responsável por reduzir a vitamina K em sua forma ativa;
- Promotores proPF4 e proITGA2b: regiões promotoras dos genes *PF4* e *ITGA2b*, ativos em megacariócitos.

3.2.2 Análise das sequências no GenBank® (NIH)

As sequências foram analisadas quanto a composição de nucleotídeos a partir de pesquisa no banco de dados genéticos GenBank®, do grupo NIH, disponível no endereço eletrônico <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>.

Para os genes *Runx1C* e *VkorC1* foi analisado o RNA mensageiro (mRNA) de cada um, depositados sob os números NM_001754.4 e NM_024006.4, respectivamente.

Para os promotores proPF4 e proITGA2b foi analisado o DNA genômico (gDNA) de cada, depositados sob os números NG_032897.1 e NG_008331.1, respectivamente. O promotor de cada gene foi identificado na região 5'UTR (*Untranslated Transcription Region*), que flanqueia o início da transcrição.

3.2.3 Análise de restrição das sequências

As sequências nucleotídicas obtidas pela análise no GenBank® foram submetidas à análise de restrição pela ferramenta NEBcutter, da New England Biolabs, disponível no endereço eletrônico <http://nc2.neb.com/NEBcutter2/>, que mostra quais os sítios de restrição

estão ou não presentes na sequência submetida. Através da análise, foram selecionadas enzimas para posterior clonagem.

3.3 Preparo das amostras utilizadas para amplificação

3.3.1 Amostras utilizadas

-Para amplificação do gene *Runx1C*:

- DNA complementar (cDNA) de células embrionárias diferenciadas em progenitores hematopoéticos, no 17º dia de diferenciação (D17)
- cDNA de células embrionárias diferenciadas em progenitores hematopoéticos, no 27º dia de diferenciação (D27)
- cDNA de células mononucleadas de sangue periférico (PBMC – *Peripheral Blood Mononuclear Cells*)

-Para amplificação do gene *VkorC1*

- cDNA de célula HepG2

-Para amplificação dos promotores proPF4 e proITGA2b

- gDNA de PBMC

3.3.2 Extração de RNA

Para obtenção do cDNA, as amostras foram primeiramente submetidas à extração de RNA total utilizando o kit *RNeasy Micro Kit* (Qiagen®), seguindo as recomendações do fabricante. O RNA obtido foi quantificado utilizando o aparelho *Nanodrop 2000* (Thermo Scientific®) e armazenado à -80°C.

3.3.3 Extração de gDNA

A extração de gDNA foi realizada com uso do kit *Blood and Cell Culture DNA mini Kit* (Qiagen®) de acordo com as instruções do fabricante. A amostra foi armazenada em freezer à -20°C.

3.3.4 Preparo de cDNA por RT-PCR

Para produção de cDNA, 2µg de cada amostra de RNA foi submetido à reação de transcriptase reversa por RT-PCR, utilizando o Kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription*” (Invitrogen®) de acordo com as instruções do fabricante. As amostras foram armazenadas em freezer à -20°C.

3.4 Amplificação das sequências

3.4.1 Desenho dos primers

Os oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) para cada sequência-alvo foram desenhados com base na análise da sequência de nucleotídeos feita no *GenBank*® e consulta à literatura, de forma que amplifiquem toda a região alvo (CDS ou promotora). Cada par de *primers* contém ainda em suas terminações sítios de restrições específicos para a posterior clonagem. Todos os *primers* foram sintetizados pela empresa *Sigma*®. A tabela 2 lista os pares de *primers* usados, com suas respectivas características.

Tabela 2. Relação e características dos *primers* utilizados para amplificação das sequências alvo

Sequência amplificada		Primer	Tamanho do produto (pb)	Temp. Melting (°C)	Temp. Anelamento (°C)	Literatura consultada
Runx1C (1)	<i>sense</i>	<u>CTCGAG</u> AAGCGATGGCTTCAG XhoI	1461	66	55	*
	<i>antisense</i>	GATATC <u>CTCAGTAGGGCCTCC</u> EcoRV		66		
Runx1C (2)	<i>sense</i>	<u>CTCGAG</u> ATGGCTTCAGACAGCATATTTGAGTCATTT XhoI	1455	62	55	(CHALLEN; GOODELL, 2010)
	<i>antisense</i>	GATATC <u>TCAGTAGGGCCTCCACACGGCCT</u> EcoRV		73		
VkorC1	<i>sense</i>	<u>CTCGAG</u> AACCTGGAGATAATG XhoI	515	46	56	*
	<i>antisense</i>	GAATTC <u>TCAGTGCCTCTTAGC</u> EcoRI		54		
proPF4	<i>sense</i>	<u>CTCGAG</u> GTGGGAGAGGCAGATAAGTAGGCAA XhoI	1720	66	56	(OKADA <i>et al.</i> , 2004)
	<i>antisense</i>	<u>CTCGAG</u> TCTGTGGCCAATGACTCCTGAGCCT XhoI		70		
proITGA2b	<i>sense</i>	<u>CTCGAG</u> TGTGCTCAATGCTGTGCC XhoI	932	63	56	(DU <i>et al.</i> , 2013)
	<i>antisense</i>	<u>CTCGAG</u> TCCTTCTTCCACAACC XhoI		54		

*: *primers* desenhados a partir das regiões alvo a serem amplificadas; Temperatura de *Melting* (TM) calculadas com ferramenta *TM calculator* da *New England Biolabs*, disponível em: www.neb.com/tools-and-resources/interactive-tools/tm-calculator

3.4.2 Amplificação por PCR

As sequências foram amplificadas pela técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) utilizando os *primers* específicos, em termociclador *GeneAmp PCR Sistem 9700* (*Applied Biosystems*®)

Para cada reação de volume final de 50µL foram utilizados: 20ng de amostra (cDNA ou gDNA), 10µM de *primer sense*, 10µM de *primer antisense*, 10mM de dNTP, 1,5mM de MgCl₂, 1U de “taq DNA polimerase” (*Invitrogen*®), 5µL de tampão 10X (fornecido pelo fabricante) e água milli-Q estéril q.s.p.

Os ciclos utilizados foram: um passo único a 95°C por 2min para a desnaturação da fita molde; seguido de 35 ciclos de 95°C (desnaturação) por 1min, Temperatura de Anelamento de cada par de *primer* por 1min e 72°C (extensão) por 2min; finalizando com uma etapa única de extensão a 72°C por 7min.

Para validação da reação foi utilizado em todos os lotes de reação um controle negativo denominado de “Branco”, no qual a quantidade de DNA-molde foi substituída por água Milli-Q, previamente esterilizada.

3.4.3 Determinação da integridade do material genético

Para verificar a integridade do cDNA utilizado, todas as amostras foram submetidas a PCR com *primers* específicos para o gene endógeno *β-actina* (tabela 3).

Tabela 3. Relação e características dos *primers* utilizados para amplificação do gene endógeno *β-actina*

Gene amplificado		Primer	Produto (pb)	Temp. Melting	Temp. Anelamento
<i>B-actina</i>	<i>sense</i>	GCCCTGAGGCACTCTTCCA	192	61°C	58°C
	<i>antisense</i>	CCAGGGCAGTGATCTCCTTCT		61°C	

TM calculada com ferramenta *TM calculator* da *New England Biolabs*, disponível em: www.neb.com/tools-and-resources/interactive-tools/tm-calculator

3.5 Eletroforese

3.5.1 Separação de fragmentos de DNA por eletroforese em gel de agarose

Os produtos resultantes das amplificações ou restrições enzimáticas foram avaliados por meio de eletroforese em gel de agarose 1% (m/V). O gel foi preparado diluindo-se 1g de agarose em 100mL de tampão TAE 1X [Tris-HCl 40mmol/L, ácido acético 20mmol/L e EDTA 1mmol/L (pH 8,0)] e lavado a aquecimento em microondas até total dissolução da agarose. Ao gel liquefeito foi adicionado Brometo de Etídio (0,5µg/mL). Às amostras foi adicionado glicerol 70%. A eletroforese foi conduzida em cuba horizontal a 100V em tampão TAE 1X, pelo tempo necessário para separação das bandas. Para avaliação do tamanho dos fragmentos foi empregado um marcador de peso molecular, sendo *φX 174 RF DNA/HaeIII Fragments (Invitrogen®)* ou *Gel pilot 1Kb plus ladder (Qiagen®)*. Os géis foram visualizados sob luz UV e fotodocumentados em equipamento fotodocumentador.

3.5.2 Purificação de fragmentos de DNA de gel de agarose

Fragmentos de DNA de tamanho esperado foram separados por meio de eletroforese em gel de agarose 1%, e purificados. A banda de interesse foi recortada do gel e purificada com utilização do kit *QIAEX II Gel extraction kit (Qiagen®)*, de acordo com as instruções do fabricante. O procedimento permite a eliminação de contaminantes antes de prosseguir com os demais experimentos.

3.6 Cultivo de bactérias

3.6.1 Meio de cultivo para bactéria

Para o cultivo das bactérias foi utilizado o meio Luria-Bertani (LB), composto por: 0,5% (m/V) de extrato de levedura, 1% (m/V) de caldo de triptona de soja e 1% (m/V) de NaCl, pH 7. Para preparo de meio LB-líquido, os componentes são diluídos em água Milli-Q e autoclavados. Para preparo de LB-ágar, é adicionado 12g de ágar em 1L de LB-líquido e autoclavado. Quando necessário, para seleção de colônias, foi adicionado ao meio o antibiótico ampicilina (concentração final de 100µg/mL) e/ou IPTG (concentração final de 0,04mM) e x-Gal (concentração final de 0,08mM).

3.6.2 Linhagens de bactérias

Em todas as transformações foram utilizadas linhagens de *Escherichia coli* competentes. Foram utilizadas duas linhagens de *E. coli*: DH10 β e Stbl3TM (Invitrogen®).

- DH10 β – Usada na transformação dos vetores de clonagem. Genótipo F⁻ *mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) Φ 80*lacZ* Δ M15 Δ *lacX74* *recA1* *endA1* *araD139* Δ (*ara leu*) 7697 *galU* *galK* *rpsL* *nupG* λ^- .
- Stbl3TM (Invitrogen®) – Usada na transformação dos vetores lentivirais. Genótipo F⁻ *mcrB* *mrrhsdS*20(*r_B*⁻, *m_B*⁻) *recA13* *supE44* *ara-14* *galK2* *lacY1* *proA2* *rpsL*20(Str^R) *xyl-5* λ *leumtl-1*.

3.6.3 Preparo de bactérias competentes

As bactérias competentes foram preparadas de acordo com o protocolo descrito por Hanahan (1983). Para isso, uma alíquota de bactéria não competente foi semeada em meio LB-ágar sem antibiótico e incubadas em estufa a 37°C por 16h. Uma colônia isolada foi selecionada e inoculada em 5mL de meio LB-líquido sem antibiótico, incubada sob agitação constante nas mesmas condições. Subsequentemente, 500 μ L dessa mini-cultura foram inoculados em 50mL de meio LB-líquido, acomodado em Erlen-Meyer de 1000mL previamente autoclavado. A cultura foi mantida sob agitação nas mesmas condições até atingir Densidade Óptica – DO (550nm) de 0,5 a 0,6, apurada por leitura em espectrofotômetro. Ao atingir a DO necessária, todo o conteúdo da cultura foi transferido para tubo falcon estéril, resfriado em gelo e centrifugada a 3000rpm por 15min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspendido em 10mL de solução R1 (KCl 100mM, MnCl 50mM, Kac 30mM, CaCl₂ 10mM, Glicerol 15%, pH 5,8), resfriado em gelo e centrifugado a 3000rpm por 12min a 4°C. O sobrenadante foi novamente descartado e o precipitado ressuspendido em 2mL de solução R2 (Na-MOPS 10mM, KCl 10mM, CaCl₂ 75mM, Glicerol 15%, pH 6,8). Foram feitas alíquotas de 100 μ L, que foram estocadas em freezer a -80°C até o momento da utilização.

3.6.4 Transformação bacteriana

Para a transformação, alíquotas de 100µL de bactéria competente foram previamente descongeladas e mantidas em gelo. Para cada alíquota foi adicionada de 0,5-7µL do material a ser transformado e deixado em gelo por 30min. A transformação se deu por choque térmico, submetendo a bactéria a 42°C por 45seg seguido de 2min em gelo. À bactéria transformada foi adicionado 250µL de meio SOC (Invitrogen®), incubada por 1h à 37°C, sob agitação constante de 200-230rpm. Após esse período, 60-250µL do meio foram espalhados em placas com meio LB-ágar, adicionado de ampicilina e/ou IPTG e x-Gal, para seleção de colônias positivas. Nas transformações realizadas para ligações foi utilizado um controle positivo, através da transformação paralela de um vetor fechado.

3.6.5 Extração de DNA plasmidial – miniprep

Após a transformação, colônias positivas isoladas foram selecionadas e inoculadas em 5mL de meio LB-líquido adicionado de ampicilina, incubadas sob agitação constante a 37°C por 16h. Decorrido o período, 1mL da cultura foi separado para confecção de estoques enquanto os outros 4mL foram centrifugados a 4000rpm por 20min. O sobrenadante foi descartado e o precipitado submetido à extração plasmidial com utilização do kit *QIAprep® Spin Miniprep* (Qiagen®), de acordo com as instruções do fabricante. O material extraído foi quantificado em aparelho *Nanodrop 2000* (Thermo Scientific®) e armazenado à -20°C.

3.6.6 Confecção de estoques em bactéria

Colônias de bactérias transformadas com os vetores produzidos e confirmadas foram estocadas. Para isso, 150µL de meio LB-líquido com ampicilina contendo as bactérias a serem estocadas foi diluído em 150µL de glicerol 70% autoclavado. Toda a manipulação foi realizada em fluxo vertical irradiado. A alíquota foi devidamente identificada e estocada em freezer à -80°C.

3.7 Clonagem

3.7.1 Vetores de clonagem utilizados

- pGem® T-easy (Promega®): Usado para clonagem do gene *VkorC1* e dos promotores proPF4 e proITAG2b. Possui 3015pb, origem de replicação (ORI), sítio múltiplo de clonagem (MCS) localizado dentro do gene Lac-z e gene de resistência ao antibiótico ampicilina para seleção de bactérias transformadas. Ele é recebido linearizado, aberto na região do MCS, e possui bases timinas (T) não pareada nas extremidades para ligação direta de produtos de PCR, que possuem bases Adenina (A) adicionada pela ação da Taq DNA polimerase (figura 7A).
- pUC57® (GenScript®): Usado na clonagem do gene *Runx1C*. Apresenta 2710pb, MCS localizado no interior do gene Lac-Z no qual foi inserida sequência e marcador de resistência ao antibiótico ampicilina, para seleção das bactérias transformadas (figura 7B).

Figura 7. Mapa dos vetores de clonagem utilizados para clonagem dos fragmentos. **(A)** O vetor pGem® T-easy (fonte: Promega®) foi usado para clonagem dos fragmentos *VkorC1*, proPF4 e proITGA2b. **(B)** O vetor vetor pUC57 (modificado de GenScript®) foi utilizado para clonagem do gene sintético *Runx1C*. Note-se que em ambos o Sítio de Multipla Clonagem (MSC) está situado no interior do gene Lac-Z.

3.7.2 Clonagem em vetor pGem T-easy® e seleção de colônias positivas

A clonagem no vetor pGem T-easy® foi executada para as sequências *VkorC1*, proPF4 e proITGA2b. Os fragmentos de tamanho esperados obtidos por PCR e verificados em gel de agarose foram extraídos e purificados do gel. A ligação ocorreu por ação da enzima T4 DNA-ligase, fornecida pelo fabricante, em tampão específico, seguindo uma proporção inserto:vetor de 3:1. A reação foi incubada a 4°C, por 16h, e 3μL da ligação foram transformados em bactéria competente DH10β.

Para seleção das colônias transformadas, as bactérias foram plaqueadas em meio LB-ágar adicionado de ampicilina, IPTG e x-Gal, e apenas colônias brancas foram selecionadas. As colônias brancas têm maior probabilidade de terem incorporado a sequência, visto que o MCS do vetor situa-se dentro do gene *lacZ*, que codifica a produção de β-galactosidase, enzima que permite à célula hospedeira metabolizar galactose. As bactérias na qual o inserto não incorporou ao vetor são capazes de metabolizar o substrato e apresentam fenótipo azul, enquanto as bactérias nas quais o inserto foi recombinado o gene *LacZ* é interrompido e a produção de β-galactosidase impedida, conferindo à bactéria a cor branca.

3.7.3 Síntese do gene *Runx1C*

A sequência referente à região CDS do gene *Runx1C*, obtida por análise no banco de dados *GenBank*®, foi sintetizada pela empresa *GenScript*®, observando-se os sítios de restrição selecionados para clonagem. O gene foi sintetizado e clonado em vetor de clonagem pUC57 pela própria empresa.

Na síntese, os sítios de restrição selecionados para clonagem foram adicionados às regiões 5' e 3' da sequência. O sequenciamento, realizado pela empresa como parte da análise e confirmação da síntese, confirma a presença dos sítios de restrição e a sequência de bases nucleotídicas sintetizada (figura 8). O sequenciamento foi realizado com os *primers* M13F e M13R.

Figura 8. Contig da porção inicial e final do sequenciamento para a sequência *Runx1C* clonada em vetor pUC57. Os retângulos destacam os sítios de restrição XhoI e EcoRV adicionados.

O vetor contendo o gene foi recebido fechado e liofilizado na quantidade aproximada de 4µg, foi ressuspensionado em 20µL de água nuclease-free, resultando em uma concentração final de 200ng/µL, e então 0,5µL foram transformados em bactéria competente DH10β. A seleção de positivos se deu da mesma forma feita para as sequências clonadas em pGem T-easy®.

3.8 Ligação em vetor lentiviral – subclonagem

3.8.1 Vetores lentivirais utilizados

O vetor lentiviral base selecionado para subclonagem do gene *Runx1C* foi o vetor p1054-CIGWS, com tamanho de 10054pb, e para clonagem da sequência promotora proITGA2b foi selecionado o vetor p1054-FVIII, com tamanho de 14708pb (figura 9).

Figura 9. Mapa dos vetores lentivirais bicistrônicos utilizados para construção lentiviral do trabalho. (A) o vetor p1054-CIGWS foi utilizado na ligação do fragmento *Runx1C*. (B) O vetor p1054-FVIII foi utilizado como base para substituição do promotor interno CMV pelo promotor proITGA2b. Note-se que os vetores apresentam o Sítio de Ligação do Ribossomo (IRES), que permite que transgene e EGFP sejam regulados pela ação do promotor interno.

Ambos os vetores apresentam os elementos essenciais cPPT, CTS, RRE e WPRE, que conduzem o cDNA viral e o transgene ao núcleo da célula e facilitam sua expressão. A expressão é regulada pelo promotor CMV (540pb), flanqueado pelos sítios de restrição XhoI. Localizado na região posterior ao promotor CMV, o vetor apresenta os sítios de restrição para as enzimas SalI e SmaI, para ligação do transgene. No vetor p1054-FVIII, essa região é ocupada pela sequência do gene do Fator VIII (FVIII) da coagulação sanguínea (4413pb). O marcador fluorescente verde EGFP é precedido da região IRES, que permite a regulação da transcrição tanto do transgene inserido quanto do EGFP pelo promotor interno (vetores bicistrônicos). Os vetores são mantidos em sua forma fechada até o momento da ligação.

3.8.2 Restrição enzimática

Os vetores lentivirais selecionados e os fragmentos a serem ligados foram digeridos com enzimas de restrição, gerando extremidades coesivas compatíveis para ligação. As enzimas utilizadas, os sítios que cada uma reconhece e a extremidade deixada por cada uma estão apresentados na tabela 4. A restrição enzimática dos fragmentos a partir do vetor de clonagem de cada foi utilizada para confirmação da clonagem e para recuperação do inserto, sendo necessária purificação do fragmento de interesse após eletroforese em gel de agarose.

Tabela 4. Relação e características das enzimas utilizadas para digestão dos vetores e fragmentos para ligação

Fragmento digerido	Enzimas Utilizadas	Sítio reconhecido	Extremidade	T. atividade	Fabricante
p1054-CIGWS	SalI SmaI	GTCGAC CCCGGG	5'-TCGA Blunt	37°C 25°C	Biolabs Biolabs
Runx1C (clonado em pUC57)	SalI EcoRV	GTCGAC GATATC	5'-TCGA Blunt	37°C 37°C	Biolabs Biolabs
p1054-FVIII	XhoI	CTCGAG	5'-TCGA	37°C	Biolabs
proITGA2b (clonado em pGem T-easy)	XhoI	CTCGAG	5'-TCGA	37°C	Biolabs
VkorC1 (clonado em pGem T-easy)	XhoI EcoRI	CTCGAG GAATTC	5'-TCGA Blunt	37°C	Biolabs

Para cada reação de restrição de 50µL foram utilizados 2µg de DNA, 1u de enzima, 5µL de tampão específico para cada enzima e água milli-Q q.s.p. As reações foram incubadas em termociclador *GeneAmp PCR Sistem 9700* (Applied Biosystems®) por 4h, na temperatura ideal de atividade de cada enzima, e inativadas a 65°C por 15min. Para reações de dupla digestão, foi usado 1u de cada enzima e tampão compatível para a atividade de ambas. Na reação de digestão do vetor p1054-CIGWS, as enzimas SalI e SmaI não possuem tampão e temperatura de atividade compatíveis, portanto foi necessário realizar duas digestões consecutivas, sendo o material purificado entre a primeira e a segunda reação para eliminação dos reagentes. A reação foi confirmada por visualização dos fragmentos em gel de agarose.

3.8.3 Defosforilação do vetor

Os vetores lentivirais digeridos foram submetidos a reação de defosforilação com utilização de enzima SAP (*Shrimp Alkaline Phosphatase*) para retirada do fosfato da extremidade 5' do vetor, evitando a religação espontânea do mesmo e mantendo-o aberto. Para a reação foi adicionado ao volume final da reação de digestão 1u da enzima SAP e novamente incubado a 37°C por 2h e inativada a 75°C por 15min, em termociclador *GeneAmp PCR Sistem 9700* (*Applied Biosystems*®). A enzima SAP é virtualmente ativa em todos os tampões específicos para enzimas de restrição. Para o vetor p1054-FVIII foi necessária purificação após eletroforese em gel de agarose para eliminação do promotor CMV.

3.8.4 Reação de ligação em vetor lentiviral

Os fragmentos digeridos e purificados foram submetidos à reação de ligação com os vetores lentivirais previamente preparados, em uma proporção inserto:vetor de 5:1, verificada por intensidade da banda em gel de agarose. A reação de ligação foi feita pela ação da enzima *T4 DNA ligase* (*Invitrogen*®), a 14°C por 16h. Os vetores ligados foram transformados em bactéria competente *Stbl3*® e plaqueadas em meio LB-ágar adicionado de ampicilina para seleção dos transformantes.

3.9 Confirmação da construção

3.9.1 Confirmação por PCR

As ligações foram confirmadas por reações PCR com utilização dos *primers* específicos da sequência ligada ou *primers* capazes de amplificar parte da sequência IRES-GFP do vetor (tabela 5). Como amostra para os PCRs, as colônias transformadas foram lisadas por agitação em vortex e 2µL foram utilizados para a amplificação. As colônias com amplificação positiva foram subtidas à extração de DNA plasmidial para os demais experimentos.

Tabela 5. Relação e características dos *primers* utilizados para a sequência IRES-GFP do vetor lentiviral p1054-CIGWS

Região amplificada		Primer	Produto (pb)	Temp. Melting	Temp. Anelamento
IRES-GFP	<i>sense</i>	CTAACGTTACTGGCCGAAG	1159	58°C	55°C
	<i>antisense</i>	TACTGGTTGTCGGGCAGCA		60°C	

3.9.2 Confirmação por restrição enzimática

As colônias transformadas com as construções p1054-Runx1C e pL-proITGA2b-FVIII que apresentaram amplificação positiva foram submetidas à reação de restrição enzimática, para confirmação da presença do inserto.

A ligação pL-proITGA2b-FVIII foi digerida com a enzima XhoI, cujos sítios de restrição estão presentes no início e final do promotor.

A ligação p1054-Runx1C foi digerida com as enzimas BamHI e BstXI. Ambas apresentam dois sítios de restrição na construção: um na sequência *Runx1C* ligada e outro no vetor.

3.9.3 Sequenciamento

O sequenciamento foi realizado para o vetor pL-proITGA2b-FVIII. Para o sequenciamento, duas reações consecutivas de PCR foram necessárias. A princípio procedeu-se uma reação de PCR normal para delimitação da região a ser sequenciada. Nessa reação, foi utilizado o *primer sense* da sequência proITGA2b e como *primer antisense* foi utilizado o *primer* selecionado para sequenciamento, nomeado *primer* SEQ – 5' CCAGGGAAGACTTTATC 3'. O *primer* SEQ possui anelamento na região inicial do gene do FVIII, amplificando 465pb do gene FVIII em direção ao promotor proITGA2b clonado, que antecede o FVIII. A amplificação resulta em uma banda de 1412pb. Posteriormente, o material foi submetido à reação sequenciamento pelo método da terminação de cadeia por dideoxinucleotídeos (ddNTPs) marcados com diferentes fluoróforos (SANGER et al, 1977). Para a reação de sequenciamento foi utilizado o kit *Big Dye® Terminator Cycle Sequencing Kit* (Life Technologies®), 2,5µM do *primer* SEQ e 100ng do material da primeira PCR. A reação do sequenciamento foi submetida às seguintes ciclagens no termociclador *GeneAmp PCR Sistem 9700* (Applied Biosystems®): 95°C por 1min seguido de 25 repetições de 96°C

por 10seg, 50°C por 5seg e 60°C por 4min. A reação do sequenciamento foi submetida à precipitação alcoólica e ressuspensa em tampão próprio para o sequenciador. Os sequenciamentos foram realizados no aparelho *ABI3500XL Genetic Analyzer* (Life Technologies®) do Hemocentro de Ribeirão Preto e o eletroferograma analisado pelo programa *ChromasPro* (Technelysium). A análise de similaridade com a sequência pretendida foi realizada através da ferramenta BLAST®, disponível no endereço <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.

3.10 Transfecção em célula animal

3.10.1 Linhagem HEK-293T e condições de cultura

A linhagem HEK-293T é derivada de rim embrionário humano e encontra-se depositada no *American Type Culture Collection* (ATCC) sob o número CRL-11268TM. Essa linhagem é transformada com o adenovírus Typ-5 e com o antígeno T do SV40, que permite a replicação de plasmídeos que possuam a origem de replicação do SV40 (FAIRMAN; STILLMAN, 1988; GRAHAM et al., 1977). Células dessa linhagem crescem de forma aderente ao plástico e foram cultivadas em meio DMEM (*Dubecco's Modified Eagle's Medium*) com Soro Fetal Bovino (SFB) 10% inativado a 56°C por 30min (*Seromed*) e 4mmol/L de L-glutamina. As células foram mantidas em cultura em estufa úmida, a 37°C e 5% de CO₂.

3.10.2 Transfecção por Polyethylenimine (PEI)

O vetor de expressão pL-proITGA2b-FVIII gerado foi transfectado em célula HEK-293T para confirmação da funcionalidade do mesmo. Para a transfecção, 4×10^6 células foram plaqueadas em placas de 10cm e mantidas em cultura por 24h, até confluência aproximada de 90%. Após o período, foi realizada a transfecção do vetor na célula pela ação do polímero catiônico *Polyethylenimine* (PEI), que se liga ao DNA formando um complexo DNA-PEI (polyplex) capaz de transfectar células de mamíferos (SEGURA et al, 2010). Foi utilizado uma proporção DNA:PEI de 1:3 (10µg do DNA do vetor para cada 30µg de PEI). O DNA foi diluído em 3mL meio DMEM previamente aquecido a 37°C. O PEI foi adicionado gota a gota à mistura mantida sob agitação em vortex, a qual foi incubada em temperatura ambiente por 15min e então adicionada à célula em cultura. O meio foi completado com 4mL de DMEM

com SBF 10%, para um volume final de 7mL. As placas foram mantidas em cultura por 24h, período após o qual todo o meio foi trocado por DMEM com SBF 10% inativado fresco e mantidas em cultura por outras 48h, e então analisadas. A transfecção foi realizada em duplicata e uma placa não-transfectada foi mantida em cultura paralelamente às outras como controle negativo.

3.10.3 Quantificação de células GFP positivas por citometria de fluxo

As células transfectadas foram avaliadas quanto à expressão de GFP por citometria de fluxo no laboratório de Citometria de Fluxo do Hemocentro de Ribeirão Preto. Para isso, as células foram tripsinizadas com 3mL de Tripsina/EDTA para desagregação e ressuspendidas em PBS 1X. As amostras foram encaminhadas para análise da porcentagem de células GFP positivas (GFP⁺) em citômetro de fluxo *FACScaliburTM*, *BD Biosciences*®. Células não transfectadas foram usadas como controle negativo para calibração.

3.10.4 Quantificação de produção de FVIII por ensaio de ELISA

O sobrenadante da cultura de HEK-293T após transfecção com o vetor pL-ITGA-FVIII foi coletado para quantificação de FVIII secretado. O sobrenadante foi centrifugado a 1200rpm, 4°C por 5min para eliminação de impurezas. O volume de 6mL do sobrenadante foi concentrado 3 vezes, para um volume final de 2mL, com utilização de coluna de centrifugação *Amicon® Ultra-4 Centrifugal Filter Units* (Millpore), com membrana de 10KDa. A centrifugação se deu por 3h, a 1200rpm e temperatura de 4°C. O material foi armazenado em freezer -80°C até o momento da utilização.

O ensaio ELISA foi realizado com o kit *Asserachrom FVIII*® (STAGO), de acordo com as instruções do fabricante. Nesse ensaio, um anticorpo monoclonal específico para o FVIII é imobilizado em poços de placas de 96 poços. A amostra que apresenta FVIII a ser mensurada é incubada nos poços a 20°C por 2h e então lavada com tampão específico. O segundo anticorpo conjugado com peroxidase é incubado a 20°C por outras 2h e lavado com tampão. O substrato tetrametilbenzidina é incubado por 5min e a reação é bloqueada pela adição de 50µL de ácido sulfúrico 1M e a absorbância é lida em espectrofotômetro a 405nm. Todos os reagentes e tampão são fornecidos pelo fabricante.

Em paralelo à reação das amostras foram realizadas reações nas mesmas condições com amostra de plasma padrão (*Siemens*) em concentrações conhecidas, para confecção da

curva padrão e equação da reta a ser utilizada para determinação da concentração das amostras (figura 10). A amostra de plasma padrão apresenta concentração em UI/mL e cada 1UI corresponde à 100% de atividade. A concentração em ng/mL é calculada com base na porcentagem de atividade multiplicado por dois.

Figura 10. Curva padrão de cinco pontos para relação entre absorvância (405nm) e concentração da amostra de FVIII, em ng/mL

Resultados

4 RESULTADOS

4.1 Análise das sequências a serem clonadas

As sequências dos genes *Runx1C* e *VkorC1* e dos promotores proPF4 e proITGA2b foram analisadas no banco de dados *GenBank*®.

Para o gene *Runx1*, presente no cromossomo 21, foi identificada a região CDS (*Coding DNA Sequence* – Sequencia Codificante do DNA) na sequência do mRNA transcrito. O gene *Runx1* apresenta três variantes, denominadas A, B e C, obtidas por expressão diferenciada e processamento pós-transcricional do gene. Entre as três variantes, a variante C (*Runx1C*) encontra-se ativa em todas as células do EH, das quais as CTHs definitivas emergem, e em todas CTHs recém-formadas e funcionais, estando, portanto, diretamente relacionada com a diferenciação hematopoética (CHALLEN; GOODELL, 2010). A figura 11 apresenta parte do mRNA analisado, com destaque para a região CDS, identificada pelo códon de início de tradução (ATG) e códon de parada (TGA), destacados na figura por asteriscos (*). As setas indicam a região de anelamento dos *primers* utilizados.

Figura 11. Região CDS do gene *Runx1C* utilizada para clonagem e produção de vetor lentiviral. (A) Representação esquemática da localização do gene *Runx1* no cromossomo 21 e transcrição da variante C (B) Destaque para a sequência nucleotídica analisada do gene *Runx1C*. A região de anelamento dos *primers sense* e *antisense* estão identificados em negrito e por setas. * códon de iniciação; ** códon de parada.

Para o gene *VkorC1*, presente no cromossomo 16, foi identificada a região CDS localizada no RNAm transcrito. A figura 12 apresenta a sequência de mRNA analisada, com destaque para a região CDS, e identificação da região de anelamento dos *primers* utilizados.

Figura 12. Região CDS do gene *VkorC1* amplificada. (A) Representação esquemática da localização do gene *VkorC1* no cromossomo 16 e transcrição da variante 1 (B) Destaque para a sequência nucleotídica analisada do gene *VkorC1*. A região de anelamento dos *primers sense* e *antisense* estão identificados em negrito e por setas. * códon de iniciação; ** códon de parada.

As sequências promotoras foram identificadas na região 5'UTR do DNA genômico correspondente de cada gene. O gene *ITGA2b* localiza-se no cromossomo 17 e, para amplificação da região promotora do gene (pro*ITGA2b*), foram desenhados *primers* que abrangessem parte da região 5' que flanqueia o gene. O *primer sense* utilizado apresenta anelamento na região da base -922 a contar do início da transcrição do gene, enquanto o *primer antisense* anela na região da base -18. A figura 13 mostra a região analisada e amplificada para clonagem e produção do vetor lentiviral, com destaque para a localização dos *primers*.

Figura 13. Região promotora do gene ITGA2b amplificada para clonagem e produção de vetor lentiviral. **(A)** Representação esquemática da localização do promotor proITGA2b no cromossomo 17. **(B)** Destaque para a sequência nucleotídica amplificada do promotor proITGA2b. A região de anelamento dos *primers sense* e *antisense* de cada sequência estão identificados em negrito e por setas.

O gene PF4 localiza-se no cromossomo 4 e os *primers* obtidos para amplificação da região promotora possuem anelamento na região da base -1770 a contar do início de transcrição e base -18. A figura 14 apresenta a região analisada e amplificada do promotor PF4, destacando-se a região de anelamento dos *primers*.

Figura 14. Região promotora do gene PF4 amplificada para clonagem e produção de vetor lentiviral. **(A)** Representação esquemática da localização do promotor proPF4 no cromossomo 4. **(B)** Destaque para a sequência nucleotídica amplificada do promotor proPF4. A região de anelamento dos *primers sense* e *antisense* de cada sequência estão identificados em negrito e por setas.

As sequências dos genes *VkorC1* e *RunX1* e dos promotores proPF4 e proITGA2b também foram analisadas quanto à composição de sítios de restrição pela ferramenta NEBcutter. Através da análise foram selecionadas enzimas de restrição para serem adicionadas nos *primers* para posterior clonagem. As enzimas inseridas nos *primers* estão na tabela 4 da sessão material e métodos (p. 55).

4.2 Amplificação das sequências a serem clonadas

As sequências de interesse foram amplificadas por PCR com utilização de *primers* específicos (tabela 2). Para amplificação do gene *Runx1C* foram utilizados dois pares de *primers*, *Runx1C*(1) e *Runx1C*(2), e foram utilizadas como amostras cDNA de progenitores hematopoéticos diferenciados a partir de Células-tronco Embrionárias no 17º e 27º dia de diferenciação (D17 e D27) e amostra de cDNA de PBMC; para amplificação do gene *VkorC1* foi utilizada amostra de cDNA de células HepG2 e para amplificação dos promotores proPF4 e proITGA2b, amostra de DNA genômico de PBMC. Os produtos de amplificação foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1%.

A técnica de PCR permitiu a amplificação dos fragmentos de interesse para o gene *VkorC1*, evidenciada pela presença de banda de tamanho 515pb (figura 15A) e para os promotores proPF4 e proITGA2b, com bandas de 1720pb e 932pb, respectivamente (figura 15B). A amplificação do gene *Runx1C* foi negativa para os dois pares de *primers* testados e para todas as amostras utilizadas. O primeiro par de *primers* utilizado, *Runx1C*(1), não apresentou amplificação (figura 15C), o que levou a tentativa de utilização de amplificação com o segundo par de *primers*, *Runx1C*(2), que também apresentou amplificação negativa (figura 15D).

Todas as amostras de cDNA utilizadas foram testadas quanto à sua integridade através da amplificação do gene *β -actina*, que amplifica uma banda de 192pb. A amplificação foi positiva para todas as amostras utilizadas, sem formação de rastros ou amplificação fragmentada (figura 15E).

Figura 15. Amplificações por PCR. (A) Amplificação da sequência *VkorC1* a partir de amostra de cDNA de HepG2. (B) Amplificação das sequências *proPF4* e *proITGA2b* a partir de DNA genômico de PBMC. (C) Amplificação negativa para a sequência *Runx1C* com utilização do par *primers Runx1C(1)* a partir das amostras D17 (raia 1), D27 (raia 2) e PBMC (raia 3). (D) Amplificação negativa para a sequência *Runx1C* com utilização do par *primers Runx1C(2)* a partir das amostras D17 (raia 1), D27 (raia 2) e PBMC (raia 3). (E) PCR das amostras de cDNA com o *primer* endógeno β -actina para verificação da integridade das amostras. M: Marcador ϕ X (Invitrogen®) (1353, 1078, 872, 603, 310, 281, 271, 194, 118, 72 pb); M': Marcador 1Kb (Invitrogen®) (12216, 11198, 10180, 9162, 8144, 7126, 6108, 5090, 4072, 3054, 2036, 1636, 1018, 506pb). B: Branco. Gel agarose 1%.

Apesar da amplificação positiva do *VkorC1* e *proPF4*, nota-se a presença de bandas inespecíficas. Portanto a banda de 515pb referente ao *VkorC1* e a banda de 1720pb referente ao *proPF4* foram purificadas após separação das bandas em gel de agarose para consecução dos demais experimentos.

4.3 Clonagem das sequências amplificadas em vetor pGem T-easy®

As sequências *VkorC1*, proPF4 e proITGA2b amplificadas e purificadas foram clonadas em vetor de clonagem pGem T-easy®. Para verificar a pureza da amostra antes da clonagem, foi aplicado um pequeno volume do material em gel de agarose (figura 16).

Figura 16. Amostras de vetor e inserto submetidos a clonagem. (A) *VkorC1* (3ul) purificado e vetor pGem T-easy® (0,5ul). (B) 3ul de proPF4 e de proITGA2b purificados. M': Marcador 1Kb (Invitrogen®) (12216, 11198, 10180, 9162, 8144, 7126, 6108, 5090, 4072, 3054, 2036, 1636, 1018, 506pb); M'': Marcador Gel Pilot 1Kb (Qiagen®) (10000, 8000, 5000, 2000, 1600, 1000, 700, 500, 400, 300, 200, 100pb). Gel agarose 1%.

Os três insertos foram clonados no vetor pGem T-easy®. O volume de 5µL de cada reação de ligação foi transformado em bactérias competentes, as quais foram plaqueadas em LB-ágar adicionado de ampicilina, IPTG e x-Gal para seleção de clones positivos. Realizou-se a seleção de 5 colônias brancas para cada vetor transformado, as quais foram enumeradas de C1 a C5. As colônias selecionadas foram submetidas à miniprep e o DNA quantificado. A clonagem de cada sequência foi confirmada por PCR e por restrição enzimática. A reação de PCR foi realizada com os *primers* específicos para cada sequência. A reação de amplificação das amostras contendo o gene *VkorC1* evidenciou a presença do inserto em 4 das 5 colônias selecionadas (figura 17A). Para o promotor proPF4, apenas 3 das 5 apresentaram amplificação positiva (figura 17B) e para o promotor proITGA2b 4 entre as 5 colônias foram positivas para a sequência (figura 17C).

Figura 17. Confirmação por PCR da clonagem das sequências em vetor pGem T-easy®. (A) Amplificação da sequência *VkorC1* clonada. (B) Amplificação da sequência *proPF4* clonada. (C) Amplificação da sequência *proITGA2b* clonada. M': Marcador 1Kb (Invitrogen®) (12216, 11198, 10180, 9162, 8144, 7126, 6108, 5090, 4072, 3054, 2036, 1636, 1018, 506pb); M'': Marcador Gel Pilot 1Kb (Qiagen®) (10000, 8000, 5000, 2000, 1600, 1000, 700, 500, 400, 300, 200, 100pb); B: Branco. Gel agarose 1%. Colônias positivas indicadas por setas

Entre as colônias com amplificação positiva, duas colônias para cada inserto foram selecionadas para checagem por enzima de restrição: C1 e C2 para o pGem-*VkorC1*, C2 e C3 para o pGem-*proPF4* e C2 e C5 para o pGem-*proITGA2b*. A restrição enzimática foi realizada com as enzimas cujos sítios de restrição foram especialmente desenhados nas porções inicial e terminal dos *primers*. Assim, a restrição resulta em um fragmento correspondente ao tamanho completo da sequência clonada e um fragmento correspondente ao tamanho do vetor de clonagem (3010pb). A restrição das amostras de pGem-*VkorC1* com as enzimas *XhoI* e *EcoRI* confirmou a presença do inserto nas duas amostras (figura 18A), o mesmo para as clonagens pGem-*proPF4* e pGem-*proITGA2b*, que foram digeridas com a

enzima XhoI (figura 18B). As colônias C2 de cada fragmento clonado foram escolhidas para dar continuidade aos experimentos.

Figura 18. Confirmação por restrição enzimática da clonagem das sequências em vetor pGem T-easy®. **(A)** Restrição enzimática do vetor pGem-*VkorC1* com as enzimas XhoI e EcoRI, realizada com DNA das colônias C1 e C2. **(B)** Restrição enzimática dos vetores pGem-proPF4 e pGem-proITGA2b com a enzima XhoI. Restrição realizada com DNA das colônias C2 e C3 de pGem-proPF4 e C2 e C5 de pGem-proITGA2b. M': Marcador 1Kb (Invitrogen®) (12216, 11198, 10180, 9162, 8144, 7126, 6108, 5090, 4072, 3054, 2036, 1636, 1018, 506pb); M'': Marcador Gel Pilot 1Kb (Qiagen®) (10000, 8000, 5000, 2000, 1600, 1000, 700, 500, 400, 300, 200, 100pb); Gel agarose 1%.

4.4 Síntese e clonagem do gene *Runx1C* pela empresa GenScript®

Devido ao insucesso das tentativas de amplificação do gene *Runx1C*, o cDNA do gene foi sintetizado pela empresa *GenScript*® e clonado em vetor pUC57® (2710pb), no sítio para EcoRV presente no Sítio de Múltipla Clonagem (MCS) do vetor (figura 19).

Figura 19. Mapa da clonagem da sequência do gene *Runx1C* sintetizada pela empresa GenScript®. A sequência foi clonada no MCS do vetor pUC57 no sítio de restrição da enzima EcoRV. Bases nucleotídicas sinalizadas no retângulo foram adicionadas pela empresa para proteção da sequência.

O vetor liofilizado foi ressuspensionado e transformado em bactérias competentes. Entre as bactérias brancas positivas, três foram selecionadas (enumeradas de C1 a C3) e submetidas à extração plasmidial. Os plasmídeos recuperados foram digeridos com as enzimas XhoI e EcoRV para checar a presença do inserto referente ao *Runx1C*. A reação de restrição resultou na formação de duas bandas em gel de agarose, de 2710pb, relativa ao vetor pUC57, e 1455pb, correspondente ao tamanho da sequência *Runx1C*, o que confirma a clonagem da sequência nos plasmídeos das colônias selecionadas (figura 20). O inserto *RunX1C* foi purificado para clonagem no vetor de expressão.

Figura 20. Confirmação por restrição enzimática da clonagem da sequência *Runx1C* em vetor pUC57®. A restrição enzimática foi realizada com as enzimas XhoI e EcoRV, realizada com DNA das colônias C1 e C2. M'': Marcador Gel Pilot 1Kb (Qiagen®) (10000, 8000, 5000, 2000, 1600, 1000, 700, 500, 400, 300, 200, 100pb); Gel agarose 1%.

4.5 Subclonagem das sequências nos vetores lentivirais

4.5.1 Subclonagem de *Runx1C* no vetor lentiviral p1054-CIGWS

O vetor pUC57-*Runx1C* foi digerido com as enzimas XhoI e EcoRV e o fragmento de 1455pb (referente ao *Runx1C*) foi purificado por eletroforese em gel de agarose 1%. Em paralelo o DNA do vetor p1054-CIGWS (10054pb) foi digerido com as enzimas SalI e SmaI para linearização e desfosforilado. O vetor linearizado e a sequência *Runx1C* purificada foram submetidas à eletroforese para confirmação (figura 21).

Figura 21. Eletroforese em gel de agarose 1% do vetor p1054-CIGWS linearizado e desfosforilado (3 μ L) e do inserto *Runx1C* utilizado (3 μ L). M^{''}: Marcador Gel Pilot 1Kb (Qiagen®) (10000, 8000, 5000, 2000, 1600, 1000, 700, 500, 400, 300, 200, 100pb).

Vetor e inserto foram submetidos à reação de ligação na proporção de 5(inserto):1(vetor) e a ligação foi transformada em bactérias competentes. A transformação resultou em 36 colônias positivas, as quais foram submetidas à reação de PCR com o par de *primers* para a sequência IRES-GFP, que amplifica uma região de 1159pb, para triagem das colônias que incorporaram o vetor de expressão. Para obtenção do material genético das colônias utilizados na PCR, foi realizada lise de um pequeno volume de bactérias por agitação em vortex. A eletroforese em gel de agarose revelou que entre as 36 colônias, 14 apresentaram amplificação positiva para a sequência testada: 1C, 1F, 1G, 2B, 2C, 2D, 3A, 3E, 3F, 3G, 4A, 4G, 5C e 5D (figura 22).

Figura 22. Amplificação da sequência IRES-GFP por PCR nas colônias transformadas com a construção p1054-Runx1C. As colônias com amplificação positiva estão apontadas por setas brancas. (A) Colônias 1A-H, 2A-H; (B) Colônias 3A-H, 4A-H. (C) Colônias 5A-D. M'': Marcador Gel Pilot 1Kb (Qiagen®) (10000, 8000, 5000, 2000, 1600, 1000, 700, 500, 400, 300, 200, 100pb); +: controle positivo; B: Branco. Gel agarose 1%.

Entre as 14 colônias com amplificação positiva, as colônias 3A, 4A, 5C e 5D foram selecionadas para extração plasmidial e confirmação da ligação por restrição enzimática. Na reação de ligação do *Runx1C* ao vetor lentiviral, os sítios de restrição originalmente desenhados no inserto são perdidos, pois a digestão do inserto e vetor são realizadas com enzimas diferentes. Assim, para determinação de enzimas para a confirmação, foi realizada análise de restrição da sequência p1054-Runx1C produzida, através da qual foram selecionadas as enzimas BamHI e BstXI (figura 23).

Figura 23. Análise de restrição da construção p1054-Runx1C. **(A)** Padrão de restrição da sequência com a enzima BamHI. **(B)** Previsão de formação de bandas em gel de agarose 1% para restrição realizada com a enzima BamHI, mostrando o padrão formado se o fragmento ligou na Orientação Correta (OC) se a ligação se deu na Orientação Errada (OE) **(C)** Padrão de restrição da sequência com a enzima BstXI. **(D)** Previsão de formação de bandas em gel de agarose 1% para restrição realizada com a enzima BstXI, mostrando o padrão formado se o fragmento ligou na Orientação Correta (OC) se a ligação se deu na Orientação Errada (OE)

A restrição permite ainda verificar se a sequência foi ligada ao vetor na orientação correta (OC). Se a orientação for errada (OE), os fragmentos formados serão diferentes. A restrição com BamHI forma fragmentos de 10903pb e 583pb na OC e 10612pb e 874pb na OE. Na OE a restrição com BstXI gera fragmentos de 10840pb e 646pb na OC e fragmentos de 9497pb e 1989pb na OE (Figura 23).

A reação de restrição com as enzimas BamHI e BstXI resultou na formação de uma banda de tamanho semelhante ao vetor apenas para a colônia 5C (figura 24).

Figura 24. Restrição enzimática da ligação p1054-Runx1C, realizada para os materiais obtidos a partir das colônias 3A, 4A, 5C e 5D com as enzimas BamHI e BstXI. Material não digerido na mesma concentração do material submetido à digestão foi aplicado ao gel como controle. M: Marcador Gel Pilot 1Kb (Qiagen®) (10000, 8000, 5000, 2000, 1600, 1000, 700, 500, 400, 300, 200, 100pb). Gel agarose 1%.

A digestão das colônias com as enzimas selecionadas evidenciou uma banda superior a 10000pb para a colônia 5C, conforme esperado para a digestão da sequência com essas enzimas. Não foi possível detectar bandas de menor peso, 583pb para a BamHI e 646 para BstXI. Isto pode ter ocorrido devido a baixa concentração de DNA no gel e/ou a grande diferença dos fragmentos de DNA. No entanto, as bandas com tamanho superior a 10000pb sugere que a construção corresponde à esperada, porém não é possível confirmar a orientação do inserto, visto que ambas orientações, correta ou errada, devem gerar bandas na altura de 10000pb, podendo ser diferenciadas apenas pelas bandas menores, não aparentes no gel. A confirmação deverá ser realizada por sequenciamento.

4.5.2 Subclonagem do promotor *proITGA2b* no vetor *p1054-FVIII*

O vetor pGem-proITGA2b foi submetido à restrição com a enzima XhoI e o fragmento referente ao proITGA2b foi purificado. Para o preparo do vetor, o vetor lentiviral p1054-FVIII foi digerido com a mesma enzima. O sítio XhoI no vetor p1054-FVIII flanqueia o promotor interno CMV, portanto a restrição do material gera uma banda de 14168pb referente ao vetor linearizado e outra banda de 540pb, referente ao promotor CMV (figura 25).

Figura 25. Restrição enzimática do vetor p1054-FVIII com enzima XhoI. A digestão libera uma banda de 540pb referente ao promotor CMV. M^{''}: Marcador Gel Pilot 1Kb (Qiagen®) (10000, 8000, 5000, 2000, 1600, 1000, 700, 500, 400, 300, 200, 100pb). Gel agarose 1%.

Subsequente à reação de digestão, o vetor foi defosforilado. Para a retirada do fragmento referente ao promotor CMV, após de separação das bandas em gel de agarose, a banda de 14168pb (referente ao vetor sem o promotor) foi purificada. Para confirmar a pureza das amostras submetidas à ligação, uma pequena quantidade de material foi submetido à eletroforese (figura 26).

Figura 26. Eletroforese em gel de agarose 1%. Vetor p1054-FVIII digerido com a enzima XhoI, defosforilado e purificado (3µL) e inserto proITGA2b purificado. M^{''}: Marcador Gel Pilot 1Kb (Qiagen®) (10000, 8000, 5000, 2000, 1600, 1000, 700, 500, 400, 300, 200, 100pb); Gel agarose 1%.

O material purificado foi submetido à reação de ligação e a construção foi transformada em bactérias competentes. A transformação apresentou 12 colônias positivas, as quais foram selecionadas e cultivadas em meio LB-líquido adicionado de ampicilina.

Para triagem das colônias que incorporaram o vetor, o material das 12 colônias foi lisado por agitação em vortex foi submetido à reações de PCR com o par de *primers* específico para a sequência proITGA2b, para triagem de colônias que incorporaram os vetores. A eletroforese em gel de agarose revelou que entre as 12 colônias, seis apresentaram banda de tamanho esperado (932pb) para a sequência testada: colônias de número C2, C4, C7, C8, C11 e C12 (figura 27).

Figura 27. Amplificação da sequência proITGA2b por PCR nas colônias transformadas com a construção pL-proITGA2b-FVIII. As colônias com amplificação positiva estão apontadas por setas brancas. (A) Colônias C1-C5. (B) Colônias C6-C12. M'': Marcador Gel Pilot 1Kb (Qiagen®) (10000, 8000, 5000, 2000, 1600, 1000, 700, 500, 400, 300, 200, 100pb); +: controle positivo; B: Branco. Gel agarose 1%.

Todas as colônias com amplificação positiva foram submetidas à extração de DNA plasmidial. A confirmação da construção foi realizada por restrição enzimática com a enzima XhoI, a qual apresenta sítios de restrição flanqueando o início e final da sequência promotora inserida no vetor. A reação evidenciou que entre as 6 colônias positivas, 5 apresentavam o inserto (colônias C2, C7, C8, C11 e C12), evidenciada pela formação de duas bandas em gel de agarose, correspondendo uma ao vetor linearizado, sem o inserto, e a outra ao inserto (figura 28).

Figura 28. Confirmação por restrição enzimática da construção pL-proITGA2b-FVIII. O material obtido da transformação das colônias foram digeridos com a enzima XhoI. Colônias positivas estão apontadas por setas brancas. Material não digerido foi aplicado como controle. M'': Marcador Gel Pilot 1Kb (Qiagen®) (10000, 8000, 5000, 2000, 1600, 1000, 700, 500, 400, 300, 200, 100pb). Gel agarose 1%.

4.6 Sequenciamento

As construções pL-proITGA2b-FVIII das colônias C2, C4, C7, C8, C11 e C12 foram submetidas a uma reação de PCR com o *primer sense* da sequência proITGA2b e o *primer antisense* SEQ, que anela na região inicial do gene FVIII presente no vetor, para produção de material para sequenciamento. A banda amplificada pelo par de *primer* corresponde à 1412pb. A amplificação permite ainda a confirmação da ligação, visto que a região somente é amplificada corretamente quando o inserto (proITGA2b) liga-se ao vetor na orientação correta, formando o molde necessário para a amplificação a partir do par de *primers* usado. A amplificação foi realizada para as seis colônias, porém o material da colônia C4 apresentou padrão de amplificação diferente dos demais (figura 29). Esta colônia também não apresentou bandas após a digestão com a enzima XhoI.

Figura 29. Amplificação por PCR para sequenciamento das construções pL-ITGA2b-FVIII. M'': Marcador Gel Pilot 1Kb (Qiagen®) (10000, 8000, 5000, 2000, 1600, 1000, 700, 500, 400, 300, 200, 100pb); B: branco. Gel agarose 1%.

A colônia C2 contendo o vetor pL-proITGA2b-FVIII foi selecionada para ter seu material confirmado por sequenciamento. Para o sequenciamento, o material obtido do primeiro PCR, descrito acima, foi submetido à reação de sequenciamento, na qual apenas o *primer antisense* SEQ é utilizado. O sequenciamento foi realizado em triplicata e os eletroferogramas gerados foram analisados em contig (figura 30).

Figura 30. Sequenciamento da construção pL-proITGA2b-FVIII. **A.** Representação esquemática da região de abrangência do sequenciamento, com destaque para a região de anelamento do *primer* SEQ usado no sequenciamento e a região de fato sequenciada. **B.** Contig do sequenciamento da construção pL-proITGA2b-FVIII com *primer* SEQ. O contig foi feito a partir do alinhamento de três sequenciamentos.

O sequenciamento foi efetuado em triplicata, porém o contig gerado ainda apresenta várias ambiguidades e bases não sequenciadas, o que prejudica a análise da sequência. Na análise, o contig obtido no sequenciamento foi analisado através da ferramenta BLAST, no programa “*nucleotide Blast*”, que alinha sequências de nucleotídeos usando como base também sequências nucleotídicas. Na ferramenta, o contig foi alinhado contra as sequências depositadas na base de dados, com filtro para alinhamento com pouca complexidade, para detecção da sequência mais provável. O alinhamento mostrou 67% de similaridade com a sequência ITGA2b, presente no cromossomo 17 (figura 31). Entretanto, a região da junção da ligação entre o promotor proITGA2b e o FVIII, não foi sequenciada, devido à proximidade do *primer* utilizado no sequenciamento, e, portando a orientação de ligação do promotor ao vetor não pôde ser confirmada.

Figura 31. Alinhamento do contig com a base de dados nucleotídicas depositada. A seta mostra o alinhamento mais significativo apresentado. Os retângulos em vermelho destacam que o alinhamento ocorreu com a sequência ITGA2b.

4.7 Avaliação funcional do vetor pL-proITGA2b-FVIII

4.7.1 Análise das células HEK-293T transfectadas

O vetor pL-ITAGA2b-FVIII foi transfectado em células HEK-293T para avaliação funcional do novo promotor clonado. A primeira análise foi realizada pela expressão do gene repórter GFP.

A figura 32 mostra a morfologia das células após 24h de transfecção (microscopia em contraste de fase) e a expressão de GFP, observada por microscopia de fluorescência.

Figura 32. Fotografias das células HEK-293 transfetadas com vetor pL-proITGA2b-FVIII. (A) Morfologia das células transfetadas (24h). Microscopia em contraste de fase (B) Expressão de GFP nas células transfetadas. Microscopia de fluorescência.

As células transfetadas foram submetidas a análise por citometria de fluxo para determinação da quantidade de células GFP positivas. A figura 33 mostra a análise das células transfetadas realizada por citometria de fluxo. A análise revelou 34,45% ($\pm 0,485\%$) das células em cultura apresentaram expressão positiva para GFP.

Figura 33. Análise da expressão de GFP por citometria de fluxo das células HEK-293T transfetadas com vetor pL-proITGA2b-FVIII. (A) Célula não transfetada (controle). (B) Primeira replicata das células transfetadas. (C) Segunda replicata das células transfetadas.

4.7.2 Análise de produção de FVIII por ELISA

O sobrenadante da cultura de células transfectadas com o vetor pL-proITGA2b-FVIII foi coletado para análise da quantidade de FVIII secretado através de ensaio ELISA. O ensaio foi realizado para a amostra de sobrenadante das duas replicatas transfectadas e para o sobrenadante das células não transfectadas, como controle. Para cálculo da concentração de cada amostra, uma curva padrão com concentrações conhecidas foi confeccionada. As amostras foram concentradas 3 vezes, para obtenção de um volume de 2mL a partir do volume inicial de 6mL. Dessa forma, as concentrações obtidas no ensaio de ELISA foram corrigidas dividindo-se por três as concentrações medidas. As absorbâncias medidas e concentrações calculadas estão dispostas na tabela 6.

Tabela 6. Absorbâncias e respectivas concentrações apresentadas pelas amostras de sobrenadante das células transfectadas com pL-proITGA2b-FVIII em ensaio ELISA

Amostra	Abs (450nm)	% atividade	Concentração (ng/mL)	Concentração corrigida (ng/mL)
Sobrenadante 1	5,528	187,5	448,3	149,45
Sobrenadante 2	4,945	224,2	375,0	124,99
Controle	0,001	0,7	1,4	0,48

O ensaio revelou que o sobrenadante apresenta FVIII secretado, evidenciando que o promotor proITAG2b clonado no vetor transfectado encontra-se ativo.

A tabela 7 resume todos os resultados obtidos nesse trabalho.

Tabela 7. Resumo das atividades e resultados obtidos no trabalho

Etapa	Metodologia	Sequências selecionadas			
		<i>VkorC1</i>	<i>Runx1C</i>	proPF4	proITGA2b
<i>Amplificação e clonagem</i>	Amplificação por PCR	+	–	+	+
	Síntese	–	+	–	–
	Clonagem em vetor de clonagem	+	+	+	+
<i>Subclonagem em vetor lentiviral e confirmação</i>	Subclonagem em vetor lentiviral	NR	+	NR	+
	Confirmação por PCR	NR	+	NR	+
	Confirmação por digestão	NR	+	NR	+
	Sequenciamento	NR	NR	NR	+
<i>Análise funcional por transfecção transitória</i>	Expressão de GFP	NR	NR	NR	34,45% (±0,485%)
	Expressão de proteína recombinante	NR	NR	NR	+

+ metodologia aplicada que obteve resultado positivo; – metodologia aplicada de obteve resultado negativo; NR metodologia ainda não realizada

4.8 Elaboração de manual de construção de vetores de expressão

A partir do trabalho desenvolvido, foi escrito um Manual de Construção de Vetores de Expressão (apêndice A). O manual tem como público-alvo pesquisadores que trabalhem com técnicas de clonagem e recombinação gênica, produção de vetores e tecnologia do DNA recombinante de todo o país. Sua publicação já está em andamento e ele será disponibilizado em versão on-line e impressa. Todas as técnicas utilizadas no trabalho, sugestões de materiais e softwares a serem utilizados, estão dispostos no manual, que conta ainda com protocolos para cada etapa do processo.

Discussão

5 DISCUSSÃO

O interesse na utilização de vetores lentivirais como ferramentas para modificação celular ganhou destaque nas últimas décadas, desde que Naldini e colaboradores demonstraram sua capacidade em integrar no genoma hospedeiro de células que estão ou não em divisão (NALDINI et al., 1996b). Uma análise das publicações na base de dados “PubMed” do grupo NCBI (disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>) com a palavra-chave “*lentiviral vector*” mostra que entre 2006 e 2015 a quantidade de trabalhos publicados nessa temática triplicou, de 156 publicações em 2006, para 489 em 2015 (figura 34).

Figura 34. Quantidade de publicações sobre vetores lentivirais (palavra-chave: “*lentiviral vector*”) publicadas no bando de dados “PubMed” (NCBI), de 2006 a 2015.

O crescente número de trabalhos publicados reflete o interesse no uso desses vetores em aplicações laboratoriais e clínicas, que podem ser utilizados na transdução de diversos tipos celulares, tanto *in vitro* quanto *in vivo* (NALDINI et al., 1996a).

Em direção ao crescente interesse e extensa aplicação desses vetores, o presente estudo possibilitou o desenvolvimento de dois vetores de expressão lentivirais para diferentes aplicações: o vetor pL-proITGA2b-FVIII, com construção voltada para expressão de FVIII em megacariócitos e plaquetas, e o vetor p1054-Runx1C, para expressão constitutiva de *Runx1C* e avaliação de seu papel em processos de diferenciação hematopoética. Esses vetores foram gerados a partir da clonagem das sequências de interesse e modificação do vetor lentiviral usado como base. Inicialmente, quatro sequências foram selecionadas, para produção de quatro vetores lentivirais: os genes *VkorC1* e *Runx1C* e os promotores proPF4 e proITGA2b. Porém, entre essas sequências apenas duas chegaram de fato a serem clonadas no

vetor lentiviral base, produzindo os vetores pL-proITGA2b-FVIII e p1054-Runx1C, dentre os quais apenas um foi confirmado por sequenciamento.

A construção de vetores de expressão lentivirais consiste em um trabalho molecular complexo, que envolve uma série etapas interdependentes, descritas resumidamente como: 1-amplificação da sequência de selecionada por PCR; 2-clonagem da sequência em vetor de clonagem; 3-recuperação da sequência e preparo do vetor lentiviral base; 4-subclonagem da sequência no vetor lentiviral e 5-confirmação final e análise funcional da construção. O trabalho e cada etapa deve ser bem planejada e executada antes que a próxima possa ser efetuada. Assim, no desenvolvimento do presente estudo, a construção de vetores para cada uma das quatro sequências seguiu um ritmo diferente, devido às confirmações prévias necessárias para a etapa seguinte. Duas entre quatro construções chegaram até a etapa final do processo de construção. Apesar disso, cada etapa executada representa um ganho no desenvolvimento de um vetor de expressão, visto que as etapas podem ser retomadas a partir da última etapa confirmada. Ainda, a atenção às técnicas durante o desenvolvimento de cada etapa possibilitou a produção de um Manual de Construção de Vetores de Expressão, com protocolos, bases de dados e ferramentas para reprodução do trabalho aqui desenvolvido por outros pesquisadores.

Na primeira etapa, a amplificação por PCR a partir das amostras utilizadas foi possível para as sequências *VkorC1*, proITGA2b e proPF4. Para amplificação dessas sequências, *primers* específicos foram desenhados, de forma que pudessem amplificar toda a região ativa necessária para clonagem. Os *primers* desenhados se mostraram eficientes na amplificação das três sequências. A seleção e desenho dos *primers* é um passo importante dessa etapa. *Primers* bem desenhados, com tamanho e porcentagens adequadas de bases citosina (C) e guanina (G), apresentam anelamento específico à sequência pretendida, permitindo sua amplificação (KOLMODIN; BIRCH, 2002).

Clonagem do gene VkorC1 em vetor de clonagem

A sequência do gene *VkorC1* amplificada foi clonada no vetor de clonagem pGem T-easy, formando o vetor pGem-VkorC1, e confirmada por PCR e restrição enzimática. O vetor confirmado encontra-se armazenado para posteriores experimentos e pode ser usado para subclonagem em um vetor lentiviral apropriado. Um vetor lentiviral com potencial para clonagem de *VkorC1* é o vetor pLVXR-Puro, produzido a partir da modificação do vetor comercial pLVX-Puro, através da inversão do sítio de múltipla clonagem pelo nosso grupo de pesquisa (dados não publicados).

Um vetor lentiviral produzido para expressão do gene *VkorC1* tem importante aplicação na produção de proteínas dependentes de vitamina K, como os fatores de coagulação FVII e FIX. O gene *VkorC1* participa diretamente no ciclo da vitamina K, através da conversão do epóxido K2,3 para a forma nativa da vitamina K, essencial para o processo de carboxilação dessas proteínas (OLDENBURG et al., 2006). Assim, a cotransdução de um vetor lentiviral para expressão de *VkorC1* em células produtoras de FVII e FIX pode levar a melhora na carboxilação dessas proteínas e a aumento na quantidade de proteínas ativas produzidas. De fato, estudos mostram que a co-expressão de *VkorC1* em células BHK (WAJIH et al., 2005) e células CHO (LIU et al., 2014) se mostra eficiente na melhora da secreção de FIX ativo carboxilado, sem afetar, contudo a quantidade de proteínas produzidas. De forma similar, sistemas de expressão que usam co-expressão de *VkorC1* foram usados com sucesso para produção de Fator X (FX) ativo (SUN et al., 2005). A expressão de *VkorC1* nessas células melhora a produção de proteínas ativas através da melhora na reciclagem do epóxido K2,3, aumentando a quantidade de vitamina K ativa para utilização no processo de carboxilação e diminuindo o acúmulo de K2,3 na célula, que é potencialmente citotóxico (LIU et al., 2014).

Construção do vetor lentiviral p1054-Runx1C

Para a sequência *Runx1C*, a amplificação por PCR não foi possível a partir das amostras disponíveis. Para que o gene possa ser expresso de forma funcional é necessária a clonagem de toda a região CDS do gene, obtida por amplificação a partir do material expresso pela célula (mRNA). O insucesso na amplificação para essa sequência pode ter sido devido ao fato das amostras utilizadas não expressarem, ou expressarem em baixa quantidade esse gene. O *Runx1* é um fator de transcrição expresso principalmente em células-tronco Hematopoéticas (CTHs). Este gene regula a diferenciação destas células em progenitores hematopoéticos definitivos (revisado por OKUDA; NISHIMURA; NAKAO, 2001). Alguns trabalhos demonstram sua expressão em outros tecidos, tais como células do músculo estriado esquelético (ZHU et al, 1994) e no epitélio da glândula lacrimal (VORONOV et al., 2013), porém esse gene não é expresso em células do sistema nervoso central, sistema respiratório ou em células do sistema reprodutivo (MARKOVA et al., 2012). Portanto, entre as amostras utilizadas nesse trabalho para amplificação de *Runx1C*, foram utilizadas duas amostras de células-tronco Embrionárias (CTEs) submetidas a diferenciação hematopoética (com 17 e 27 dias de diferenciação) com o intuito de obter CTHs e seus progenitores. No entanto, a diferenciação *in vitro* não corresponde exatamente ao desenvolvimento fisiológico *in vivo*,

portanto o padrão de expressão gênico não é necessariamente o mesmo. A escolha da amostra de PBMC, também utilizada, se deu através da análise do nível de expressão de *Runx1* através da ferramenta online “Genecards” (www.genecards.org). A análise indicou uma baixa expressão de *Runx1* em monócitos, linfócitos T (CD4, CD8 e NK) e linfócitos B, porém a amplificação desse gene a partir dessa amostra também não foi possível.

A clonagem do gene *Runx1* humano se mostra uma tarefa difícil devido à dificuldade em encontrar tecidos que expressem o gene em quantidade suficiente para amplificação. A clonagem do gene murino já foi realizada por alguns pesquisadores (FUJITA et al., 2001; LORSBACH et al., 2004). Entretanto, o gene murino não apresenta em sua extensão todos os *exons* transcritos pelo gene *Runx1* humano. Entre alguns trabalhos que utilizaram isoformas humanas do *Runx1* estão o trabalho de Challen e Goodell, que realizaram experimentos com *Runx1B* e *Runx1C* humanos recombinados em vetores retrovirais e Ran e colaboradores, que realizaram experimentos utilizando vetores com a isoforma *Runx1A* (CHALLEN; GOODELL, 2010; RAN et al., 2013). A obtenção dos genes *Runx1B* e *C* utilizados por Challen e Goodell se deu pela síntese das duas sequências pela empresa GenScript, enquanto Ran não descreve a fonte utilizada ou como foram confeccionados os vetores do estudo.

Devido à dificuldade na obtenção de um tipo celular que expresse *Runx1C*, optamos pela síntese do gene pela empresa GenScript, que realizou a entrega do gene clonado em vetor pUC-57 (pUC-Runx1C). O vetor p1054-Runx1C foi construído a partir da subclonagem do gene *Runx1C* purificado a partir do vetor pUC-Runx1C no vetor lentiviral base p1054-CIGWS. A quantidade de 36 colônias foi obtida a partir da transformação da ligação em bactérias competentes, entre as quais 14 foram identificadas como positivas para incorporação do vetor. A triagem de bactérias positivas entre as 36 transformadas foi realizada por PCR com *primers* que amplificam a região IRES-GFP presente no vetor p1054-CIGWS. Apesar da grande quantidade de colônias obtidas na transformação, a triagem revelou que apenas parte delas apresentaram incorporação do vetor lentiviral. As demais colônias provavelmente incorporaram o vetor de clonagem do qual o fragmento *Runx1C* foi purificado, reflexo da impureza na purificação da amostra submetida à ligação.

A triagem permitiu indicar quais colônias incorporaram o vetor p1054-CIGWS, sem, contudo indicar a presença do fragmento *Runx1C* subclonado nesses vetores. Portanto, entre as 14 colônias positivas, quatro foram selecionadas para confirmação da construção por restrição enzimática (colônias 3A, 4A, 5C e 5D). As reações de restrição permitiram concluir que a colônia 5C apresenta incorporação do vetor p1054-Runx1C construído. As restrições foram realizadas com as enzimas BamHI e BstXI, e esperava-se a formação de bandas altas,

de cerca de 10000pb e bandas menores, de 583pb para o BamHI e 646pb para BstXI. A restrição do material da colônia 5C apresentou o padrão esperado para as bandas maiores (≈ 10000 pb), porém as bandas menores não foram observadas no gel.

Na migração dos fragmentos formados pela restrição no gel de agarose, as bandas menores deveriam ser observadas em regiões mais baixas do gel. A separação de fragmentos de DNA por eletroforese em gel de agarose ocorre pela capacidade que as moléculas têm de migrar através do gel, que é dada pela sua relação carga/massa (HELLING; GOODMAN; BOYER, 1974). Assim, a taxa de migração de uma molécula de DNA através de um gel é determinada: 1- pelo tamanho da molécula (AAIJ; BORST, 1972); 2- pela concentração de agarose no gel; 3- pela conformação do DNA; 4- pela tensão aplicada; 5- pela presença de intercalantes de DNA (brometo de etídeo); 6- tipo de agarose e 7- tipo de tampão utilizado. A restrição do vetor p1054-Runx1C com BamHI e BstXI forma bandas maiores e menores, que migram mais no gel. Por serem bandas com tamanhos bem diferentes a visualização dos fragmentos de menor tamanho torna-se difícil, visto que a intensidade da banda no gel de agarose é dada pela quantidade de intercalante de DNA (brometo de etídeo) que o fragmento incorpora (HELLING; GOODMAN; BOYER, 1974). Assim, apesar de haver a mesma quantidade de fragmentos grandes e pequenos formados pela restrição do material, a banda de maior tamanho apresenta maior intensidade, enquanto a banda de menor tamanho, com menor intensidade, nem sempre é visualizada. O padrão de restrição obtido nas restrições realizadas indica que a colônia 5C apresenta o vetor lentiviral p1054-Runx1C construído, porém a confirmação por sequenciamento ainda se faz necessária.

O vetor p1054-Runx1C construído tem potencial para aplicação em estudos de diferenciação hematopoética, visto que o gene *Runx1* tem importante participação nesse processo. Esse gene é expresso durante a formação de CTHs definitivas. Sua expressão leva à formação de CTHs funcionais a partir das células do Endotélio Hemogênico na região Aorta-Mesonefros-Gônada (CHEN et al., 2009; LORSBACH et al., 2004; NORTH et al., 1999, NORTH et al., 2002). Entre as três isoformas do gene, a expressão da isoforma C, em contrapartida às isoformas A e B, está intimamente relacionada ao surgimento de CTHs definitivas em modelos murinos (CHALLEN; GOODELL, 2010; FUJITA et al., 2001). A expressão das variantes A e C *in vitro* em Células-tronco pluripotentes melhora a formação de células hematopoéticas, progenitores hemato-endoteliais e unidades formadoras de colônia (RAN et al., 2013; REAL et al., 2013), porém a isoforma C apresenta capacidade de reconstituição do sistema hematopoético *in vivo* (REAL et al., 2013). Dessa forma, a transdução desse vetor em Células-tronco Embrionárias ou em Células Pluripotentes

Induzidas pode ser utilizada no estudo da participação desse gene na diferenciação hematopoética e ainda para melhora na diferenciação dessas células em progenitores hematopoéticos definitivos.

Clonagem do promotor proPF4 e construção do vetor lentiviral pL-proITGA2b-FVIII

As sequências dos promotores proPF4 e proITGA2b foram obtidas com sucesso a partir da amplificação por PCR e foram clonadas no vetor de clonagem pGem-Teasy, formando os vetores pGem-proPF4 e pGem-proITGA2b. A clonagem foi confirmada por PCR e por restrição enzimática e estoques foram confeccionados com material das colônias confirmadas. A sequência proITGA2b, foi purificada do vetor de clonagem pGem-proITGA2b para continuidade dos experimentos e produção do vetor lentiviral. Já o vetor pGem-proPF4 está armazenado e devido ao prazo não foi clonado no vetor lentiviral.

Os dois promotores apresentam a mesma atividade tecido-específico, com ativação da expressão gênica em megacariócitos e plaquetas, tendo, portanto, potencial para aplicações semelhantes (WILCOX, 2016). A clonagem dos promotores em vetores lentivirais representa estratégia para direcionar a síntese de algumas proteínas para esses tipos celulares. De forma semelhante, a utilização de vetores com promotores específicos vem sendo usado por diversos pesquisadores para melhorar a expressão de genes em vários tipos celulares, como em hepatócitos (NASH et al., 2004; PICANÇO et al., 2007), cardiomiócitos (LEE et al., 2011), células B (LAURIE et al., 2007), neurônios (HIOKI et al., 2007; JAKOBSSON et al., 2003) e células hematopoéticas (DUPUY et al., 2005).

Para produção do vetor megacariócito-específico desse estudo, o promotor proITGA2b foi purificado a partir do vetor de clonagem foi utilizado na modificação do vetor lentiviral base p1054-FVIII. O vetor base apresenta expressão de FVIII de coagulação sanguínea sob controle do promotor CMV. O promotor CMV foi retirado da estrutura base do vetor lentiviral por restrição enzimática e o promotor proITGA2b purificado foi subclonado no vetor lentiviral, em substituição ao promotor CMV retirado. A ligação resultou na formação do vetor pL-proITGA2b-FVIII. A transformação da ligação em bactérias competentes resultou na formação de 12 colônias, as quais foram submetidas à PCR com o par de *primers* para a sequência proITGA2b para triagem das colônias que incorporaram o vetor produzido. A triagem mostrou que entre as 12, seis colônias apresentaram amplificação positiva para o proITGA2b (932pb), indicando a incorporação do vetor. Para confirmação da construção, as oito colônias foram digeridas com a enzima XhoI. A restrição da construção correta deve formar dois fragmentos: 1-o promotor proITGA2b (932pb) e 2-o vetor lentiviral p1054-FVIII

sem o promotor (14168pb). A restrição permitiu confirmar que cinco colônias – C2, C7, C8, C11 e C12 – incorporaram a construção pL-proITGA2b-FVIII. Apesar disso, as reações de PCR e restrição executadas não permitem a confirmação da orientação do promotor nos vetores incorporados.

Para confirmação do vetor pL-proITGA2b-FVIII foi realizado sequenciamento da colônia C2. O sequenciamento abrangeu 1024pb da amostra, porém desses, apenas 500pb apresentaram qualidade para análise. Os 500pb analisados pela ferramenta BLAST mostraram 67% de similaridade com o promotor do gene ITGA2b depositado no banco de dados, permitindo confirmar que a sequência clonada no vetor corresponde de fato ao promotor pretendido. Porém, os 500pb não abrangeram a região de ligação entre o promotor e o FVIII do vetor lentiviral utilizado, não possibilitando a confirmação da direção da ligação. No sequenciamento automático é comum que as partes do início e do final da região sequenciada apresentem qualidade ruim. Isso ocorre devido a sobrecarga de resíduos no capilar do sequenciador no início da leitura, e pelo esgotamento dos reagentes ao final da reação. A qualidade do sequenciamento pode ser afetada também por resíduos da primeira reação de PCR, como restos de *primers*, dNTPs e tampão, que atrapalham a reação de sequenciamento ou pelo excesso de DNA submetido ao sequenciamento (ADAMS, 2012). Assim, para melhora na qualidade do sequenciamento, é necessário o desenho de um novo *primer* de sequenciamento, com localização a cerca de 200pb da região de ligação entre promotor e FVIII, garantindo que a região pretendida seja sequenciada. É essencial ainda a purificação e quantificação do material submetido à reação de sequenciamento, para evitar interferências dos reagentes prévios.

Em paralelo, foi realizada a caracterização funcional do vetor pL-proITGA2b-FVIII através de transfecção transiente em células HEK-293T e análise da subsequente expressão de GFP e secreção de FVIII pelas células transfectadas. A análise por citometria de fluxo revelou a presença de 34,45% ($\pm 0,485\%$) de células GFP positivas nas amostras transfectadas. A mensuração da secreção de proteína FVIII pelo ensaio de ELISA apresentou quantificação de 137,22ng/mL ($\pm 12,23$) de FVIII secretado no meio. Em conjunto, as análises de expressão de GFP e o ensaio de ELISA revelam que a transfecção das células HEK-293T com o vetor pL-proITGA2b-FVIII foi eficiente e comprovam a funcionalidade do vetor. O vetor pL-proITGA2b-FVIII gerado apresenta um cassete de expressão bi-cistrônico, com co-expressão de FVIII e GFP ativada pelo promotor proITGA2b clonado. Assim, a expressão positiva para GFP e produção e secreção de FVIII pelas células indicia que o vetor produzido encontra-se ativo e que o promotor proITGA2b clonado permite a expressão gênica de GFP e FVIII.

As análises permitem testar a funcionalidade do vetor, contudo, através dos experimentos realizados, não foi possível comprovar a especificidade do promotor ptoITGA2b clonado no vetor. Apesar de ser um promotor para atividade específica em megacariócitos, o promotor proITAG2b apresentou atividade na célula HEK-293T, que é derivada de rim embrionário humano. Esse resultado não descaracteriza a atividade específica do promotor. De forma similar, Picanço e colaboradores (2007) ao utilizarem vetor lentiviral com promotor hAAt, específico para expressão em células hepáticas, obtiveram expressão moderada (0,47UI/mL) da proteína FVIII nas células renais HEK-293T. Assim, a expressão específica do vetor pL-proITGA2b-FVIII em megacariócitos ainda precisar ser testada. Para isso, podem ser usadas as linhagens megacariocíticas MEG-01 (ATCC® CRL-2021TM) e HEL 92.1.7 (ATCC® TIB-180), essa última já utilizada com sucesso por Du e colaboradores (2013) para expressão de luciferase guiada pelo promotor proITGA2b.

A confirmação da especificidade de expressão do vetor pL-proITGA2b-FVIII em linhagens megacariocíticas se faz necessária, visto sua aplicabilidade para expressão de FVIII diretamente em megacariócitos e plaquetas. A utilização de vetores com expressão direcionada a esses tipos celulares representa uma estratégia inovadora e eficiente para terapia gênica de diversas doenças, pois as plaquetas participam diretamente de diversos processos fisiológicos, como a coagulação sanguínea e resposta imune (WILCOX, 2016). Essas células poderiam, portanto, ser usadas para transdução de fatores de coagulação sanguíneos para tratamento de doenças como a hemofilia A (deficiência na produção de FVIII) e hemofilia B (deficiência na produção de FIX). Estudos de terapia gênica para essas doenças apresentam foco na modificação de células hepáticas (ANNONI et al., 2013; CANTORE et al., 2015; PICANÇO et al., 2007) e células hematopoéticas (KOOTSTRA et al., 2003b; MOAYERI et al., 2005; RAMEZANI et al., 2011). A utilização de plaquetas como veículos na entrega desses fatores se mostra uma alternativa viável, pois essas células participam diretamente no processo de coagulação e os fatores de coagulação seriam expressos por elas seriam secretados diretamente no local de injúria (LESLIE, 2010; WILCOX, 2016). De fato, alguns grupos utilizaram essas células eficientemente para terapia de hemofilia A (DU et al., 2013; WANG et al., 2015) e Hemofilia B (CHEN et al., 2014). Ainda, a utilização de plaquetas para expressão dos fatores de coagulação é eficiente mesmo para tratamento de cobaias com desenvolvimento de anticorpos inibitórios. Isso ocorre pois as proteínas ficam armazenadas internamente nas plaquetas na forma α -grânulos, que ficam protegidos da ação dos anticorpos inibitórios e são liberados localmente, ativando rapidamente a coagulação (KUETHER et al., 2012; SHI et al., 2006).

Os dois vetores lentivirais gerados, PL-proITGA2b-FVIII e p1054-Runx1C, são vetores de terceira geração derivados de HIV-1 e apresentam remoção de parte da sequência promotora U3 (Δ U3) da região 3' LTR do genoma viral, sendo, portanto, vetores são auto-inativantes (SIN – do inglês *Self Inactivated*). Vetores lentivirais derivados do genoma viral do HIV-1 estão entre os mais utilizados, por terem seu genoma bem caracterizado e por terem sido extensivamente modificados a fim de tornar sua utilização segura (COCKRELL; KAFRI, 2003). Por terem parte da sequência viral U3 removida e por não apresentarem o promotor U3 na região 5'LTR, os vetores gerados apresentam segurança elevada, visto que a atividade promotora da região U3 original do vírus é desligada nos DNAs integrados. Dessa forma, ao integrarem-se ao genoma da célula-alvo, ocorre apenas a transcrição do transgene regulada pelo promotor interno, e o RNA viral não é transcrito, reduzindo a possibilidade de formação de Lentivírus Competentes em Replicação (RCLs) e a transposição do material integrado a outras células (ZUFFEREY et al., 1998). Ainda, os vetores gerados apresentam as sequências cPPT e CTS e elemento regulatório da transcrição do vírus da hepatite de marmota (WPRE), que melhoram a eficiência de integração do vetor de expressão lentiviral ao DNA na célula-alvo e aumentam a estabilidade do DNA transcrito, melhorando a expressão (SIRVEN et al., 2000; ZUFFEREY et al., 1999)

De forma sucinta, os dois vetores lentivirais produzidos podem ser utilizados em diversas aplicações, tanto em pesquisa básica no estudo da diferenciação hematopoética *in vitro* e produção de CTHs funcionais (vetor p1054-Runx1C) quanto em ensaios de terapia gênica para hemofilia A, através da expressão direcionada de FVIII em megacariócitos e plaquetas (vetor pL-proITGA2b-FVIII).

Conclusão

6 CONCLUSÃO

Este trabalho permitiu a clonagem das regiões codificantes (CDS – *Coding DNA Sequence*) dos genes *VkorC1* e *Runx1C* e das regiões promotoras proPF4 e proITGA2b em vetores intermediários (pGem T-easy e pUC-57).

Além disso, esta dissertação permitiu o desenvolvimento de dois vetores lentivirais com potencial para aplicações biotecnológicas e clínicas. O vetor pL-proITGA2b-FVIII foi confirmado por sequenciamento e sua funcionalidade foi testada em células HEK-293T.

Apesar das demais sequências não terem chegado às etapas finais do processo de construção de vetor de expressão, todas encontram-se clonadas em vetores de clonagem já foram confirmadas por diversos métodos. Os estoques efetuados a partir das colônias confirmadas pode ser facilmente obtido para consecução de outros experimentos, incluindo a construção de vetores lentivirais.

Ainda, durante a execução deste projeto foi desenvolvido um guia prático e aplicado, o Manual de Construção de Vetores de Expressão, que está em vias de publicação (apêndice A). O manual apresenta as técnicas, processos, protocolos e ferramentas utilizadas no decorrer do processo de construção dos vetores deste trabalho.

Dessa forma, o presente trabalho apresenta contribuição prática, visto que deixa construídos vetores que podem ser utilizados na realização de estudos envolvendo as sequências aqui trabalhadas, e contribuição teórica, através do Manual produzido que auxiliará pesquisadores que pretendem desenvolver projetos similares.

Referências Bibliográficas

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS¹

- AAIJ, C.; BORST, P. The gel electrophoresis of DNA. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 269, n. 2, p. 192–200, 1972.
- ADAMS, M. D.; FIELDS, C.; VENTER, J. C. (Ed.). **Automated DNA sequencing and analysis**. Elsevier, 2012.
- ANNONI, A. et al. Liver gene therapy by lentiviral vectors reverses anti-factor IX pre-existing immunity in haemophilic mice. **EMBO Molecular Medicine**, v. 5, n. 11, p. 1684–1697, 2013.
- BUKRINSKY, M. I. et al. A nuclear localization signal within HIV-1 matrix protein that governs infection of non-dividing cells. **Nature**, v. 363, p. 210–211, 1993.
- BURNS, J. C. et al. Vesicular stomatitis virus G glycoprotein pseudotyped retroviral vectors: concentration to very high titer and efficient gene transfer into mammalian and nonmammalian cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 90, n. 17, p. 8033–8037, 1993.
- CANTORE, A. et al. Liver-directed lentiviral gene therapy in a dog model of hemophilia B. **Science Translational Medicine**, v. 7, n. 277, p. 277ra28–277ra28, 2015.
- CHALLEN, G. A; GOODELL, M. A. Runx1 isoforms show differential expression patterns during hematopoietic development but have similar functional effects in adult hematopoietic stem cells. **Experimental hematology**, v. 38, n. 5, p. 403–16, maio 2010.
- CHARNEAU, P.; ALIZON, M.; CLAVEL, F. A second origin of DNA plus-strand synthesis is required for optimal human immunodeficiency virus replication. **Journal of virology**, v. 66, n. 5, p. 2814–20, 1992.
- CHEN, M. J. et al. Runx1 is required for the endothelial to haematopoietic cell transition but not thereafter. **Nature**, v. 457, n. 7231, p. 887–91, 12 fev. 2009.
- CHEN, Y. et al. Platelet gene therapy by lentiviral gene delivery to hematopoietic stem cells restores hemostasis and induces humoral immune tolerance in FIX(null) mice. **Molecular therapy**, v. 22, n. 1, p. 169–77, 2014.
- CHINNASAMY, D. et al. Lentiviral-mediated gene transfer into human lymphocytes: role of HIV-1 accessory proteins. **Blood**, v. 96, n. 4, p. 1309–16, 2000.
- COCKRELL, A. S.; KAFRI, T. HIV-1 vectors: Fulfillment of expectations, further advancements, and still a way to go. **Current Hiv Research**, v. 1, n. 4, p. 419–439, 2003.
- COCKRELL, A. S.; KAFRI, T. Gene delivery by lentivirus vectors. **Molecular Biotechnology**, v. 36, n. 3, p. 184–204, 2007.
- COIL, D. A.; MILLER, A. D. Phosphatidylserine Is Not the Cell Surface Receptor for Vesicular Stomatitis Virus Phosphatidylserine Is Not the Cell Surface Receptor for Vesicular Stomatitis Virus. **Journal of Virology**, v. 78, n. 20, p. 10920–10926, 2004.

- COLLINS, K. L. et al. HIV-1 Nef protein protects infected primary cells against killing by cytotoxic T lymphocytes. **Nature**, v. 391, n. 6665, p. 397–401, 1998.
- DA ROSA, N. G. et al. SK-HEP cells and lentiviral vector for production of human recombinant factor VIII. **Biotechnology letters**, v. 34, n. 8, p. 1435–43, 2012.
- DAYA, S.; BERNS, K. I. Gene Therapy Using Adeno-Associated Virus Vectors. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 21, n. 4, p. 583–593, 2008.
- DE PALMA, M. et al. In vivo targeting of tumor endothelial cells by systemic delivery of lentiviral vectors. **Human gene therapy**, v. 14, n. 12, p. 1193–206, 2003.
- DELEND, C. Lentiviral vectors: optimization of packaging, transduction and gene expression. **The journal of gene medicine**, v. 6 Suppl 1, p. S125–38, 2004.
- DEMAISON, C. et al. High-level transduction and gene expression in hematopoietic repopulating cells using a human immunodeficiency virus type 1-based lentiviral vector containing an internal spleen focus forming virus promoter. **Human Gene Therapy**, v. 13, n. 7, p. 803–813, 2002.
- DU, L. M. et al. Platelet-targeted gene therapy with human factor VIII establishes haemostasis in dogs with haemophilia A. **Nature communications**, v. 4, p. 2773, jan. 2013.
- DULL, T. et al. A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system. **Journal of virology**, v. 72, n. 11, p. 8463–71, 1998.
- DUPUY, F. P. et al. Lentiviral transduction of human hematopoietic cells by HIV-1- and SIV-based vectors containing a bicistronic cassette driven by various internal promoters. **Journal of Gene Medicine**, v. 7, n. 9, p. 1158–1171, 2005.
- ESCORS, D. et al. **Lentiviral vectors and gene therapy**. [s.l: s.n.]. v. 4
- ESCORS, D.; BRECKPOT, K. Lentiviral vectors in gene therapy: Their current status and future potential. **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis**, v. 58, n. 2, p. 107–119, 2010.
- FAIRMAN, M. P.; STILLMAN, B. Cellular factors required for multiple stages of SV40 DNA replication in vitro. **The EMBO journal**, v. 7, n. 4, p. 1211–8, 1988.
- FOUCHIER, R. A. et al. Human immunodeficiency virus type 1 Vif does not influence expression or virion incorporation of gag-, pol-, and env-encoded proteins. **Journal of virology**, v. 70, n. 12, p. 8263–8269, 1996.
- FRANKEL, A. D.; FRANCISCO, S.; YOUNG, J. A. T. HIV-1: Fifteen Proteins and an RNA. **Annual review of biochemistry**, v. 67, n. 1, p. 1–25, 1998.
- FUJITA, Y. et al. Identification of an alternatively spliced form of the mouse AML1/RUNX1 gene transcript AML1c and its expression in early hematopoietic development. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 281, n. 5, p. 1248–1255, 2001.
- GASCÓN, S. et al. Dual-promoter lentiviral vectors for constitutive and regulated gene expression in neurons. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 168, n. 1, p. 104–112, 2008.

- GINN, S. L. et al. Promoter interference mediated by the U3 region in early-generation HIV-1-derived lentivirus vectors can influence detection of transgene expression in a cell-type and species-specific manner. **Human gene therapy**, v. 14, p. 1127–1137, 2003.
- GRAHAM, F. et al. Characteristics of a Human Cell Line Transformed by D N A from Human Adenovirus Type 5. **Journal general virology**, v. 36, n. 2977, p. 59–74, 1977.
- GREENBERG, K.P. GELLER, S.F. SCHAFFER, D.V. FLANNERY, J. G. Targeted transgene expression in Müller glia of normal and diseased retinas using lentiviral vectors. **Investigative ophthalmology & visual science**, v. 48, n. 4, p. 1844, 2007.
- HANAHAN, D. Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. **Journal of molecular biology**, v. 166, n. 4, p. 557–580, 1983.
- HARRIS, R. S. et al. DNA deamination mediates innate immunity to retroviral infection. **Cell**, v. 113, n. 6, p. 803–809, 2003.
- HELLING, R. B.; GOODMAN, H. M.; BOYER, H. W. Analysis of endonuclease R-EcoRI fragments of DNA from lambdoid bacteriophages and other viruses by agarose-gel electrophoresis. **Journal of virology**, v. 14, n. 5, p. 1235–44, 1974.
- HEMATTI, P. et al. Distinct genomic integration of MLV and SIV vectors in primate hematopoietic stem and progenitor cells. **PLoS biology**, v. 2, n. 12, p. e423, 2004.
- HIOKI, H. et al. Efficient gene transduction of neurons by lentivirus with enhanced neuron-specific promoters. **Gene therapy**, v. 14, n. 11, p. 872–882, 2007.
- HOLTKOTTER, O. et al. Integrin $\alpha 2$ -deficient mice develop normally, are fertile, but display partially defective platelet interaction with collagen. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 13, p. 10789–10794, 2002.
- ICTV: **International Committee on Taxonomy of Viruses**. Disponível em: <http://www.ictvonline.org/index.asp>. Acesso em: 20/01/2016
- JAKOBSSON, J. et al. Targeted transgene expression in rat brain using lentiviral vectors. **Journal of Neuroscience Research**, v. 73, n. 6, p. 876–885, 2003.
- KATZ, R. The Retroviral Enzymes. **Annual Review of Biochemistry**, v. 63, n. 1, p. 133–173, 1994.
- KIM, V. N. et al. Minimal requirement for a lentivirus vector based on human immunodeficiency virus type 1. **Journal of virology**, v. 72, n. 1, p. 811–816, 1998.
- KOLMODIN, L. A.; BIRCH, D. E. Polymerase Chain Reaction: Basic Principles and Routine Practice. In: CHEN, B.-Y.; JANES, H. W. (Eds.). **Methods in Molecular Biology: PCR cloning protocols**. 2. ed. [s.l.] Humana Press, 2002. p. 3–18.
- KOOTSTRA, N. A.; MATSUMURA, R.; VERMA, I. M. Efficient production of human FVIII in hemophilic mice using lentiviral vectors. **Molecular Therapy**, v. 7, n. 5, p. 623–631, 2003a.

- KOOTSTRA, N. A.; MATSUMURA, R.; VERMA, I. M. Efficient production of human FVIII in hemophilic mice using lentiviral vectors. **Molecular Therapy**, v. 7, n. 5 I, p. 623–631, 2003b.
- KUETHER, E. L. et al. Lentivirus-mediated platelet gene therapy of murine hemophilia A with pre-existing anti-factor VIII immunity. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 10, n. 8, p. 1570–1580, 2012.
- KURODA, H. KUTNER, R.H. BAZAN, N.G. REISER, J. A comparative analysis of constitutive and cell- specific promoters in the adult mouse hippocampus using lentivirus vector- mediated gene transfer. **The journal of gene medicine**, v. 10, n. 11, p. 1163–1175, 2008.
- LAURIE, K. L. et al. Cell-specific and efficient expression in mouse and human B cells by a novel hybrid immunoglobulin promoter in a lentiviral vector. **Gene therapy**, v. 14, n. 23, p. 1623–31, 2007.
- LEE, C. J. et al. Promoter-specific lentivectors for long-term, cardiac-directed therapy of Fabry disease. **Journal of Cardiology**, v. 57, n. 1, p. 115–122, 2011.
- LESLIE, M. Beyond Clotting: The Powers of Platelets. **Science**, v. 328, n. April, p. 562–564, 2010.
- LEWIS, P. F.; EMERMAN, M. Passage through mitosis is required for oncoretroviruses but not for the human immunodeficiency virus. **Journal of virology**, v. 68, n. 1, p. 510–516, 1994.
- LIU, B. H. et al. CMV enhancer/human PDGF-beta promoter for neuron-specific transgene expression. **Gene therapy**, v. 11, n. 1, p. 52–60, 2004.
- LIU, J. et al. Improved expression of recombinant human factor IX by co-expression of GGCX, VKOR and furin. **Protein Journal**, v. 33, n. 2, p. 174–183, 2014.
- LORSBACH, R. B. et al. Role of RUNX1 in adult hematopoiesis: Analysis of RUNX1-IRES-GFP knock-in mice reveals differential lineage expression. **Blood**, v. 103, n. 7, p. 2522–2529, 2004.
- MAETZIG, T. et al. Gammaretroviral Vectors: Biology, Technology and Application. **Viruses**, v. 3, n. 12, p. 677–713, 2011.
- MAIER, P.; VON KALLE, C.; LAUFS, S. Retroviral vectors for gene therapy. **Future microbiology**, v. 5, n. 10, p. 1507–23, 2010.
- MANN, R.; MULLIGAN, R. C.; BALTIMORE, D. Construction of a retrovirus packaging mutant and its use to produce helper-free defective retrovirus. **Cell**, v. 33, n. 1, p. 153–159, 1983.
- MARKOVA, E. N. et al. Transcription factor RUNX1. **Molecular Biology**, v. 46, n. 6, p. 846–859, 2012.
- MCGREW, M. J. et al. Efficient production of germline transgenic chickens using lentiviral vectors. **EMBO reports**, v. 5, n. 7, p. 728–33, 2004.

- MILLER, A. D. Development and applications of retroviral vectors. In: Coffin, J. M.; Hughes, S. H.; Varmus, H. E. (ed.). **Retroviruses**. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. p. 437–473, 1997.
- MIYOSHI, H. et al. t(8;21) breakpoints on chromosome 21 in acute myeloid leukemia are clustered within a limited region of a single gene, AML1. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 88, n. 23, p. 10431–4, 1991.
- MIYOSHI, H. et al. Development of a self-inactivating lentivirus vector. **Journal of virology**, v. 72, n. 10, p. 8150–8157, 1998.
- MOAYERI, M.; HAWLEY, T. S.; HAWLEY, R. G. Correction of murine hemophilia a by hematopoietic stem cell gene therapy. **Molecular Therapy**, v. 12, n. 6, p. 1034–1042, 2005.
- MODLICH, U. et al. Insertional Transformation of Hematopoietic Cells by Self-inactivating Lentiviral and Gammaretroviral Vectors. **Molecular Therapy**, v. 17, n. 11, p. 1919–1928, 2009.
- MOREAU-GAUDRY, F. et al. hematopoietic cells with self-inactivating lentiviral vectors High-level erythroid-specific gene expression in primary human and murine hematopoietic cells with self-inactivating lentiviral vectors. **Blood**, v. 98, n. 9, p. 2664–2672, 2001.
- NALDINI, L. et al. In vivo gene delivery and stable transduction of post mitotic cells by a lentiviral vector. **Science**, v. 272, n. April, p. 263–267, 1996a.
- NALDINI, L. et al. Efficient transfer, integration, and sustained long-term expression of the transgene in adult rat brains injected with a lentiviral vector. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, n. 21, p. 11382–8, 1996b.
- NASH, K. L. et al. Hepatocyte-specific gene expression from integrated lentiviral vectors. **Journal of Gene Medicine**, v. 6, n. 9, p. 974–983, 2004.
- NEIL, S. J. D.; ZANG, T.; BIENIASZ, P. D. Tetherin inhibits retrovirus release and is antagonized by HIV-1 Vpu. **Nature**, v. 451, n. 7177, p. 425–430, 2008.
- NORTH, T. et al. Cbfa2 is required for the formation of intra-aortic hematopoietic clusters. **Development**, v. 126, n. 11, p. 2563–2575, 1999.
- NORTH, T. E. et al. Runx1 expression marks long-term repopulating hematopoietic stem cells in the midgestation mouse embryo. **Immunity**, v. 16, n. 5, p. 661–672, 2002.
- NUCIFORA, G.; ROWLEY, J. D. AML1 and the 8;21 and 3;21 Translocations in Acute and Chronic Myeloid Leukemia. **Blood**, v. 86, n. 1, p. 1–14, 1995.
- OGAWA, E. et al. PEBP2/PEA2 represents a family of transcription factors homologous to the products of the Drosophila runt gene and the human AML1 gene. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 90, n. 14, p. 6859–6863, 1993.
- OKADA, Y. et al. Upstream stimulatory factors stimulate transcription through E-box motifs in the PF4 gene in megakaryocytes. **Blood**, v. 104, n. 7, p. 2027–34, 1 out. 2004.

OKUDA, T. et al. AML1, the target of multiple chromosomal translocations in human leukemia, is essential for normal fetal liver hematopoiesis. **Cell**, v. 84, n. 2, p. 321–30, 26 jan. 1996.

OKUDA, T.; NISHIMURA, M.; NAKAO, M. RUNX1 / AML1: A Central Player in Hematopoiesis. **International Journal of Progress in Hematology**, v. 74, p. 252–257, 2001.

OLDENBURG, J. et al. Vitamin K Epoxide Reductase Complex Subunit 1 (VKORC1): The Key Protein of the Vitamin K Cycle. **ANTIOXIDANTS & REDOX SIGNALING**, v. 8, p. 347–353, 2006.

OLDENBURG, J. et al. VKORC1: Molecular target of coumarins. **Journal of thrombosis and Haemostasis**, v. 5, n. SUPPL. 1, p. 1–6, 2007.

PICANÇO, V. et al. Recombinant expression of coagulation factor VIII in hepatic and non-hepatic cell lines stably transduced with third generation lentiviral vectors comprising the minimal factor VIII promoter. **Cytotherapy**, v. 9, n. 8, p. 785–794, 2007.

PICANÇO-CASTRO, V., FONTES, A.M., RUSSO-CARBOLANTE, E.M.D.S. AND COVAS, D.T. Lentiviral-mediated gene transfer-a patent review. **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v 18, n 5, 2008.

PICANÇO-CASTRO, V. et al. Pluripotent Reprogramming of Fibroblasts by Lentiviralmediated Insertion. **Stem Cells and Development**, v. 20, n. 1, 2011.

PLUTA, K.; KACPRZAK, M. M. Use of HIV as a gene transfer vector. **Acta Biochimica Polonica**, v. 56, n. 4, p. 531–595, 2009.

POESCHLA, E. M.; WONG-STAAAL, F.; LOONEY, D. J. Efficient transduction of nondividing human cells by feline immunodeficiency virus lentiviral vectors. **Nature medicine**, v. 4, n. 3, p. 354–357, 1998.

RAMEZANI, A.; ZWEIER-RENN, L. A.; HAWLEY, R. G. Factor VIII delivered by haematopoietic stem cell-derived B cells corrects the phenotype of haemophilia A mice. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 105, n. 4, p. 676–687, 2011.

RAN, D. et al. RUNX1a enhances hematopoietic lineage commitment from human embryonic stem cells and inducible pluripotent stem cells. **Blood**, v. 121, n. 15, p. 2882–90, 11 abr. 2013.

RATTRAY, A. J.; CHAMPOUX, J. J. Plus-strand priming by Moloney murine leukemia virus. The sequence features important for cleavage by RNase H. **J Mol Biol**, v. 208, n. 3, p. 445–456, 1989.

REAL, P. J. et al. The role of RUNX1 isoforms in hematopoietic commitment of human pluripotent stem cells. **Blood**, v. 121, n. 26, p. 5250–5252, 2013.

REHEMTULLA, A et al. In vitro and in vivo functional characterization of bovine vitamin K-dependent gamma-carboxylase expressed in Chinese hamster ovary cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 90, n. May, p. 4611–4615, 1993.

- SAKUMA, T. et al. Inhibition of Lassa and Marburg virus production by tetherin. **Journal of virology**, v. 83, n. 5, p. 2382–5, 2009.
- SAKUMA, T.; BARRY, M. A.; IKEDA, Y. Lentiviral vectors: basic to translational. **The Biochemical journal**, v. 443, n. 3, p. 603–18, 2012.
- SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 74, n. 12, p. 5463–7, 1977.
- SEGURA, M.M., GARNIER, A., DUROCHER, Y., ANSORGE, S. AND KAMEN, A. New protocol for lentiviral vector mass production. In: **Lentivirus Gene Engineering Protocols**, Human Press, p. 39-52, 2010
- SHI, Q. et al. Factor VIII ectopically targeted to platelets is therapeutic in hemophilia A with high-titer inhibitory antibodies. **Journal of Clinical Investigation**, v. 116, n. 7, p. 1974–1982, 2006.
- SIRVEN, A. et al. The human immunodeficiency virus type-1 central DNA flap is a crucial determinant for lentiviral vector nuclear import and gene transduction of human hematopoietic stem cells. **Blood**, v. 96, n. 13, p. 4103–4110, 2000.
- STEVENSON, M.. Molecular biology of lentivirus-mediated gene transfer. In: TRONO, D. (org.). **Lentiviral Vectors**. Springer Berlin Heidelberg, p. 1-30, 2002.
- SUN, Y. M. et al. Vitamin K epoxide reductase significantly improves carboxylation in a cell line overexpressing factor X. **Blood**, v. 106, n. 12, p. 3811–3815, 2005.
- SZYMCZAK, A. L. et al. Correction of multi-gene deficiency in vivo using a single “self-cleaving” 2A peptide–based retroviral vector. **Nature Biotechnology**, v. 22, n. 5, p. 589–594, 2004.
- TIE, J.-K.; STAFFORD, D. W. Structural and functional insights into enzymes of the vitamin K cycle. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 14, n. 2, p. 236–247, 2016.
- VOLPERS, C.; KOCHANKEK, S. Adenoviral vectors for gene transfer and therapy. **The journal of gene medicine**, v. 6, n. S1, p. 164–171, 2004.
- VORONOV, D. et al. Transcription Factors Runx1 to 3 Are Expressed in the Lacrimal Gland Epithelium and Are Involved in Regulation of Gland Morphogenesis and Regeneration. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 54, n. 5, p. 3115, 2013.
- WAIJH, N. et al. Increased production of functional recombinant human clotting factor IX by baby hamster kidney cells engineered to overexpress VKORC1, the vitamin K 2,3-epoxide-reducing enzyme of the vitamin K cycle. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 36, p. 31603–31607, 2005.
- WANG, S. et al. Cloning and characterization of subunits of the T-cell receptor and murine leukemia virus enhancer core-binding factor. **Molecular and cellular biology**, v. 13, n. 6, p. 3324–39, 1993.

WANG, X. et al. Intraosseous Delivery of Lentiviral Vectors Targeting Factor VIII Expression in Platelets Corrects Murine Hemophilia A. **Molecular Therapy**, v. 23, n. 4, p. 617–26, 2015.

WATANABE, S.; TEMIN, H. M. Encapsidation sequences for spleen necrosis virus, an avian retrovirus, are between the 5' long terminal repeat and the start of the gag gene. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 79, n. 19, p. 5986–90, 1982.

WILCOX, D. A. Megakaryocyte and megakaryocyte precursor related gene therapies. **Blood**, v. 127, n. 10, p. 1260–1269, 2016.

YAKURA, Y. et al. An induced pluripotent stem cell-mediated and integration-free factor VIII expression system. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 431, n. 2, p. 336–41, 8 fev. 2013.

YU, S. F. et al. Self-inactivating retroviral vectors designed for transfer of whole genes into mammalian cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 83, n. 10, p. 3194–3198, 1986.

YU, X. et al. Lentiviral vectors with two independent internal promoters transfer high-level expression of multiple transgenes to human hematopoietic stem-progenitor cells. **Molecular Therapy**, v. 7, n. 6, p. 827–838, 2003.

ZHU, X.; YEADON, J. E.; BURDEN, S. J. AML1 is expressed in skeletal muscle and is regulated by innervation. **Molecular and cellular biology**, v. 14, n. 12, p. 8051–8057, 1994.

ZHU, Y. Multigene Lentiviral Vectors Based on Differential Splicing and Translational Control. **Molecular Therapy**, v. 4, n. 4, p. 375–382, 2001.

ZUCKER, M B.; KATZ, I R. Platelet factor 4: production, structure, and physiologic and immunologic action. **Experimental Biology and Medicine**, v. 198, n. 2, p. 693-702, 1991.

ZUFFEREY, R. et al. Multiply attenuated lentiviral vector achieves efficient gene delivery in vivo. **Nature biotechnology**, v. 15, n. 9, p. 871–875, 1997.

ZUFFEREY, R. et al. Self-inactivating lentivirus vector for safe and efficient in vivo gene delivery. **Journal of virology**, v. 72, n. 12, p. 9873–9880, 1998.

ZUFFEREY, R. et al. Woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element enhances expression of transgenes delivered by retroviral vectors. **Journal of virology**, v. 73, n. 4, p. 2886–2892, 1999.

Apêndice

APÊNDICE

Apêndice A – Manual de Construção de Vetores de Expressão

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
FUNDAÇÃO HEMOCENTRO DE RIBEIRÃO PRETO

MANUAL DE CONSTRUÇÃO DE VETORES DE EXPRESSÃO

Naiara Cristina Pulzi Saito Vedoveli
Virgínia Picanço e Castro

Ribeirão Preto
2016

Prefácio

O presente manual descreve como gerar um vetor para expressão de uma proteína ou de um domínio e busca facilitar o trabalho do pesquisador que pretende construir um vetor de expressão. Ele apresenta de forma prática as etapas a serem utilizadas e sugestões de ferramentas que podem ser usadas para guiar o trabalho. Os procedimentos aqui descritos baseiam-se em algumas técnicas básicas da Biologia Molecular, portanto os mesmos procedimentos podem ser plenamente aplicáveis para qualquer construção que se deseja expressar, com algumas pequenas modificações. Lembre-se que cada passo pode ser realizado de diferentes maneiras. Este manual descreve a maneira como nosso laboratório trabalha. Você deve escolher os métodos, reagentes e kits de acordo com sua disponibilidade e conhecimentos.

Neste manual os vetores lentivirais foram escolhidos como exemplo, porém outros vetores de expressão disponíveis no mercado também podem ser utilizados. Também são fornecidos os protocolos utilizados para cada etapa e alguns *links* importantes, como apoio aos protocolos e análises. Ainda assim, a consulta a outros materiais é pertinente para sanar dúvidas sobre os procedimentos e analisar o processo caso alguma coisa dê errado. O livro “*Molecular Cloning*” (título em inglês) de Sambrook & Russel, do qual vários dos protocolos aqui utilizados foram adaptados, consiste em uma ótima fonte de consulta, bem como o livro “*Current Protocols in Molecular Biology*” de Wiley & Sons, e a série “*Methods in Molecular Biology*”, da editora Humana Press.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....111

I. PLANEJAMENTO DA CONSTRUÇÃO.....114

- A) ANÁLISE DE RESTRIÇÃO 117
- B) DESENHO DOS *PRIMERS* 118
- C) ESCOLHA DO VETOR DE EXPRESSÃO 123

II. AMPLIFICAÇÃO E CLONAGEM.....126

- A) REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE – PCR 126
- B) ANÁLISE DOS PRODUTOS DE PCR 131
- C) PURIFICAÇÃO DO FRAGMENTO AMPLIFICADO 133
- D) CLONAGEM EM VETOR DE CLONAGEM 135

III. SUBCLONAGEM EM VETOR DE EXPRESSÃO142

- A) PREPARO DE INSERTO E VETOR DE EXPRESSÃO PARA SUBCLONAGEM
142
- B) LIGAÇÃO 144

IV. ANÁLISE DOS TRANSFORMANTES.....146

- A) ANÁLISE POR RESTRIÇÃO 146
- B) SEQUENCIAMENTO 147
- C) CONFEÇÃO DE ESTOQUES 149

V. ANÁLISE FUNCIONAL.....150

INTRODUÇÃO

A metodologia para construção de um vetor de expressão tem por base técnicas de Biologia Molecular, em particular a tecnologia do DNA recombinante, sendo composta por etapas que se complementam. Por mais que pareça simples, o papel do pesquisador em cada etapa desse processo é fundamental, visto que uma etapa bem planejada e desenvolvida prepara e facilita as subseqüentes.

O desenvolvimento de um vetor de expressão envolve basicamente as seguintes etapas:

- **Planejamento da construção e escolha do vetor**
 - O planejamento deve ser cuidadosamente pensado, tanto antes de se iniciar o processo quanto ao longo de todo o trabalho. A seqüência a ser ligada e o vetor de expressão a ser utilizado devem ser cuidadosamente analisados para definição de uma estratégia de amplificação e facilitar a posterior ligação. O vetor de expressão já deve ser escolhido, com base em suas características e estrutura, para que a construção possa ser corretamente clonada e posteriormente expressa na célula hospedeira.
- **Amplificação da seqüência-alvo**
 - A seqüência a ser recombinada deve ser isolada. A amplificação pela técnica de PCR facilita e agiliza o processo. É necessário cuidado com a técnica e utilização de *primers* bem planejados, para que amplifique especificadamente a seqüência que se deseja, por completo, e de forma que facilite a posterior ligação.
- **Clonagem e confirmação**
 - A seqüência isolada deve ser clonada em vetor de clonagem e transformada em bactéria competente. Colônias transformadas devem ser isoladas e expandidas para obtenção de mais material. Para confirmação da clonagem, é possível utilizar reação de restrição enzimática, PCR ou sequenciamento.

- **Recuperação do inserto e subclonagem em vetor de expressão**
 - O inserto é recuperado do vetor de clonagem por restrição enzimática e ligado ao vetor de expressão escolhido. O vetor também deve ser previamente preparado para a ligação. A construção deve ser transformada em bactéria competente.
- **Seleção de clones positivos e verificação da construção**
 - Os clones que incorporaram o vetor de expressão com a construção são selecionados. A construção deve ser verificada e então os clones positivos são estocados sob baixa temperatura.
- **Teste de expressão**
 - Por fim, para testar a efetividade da construção, pode-se realizar a transdução ou transfecção do vetor em uma linhagem e induzir sua expressão, de forma a verificar a viabilidade do vetor produzido.

Uma visão geral do processo é apresentada na figura 1.

É necessário que o pesquisador tenha todo o processo planejado desde o início e que esteja atento a cada etapa para que possa realizar ajustes e correções.

I. PLANEJAMENTO DA CONSTRUÇÃO

Este é talvez o passo mais importante de todo o processo e provavelmente você voltará nele muitas vezes durante a montagem do vetor. Na montagem de um vetor de expressão, todas as etapas a serem seguidas são dependentes e complementares, portanto o planejamento deve ser muito bem pensado antes do início do processo.

A forma mais fácil de expressar uma proteína é expressá-la de forma completa, de N- a C-terminal, sem cortes na sua estrutura. Se o objetivo é expressar parte de uma proteína, esta é uma tarefa mais difícil, pois é necessário determinar os limites dos domínios proteicos que se deseja expressar. Essa e outras perguntas devem ser bem pensadas e decididas antes do início da construção.

Ao planejar sua construção, vários aspectos devem ser levados em conta. O estudo, pesquisa, leitura e verificação dos materiais a serem usados são essenciais nessa etapa. Algumas perguntas a serem feitas a respeito da sua construção para auxiliar o processo de planejamento são:

O que eu desejo com meu vetor de expressão?

Um vetor de expressão pode ser usado para consecução de vários objetivos, como: expressar uma proteína recombinante, avaliar o papel de um promotor para controlar expressão de determinado gene, expressar um marcador para rastrear uma célula em um organismo etc. É necessário estabelecer com cuidado o objetivo da construção, para que o vetor de expressão seja corretamente desenhado.

Qual sequência eu desejo ligar no meu vetor de expressão?

Você deve conhecer toda a sequência nucleotídica que deseja utilizar (sequência de bases nitrogenadas), deve conhecer o tamanho da sua sequência e o organismo da qual ela será obtida. Deve avaliar ainda se a sequência a ser ligada corresponde a um gene ou uma região promotora. Se for um gene, qual proteína ele expressa, e se possui éxons e introns e quais células ou tecidos o expressam. Aqui você já deve ter em mente qual fonte utilizará para isolar sua sequência.

Qual vetor de expressão será utilizado?

Existem inúmeros vetores de expressão, que se diferenciam pelo tamanho de fragmento de DNA que é capaz de incorporar, pela capacidade de expressar em um determinado tipo celular e na durabilidade da expressão. É necessário escolher o tipo de vetor antes do início do processo, tendo em mente seu tamanho, em qual organismo deseja expressá-lo e como rastreará ou quantificará a expressão. Você deve ter conhecimento do mapa de ser vetor, que deve apresentar, no mínimo, a localização do promotor e dos sítios de restrição presentes no vetor. Quando disponível, o conhecimento de toda a sequência de bases nitrogenadas do vetor ajuda planejar melhor sua ligação e avaliar possíveis erros.

Como realizarei a ligação da minha sequência-alvo ao vetor?

Para ligar a sequência ao vetor, a reação de ligação catalisada pela enzima DNA-ligase é necessária. Porém é importante pensar em como tornar essa ligação mais eficiente, e como fazer para que a sua sequência fique na orientação correta. A utilização de

extremidades coesivas deixadas por algumas enzimas de restrição auxiliam esse trabalho, mas as enzimas a serem utilizadas devem ser bem escolhidas. Por isso a análise de restrição deve ser bem feita, de forma que as enzimas escolhidas não afetem a sequência ou o vetor.

Qual o hospedeiro em que o vetor de expressão será utilizado?

O hospedeiro ou organismo-alvo corresponde à célula ou organismo em que ocorrerá a expressão. Ele deve ser pensado junto com a escolha do vetor, pois estão intimamente relacionados. Alguns vetores são específicos de alguns tipos celulares, como células humanas ou leveduras, e os promotores presentes nos vetores respondem a determinados tipos de células. Se o vetor utilizado não corresponder ao tipo celular, a expressão não será satisfatória. Nessa fase, você já deve planejar como será feita a transfecção/transdução (inserção do seu vetor no organismo-alvo), a depender do vetor e organismo-alvo escolhidos.

Quais materiais, reagentes e/ou animais serão utilizados?

É de extrema importância avaliar qual será sua necessidade em termos de materiais e reagentes, e a avaliação da necessidade de uso de algum animal nos experimentos. Se o uso de animais for necessário, a aprovação do comitê de ética da instituição é imprescindível. Você deve fazer uma previsão da quantidade de animais necessários, trabalhando com o mínimo possível. Os materiais e reagentes também já devem ser pensados, pois os trâmites burocráticos de compra de materiais podem atrasar seu trabalho.

É importante que todas essas questões sejam exaustivamente avaliadas, para que todas as etapas do processo de construção sejam bem executadas. Pensar sobre essas perguntas auxiliará na tomada de decisões e, durante todo o processo, elas podem ser reavaliadas. Uma vez definidas essas questões, é necessário iniciar as análises e escolhas de *primers* e vetores.

a) Análise de restrição

Ao planejar a construção, faz-se necessária uma ampla análise de restrição das sequências a serem utilizadas. Para isso, é necessário conhecer a sequência de bases nucleotídicas completa do fragmento a ser ligado e do vetor. Caso não seja possível conhecer toda a sequência do vetor (por motivos de patente, por exemplo) deve-se conhecer ao menos o mapa que indique a presença e localização dos sítios de restrição do mesmo.

Para o fragmento a ser ligado, um sítio de restrição pode ser adicionado às suas extremidades de forma a facilitar a posterior ligação. Isso pode ser feito com a utilização de *primers* desenhados especialmente com os sítios de restrição escolhidos, de forma que, durante a amplificação, esses sítios se localizem nas extremidades da sequência amplificada.

A análise de restrição auxiliará na escolha de enzimas a serem utilizadas. Existem vários programas computacionais que auxiliam nessa análise. Esses programas são capazes de analisar a sequência de bases fornecida em busca dos sítios de restrição para uma série de enzimas comercialmente disponíveis, e listar as enzimas que realizam cortes, as que não realizam e qual a posição de cada sítio de restrição.

Um programa eficiente, gratuito e online a ser utilizado é o NEBCutter V2.0 (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/>), da empresa New Englands Biolabs®.

Para o vetor, é importante encontrar os sítios de restrição capazes de abrir sua estrutura no local correto para ligação da sua sequência, de forma que o vetor seja linearizado, mas não perca nenhuma estrutura essencial. Para a sequência, as enzimas que não apresentam sítios de restrição dentro da sequência são as melhores candidatas a serem colocadas nos *primers* para limitarem as bordas da sequência. Qualquer enzima que **não reconheça** o DNA a ser clonado e corte o vetor pode ser usada.

Caso a enzima a ser utilizada corte o fragmento, mas corresponde à enzima necessária para a ligação no vetor, pode-se procurar por enzimas similares, que reconhecem sequências diferentes, mas deixam a mesma extremidade coesiva. Por exemplo, as enzimas *XhoI* e a *SalI*, que deixam uma ponta coesiva com as terminações TCGA, mesmo que reconheçam sequências levemente diferentes. A relação completa de enzimas que geram pontas coesivas complementares você pode achar no site da New England BioLabs (<https://www.neb.com/tools-and-resources/selection-charts/compatible-cohesive-ends-and-generation-of-new-restriction-sites>).

b) Desenho dos *primers*

O desenho de *primers* é o passo chave para uma reação de PCR bem sucedida, além de ser uma valiosa ferramenta para adição dos sítios de restrição escolhidos. Porém, alguns cuidados devem ser tomados, para que a amplificação com o par de *primers* escolhido ocorra de maneira satisfatória.

Quando se desenha *primers* para diversas aplicações, como clonagem, PCR multiplex, convencional ou até mesmo Real-time PCR, é essencial verificar o tamanho da sequência amplificada (amplicon) e selecionar sequências *sense* e *antisense* que não formem dímeros ou alças intramoleculares, para que a reação seja

totalmente eficiente. Este processo requer a utilização de ferramentas de bioinformática e experiência na confecção de *primers*. Algumas ferramentas online que podem ser utilizadas para verificação dos *primers* são a “NetPrimer”, da Premier Biosoft (<http://www.premierbiosoft.com/netprimer/>) e o Primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>).

Algumas observações são essenciais para o desenho de *primers*:

- Evitar três ou mais bases nucleotídicas G ou C na terminação 3', pois pode diminuir a especificidade, uma vez que isso aumenta a estabilidade de hibridizações não específicas e a região 3' é crítica para a especificidade e sensibilidade do PCR.
- Algumas bibliografias sugerem a terminação do *primer*, na extremidade 3', com um único nucleotídeo C ou G, a fim de garantir que a terminação na qual a enzima taq-polimerase age esteja fortemente ligada à sequência-alvo
- Um tamanho de 18 a 22pb para os *primers* é suficiente para garantir a especificidade do mesmo
- Evitar complementaridade entre os *primers* (para evitar a formação de dímeros) e evitar complementaridade interna em um mesmo *primer* (para evitar a formação de estruturas secundárias, como os “*hairpins*”)
- Tenha certeza que seu par de *primers* amplifique toda a região pretendida. O *primer sense* deve amplificar no sentido 5'→3' da sequência; o *primer antisense* deve amplificar em direção ao *primer sense*, ou seja, ele amplifica a fita complementar da região pretendida. Para isso, o *primer antisense* deve sempre ser o **reverso complementar** da sequência pretendida.

Quando deseja-se amplificar uma região gênica para ser posteriormente expressa, os *primers* devem ser desenhados de forma que amplifiquem toda a região codificante (CDS) do gene, desde o códon de iniciação (ATG) até o códon de finalização (TGA/TAA/TAG). Essa região pode ser identificada pela análise bioinformática da sequência do gene no site do grupo NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Para regiões promotoras, os *primers* devem amplificar a região 5' não transcrita do gene (5'UTR) que flanqueia o início da transcrição. A análise dessa região também pode ser feita através do site NCBI. É necessário que os *primers* amplifiquem a menor região possível que ainda apresente atividade promotora. Para isso é necessária a consulta à bibliografia pertinente.

Se é de interesse a adição de sítios de restrição à extremidade da sequência amplificada, isso já deve ser feito no desenho dos *primers*, após análise de restrição e escolha dos sítios de restrição a serem utilizados. Para isso, algumas dicas que deve-se ter em mente:

- Tenha a certeza que o DNA amplificado será inserido no vetor na orientação correta, ou seja, na fase de leitura correta. O sítio de restrição a ser ligado na extremidade 3' livre do vetor, onde encontra-se o promotor, deve ser colocado no *primer sense*, para que fique na extremidade 5' livre do inserto.
- Adicione nucleotídeos extras na extremidade 5' para garantir a clivagem pela enzima de restrição. A maioria das enzimas são menos eficientes quando o sítio de clivagem está próximo a extremidade 5'. Cinco a seis nucleotídeos são geralmente suficientes.

Quando adquiridos de empresa específica, os *primers* vêm dessalinizados e liofilizados. Como o DNA está sujeito a degradação em pH ácido, eles devem ser ressuspensos em água Milli-Q previamente esterilizada, nuclease-free e o pH ser ajustado para 7-8, ou ressuspensado em tampão TE (10mM Tris-HCl, 0.1mM EDTA, pH 8). Essa solução, chamada solução-estoque, deve permanecer estocada em freezer -20°C e somente uma alíquota deve ser retirada para o trabalho, evitando sua contaminação. Para a solução-trabalho, que será utilizada nas reações de PCR, a concentração deve ser ajustada. Assim, deve-se diluir o *primer* para uma concentração de 10μM (10^{-6} μmol/μL ou 10pmol/μL). A solução-trabalho também deve ser estocada a -20°C e, quando em uso, deve ser mantida em gelo.

PROTOCOLO1. Diluição dos *primers*

-solução-estoque: verificar na bula do *primer* recebido a quantidade (em nmol) informada, e calcular a concentração a partir da quantidade de água que foi adicionada a partir da fórmula:

$$C = \frac{n}{V}$$

Na qual: n = quantidade de matéria do *primer*
V= volume final

Exemplo

Se a quantidade de primer recebida foi de 40nmol e foi adicionado 200μL de água, a concentração final da solução-estoque será de 0,2nmol/μL, ou 200pmol/μL)

-solução trabalho: diluir a partir da solução estoque utilizando-se a formula:

$$C_1.V_1 = C_2.V_2$$

Na qual: C₁= concentração da solução-estoque
V₁= volume da solução estoque a ser diluída
C₂= concentração desejada para a solução-trabalho
V₂= volume final para a solução trabalho

Exemplo

Se a solução estoque encontra-se a 200pmol/μL e deseja-se a solução-trabalho a 10pmol/μL (10μM) e um volume final de 50μL, temos:

$$200.V_i = 10.50$$

VI será portanto igual a 2,5μL, e para solução-trabalho deve-se diluir 2,5μl da solução-estoque em 47,5μL de água milli-Q estéril (para um volume final de 50μL).

c) Escolha do vetor de expressão

O vetor de expressão a ser utilizado deve ser escolhido já no planejamento e consiste em uma das ferramentas principais do trabalho. É necessário estabelecer qual será a estratégia de clonagem do inserto nesse vetor e em qual organismo ou célula deseja-se que a proteína seja expressa.

O vetor de expressão diferencia-se dos vetores de clonagem por apresentarem regiões promotoras que possam ser reconhecidas e ativadas pelo hospedeiro para que ocorra a transcrição do gene de interesse, permitindo que a construção gênica seja expressa pelo organismo hospedeiro. Para cada organismo hospedeiro diferente – *bactérias, fungos, células de insetos ou mamíferos* – existem vetores de expressão específicos, com características que permitam a expressão nesses tipos celulares.

Os vetores lentivirais, foco desse manual, são vetores utilizados para expressão de proteínas em células de mamíferos. Eles consistem na escolha de muitas instituições, dada sua capacidade de se integrar ao genoma da célula-hospedeira, garantindo uma transcrição duradoura do transgene. Existem vários vetores lentivirais, comerciais ou não. Sua escolha deve ser pensada com base em algumas características:

- **Promotor** – o promotor deve ser reconhecido e ativado pela célula hospedeira. Muitos vetores lentivirais

apresentam como promotor o CMV (promotor do Citomegalovírus), que é um promotor forte e ativo em vários tipos celulares, útil quando deseja-se larga expressão de proteínas heterólogas. Se sua intenção é uma expressão controlada ou direcionada a um tipo celular, outro promotor deve ser escolhido, ou ainda, pode ser necessária a substituição do promotor. Se esse for o caso, é necessário conhecer os sítios de restrição que flanqueiam o promotor, para que esse possa ser retirado do vetor sem alteração de sua estrutura.

- **Sítio de Múltipla Clonagem** - o sítio de clonagem corresponde à região na qual o fragmento a ser expresso será inserido. Ele deve apresentar sítios de restrição únicos na sequência do vetor. Esses sítios devem ser conhecidos para seleção de enzimas e estabelecimento da estratégia de clonagem.
- **Marcador ou gene repórter** - é necessário que o vetor lentiviral tenha um marcador ou gene repórter que permita selecionar ou quantificar as células que incorporaram o vetor. O gene GFP, que codifica uma proteína verde-fluorescente, é bastante usado para esses casos. Em muitos vetores lentivirais, esse gene é co-expresso com o gene de interesse, transcrição mediada pelo mesmo promotor que permite a análise da expressão gênica. Se a intenção é utilizar o vetor de expressão em uma célula que já expresse GFP (se outro vetor de expressão com GFP já foi inserido nessa célula, por exemplo), é necessário um vetor com um marcador diferente, como por exemplo, o gene de resistência a neomicina.

A construção de vetores de expressão é uma ferramenta importante no desenvolvimento científico e biotecnológico, visto que por esse meio é possível realizar o estudo da estrutura e função de genes, o estudo de regiões promotoras e reguladoras e a expressão de proteínas recombinantes.

II. AMPLIFICAÇÃO E CLONAGEM

a) Reação em Cadeia da Polimerase – PCR

A reação de PCR permite a amplificação do fragmento de interesse a partir de uma amostra apropriada. A amostra deve ser escolhida com base no fragmento desejado. Se a intenção é a clonagem de uma sequência para ser expressa, é desejável que essa sequência não apresente introns, para que seja necessária a clivagem pela célula receptora (que poderia se dar da forma não desejada). Nesse caso, deve-se utilizar como amostra o cDNA (DNA complementar) produzido a partir do mRNA (RNA mensageiro) obtido de células que expressem o gene em questão. Se a intenção é a amplificação de uma região promotora, a amostra a ser utilizada deve ser de DNA genômico.

A reação é realizada em pequenos tubos de 200ul que contém todos os reagentes necessários para a amplificação e permite que o calor necessário para consecução de cada etapa seja transferido para reação. Em cada tubo, os seguintes reagentes devem ser adicionados:

- **Taq DNA-polimerase**
 - Realiza a extensão da nova fita de DNA a partir do DNA-molde
- **Tampão 10X (fornecido pelo fabricante)**
 - Tampão de ação específico para a DNA-polimerase
- **Cloreto de Magnésio – MgCl₂ (50Mm)**
 - Funciona como co-fator da enzima DNA-polimerase
- ***Primers* (concentração de 10μM)**
 - São os iniciadores, reconhecidos pela DNA-polimerase, para início da extensão
- **Mix de dNTP (deoxinucleotídeos tri-fosfato) (concentração de 10mM)**

o Consistem em bases nucleotídicas trifosfatos utilizadas como substrato para produção da nova fita

- **Amostra de DNA molde**
- **Água milli-Q estéril**

Os reagentes devem ser adicionados na concentração correta, visto que muitos deles limitam a qualidade da reação. A reação de PCR deve ser submetida a um termociclador com etapas e temperaturas específicas, que farão a desnaturação da fita de DNA-molde, anelamento dos *primers* ao DNA-molde e extensão da nova fita pela DNA-polimerase. Cada uma dessas etapas tem uma temperatura específica de ação, que devem ser conhecidas e controladas.

PROTOCOLO 2. Polimerase Chain Reaction - PCR

Para cada reação de PCR, o volume e concentração ideais são:

Reagente	Volume	Concentração final
Tampão 10X	5µL	1X
MgCl ₂ (50mM)	1,5µL	1,5mM
dNTP (10mM)	1µL	0,2mM
<i>Primer</i> F (10µM)	1µL	0,2µM
<i>Primer</i> R (10µM)	1µL	0,2µM
Taq DNA-polimerase	0,2 - 0,5µL	1u
DNA template	0,5 - 2µL	20ng
Água milli-Q estéril nuclease-free	q.s.p 50µL	-

Para várias amostras:

- Calcular a quantidade necessária de tampão, dNTPs, água, *primers* e DNA polimerase para todas as amostras, e misturá-los em um “*mix*”
**calcular 10% a mais de cada reagente, considerando eventuais perdas de pipetagem*
- Distribuir o volume necessário de “*mix*” para cada reação (descontando-se o volume de DNA-molde a ser utilizado)
- Distribuir o volume de DNA-molde em cada tubo de reação
- Submeter a reação a termociclador

Programa básico para reação de PCR:

A reação necessita apenas de alguns nanogramas de DNA-molde, portanto dilua o DNA original para não saturar a reação. A Taq DNA-polimerase é a enzima que fará a extensão e cópia da fita de DNA molde, e deve ser adicionada por último na reação. A enzima Taq DNA-polimerase deve ser mantida em freezer -20°C

até o momento de sua utilização, para aumentar sua vida útil. Muitas DNA-polimerase possuem atividade “*proofreading*”, corrigindo possíveis erros de inserção de bases durante a extensão. Isto faz com que a enzima introduza menos erros na síntese do DNA. No entanto, mesmo com a utilização da Taq comum, a maioria dos fragmentos são corretos. A enzima *proofreading* é recomendada para fragmentos grandes, maiores que 1000pb.

As enzimas não *proofreading* adicionam uma calda de nucleotídeos “A” no fim da extremidade 3’ do DNA, criando bases sem pareamento. Esta base pode ser utilizada para clonar o fragmento usando o pareamento A/T (kit topo TA). Enzimas *proofreading* não adicionam bases adicionais, e, portanto, geram produtos de pontas retas (*blunt ends*).

Outros fatores que afetam a qualidade do produto PCR incluem a qualidade do DNA-molde, as condições da reação (temperaturas), e número de ciclos. Como cada ciclo pode introduzir erros, é recomendado diminuir o número de ciclos, geralmente 25 ciclos são suficientes.

Se você está preparando muitas amostras, a realização de um *master mix* é recomendado. No *mix* são adicionados o tampão, dNTPs, água, *primers* e DNA polimerase, em volume total para todas as reações. O *mix* é dividido entre os tubos de reação e adicionado o DNA molde. Este procedimento acelera o trabalho e diminui a chance de erros de pipetagem e de contaminação dos estoques.

O tempo e as temperaturas da reação dependem do tamanho do fragmento a ser amplificado e a da composição dos *primers*. A regra básica recomenda a utilização de 1 minuto de extensão para cada 1Kb da sequência alvo e 58°C de temperatura de anelamento para os *primers* com 24pb. Existem variações no cálculo da temperatura de anelamento dos *primers*, de acordo com

diferentes autores. A composição de bases dos *primers* e a concentração desses e de sais na reação podem alterar a temperatura ideal para o anelamento. A temperatura de anelamento pode ser calculada a partir da Temperatura de “*Melting*” dos *primers*, temperatura em que metade da quantidade de *primers* encontra-se anelada, ficando 5°C abaixo dessa. Para esse cálculo, várias ferramentas podem ser utilizadas. Algumas ferramentas online estão disponíveis, como por exemplo a ferramenta da Applied BioSystems (<http://www6.appliedbiosystems.com/support/techtools/calc/>), a da New England Biolabs (<https://www.neb.com/tools-and-resources/interactive-tools/tm-calculator>) e da Thermo Scientific (<http://www.thermoscientificbio.com/webtools/tmc/>). Esse cálculo dará uma base para iniciar o trabalho de amplificação, porém, na prática, será necessário analisar o resultado da amplificação e otimizar a temperatura de anelamento.

Se mesmo após otimização da temperatura de anelamento a PCR ainda resultar em amplificação inespecífica, alguns parâmetros podem ser alterados a fim de melhorar o anelamento dos *primers* e a amplificação, como:

- Aumentar a concentração de $MgCl_2$ - o aumento de cloreto de magnésio pode melhorar o anelamento dos *primers*, porém uma concentração muito alta pode inibir a atividade da Taq DNA-polimerase
- Adição de Tween-20 - a utilização de alguns detergentes não-iônicos, como o tween-20, estabiliza a ação da Taq DNA-polimerase e diminui a formação de estruturas secundárias. Cerca de 0,05% de tween-20 ajuda a evitar a inibição da Taq DNA-polimerase por vestígios de SDS existentes na reação

b) Análise dos produtos de PCR

Os fragmentos de PCR podem ser avaliados por eletroforese em gel de agarose. A porcentagem do gel de agarose depende do tamanho do fragmento que será analisado, quanto maior a concentração do gel, maior a dificuldade que o fragmento encontrará em migrar através dele. Portanto géis mais concentrados são indicados para fragmentos pequenos, enquanto para fragmentos maiores são usados géis com menor porcentagem de agarose. Géis de 2% podem ser usados para fragmentos menores que 500pb. Géis de 1,5% para fragmentos de 1000pb e géis de 1% para fragmentos maiores. Quando deseja-se uma boa separação das bandas, para purificação de alguma delas, por exemplo, é necessário um gel mais concentrado e um tempo maior de corrida.

PROTOCOLO 3. Gel de agarose

- Diluir a massa apropriada de agarose em tampão TAE 1X [Tris-HCl 40mmol/L, ácido acético 20mmol/L e EDTA 1mmol/L (pH 8,0)]. Aquecer até total dissolução da agarose

Calcular a porcentagem de gel de agarose em m/V, através da fórmula:

$$\% = m/V$$

Na qual: m = massa de agarose

V = volume final

Exemplo

Para um gel de agarose 1% de 100mL, deve-se diluir 1g de agarose em 100mL de TAE.

- Adicionar solução marcadora (Brometo de Etídeo, GelRed® ou similar) diretamente no gel em concentração apropriada, de acordo com as instruções do fabricante
- Verter o gel em cuba horizontal apropriada e aguardar até total polimerização

Uma vez finalizada a reação de PCR, 10-15 µL da reação pode ser submetida à eletroforese para análise da amplificação. Ao produto de PCR dever ser adicionado 10% do volume do Tampão de amostra (98% de glicerol, SDS 0,1% e azul de bromofenol), que dará densidade a amostra, para que possa se depositar no fundo do poço do gel. Em cada corrida é necessário aplicar um marcador de peso molecular, uma solução com fragmentos de DNA de pesos conhecidos, para comparação com o fragmento amplificado pela PCR.

As amostras e o marcador de peso molecular são aplicados no gel e a corrida é geralmente realizada a 80 volts até o corante chegar na parte inferior do gel. Como o DNA possui carga negativa ele migrará do polo negativo para o polo positivo. Certifique-se que a cuba foi conectada corretamente. Finalizada a eletroforese, o gel pode ser visualizado sob luz ultravioleta e fotografado. Aparelhos especiais são utilizados para isso.

c) Purificação do fragmento amplificado

Quando a amplificação por PCR não é específica, algumas bandas não correspondentes à esperada podem aparecer na reação. Essas bandas podem atrapalhar o processo de clonagem, visto que sequências inespecíficas podem se ligar ao vetor, conferindo perda de tempo e material. Por isso, quando isso ocorre, é importante purificar o produto PCR utilizando gel de agarose. O material da PCR é submetido à eletroforese em gel agarose para separação das bandas. A banda de tamanho correspondente ao esperado é recortada do gel e o material genético presente nela é recuperado. É importante utilizar sempre uma lâmina nova, que não tenha sido contaminada com nenhum outro fragmento de DNA. A recuperação é feita com a utilização de kit específico, como por exemplo o Kit da GE “*Illustra GFX PCR DNA and band purification*”® ou o Kit da QIAGEN “*QIAEX II Gel Extraction Kit*”. Todos esses kits têm o mesmo princípio: a banda recortada do gel é solubilizada em tampão específico, a solução é submetida a um material na qual o DNA se ligará, separando-se do restante da solução. Por último, o DNA é eluído da coluna e recuperado. Esse mesmo procedimento é utilizado para purificação de fragmento digerido a partir do vetor de clonagem.

PROTOCOLO 4. Purificação de gel de agarose

KIT: QIAEX II Gel extraction Kit (QIAGEN®)

Prévio:

Separar o fragmento de interesse por eletroforese em gel de agarose

Processo:

- Recortar a banda de tamanho correspondente do gel, usando lâmina limpa, sob observação em luz UV.
- Dispor a banda em tubo limpo e calcular a massa da banda (banda = massa tubo vazio – massa do tubo cheio).
**NÃO colocar mais que 250mg por tubo!*
- Adicionar 3 volumes de tampão QX1 (para cada 100mg de gel, add 300µL de tampão)
- Ressuspender a suspensão QIAEX II em vortex por 30s. Adicionar ao tubo: 10µL (para ≤ 2µg de DNA) ou 30µL (para 2-10µg de DNA)
- Incubar: 50°C por 10min. agitar a cada 2min para manter as partículas QIAEX II em suspensão. *Para fragmentos maiores que 10kB, não vortexar! *A solução deve ficar amarela. Caso não fique, corrigir pH com acetato de sódio 3M (pH 5,0)
- Centrifugar: 30s, 17900g (13000rpm)
- Remover sobrenadante gentilmente com uma pipeta
- Lavagem: adicionar 500µL de QX1 e ressuspender pellet
- Centrifugar: 30s, 17900g (13000rpm)
- Remover sobrenadante gentilmente com uma pipeta
- Lavagem: adicionar 500µL de tampão PE e ressuspender pellet
- Centrifugar: 30s, 17900g (13000rpm)
- Remover sobrenadante gentilmente com uma pipeta
- Repetir etapa de lavagem com tampão PE
- Deixar secar em temperatura ambiente por 10-15min, ou até o pellet ficar branco
- Eluição: adicionar 20µL de TE e ressuspender pellet
- Incubar por 5min a temperatura ambiente
- Centrifugar: 30s, 17900g (13000rpm)
- Transferir sobrenadante para tubo limpo e armazenar -20°C

d) Clonagem em vetor de clonagem

A clonagem corresponde ao passo na qual a sequência obtida por PCR é inserida em um vetor de clonagem, e esta construção deve ser transformada em bactéria competente. A partir daí, outras decisões podem ser tomadas: a sequência pode ser estocada, sequenciada ou ainda recuperada para construção do vetor de expressão.

Os vetores de clonagem são plasmídeos caracterizados por possuírem uma origem de replicação (ORI) e um gene de resistência a antibiótico, para seleção dos clones positivos. Quando inseridos no organismo hospedeiro, normalmente cepas de bactérias da espécie *E. coli*, a ORI é reconhecida e o plasmídeo é replicado, de forma independente DNA genômico da bactéria. Com a expansão clonal das colônias de bactérias, os plasmídeos são também replicados. As células cultivadas são então recuperadas e o DNA plasmidial, contendo seu fragmento, é extraído.

A clonagem implica portanto em três passos: 1 - ligação do fragmento amplificado ao vetor de clonagem; 2 - transformação em bactéria competente e cultivo e 3 - Extração de DNA plasmidial (miniprep).

Os vetores de clonagem comercialmente disponíveis apresentam-se como vetores linearizados que apresentam em suas extremidades uma base de timina (T) não pareada. Essa estratégia é utilizada para ligação do inserto ao vetor. A sequência a ser inserida, obtida por PCR, apresenta em sua extremidade 5' uma base de Adenina (A) livre, inserida pela DNA polimerase durante a extensão da cadeia. Assim o pareamento entre vetor e inserto é facilitado. A ligação ocorre pela ação da enzima DNA ligase. Alguns vetores de clonagem comercialmente disponíveis são os vetores pGem T® e pGem T Easy® da Promega® e TOPO TA® da Invitrogen®.

Para a reação de ligação do inserto ao vetor de clonagem, é importante manter uma proporção inserto : vetor de 3:1. A quantidade de inserto deve ser maior que a de vetor, pois a probabilidade de o inserto se ligar é baixa. Mantendo uma proporção maior de inserto, as chances são aumentadas. Essa concentração pode ser avaliada qualitativamente em gel de agarose, no qual o volume que se deseja utilizar de inserto e de vetor, cerca de 3 a 6µL de inserto e 0,5 a 1µL de vetor, é aplicado em gel e avaliado a intensidade das bandas obtidas. A intensidade indica a quantidade de material genético presente no volume aplicado, e a partir daí pode-se tomar a decisão de qual volume utilizar na reação. À reação deve ainda ser adicionado a DNA ligase, o tampão específico da enzima fornecido junto com o kit e água estéril. A reação deve ser conduzida em temperatura específica, de acordo com instruções do kit a ser utilizado.

O material obtido nessa ligação deve ser transformado em bactérias competentes, que serão cultivadas em meio contendo antibiótico. O vetor apresentam em sua estrutura um marcador de seleção, normalmente resistência a determinados antibióticos, como ampicilina. Quando a bactéria incorpora o vetor, ela passa a ser resistente a esse antibiótico, sendo capaz de crescer mesmo em sua presença. Dessa forma é possível selecionar as colônias de bactérias que incorporaram o vetor. Muitos vetores apresentam ainda artifícios para selecionar colônias as quais o vetor incorporou o inserto. A região na qual o inserto deve ser ligar fica dentro do gene da β -galactosidase (lac-Z), que confere à bactéria a capacidade de metabolizar alguns carboidratos. Se o vetor se religa sem o inserto, o gene é reestruturado e fica intacto, a bactéria será capaz de metabolizar o carboidrato e conferindo fenótipo azul; se o inserto se liga ao vetor, o gene é interrompido e portanto não é expresso, a bactéria não será capaz de metabolizar o carboidrato e

expressará o fenótipo branco. Dessa forma, somente colônias brancas devem ser selecionadas, pois as chances de que o inserto de interesse tenha se ligado aos vetores nelas presentes é maior.

PROTOCOLO 5. Transformação de bactérias competentes por choque térmico

*Todos os procedimentos devem ser realizados em fluxo e com os materiais em gelo

1. Descongelar tubo com alíquota de bactérias competentes em gelo
2. Adicionar cuidadosamente 3 a 7 μ L do material da ligação ao tubo. NÃO agitar ou pipetar para cima e para baixo!
**para plasmídeo ou vetor fechado, usar 0,5 μ L*
3. Deixar o tubo no gelo por 30min.
4. Colocar o tubo em banho-maria a 42°C por 45 segundos
5. Retirar do banho e colocar imediatamente em gelo, por 2 min
6. Adicionar cuidadosamente 250 μ L de meio SOC previamente aquecido a 37°C
7. Fechar bem o tubo e incubar horizontalmente em shaker a 37°C, por 1h, a uma rotação de 200-230rpm
8. Espalhar um volume de 25-100 μ L das bactérias transformadas em placas previamente preparadas, contendo meio NA-ágar, antibiótico e, se necessário, IPTG e x-Gal
9. Cultivar as placas invertidas em estufa a 37°C, overnight (16h)
10. Selecionar clones positivos

* O excedente de bactérias transformadas pode ser estocada a 4°C por 24h. Uma nova alíquota pode ser espalhada em nova placa no dia posterior

Após a seleção é necessária a confirmação da clonagem. Para isso, o material das colônias positivas selecionadas deve ser extraído. A extração de DNA plasmidial (miniprep) pode ser feita com base nos protocolos descritos por Sambrook & Russel em “*Molecular Cloning*”, ou com auxílio de Kits comerciais, que usam os mesmo princípios, mas agilizam e facilitam o trabalho. O Kit da QIAGEN “*QIAprep spin miniprep*” é o mais utilizado em nosso laboratório.

PROTOCOLO 6. Extração de DNA plasmidial – Miniprep

KIT: “QIAprep spin miniprep”, QIAGEN®

Prévio: Cultivar as colônias positivas selecionadas da transformação em 5mL de meio NA adicionado de antibiótico, em shaker a 37°C, rotação de 200-230rpm, overnight. Reservar 1mL da cultura para confecção de estoques

Obs: Todos os tampões são fornecidos pelo Kit

Todas as centrifugações são realizadas a 16000xg (cerca de 13000rpm) e temperatura ambiente

1. Centrifugar a cultura a 4000rpm por 20min
2. Descartar o sobrenadante e ressuspender o pellet em 250µL de tampão P1. Homogeneizar e transferir para tubo de centrífuga (1,5mL)

3. Adicionar 250µL de tampão P2 e misturar por inversão, de 4 a 6 vezes, até que a solução fique homogênea. **NÃO** permitir que a reação ocorra por mais de 5min.! O kit vem com uma solução denominada “*Lyse Blue Reagent*”, que é adicionado ao tampão P2. Se esse for o caso, nesse passo, a solução ficará azul.
4. Adicionar 350µL de tampão N3 e misturar por inversão, de 3 a 6 vezes. Se estiver usando o *Lyse blue reagent*, a solução ficará clara
5. Centrifugar por 10min.
6. Coletar o sobrenadante, com cuidado para que os restos celulares depositados no fundo não sejam pipetados
7. Depositar o sobrenadante na coluna, acondicionada em tubo limpo e centrifugar por 60seg. O DNA fica retido na coluna.
8. Descartar o líquido e adicionar, à mesma coluna, 750µL de Tampão PE, para lavagem, e centrifugar por 60seg. O tampão retira o excesso de sais que restaram na coluna, mas não elui o DNA
**Tenha certeza de que o tampão PE foi adicionado de etanol previamente a essa etapa!*
9. Descartar o líquido e acomodar a coluna em tubo limpo. Adicionar Ao centro da coluna 50µL de tampão EB. Incubar por 1min e centrifugar por 60seg. O tampão EB eluí o DNA que ficou na coluna.
10. Armazenar o DNA obtido em freezer a -20°C

A confirmação pode ser feita de duas formas: PCR e restrição enzimática. A PCR deve utilizar os pares de *primers* desenhados para aquela sequência específica e deve ser conduzida nas mesmas condições otimizadas utilizadas para amplificação da sequência, porém utilizando como DNA-molde o DNA plasmidial obtido a partir das colônias selecionadas. O produto analisado por

eletroforese deve produzir uma banda com o tamanho do fragmento clonado.

Para a restrição enzimática, devem ser utilizadas as enzimas cujos sítios de restrição foram desenhados nos *primers* usados na amplificação. A reação e temperatura devem ser feitas de acordo com cada enzima. Após a restrição, o produto deve ser analisado por eletroforese, a qual deverá apresentar duas bandas, sendo uma do tamanho do vetor e outra do tamanho do inserto.

PROTOCOLO 7. Restrição enzimática

	Volume
Enzima *	1μL (10u)
Tampão 10X	5μL
BSA(10mg/mL) **	0,5μL
DNA	1-2μg
Água milli-Q estéril	q.s.p 50μL

*Adicionar por último

**Se necessário

- Verificar o tampão específico de cada enzima e a necessidade de adição de BSA à reação.
- Submeter a reação à restrição por 4h, em temperatura de ação de cada enzima. Inativar por 15min.
- Para reações de dupla digestão, adicionar 1μL de cada enzima.

*Para digestão de diversas amostras utilizando a mesma enzima, é necessária a preparação de um “mix”, que contenha todos os reagentes EXCETO o DNA. O mix deve ser calculado com base na quantidade de amostras e com um excedente de

10% de cada reagente. O volume necessário é distribuído nos tubos e, então, o DNA para digestão é adicionado individualmente a cada tubo. Toda a preparação deve ser conduzida em gelo.

III. SUBCLONAGEM EM VETOR DE EXPRESSÃO

a) Preparo de inserto e vetor de expressão para clonagem

A subclonagem consiste na retirada do inserto do vetor de clonagem e ligação no vetor de expressão escolhido. Para recuperação do inserto para ligação é realizada reação de restrição enzimática a partir do vetor de clonagem confirmado. Para isso, uma quantidade maior de DNA é submetido à restrição, e todo o volume é aplicado em gel de agarose, que realizará a separação do inserto digerido e do vetor. A banda correspondente ao tamanho esperado para o inserto é recortada do gel e purificada com a utilização de kit específico, e pode ser então ligada ao vetor de clonagem. Os protocolos envolvidos nesses procedimentos foram explicados acima (protocolos 7 e 4).

Os vetores de expressão normalmente apresentam-se fechados. Para que a ligação do inserto possa ser feita, o primeiro passo é linearizar o vetor de expressão. A linearização é realizada por restrição enzimática, utilizando a enzima ou enzimas já selecionadas na etapa de planejamento. A restrição deve ser capaz de abrir o vetor no ponto necessário para a ligação e de deixar a extremidade coesiva necessária para ligação do inserto. Assim as enzimas utilizadas na restrição do fragmento devem ser compatíveis com as enzimas utilizadas na restrição do vetor. É importante usar duas enzimas diferentes que apresentem sítios de restrição subsequentes no vetor, linearizando esse sem perder fragmentos mas deixando duas extremidades diferentes. Essa ação tem a finalidade de dificultar a re-ligação espontânea do vetor.

Ainda que o vetor tenha sido linearizado com enzimas diferentes, a probabilidade de religação ainda é alta, pois o vetor apresenta em sua extremidade 3' um grupamento fosfato que pode fornecer a energia necessária para a ligação, favorecendo a religação

do vetor vazio. Portanto, no preparo do vetor é necessário realizar a reação de defosforilação, para retirada desse fosfato. Essa reação é realizada por Fosfatases, enzimas capazes de catalisar a retirada do grupamento fosfato. Duas fosfatases comercialmente disponíveis são a enzima SAP (Shrimp Alkaline Phosphatase) e a CIAP (Calf Intestinal Alkaline Phosphatase). A inativação da enzima é importante, pois se não for feita corretamente, a enzima continuará ativa no momento da ligação, defosforilando o fosfato presente no inserto e dificultando a ligação.

PROTOCOLO 8 . Defosforilação

A defosforilação com a enzima SAP pode ser realizada de duas maneiras: Com a enzima agindo diretamente no tampão usado na restrição, ou após purificação do vetor do gel.

Direto na reação de restrição:

- Após conclusão da reação de restrição do vetor, adicionar 1µL de enzima SAP à 50µL de reação de restrição
- Incubar a 37°C por 1h
- Inativar a 75°C por 15min

Após purificação:

- Adicionar 30µL do vetor linearizado purificado
- Adicionar 1µL de enzima SAP
- Adicionar 4µL de tampão específico da enzima
- Incubar a 37°C por 1h
- Inativar a 75°C por 15min

b) Ligação

Com vetor e inserto preparados, a ligação pode ser feita. Todo o planejamento da construção tem por objetivo facilitar essa etapa. Se não foi bem executado, a ligação do inserto ao vetor de expressão não será possível. Se a construção foi bem planejada, nessa etapa já devemos ter o vetor e inserto digeridos com as mesmas enzimas, de forma que a extremidade deixada no vetor seja compatível com a deixada no inserto, facilitando a ligação. Caso contrário, a ligação torna-se praticamente impossível. As chances do vetor se religar sem o inserto são grandes e a probabilidade de um vetor incorporar o inserto será baixa. O trabalho deverá ser feito várias vezes para obtenção de sucesso, que nem sempre será possível.

Mesmo com tudo certo, planejado, e com vetor e inserto digeridos, a eficiência de ligação é baixa. Nessa etapa, é importante manter uma proporção inserto:vetor de 6:1 até 10:1. A proporção deve ser avaliada qualitativamente com antecedência por observação de intensidade de banda em gel de agarose. O mesmo volume, cerca de 3µL, de vetor e inserto devem ser aplicados em gel e comparado sua intensidade. Baseado nisso, o volume de cada componente da reação pode ser estabelecido.

Para catalisar a reação de ligação, a enzima T4 DNA ligase se faz necessária. Assim, à reação são adicionados: vetor e inserto em proporção previamente estipulada, enzima, tampão específico da enzima fornecido com o kit e água estéril. A temperatura e tempo de incubação devem variar de acordo com a enzima utilizada, de acordo com instruções fornecidas por cada fabricante. Alguns fabricantes sugerem que uma reação de ligação de 30min a 1h seja suficiente para adquirir uma quantidade satisfatória de colônias; outros sugerem ligações overnight.

PROTOCOLO 9. Ligação

	Volume
Vetor	1µL *
Inserto	3µL *
Tampão 10X	2µL
T4 DNA ligase	1µL
Água milli-Q estéril	q.s.p 20µL

**Volume a depender da concentração aparente analisada em gel de agarose*

- Adicionar todos os reagentes a tubo limpo
- Incubar em termociclador a 16°C (ou temperatura instruída pelo fabricante), overnight

A reação de ligação deve ser transformada em bactéria competente (vide protocolo 5), a qual deve ser plaqueada e cultivada em meio com marcador de seleção. Cada vetor de expressão apresentará marcadores de seleção, para selecionar as bactérias que o incorporaram. Normalmente correspondem à marcadores de resistência a antibióticos, como a ampicilina. Assim, as bactérias que incorporarem os vetores serão resistentes, sendo capazes de crescer em meio mesmo na presença do antibiótico. As colônias positivas devem ser selecionadas para posteriores análises e confirmação.

IV. ANÁLISE DOS TRANSFORMANTES

a) Análise por restrição

A análise por restrição é uma análise em nível macroscópico: ela permite definir quais clones incorporaram a sequência e inferir quais estão com a construção desejada, porém não é possível definir se a sequência clonada corresponde à pretendida, o que pode ser confirmado somente no sequenciamento.

Para a análise de restrição, é importante ter em mente todo o processo realizado para escolha de enzimas viáveis. As enzimas usadas para a clonagem podem ser utilizadas. Elas devem digerir o fragmento, retirando-o do vetor e permitindo a verificação de sua incorporação. A digestão deve resultar em dois fragmentos: um referente ao tamanho do vetor e outro ao tamanho do fragmento.

Se para a clonagem foram usadas enzimas diferentes (ex: XhoI para o inserto e SalI para o vetor), durante a ligação o sítio de restrição é perdido. Portanto é necessária uma nova análise de restrição, agora do vetor + fragmento formado, para determinação de novas enzimas. Nesse caso, é importante selecionar enzimas que apresentem dois sítios, sendo um dentro da sequência ligada e outro no vetor. Se a sequência foi ligada corretamente, a restrição deve apresentar dois fragmentos. Caso a sequência não foi incorporada, a restrição apresentará apenas um fragmento, referente ao vetor aberto. Caso não exista uma única enzima com esse padrão de corte, pode-se realizar a escolha de duas enzimas compatíveis, ou uma enzima com três sítios de restrição. É importante não escolher enzimas com mais de três sítios, pois nesse caso os fragmentos formados terão tamanho muitos pequenos e variáveis e será mais difícil realizar inferências.

Essa estratégia de utilizar enzimas com corte no fragmento e no vetor pode ser utilizada também para checar a orientação do fragmento ligado. A análise de restrição deve evidenciar o padrão de fragmentos formados caso a ligação ocorra em sentido correto. O padrão de restrição caso o sentido de ligação for contrário deve ser ligeiramente diferente.

b) Sequenciamento

O sequenciamento permite a confirmação final da construção. Ele pode ser feito também durante a fase de clonagem, para verificação do fragmento clonado. No sequenciamento, é necessário definir os limites do fragmento que deseja-se sequenciar, para escolha de *primers* apropriados. O sequenciamento do vetor completo é um trabalho mais complexo, portanto deve-se definir uma sequência de cerca de 500 pb que possa confirmar a construção (ex: fragmento que mostre a região de ligação do inserto e vetor). Os *primers* devem localizar-se cerca de 50 pb antes e depois da região a ser sequenciada, pois as primeiras e últimas bases do sequenciamento não apresentam boa qualidade.

É importante sempre realizar as reações de sequenciamento em replicadas (duplicata ou triplicata), visto que cada sequenciamento pode errar ou não sequenciar algumas bases e cada reação apresenta bases não sequenciadas que são preenchidas pelas replicatas. O alinhamento das replicatas dará uma sequência mais provável para seu fragmento. O sequenciamento em replicata aumenta também a confiança das bases sequenciadas.

A reação de sequenciamento é feita em duas etapas: 1-PCR normal: utiliza como amostra o vetor a ser sequenciado e um par de *primers* que limite a região a ser sequenciada; 2-PCR para sequenciamento: utiliza como molde o material da 1ª PCR e, SEPARADAMENTE, o *primers sense* OU *antisense* e kit

específico que contenham ddNTPs (dideoxynucleotídeos), como o kit BigDye®.

PROTOCOLO 10. Sequenciamento

	Volume
Big Dye Terminator	2µL
Tampão 5X	2µL
<i>Primer</i> (10µM)	0,3µL
DNA-molde	1µL (Max.: 100ng)
Água milli-Q estéril	q.s.p 10µL

Proceder a reação ao seguinte ciclo:

É importante observar algumas coisas para que a reação de sequenciamento ocorra de maneira satisfatória: concentração do *primer*, pureza e concentração da amostra, qualidade dos materiais utilizados. A purificação da 1ª PCR para a reação de sequenciamento ajuda a melhorar a qualidade do mesmo, pois elimina restos de *primers* e reagente que podem atrapalhar o sequenciamento.

A reação sequenciada é precipitada e ressuspendida em tampão, para aplicação em aparelho de sequenciamento. Os eletroferogramas gerados devem ser alinhados para formação de *contig* através de programa de análise de sequenciamento. O programa *Chromaspro*, da *Technelysium*, é um programa gratuito e de fácil manipulação.

O resultado gerado deve ser analisado pelo usuário. Os programas de alinhamento de sequências *Clustalw* e *BLAST* podem ser usados para determinar se a sequência obtida no sequenciamento corresponde à pretendida.

c) Confeção de estoques

Uma vez confirmada, o vetor produzido deve ser estocado. O estoque-mãe é realizado em bactérias. O vetor construído e confirmado é transformado em bactérias competentes. Clones positivos são selecionados para expansão em meio líquido e estoque.

O estoque é realizado adicionando-se a mesma proporção de meio contendo as bactérias e glicerol 70% (ex: 150µL de meio e 150µL de glicerol). Os estoques devem ser imediatamente submetidos a congelamento em freezer à -80°C.

O glicerol permite um congelamento gradual da bactérias, sem a formação de cristais de água no interior de seu citoplasma, o que levaria a morte das mesmas. Quando necessário, um vial de estoque pode ser descongelado e colocado em cultura, para expansão das bactérias e extração do material. É importante que o vial retirado do estoque seja prontamente substituído, pela confecção de um novo estoque, para que o banco nunca acabe.

O estoque em bactéria é importante pois: 1) pode ser mantido por diversos anos, sem morte das bactérias ou degradação do DNA, 2) é um estoque renovável.

V. ANÁLISE FUNCIONAL

O vetor de expressão lentiviral produzido e confirmado deve ser analisado quanto sua capacidade de expressar a construção clonada. Para tanto, ele deve ser inserido na célula-alvo e a expressão deve ser analisada. No caso de vetores lentivirais, a inserção pode ser feita de duas formas: por transfecção ou transdução.

A transfecção do vetor lentiviral é feita com auxílio de moléculas lipídicas, como a lipofectamina ou o PEI, que formam um complexo em torno do DNA, facilitando sua captação pela célula. A célula incorpora e ativa o vetor, porém esse não é integrado ao seu genoma e sua expressão é, portanto, passageira.

Na transdução, a inserção do vetor de expressão lentiviral é feita por um vírus. O vírus é produzido artificialmente pelo co-transfecção do vetor de expressão lentiviral e vetores acessórios em uma célula produtora, normalmente a Hek293T. Os vetores acessórios são responsáveis pela montagem das estruturas virais (cápsideo e envelope) e o vetor de expressão lentiviral que foi produzido será captado pelo vírus. Os vírus produzidos são recuperados e submetidos à cultura de células-alvo. Nesse processo, o vírus insere o vetor de expressão lentiviral na célula e media sua integração ao DNA genômico da célula. A expressão do vetor nesse processo é duradoura.

Os protocolos de transfecção e transdução são muito complexos e envolvem um grande conhecimento de cultura celular e produção/quantificação de vírus (título viral). Ao chegar nessa etapa, seu estudo deve ser aprofundado, usando outros materiais para apoio.

A análise da expressão pode ser feita pela quantificação de proteína produzida pelo gene repórter (ex: GFP), caso o vetor

possua a transcrição do gene e do gene repórter sob controle do mesmo promotor, ou pela quantificação de proteína produzida, caso a proteína seja secretada pela célula.

A quantificação de células GFP positivas indica que o promotor está ativo e guiando a expressão desse gene, e portanto, também estará guiando a expressão do gene desejado. Ela pode ser feita por análise das células em citometria de fluxo. As células cultivadas e transfectadas/transduzidas devem ser coletadas e passadas pelo aparelho, que detectará a quantidade de células que expressam o GFP e o nível de expressão. É essencial a existência de um controle negativo (células não transformadas, que não produzem GFP), para indicar o nível de expressão basal da célula.

A detecção de proteínas secretadas pode ser feita através de ensaio de ELISA. É necessário a coleta do meio no qual as células foram cultivadas para o ensaio. O ELISA detecta proteínas com base na sua ligação a anticorpos imobilizados e a consequente ativação de um substrato cromático. A quantidade de substrato ativado indica a concentração de proteínas na amostra, com base em uma curva-padrão para concentração das amostras. Por utilizar anticorpos, o teste de ELISA é altamente específico, sendo necessário um teste específico para cada tipo de proteína que deseja-se detectar.

A realização dos testes de análise funcional são essenciais para estabelecer a funcionalidade do vetor produzido. Com tudo confirmado, o vetor pode então ser usado para produção de proteínas heterólogas, expressão de genes em um tipo celular ou o objetivo a que se destina.