Elida Adalgisa Neri

Estudo da Região Promotora do Gene do Permutador Na⁺/H⁺ (NHE3)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Fisiologia Humana.

SÃO PAULO

2009

Elida Adalgisa Neri

**Estudo da Região Promotora do Gene do
Permutador Na^+/H^+ (NHE3)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Fisiologia Humana.

Área de Concentração: Fisiologia Humana

Orientadora: Prof. Dr. Nancy Amaral Rebouças

SÃO PAULO

2009

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Neri, Elida Adalgisa.

Estudo da região promotora do gene do permutador Na^+/H^+ (NHE3)
/ Elida Adalgisa Neri. -- São Paulo, 2009.

Orientador: Nancy Amaral Rebouças.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Fisiologia e Biofísica. Área de concentração: Fisiologia Humana. Linha de pesquisa: Transporte de íons em células epiteliais.

Versão do título para o inglês: Study of the Na^+/H^+ (NHE3) exchanger gene promoter region.

Descritores: 1. Troca iônica 2. Fatores de Transcrição 3. Biologia Molecular-Técnicas 4. Fisiologia renal I. Rebouças, Nancy Amaral II. Universidade de São Paulo. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana III. Título.

ICB/SBIB57/2009

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Elida Adalgisa Neri.

Título da Dissertação: Estudo da região promotora do gene do permutador Na^+/H^+ (NHE3) .

Orientador(a): Nancy Amaral Rebouças.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../.....,

() **Aprovado(a)**

() **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

Aos meus pais e familiares que sempre me apoiaram
e incentivaram constantemente.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus.

A minha família que sempre me apoiou e me auxiliou em todos os momentos.

Aos alunos Gabriela, Pedro Henrique, a técnica Camila e a Prof. Nancy Amaral Rebouças do Laboratório de Biologia Molecular de Transportadores de Membranas que contribuíram de maneira significativa para o meu conhecimento e o desenvolvimento deste trabalho.

A agência financiadora CAPES pelo apoio financeiro.

Enfim a todos que contribuíram para a realização deste trabalho

RESUMO

NERI, E. A. **Estudo da Região Promotora do Gene do Permutador Na^+/H^+ (NHE3)**. 2009. 66 f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Humana) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

Tendo em vista a importância do permutador Na^+/H^+ (isoforma 3) na reabsorção de NaCl e NaHCO_3 em túbulos proximais e conseqüentemente no equilíbrio ácido-base e volume celular, surgiu o interesse em identificar a região promotora essencial para a transcrição do gene NHE3 e os elementos de ligação de fatores de transcrição presentes no mesmo, em células de túbulos proximais renais. Para isso, os segmentos da região flanqueadora 5' do gene NHE3 de rato foram obtidos por PCR e inseridos no plasmídeo pGL3-basic, que codifica o gene repórter *Firefly luciferase*. Os seguintes fragmentos foram analisados 1) -157 a +31; 2) -152 a +55; 3) -85 a +31; 4) -65 a +31; 5) -44 a +31; 6) -33 a +31; 7) -25 a +31; 8) -157 a +35, com deleção do elemento GATA (posição +20 a +23). Estes foram transfectados em células OKP, uma linhagem de túbulos proximais de rim de *opossum*. A atividade promotora de transcrição de cada segmento foi analisada em comparação com a atividade de luciferase observada com a transfecção do vetor pGL3-basic não recombinante, sem promotor. Foi realizado a cotransfecção do vetor pRL-CMV, que contém o gene da proteína repórter Renilla luciferase, usado como controle da eficiência de transfecção. Após serem analisados os resultados, observou-se que a atividade do promotor foi mais elevada com o constructo -152 a +55 (76.52 ± 45.26 (n=9)). Além disso, conseguimos identificar a existência de possíveis ativadores transcripcionais no segmento entre a posição -85 e -65 (Egr-1/Sp1); -44 e -33 (Egr-1) e -33 e -25 (elemento TATA-Box não canônico), pois a remoção destes nucleotídeos reduziu significativamente a atividade do promotor. Outra observação foi a presença de elementos inibitórios entre as bases -65 e -44 (Sp1/Ap2), pois com a retirada destes, observamos um aumento muito significativo da atividade do promotor. O menor segmento (-25/+31) apresentou atividade promotora significativa, sugerindo que ainda tenha os elementos indispensáveis para a montagem do complexo transcricional primário, embora com eficiência já bem reduzida. A presença do elemento GATA no primeiro exon, embora importante para a transcrição do gene NHE3 em células intestinais, não parece ser importante para a atividade transcricional em células de túbulos proximais.

Palavras chave: Região promotora; Permutador Na^+/H^+ .

ABSTRACT

NERI, E. A. **Study of the Promoter Region of the Na/H Exchanger (NHE3) Gene.** 2009. 67 f Dissertação (Mestrado em Fisiologia Humana) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

In view of the importance of the exchanger Na^+ / H^+ (isoform 3), in reabsorption of NaCl and NaHCO_3 in proximal tubules and consequently the acid-base balance, and cell volume, came the interest in identifying the region promoter essential for transcription of the NHE3 gene and the elements of the binding of transcription factors present in the same, in cells renal proximal tubules. For this, segments of the 5' flanking region of the rat NHE3 gene were obtained by PCR and inserted into pGL3-basic vector, which encodes Firefly luciferase reporter gene. The following fragments were analyzed 1) -157 to +31, 2) -152 to +55, 3) -85 to +31, 4) -65 to +31, 5) -44 to +31, 6) -33 to +31, 7) -25 to +31; 8) -157 to +35, with deletion of the GATA element (position +20 to +23). These were transfected in OKP cells, line of the renal proximal tubules of opossum kidney. The promoter activity of transcription of each segment was analyzed in comparison with the luciferase activity observed with transfection of the pGL3-basic vector recombinant, without promoter. Was performed cotransfecção of PRL-CMV vector, containing the gene of the reporter protein Renilla luciferase, used as internal control of the efficiency of transfection. After analyzing the results, observed promoter activity was higher with the construct -152 to +55 (76.52 ± 45.26 ($n = 9$)). Furthermore, we identify the possible existence of transcriptional activators in the segment between position -85 and -65 (Egr-1/Sp1), -44 and -33 (EGR-1) and -33 and -25 (atypical TATA-box element) because the removal of these nucleotides significantly reduced the activity of the promoter. Another observation was the presence of inhibitory elements between bases -65 and -44 (Sp1/Ap2), because with the deletion of these, we observed a very significant increase in the activity of the promoter. The lower segment (-25 / +31) showed significant promoter activity, suggesting that still has the elements essential for transcription complex assembly of the primary, in spite of with reduced efficiency well. The presence of the GATA element in the first exon, although important for the transcription of the NHE3 gene in intestinal cells, does not appear to be important for transcriptional activity in cells of proximal tubules.

Key words: Region Promoter; Na/H Exchanger.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Região flanqueadora 5' do gene NHE3 de rato. Com demarcação das deleções de interesse neste estudo e a identificação de alguns possíveis sítios de reconhecimento e ligação para fatores de transcrição. Os sinais de + e –, na frente dos fatores de transcrição indicam: (+) o sítio de reconhecimento e ligação para o fator encontra-se na fita sense e (-) na fita antisense.....	19
Figura 2- Região flanqueadora 5' do gene NHE3 de rato. Com demarcação das mutações nos possíveis sítios de reconhecimento e ligação para os fatores de transcrição Egr-1, Sp1 e Ap2, os nucleotídeos destacados em verde, correspondem aos nucleotídeos mutados.....	21
Figura 3 - PCR realizada para amplificar os segmentos da região flanqueadora 5' do gene NHE3 de rato.....	34
Figura 4 - PCR realizada para amplificar os segmentos da região flanqueadora 5' do gene NHE3 de rato.....	34
Figura 5 - Pareamento dos oligonucleotídeos para obtenção do segmento da região flanqueadora 5' do gene NHE3 de rato.....	35
Figura 6 - Pareamento dos oligonucleotídeos para obtenção dos segmentos da região flanqueadora 5' do gene NHE3 de rato.....	35
Figura 7 - PCR realizada para amplificar os segmentos da região promotora de NHE3 de rato, com inserção de mutações pontuais nos possíveis sítios de ligação.....	36
Figura 8. PCR de colônia para confirmação da presença do inserto no plasmídeo.....	37
Figura 9. Quantificação dos plasmídeos recombinantes em triplicata.....	38
Figura A.1- Eletroferogramas das sequências.....	61

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Atividade dos segmentos promotor-NHE3 de rato clonados em pGL3-basic, avaliada pela Atividade de Firefly luciferase em relação à atividade de Renilla luciferase, normalizada para a atividade observada com o vetor sem promotor (pGL3-basic). Analisados através de <i>teste t</i> (n=9). (#) estatisticamente diferente em relação ao pGL3-basic.....	40
Gráfico 2 - Análise das atividades das deleções da região 5' do promotor-NHE3 de rato clonados em pGL3-basic, avaliada pela atividade de Firefly luciferase em relação à atividade de Renilla luciferase, normalizada para a atividade observada com o vetor sem promotor (pGL3- basic). Analisados através de <i>teste t</i> . Fragmento -25/+31 (n=6), para os demais fragmentos n=9. (∂) Estatisticamente diferente em relação à -157/+31, (*) estatisticamente diferente quando comparado entre os fragmentos e (#) estatisticamente diferente em relação ao pGL3-basic.....	42
Gráfico 3 - Atividade do fragmento com deleção no elemento GATA na posição +20/+23 do promotor-NHE3 de rato clonados em pGL3, avaliada pela atividade de Firefly luciferase em relação à atividade de Renilla luciferase, normalizada para a atividade observada com o vetor sem promotor (pGL3-basic) (n=9). (#) estatisticamente diferente em relação ao pGL3-basic.....	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Valores da luminescência obtida da dosagem de Luciferase de lisado de células OKP transfectadas com os segmentos -152/+55 e -157/+31. Os valores representam a atividade relativa Firefly/Renilla Luciferase e são as médias das duplicatas de leitura divididos pelo valor de pGL3-basic.....	39
Tabela 2 - Média e Erro Padrão das amostras basic (vetor pGL3-basic vazio), segmento -152/+55 e -157/+31.....	39
Tabela 3 - Valores da luminescência obtida da dosagem de Luciferase de lisado de 3 células OKP transfectadas com os segmentos com deleções na região flanqueadora 5' do gene NHE3 de rato. Os valores representam Firefly/Renilla Luciferase e são as médias das duplicatas de leitura divididos pelo valor de pGL3-basic.....	41
Tabela 4 - Média e Erro Padrão dos dados obtidos com a luminescência dos segmentos em que foram realizados as deleções na região flanqueadora 5' do gene NHE3 de rato.....	41
Tabela 5 - Valores da luminescência obtida da dosagem de Luciferase de lisado de células OKP transfectadas com os segmentos -157/+31 e o segmento sem o elemento GATA (-157/+35. Os valores representam Firefly/Renilla Luciferase e são as médias das duplicatas de leitura divididos pelo valor de pGL3-basic.....	43
Tabela 6 - Média e Erro Padrão dos dados obtidos com a luminescência dos segmentos -157/+31 e -157/+35 (sem o elemento GATA).....	44
Tabela A.1 - Sequência dos iniciadores utilizados para obtenção dos segmentos da região 5' flanqueadora do gene NHE3 de rato.....	56
Tabela B.1 - Sequência dos iniciadores utilizados para obtenção dos segmentos da região 5' flanqueadora do gene NHE3 de rato com mutação pontual nos possíveis sítios para Egr-1/Sp1 (-80/+31).....	57
Tabela B.2 - Sequência dos iniciadores utilizados para obtenção dos segmentos da região 5' flanqueadora do gene NHE3 de rato com inserção das mutações pontuais nos possíveis sítios para Sp1 e Ap2(-60/+31).....	57
Tabela C.1 - Reação de ligação dos produtos no vetor pGL3-Basic.....	57
Tabela C.2 - Reações controle da ligação no vetor pGEM-T Easy (Promega) (3000bp)....	57

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMPC- adenosina monofosfato cíclico
Ap- *activator protein*
Bp- pares de bases
Ca-CM- cálcio-calmodulina
CHP1- proteína homóloga à calcineurina 1
CHP2- proteína homóloga à calcineurina 2
C/EBP- CCAAT/*enhancer-binding protein*
CO₂- dióxido de carbono
CREB- elementos responsivos a AMPC
Cys- Cisteína)
Egr-1- early growth response factor 1
DPPIV- dipeptidil peptidase IV
H⁺- hidrogênio
H₂O- água
HCO₃⁻- bicarbonato
His- Histidina
IFN- γ - *Interferon γ*
Inr- initiator elements
NaCl- cloreto de sódio
NaHCO₃- bicarbonato de sódio
NHE3- permutador sódio/hidrogênio isoforma 3
NHEs- Permutadores sódio/hidrogênio
NBC1A - cotransportador Sódio-bicarbonato
NHERF-1- Na⁺/H⁺ *exchanger regulatory factor* 1
NHERF-2- Na⁺/H⁺ *exchanger regulatory factor* 2
NHERF-3 (ou PDZK1),
NHERF-4 (IKEPP)-
NF-Y- *nuclear factor Y*
PCR- Reação de Polimerização em cadeia.
PMA- forbol 12-miristato -13 acetato
PKA- proteína cinase A
PKC- Proteína cinase C
PPA2- fosfatase A2
PTH- Hormônio da paratireóide
RNA pol II- RNA polimerase II
Sp (*specificity protein*) e
TBP- "*TATA-binding protein*"
TFIID- fator de transcrição IID
TNF- α - "*tumor-necrosis factor- α* "
5'UTR- 5' não traduzida

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 REVISÃO DA LITERATURA.....	13
1.1.1 Permutadores.....	13
1.1.2 Permutadores Na^+/H^+ (NHEs).....	13
1.1.3 Isoforma 3 (NHE3).....	15
1.1.3.1 Fosforilação de NHE3.....	15
1.1.3.2 Papel de proteínas acessórias na regulação de NHE3.....	15
1.1.3.3 Modulação transcricional da expressão de NHE3.....	16
1.1.3.3.1 Mecanismos gerais de controle de transcrição.....	16
1.1.3.3.2 Modulação transcricional de NHE3.....	17
1.1.4 Sequências regulatórias identificadas nos genes NHE1, NHE2 e NHE3.....	17
1.1.5 Região promotora do gene NHE3.....	18
1.2 OBJETIVOS.....	20
2 MATERIAIS E MÉTODOS	21
2.1 REAÇÃO EM POLIMERIZAÇÃO EM CADEIA (PCR).....	21
2.2 FOSFORILAÇÃO DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS 25/+31 E -33/+31.....	23
2.3 DESFOSFORILAÇÃO DO VETOR PGL3-BASIC COM FOSFATASE ALCALINA BACTERIANA	23
2.4 PURIFICAÇÃO DO PRODUTO DE PCR	24
2.5 DIGESTÃO DOS FRAGMENTOS OBTIDOS POR PCR E DO VETOR PGL3- BASIC COM ENDONUCLEASES ESPECÍFICAS.....	24
2.6 EXTRAÇÃO DAS BANDAS DO GEL.....	25
2.7 REAÇÃO DE LIGAÇÃO DO PRODUTO DE PCR NO VETOR PGL3- BASIC (4.818 BP).....	25
2.8 TRANSFORMAÇÃO DE BACTÉRIAS XL1-BLUE OU TOP 10.....	25
2.9 OBTENÇÃO DE CÉLULAS COMPETENTES.....	26
2.10 IDENTIFICAÇÃO DOS VETORES RECOMBINANTES ATRAVÉS DA AMPLIFICAÇÃO DO SEGMENTO CLONADO POR PCR DE COLÔNIAS DE BACTÉRIAS.....	27
2.11 PURIFICAÇÃO DE PLASMÍDEOS RECOMBINANTES.....	28

2.12 SEQUENCIAMENTO DOS VETORES RECOMBINANTES.....	29
2.13 QUANTIFICAÇÃO DOS PLASMÍDEOS RECOMBINANTES PARA TRANSFEÇÃO.....	30
2.14 CULTURA DE CÉLULAS.....	30
2.15 ANÁLISE DO GENE REPÓRTER DA LUCIFERASE	31
2.16 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	32
3 RESULTADOS	33
3.1 FRAGMENTOS DO PROMOTOR NHE3, ORIGINAIS E MUTADOS, PREPARADOS PARA A INSERÇÃO EM PGL3-BASIC.....	33
3.2 ANÁLISE DA ATIVIDADE PROMOTORA DOS DEFERENTES SEGMENTOS.....	38
4 DISCUSSÃO	45
5 CONCLUSÕES	51
REFERÊNCIAS	52
ANEXOS	56

1 INTRODUÇÃO

1.1 REVISÃO DA LITERATURA

1.1.1 Permutadores

Permutadores são proteínas integrais de membranas que realizam transporte acoplado de substâncias, em direções opostas. O modelo proposto para o mecanismo de funcionamento desses transportadores pressupõe que a ligação dos solutos transportados está associada a mudanças conformacionais da proteína que resultam em movimento do sítio de ligação dos íons, de modo que possam ser expostos de um ou outro lado da membrana. Essa mudança conformacional está associada à mudança na afinidade do transportador por uma das espécies transportadas, permitindo seu deslocamento contra gradiente de potencial químico ou eletroquímico.

1.1.2 Permutadores Na^+/H^+ (NHEs)

Os permutadores Na^+/H^+ realizam a troca de Na^+ extracelular por H^+ intracelular. Estas proteínas participam de processos fisiológicos como controle do pH e volume intracelular, nas células polarizadas ou não polarizadas, assim como regulação do volume extracelular e homeostase ácido-base através da reabsorção de Na^+ e secreção de H^+ nos epitélios do trato intestinal e de túbulos renais (ORLOWSKI e GRINSTEIN 2004). A utilização de técnicas de biologia molecular permitiu identificar 10 isoformas desses transportadores em mamíferos. Estas isoformas possuem distribuição tecidual, propriedades cinéticas, características farmacocinéticas e mecanismos regulatórios distintos. A primeira isoforma NHE a ter sua sequência de amino ácidos definida, em 1989 por SARDET et al., foi a forma expressa constitutivamente de forma obíqua em quase todas as células de mamíferos, denominada NHE1. Posteriormente, foram identificadas as formas NHE2, NHE3, e NHE4, que são formas particularmente abundantes em epitélios. NHE6, NHE7 e NHE9 são encontradas em organelas intracelulares. NHE8 é observada em epitélios, especialmente nas fases iniciais do desenvolvimento dos mamíferos (SARDET et al., 1989; ORLOWSKI e GRINSTEIN 2004). Em epitélios, NHE1 e NHE4 encontram-se em membrana basolateral; NHE2, NHE3 e NHE8 estão localizados em membranas apicais; NHE5, expresso no cérebro, não é observado em

epitélios. A última isoforma identificada, NHE10, aparentemente é seletivamente expressa em osteoclastos (SARDET et al., 1989; TSE et al., 1992; TSE et al., 1993; KLANKE et al., 1995; BRANT et al., 1995; LEE et al., 2008).

Quanto à localização subcelular dos NHEs em túbulos renais, NHE3 e NHE8 estão presentes em membrana apical de túbulos proximais; NHE2 e NHE3 em membrana apical de segmento espesso ascendente; NHE2 em membrana apical de túbulo convoluto distal; NHE1 e NHE4 estão presentes em membrana basolateral, especialmente de células do nefro distal (GOYAL et al., 2003; ORLOWSKI e GRINSTEIN 2004; MALO e FLIEGEL 2006; SLEPKOV et al., 2007).

Os NHEs apresentam entre 25-70% de identidade no que se refere a amino ácidos e apresentam topologia similar na membrana: um domínio amino-terminal altamente hidrofóbico com 12 segmentos transmembranas, e um longo domínio carboxi-terminal hidrofílico localizado no citoplasma celular. O domínio citoplasmático está envolvido na regulação da atividade dos NHEs através da interação com proteínas citosólicas, além de possuírem sítios que são fosforilados por diferentes proteínas cinases (ORLOWSKI e GRINSTEIN 2004; LEE et al., 2008).

1.1.3 Isoforma 3 (NHE3)

NHE3 é a forma mais abundante de permutador Na^+/H^+ em tecido renal, mas é também expresso de forma abundante no trato intestinal, especialmente em íleo. É encontrado também nos demais segmentos do intestino delgado e em cólon (DONOWITZ e LI 2007), em vesícula biliar (COLOMBANI et al., 1996), epidídimo e várias regiões do cérebro (BRANT et al., 1995).

Os túbulos proximais são responsáveis pela maior parte da reabsorção de Na^+ , Cl^- , HCO_3^- e água filtrados. Neste segmento, a maior parte do Na^+ filtrado é reabsorvido em troca por H^+ através de NHE3. A força movente do processo é o gradiente de potencial químico do Na^+ estabelecido pela bomba Na^+/K^+ -ATPase presente na membrana basolateral. O H^+ intracelular secretado para a luz provem essencialmente da geração de ácido carbônico, pela ação da anidrase carbônica do tipo II; este, na luz, é tamponado principalmente pelo HCO_3^- , com geração de ácido carbônico que, na presença da anidrase carbônica tipo IV em membrana apical, rapidamente se transforma em CO_2 e H_2O . O CO_2 se difunde para a célula, onde novamente é usado na geração de mais H^+ e HCO_3^- . O HCO_3^- intracelular é reabsorvido para o sangue através da membrana basolateral, principalmente pelo cotransportador $\text{Na}^+-\text{HCO}_3^-$

(NBC1A). Assim, NHE3 propicia a reabsorção de grande quantidade de NaHCO_3 em túbulos proximais (ORLOWSKI e GRINSTEIN 2004). Estudos com camundongos com *knockout* do gene NHE3 mostraram uma redução significativa na reabsorção renal de bicarbonato. Na ausência dessa proteína estes animais tendem a ser levemente hipotensos e acidóticos (SCHULTHEIS et al., 1998).

A atividade de NHE3 é regulada em diferentes planos: fosforilação, reciclagem da proteína NHE3 entre a membrana apical e vesículas subapicais, assim como modulação da transcrição gênica. Vários hormônios foram identificados como reguladores de NHE3, como os hormônios glicocorticóides, tireoideanos, da paratireóide (HERBERTH et al., 2008), insulina, angiotensina II. Osmolaridade e concentração de prótons intracelulares são também variáveis importantes da determinação da expressão de NHE3 (YUN et al., 1995; HAYASHI et al., 2002; ORLOWSKI e GRINSTEIN 2004; FUSTER et al., 2007).

1.1.3.1 Fosforilação de NHE3

Um importante mecanismo de modulação de NHE3 é a fosforilação que ocorre em condições basais e pode ser modificada por alguns hormônios. A regulação pode ocorrer por fosforilação direta da proteína de NHE3, como acontece após ativação proteína cinase A (PKA) por PTH, ou pela fosforilação de proteínas acessórias que interagem com NHE3, que parece ocorrer quando há ativação de PKC. Já foram identificados serinas presentes no domínio carboxi-terminal que são fosforiladas por PKA como a Serina 552, 605 e 634; estudos que em que foram realizadas mutações pontuais nesses aminoácidos reduziram ou aboliram o efeito de PKA sobre a atividade de NHE3, como o efeito inibitório do PTH (MOE 1999).

1.1.3.2 Papel de proteínas acessórias na regulação de NHE3

Existem proteínas acessórias que interagem com a região citoplasmática de NHE3 e parecem ser essenciais, pois estas regulam o tráfego e a atividade deste permutador. Algumas das proteínas identificadas foram: NHERF-1 (Na^+/H^+ *exchanger regulatory factor* 1), NHERF-2 (ou E3KARP), NHERF-3 (ou PDZK1), NHERF-4 (IKEPP), (DONOWITZ et al., 2005); PPA2 (fosfatase A2) , Ca-CM (cálcio-calmodulina) , CHP1 e CHP2 (proteína homóloga à calcineurina) (PANG et al., 2002) (BIEMESDERFER et al., 1999; VOLTZ et al., 2001; PANG et al., 2002; ORLOWSKI e GRINSTEIN 2004).

Na região intermicrovilar, NHE3 interage com megalina e aparentemente nesta região o NHE3 é inativo (ORLOWSKI e GRINSTEIN 2004). DPPIV (dipeptidil peptidase IV) interage com NHE3 em microvilosidades, onde NHE3 é funcional, e aparentemente esta associação pode afetar sua expressão e/ou a atividade de NHE3 (GIRARDI et al., 2008). NHE3 interage também com Ezrin que funciona como uma proteína ancoradora de PKA ou AKAP, que pode posicionar fisicamente PKA próximo a NHE3 e promover fosforilação do permutador e/ou proteínas do citoesqueleto (ORLOWSKI e GRINSTEIN 2004).

1.1.3.3 Modulação transcricional da expressão de NHE3

1.1.3.3.1 Mecanismos gerais de controle de transcrição

Existem vários níveis de regulação da expressão de uma proteína, mas o primeiro passo é a transcrição. Para que ocorra a transcrição de um gene é necessária a existência de uma sequência regulatória de DNA localizada à montante do sítio de início de transcrição, chamada de região promotora, à qual se liga o complexo transcricional primário contendo a RNA polimerase II (RNA pol II).

Uma sequência comum no promotor é o elemento “TATA box”, uma região rica em A-T encontrada geralmente 30 pares de bases a montante do sítio de início de transcrição, onde se liga a “TATA-binding protein” (TBP), umas das subunidades do fator de transcrição IID (MALAKOOTI et al., 2002). Os fatores envolvidos na transcrição mediada por RNA pol II compreendem os fatores gerais de transcrição TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIIF e TFIIH. O complexo multiprotéico TFIID contém a TBP e outros dez fatores associados (RANISH e HAHN 1996; YANG et al., 2007).

A montagem do complexo transcricional primário pode ser favorecida ou dificultada por proteínas que modificam a estrutura da cromatina por adição de grupos químicos específicos às histonas, como metilação, acetilação, fosforilação ou ubiquitinação. Além disso, fatores de transcrição que se ligam a outros elementos do DNA, à montante ou à jusante do promotor, na região 5' não traduzida (5'UTR) ou em intros, também podem interferir com a montagem e com a estabilidade do complexo transcricional primário, determinando a eficiência do início da transcrição.

Os fatores de transcrição são classificados em famílias de acordo com os motivos estruturais envolvidos no reconhecimento das sequências específicas de DNA. Para o reconhecimento dos pares de bases no DNA é necessário um encaixe molecular adequado que

envolve estabelecimento de pontes de hidrogênio, interações eletrostáticas e interações hidrofóbicas. As interações individuais são fracas, mas este contato é de aproximadamente 20 bases em uma interface proteína-DNA e, ao se somarem, tornam-se fortes e específicas (ALBERTS et al., 2004).

1.1.3.3.2 Modulação transcricional de NHE3

A modulação transcricional positiva e negativa de NHE3 já foi descrita em algumas condições específicas. Estímulos que induziram o aumento dos níveis de mRNA de NHE3 foram: a angiotensina II (XU et al., 2006); butirato de sódio (KIELA et al., 2001); insulina (KLISIC et al., 2002); glicocorticóide (KANDASAMY e ORLOWSKI 1996); hormônio tireoideano (CANO et al., 1999); acidose metabólica (YAMAJI et al., 1995) e PMA (forbol 12-miristato -13 acetato) (MALAKOOTI et al., 2006). Já a inibição foi observada com *Interferon γ* (IFN- γ) e “*tumor-necrosis factor- α* ” (TNF- α) (AMIN et al., 2006) e PTH (BEZERRA et al., 2008).

1.1.4 Sequências regulatórias identificadas nos genes NHE1, NHE2 e NHE3

Analisando as regiões promotoras dos genes das proteínas NHE1, NHE2 e NHE3 encontramos sítios de ligação para fatores de transcrição que são comuns a muitos outros promotores, como sítios de ligação para fatores de transcrição da família Sp (*specificity protein*) e Ap (*activator protein*); CREB (elementos responsivos a AMPc); TATA box, referido anteriormente, e muitos outros. O elemento TATA box típico não está presente no promotor dos genes NHE2 e NHE3.

MILLER et.al., em 1991, foi o primeiro grupo a clonar e sequenciar a região flanqueadora 5' do NHE1 de humano (1.377 pb). Neste segmento, foram identificados vários possíveis sítios para fatores de transcrição, tais como três sítios Ap1, Ap2, dois CAAT boxes, quatro GC boxes, cinco CACCC, elementos responsivos a AMPc, Sp1, NF-Y (*nuclear factor Y*), quatro hemi-sítios consensuais para ligação de receptores para glicocorticóides e a presença do elemento TATA box quase idêntico ao canônico (TATAAA), 25 bases à montante do sítio de início de transcrição (MILLER et al., 1991).

Na região flanqueadora 5' do gene NHE2 foram identificados cinco elementos responsivos a glicocorticóides, quatro sítios de ligação para CACCC, um NFY-CBF, sítios para Egr-1 (early growth response factor 1), elementos responsivos a ácido retinóico e

progesterona. A região próxima ao sítio de início de transcrição não apresenta os elementos TATA e CAAT boxes típicos. Quando comparadas as seqüências promotoras de NHE2 com NHE1 e NHE3 não se observa identidade significativa (MULLER et al., 1998).

1.1.5 Região promotora do gene NHE3

Os primeiros estudos da região promotora de NHE3 de rato foram realizados por CANO e por Kandasamy e Orlowski, ambos em 1996 (KANDASAMY e ORLOWSKI 1996; CANO 1996). O mapeamento do sítio de início de transcrição feita por CANO chegou a resultado distinto daquele obtido por Kandasamy e Orlowski, 128 e 97 pb acima do sítio de início de tradução (ATG inicial), respectivamente. Esse último foi posteriormente confirmado por outros laboratórios, inclusive o nosso. A posição 97 é o principal sítio de início de transcrição, mas alguns transcritos começam nas posições 100 ou 96. O sítio de início de transcrição é o mesmo em diferentes órgãos: estômago, colo e rim.

A região promotora propriamente dita (aproximadamente 150 bp acima da posição de início de transcrição, posição +1) caracteriza-se pela ausência dos elementos TATA e CCAAT/*enhancer-binding protein* (C/EBP) boxes típicos, mas mostra a seqüência ATTAAA na posição -31 a montante do sítio de início de transcrição; três possíveis sítios de ligação para Sp1 e Egr-1 (*early growth response 1*). Na região flaquedora que se estende a 1.377 pb à montante da posição +1, são encontrados vários hemi-sítios consensuais para ligação de receptores para glicocorticóides, dois sítios para ligação de progesterona, sete hemi-sítios para ligação de receptores para hormônio tireoideano (KANDASAMY e ORLOWSKI 1996; CANO 1996a).

A região promotora do gene NHE3 humano foi mapeada por MALAKOOTI e colaboradores em 2002, quando clonaram 1,6 kb desta região e encontraram o sítio de início de transcrição 116 pb à montante do ATG inicial (início de tradução). É observada uma seqüência TATA box-like na posição - 40 (ATTAAA), relativa ao sítio de início de transcrição. No segmento de 150 pb iniciais de região reguladora transcrição (promotor propriamente dito) são também observados sítios de ligação para Egr-1, Sp1/Sp3, para AP-2., Dentro segmento da região flanqueadora 5' clonada (1.600 pb) são observados também 5 hemi-sítios para ligação de receptores de hormônios esteroidais, e dois para hormônio tireoideano (MALAKOOTI et al., 2002).

Alguns elementos regulatórios são bem conservados entre os promotores do gene NHE3 de ratos e de humanos. Na região -100 a +1, estes promotores apresentam 79% de

nucleotídeos idênticos. As sequências consensuais para Sp1/Sp3, TFIID e CACCC estão presentes em posições similares em ambos os promotores. No entanto, existem elementos *cis* para diferentes fatores de transcrição que são específicos de cada promotor, sugerindo que existam mecanismos diferentes de controle da expressão de NHE3 entre estas duas espécies (MALAKOOTI et al., 2002).

Sequências presentes no primeiro exon do gene NHE3 também parecem ser relevantes na modulação da transcrição do mesmo. Em experimentos realizados em células de adenocarcinoma de colon humano, células Caco 2, Kiela e colaboradores observaram que o elemento GATA presente na posição +20 no primeiro exon é reconhecido pelo fator de transcrição GATA-5, e sua ligação ao DNA resulta em aumento sinérgico da estimulação observada com a ligação de dos fatores Sp1 e Sp3 em elementos presentes na promotora vizinha ao primeiro exon (KIELA et al., 2003).

Estudos preliminares realizados em nosso laboratório mostraram que a região flanqueadora da extremidade 5' do gene NHE3 de rato correspondente à posição -152 (relativa ao sítio de início de transcrição) é mais ativa como promotora da transcrição que os segmentos maiores, - 2.095, - 1,196, -889 e -467 (REBOUÇAS et al., 2006).

Na figura 1, apresentamos a sequência da região flanqueadora 5' próxima ao sítio de início de transcrição (posição +1) do gene NHE3 de rato. Os possíveis sítios de reconhecimento e ligação para os fatores de transcrição mostrados abaixo foram obtidos através do programa para análise de promotores - MatInspector (Genomatix). Nesta figura também identificamos as posições utilizadas para remoções sucessivas de segmentos do promotor, realizadas em nosso estudo.

Figura 1- Região flanqueadora 5' do gene NHE3 de rato. Com demarcação das deleções de interesse neste estudo e a identificação de alguns possíveis sítios de reconhecimento e ligação para fatores de transcrição. Os sinais de + e - na frente dos fatores de transcrição indicam: (+) o sítio de reconhecimento e ligação para o fator encontra-se na fita sense e (-) na fita antisense.

1.2 OBJETIVOS

Tendo em visto a importância do permutador NHE3 na reabsorção de Na⁺ e fluidos em túbulos renais, decidimos analisar mais detalhadamente a região promotora do gene NHE3 com o intuito de identificar precisamente qual é o segmento da região promotora indispensável para a transcrição do gene NHE3 de rato e identificar os elementos essenciais para a regulação positiva e negativa da transcrição presentes nesse promotor.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 REAÇÃO DE POLIMERIZAÇÃO EM CADEIA (PCR)

Alguns segmentos de DNA correspondentes à região promotora de NHE3 analisados nesse estudo foram obtidos a partir de segmento de DNA previamente amplificado por PCR, utilizando DNA genômico de células de rim de rato como molde, clonado em pGL-3 basic e sequenciado em ambas as direções. Esse DNA previamente clonado em nosso laboratório foi utilizado como molde em nossas reações de PCR. (“Polymerase Chain Reaction”).

Os primeiros fragmentos da região promotora que obtivemos foram os seguintes: -157/+31; -85/+31 e -65/+31. Em seguida, introduzimos mutações pontuais em seqüências correspondentes a possíveis sítios de reconhecimento de fatores de transcrição, identificadas pela cor verde na figura 2, demonstrada abaixo.

- 205	GGTGGCTGAGGAGCCCGCAGCATCCAGAGAGCCAGGACTTCTAGGCTGGGGCCCAACCAAGTAGGTGGGC	
		▼-80 EGR-1 +Sp1
- 135	GTGAGCAGCACAGGCGCGAGACCTTCTAACGCAGCAGACTGTTTGATTACGTGCGCAGCGG <u>GG G CGGG</u>	
	▼-60+Sp1 -AP2	▼+1
- 65	AAGGC <u>CCCGC</u> <u>CCTG</u> <u>GCGC</u> GG GAGGGGGCAG CGGGATTAAAGGCCACCCGG GCAGGCCTGG GGACt _{gact}	
	▼+31	
+ 6	gctgccagctccggatagcgagagggctgtgacgaagagcgagcaggtaccac	

Figura 2- Região flanqueadora 5' do gene NHE3 de rato. Com demarcação das mutações nos possíveis sítios de reconhecimento e ligação para os fatores de transcrição Egr-1, Sp1 e Ap2, os nucleotídeos destacados em verde, correspondem aos nucleotídeos mutados.

Os fragmentos com mutações pontuais obtidos foram:

- constructo -80/+31 com mutação em um possível sítio de ligação para Egr1/Sp1 (superponíveis);
- constructo -60/+31 com 2 mutações pontuais no possível sítio de ligação para Sp1/Ap2;
- constructo sem o elemento GATA (-157/+35).

As condições para a amplificação dos fragmentos de DNA por PCR utilizados neste trabalho seguem o seguinte protocolo:

- 2 ng de DNA (fragmento -2095/+55 inserido no vetor pGL3-basic)
- 200 µM de cada um dos dNTPs (ATP, CTP, GTP e TTP)
- 1,5 mM de MgCl₂
- Tampão para PCR

- 20 pmol de cada primer (sense e antisense)
- 5 unidades de Taq Polimerase (Invitrogen)
- H₂O para o volume final de 50 µL.

As reações de amplificação foram feitas em termociclador GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer) utilizando as seguintes condições:

94 °C- 2 minutos	
94 °C- 30 segundos	} 30 ciclos
65 °C- 30 segundos	
2 °C- 30 segundos	
72 °C- 7 minutos	
4 °C - ∞	

Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida 8%, corado com brometo de etídeo e visualizado no Analisador de Imagens Eagle Eye II (Stratagene), para confirmação dos tamanhos dos fragmentos obtidos.

Na tabela A.1, em anexos, estão representadas as seqüências dos iniciadores (Invitrogen) utilizados para a amplificação dos diferentes segmentos da região promotora do gene NHE3.

Nas reações para inserção de mutações pontuais nos possíveis sítios de reconhecimento dos fatores de transcrição, utilizamos as seqüências que se encontram na Tabela B.1, Tabela B.2, em anexos (os nucleotídeos destacados em verde correspondem às bases mutadas).

Para as Tabelas A.1, B.1 e B.2, destacamos as bases em vermelho que correspondem aos sítios de reconhecimento para as enzimas de restrição, e bases em azul correspondem às bases adicionadas para facilitar a digestão do produto de PCR pelas enzimas de restrição. As bases em preto correspondem a seqüência do promotor.

Como não foi possível obter os fragmentos -25/+31, -33/+31, -44/+31 por PCR devido ao pequeno tamanho, optamos por sintetizar a seqüência inteira, fitas sense e anti-sense, as quais foram aneladas por reação de pareamento *in vitro*.

Para isto os oligonucleotídeos foram ressuspensos em água para uma concentração final de 4,1 µg/µL.

Em seguida cada oligonucleotídeo foi adicionado a tubos contendo solução STE (10 mM Tris-Cl, pH 8.0; 0,1 M NaCl; 1 mM EDTA, pH 8.0) para um volume final de 50 µL.

O anelamento das fitas foi obtido com a incubação da reação nas seguintes condições:

95 °C - 3 minutos	}	1 vez
85 °C- 5 minutos		
75 °C- 5 minutos		
60 °C- 10minutos		
50 °C- 10minutos		
25 °C- 2 horas		

Após o anelamento, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 8% corado com brometo de etídeo, para a confirmação do tamanho dos fragmentos.

2.2 FOSFORILAÇÃO DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS -25/+31 E -33/+31

A fosforilação das extremidade 5' dos oligonucleotídeos -25/+31 e -33/+31 foi realizada com o objetivo de possibilitar a ligação de fragmentos no vetor (desfosforilado) para clonagem.

Para isto foram adicionados ao tubo:

- 100 pmoles de oligonucleotídeos
- Tampão para T4-PNK (polinucleotídeo cinase) 1X
- 0,1 mM ATP
- 20 U de T4 - PNK (Promega)
- Foi feita uma incubação à 37 °C por 30min.
- A reação foi interrompida pela adição de 2µL de EDTA 0.5M
- O produto foi purificado com fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) e precipitado com etanol e meio volume de acetato de amônio 7,5M
- O precipitado foi lavado com etanol 70% e dissolvido em Buffer TE 1X.

2.3 DESFOSFORILAÇÃO DO VETOR PGL3-BASIC COM FOSFATASE ALCALINA BACTERIANA

Com os fragmentos já fosforilados o vetor pGL3-basic foi desfosforilado com o objetivo de facilitar a ligação nos mesmos.

O vetor foi primeiramente digerido com a enzima de restrição SmaI, produzindo extremidades cegas. A seguir foi realizado o seguinte protocolo:

- Foi adicionado 1 pmol de DNA

- Tampão da enzima BAP (Invitrogen) (70 U)
- Completado com H₂O para um volume final de 39 µL
- Incubado por 1h a 65 °C
- A BAP foi inativada e removida com fenol:clorofórmio (25:24) e o produto precipitado com etanol absoluto gelado.

2.4 PURIFICAÇÃO DO PRODUTO DE PCR

Para a purificação dos produtos de PCR foi utilizado o Kit ChargeSwitch®PCR Clean-Up (Invitrogen), de acordo com as especificações do fabricante. O kit é composto de *beads* (esferas) magnéticas (ChargeSwitch®Magnetic Beads) que se ligam ao DNA e depois são separadas do restante das moléculas presentes em solução por meio de uma estante que contém um lado magnético. Em solução com pH ácido (25 mg/mL em 10 mM MES, pH 5.0; 10 mM NaCl; 0.1% Tween 20), a *bead* magnética que contém carga positiva interage com a carga negativa do ácido nucléico. Para a eluição do produto, a carga é neutralizada com tampão de eluição de pH 8.5 (10 mM Tris-HCl, pH 8.5). A técnica foi realizada de acordo com o protocolo sugerido pelo fabricante.

2.5 DIGESTÃO DOS FRAGMENTOS OBTIDOS POR PCR E DO VETOR PGL3-BASIC COM ENDONUCLEASES ESPECÍFICAS

Os fragmentos -157/+31, -85/+31, -65/+31 e -44/+31, que foram amplificados com oligonucleotídeos contendo sítios de reconhecimento para enzimas de restrição na extremidade 5', e o vetor pGL3-basic foram digeridos com endonucleases para a formação de extremidades coesivas compatíveis, para posterior inserção dos fragmentos no vetor pGL3-basic e transformação em bactérias XL1-Blue (Stratagene) ou Top 10 (Invitrogen). As enzimas utilizadas foram KpnI e HindIII (Promega). Para as digestões foram utilizados 46 µL do produto de PCR; Tampão J 1X; BSA 0,1%; 20 U da enzima KpnI (Promega). As reações foram incubadas a 37 °C 16h.

Após a incubação as amostras foram purificadas com QIAquick®Spin Kits (Quiagen), de acordo com o protocolo recomendado pelo fabricante. Esse é um sistema composto por membrana de sílica na base de uma coluna onde o DNA se liga na presença de alta concentração de sal e pH ≤ 7.5, enquanto os contaminantes passam por ela. Posteriormente o DNA é eluído da coluna por tampão Tris ou água.

Após a digestão com KpnI, foi realizada a digestão com HindIII (Promega), seguindo os mesmos procedimentos descritos acima.

Terminadas as digestões e purificações, os produtos de PCR e o vetor pGL3-basic foram submetidos à eletroforese, em gel de agarose na concentração de 1,5% para o vetor e em gel de agarose “Low Melting Point” (Gibco BRS) 3% para os fragmentos obtidos por PCR, para a separação dos fragmentos com tamanho adequado. Em seguida todos foram cortados do gel e purificados.

2.6 EXTRAÇÃO DAS BANDAS DO GEL

As bandas foram extraídas do gel de agarose utilizando-se o kit QIAquick®Spin Kits (Quiagen), de acordo com o protocolo recomendado pelo fabricante.

2.7 REAÇÃO DE LIGAÇÃO DO PRODUTO DE PCR NO VETOR PGL3- BASIC (4.818 BP)

O vetor utilizado em nossos experimentos (pGL3- basic - Promega) possui 4.818 bp, e contém a sequência para a transcrição do gene repórter da *Firefly luciferase*, utilizada para quantificar a atividade transcricional do promotor inserido a montante desse gene. Também contém sequência para o gene de resistência a ampicilina e sítios de reconhecimento para enzimas de restrição. Para a reação de ligação foi utilizada a relação da quantidade de inserto/vetor de 3:1, com a utilização da enzima T4 DNA ligase (Promega). As reações de ligação encontram-se na Tabela C.1, nos anexos, para as reações de controle da ligação utilizamos o vetor pGEM-T Easy (Promega) (3000bp), descrita na Tabela C.2, também em anexos. Para a realização do protocolo utilizamos as recomendações do fabricante.

2.8 TRANSFORMAÇÃO DE BACTÉRIAS XL1-BLUE OU TOP 10

A técnica utilizada para transformação das bactérias *XL1-blue* (Stratagene) ou *Top 10* (Invitrogen) competentes foi a de choque térmico.

A técnica de transformação foi realizada da seguinte forma:

- 100 µL de bactérias *XL1-Blue* ou *Top 10*, já competentes foram adicionados aos tubos de reação no gelo.

- Foram então acrescentados aos tubos 1,7 µl de β-Mercaptoetanol diluído (1:10) sendo incubados no gelo durante 10 minutos e homogeneizados a cada 2.
- Após a incubação, 10 µL da reação de ligação (inserto + vetor) foram adicionados.
- Em seguida, todas as reações foram incubadas no gelo por 30 minutos e agitadas a cada 5.
- Após este período os tubos foram incubados em banho-maria a 42°C por exatamente 45 segundos sendo logo em seguida transferidos para o gelo onde permaneciam por no mínimo 2 minutos (choque-térmico).
- Depois de adicionados 0,9 mL de meio SOC (Bacto-tryptone 20%; Bacto-yeast extract 5%; NaCl 0,5%; KCl 250 mM e 20 mM de glicose) previamente aquecido a 42 °C, as bactérias ficaram incubadas no *shaker* a 37 °C, 225 rpm por 1 hora (para que as bactérias passassem a expressar o gene de resistência a ampicilina).
- Após o período de incubação, as bactérias foram semeadas nas placas de meio LB, permaneceram no fluxo laminar até secar e novamente foram incubadas em estufa a 37 °C por aproximadamente 16 horas.

Para o preparo das placas foi utilizado meio LB (Luria-Bertani): Bacto-yeast extract 5%; Bacto-tryptone 10%; NaCl 10%, acrescido de agar (Select Agar) 15%; e 50 µg/mL de ampicilina.

2.9 OBTENÇÃO DE CÉLULAS COMPETENTES:

- 1º dia: o estoque de *XLI-Blue* (*E. coli*) foi semeado em placa com meio LB sólido sem antibiótico a 37 °C por 16h.
- 2º dia: uma colônia foi isolada e inoculada em meio LB líquido (8 mL) e incubada sob agitação a 37 °C por 16h.
- 3º dia: 0,4 mL deste meio foi inoculado em 40 mL de meio LB e novamente incubado a 37 °C e sob agitação, até obtenção de OD₅₀₀= 0,4-0,6.
- Estas bactérias foram então centrifugadas a 3000 rpm por 10 minutos a 4 °C, sendo incubadas no gelo.
- O sobrenadante foi descartado, foi adicionado 20 mL de CaCl₂ 100 mM gelado, sendo ressuscitado o *pellet* e posteriormente incubadas no gelo com essa solução por 20 minutos.
- Após centrifugação por 5 minutos à 4 °C foi descartado o sobrenadante.

- O *pellet* foi novamente ressuspensionado em 4 mL de CaCl_2 100 mM gelado e adicionado 706 μL de glicerol autoclavado.
- Depois de homogeneizadas, as amostras foram aliqüotadas e guardadas à -20°C .
- No quarto dia os tubos foram submetidos a banho de gelo seco e etanol e depois estocados no freezer à -80°C .

2.10 IDENTIFICAÇÃO DOS VETORES RECOMBINANTES ATRAVÉS DA AMPLIFICAÇÃO DO SEGMENTO CLONADO POR PCR DE COLÔNIAS DE BACTÉRIAS

A confirmação da presença e tamanho dos fragmentos inseridos no vetor foi obtida por PCR a partir dos próprios constructos clonados nas bactérias crescidas nas placas. Para isso parte da colônia era coletada com alça e colocada diretamente no tubo de reação de PCR. Para garantir a integridade da possível colônia positiva, antes de ser adicionada ao tubo de reação, a colônia era semeada em uma placa contendo ampicilina, chamada placa espelho.

Para a reação de PCR de colônia foi utilizado a seguinte reação:

- Tampão da PCR 10X
- 1,5 mM MgCl_2
- 125 μM dNTPs mix (ATP, CTP, GTP e TTP)
- Taq DNA polimerase comum (5 U)
- Volume final completado com H_2O para 15 μL .

Os primers utilizados nesta reação foram aqueles sugeridos no manual do vetor pGL3-basic para sequenciamento de fragmentos inseridos:

- Sense: RVprimer 3 (0,166 pmol/ μL) - 5' CTAGCAAATAGGCTGTCCC 3'
- Anti-sense: GLprimer 2 (0,166 pmol/ μL) - 5' CTTTATGTTTTTGGCGTCTTCCA 3'

As condições da PCR foram as seguintes:

94 $^\circ\text{C}$ - 4 minutos	} 30 ciclos
95 $^\circ\text{C}$ - 45 segundos	
50 $^\circ\text{C}$ - 45 segundos	
72 $^\circ\text{C}$ - 1 minuto	
72 $^\circ\text{C}$ - 5 minutos	
4 $^\circ\text{C}$ - ∞	

Os produtos das PCR obtidos foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida 8% para análise dos tamanhos dos fragmentos.

2.11 PURIFICAÇÃO DE PLASMÍDEOS RECOMBINANTES (MAXI-PREP)

Após a confirmação da inserção dos fragmentos desejados, estes foram purificados através de maxi-preparações.

Para isto, uma colônia foi inoculada em 250 mL de meio LB (luria-bertani) com 100 mg/mL de ampicilina, sob agitação de 250 rpm a 37 °C, até a obtenção de uma densidade óptica- OD₅₆₀= 0,7-0,9.

- Depois centrifugado por 15 minutos a 3000 rpm e descartado o sobrenadante.
- O *pellet* foi ressuscitado em 20 mL de GTE Buffer (50 mM glucose; 25 mM Tris-Cl; 10 mM EDTA, pH8), homogenizado, a ele foi adicionado uma ponta de espátula de lisozima em pó (Sigma) para a lise da parede bacteriana, e depois misturado por inversão.
- Foi adicionado 20 mL de solução de lise NaOH/SDS (0.2 M NaOH, 1% SDS) e incubado por 3 minutos à temperatura ambiente.
- Posteriormente adicionado 15 mL de solução de acetato de potássio 5M (pH 4,8) e homogenizado por inversão.
- A amostra foi centrifugado a 11.000 rpm por 15 minutos à 4 °C e o sobrenadante foi filtrado e coletado em um tubo limpo.
- Após a filtração foi adicionado 30 mL de isopropanol 100% gelado e incubado no gelo por 10 minutos.
- E realizado uma nova centrifugação a 11.000 rpm por 15 minutos à 4 °C.
- Então o *pellet* foi dissolvido em 5 mL de TE buffer 1X (10mM Tris-Cl; 1mM EDTA, pH 7.5), adicionado 5 mL de LiCl 5M e incubado no gelo por 10 minutos.
- Após este período foi centrifugado a 11.000 rpm por 15 minutos à 4 °C.
- O sobrenadante foi colocado em um tubo limpo, foi adicionado 10 mL de isopropanol gelado e incubado no gelo por 10 minutos.
- Sendo novamente centrifugado a 11.000 rpm por 15 min à 4 °C e o sobrenadante descartado.
- O *pellet* que se formou no tubo foi ressuscitado em 1 mL de TE buffer 1X, sendo adicionado 15 µL de RNase, homogeneizado e incubado à 37 °C por 17h.
- Depois deste período foi adicionado 300 µL de fenol:clorofórmio:álcool isoamil (25:24:1), agitado por 30 segundos e centrifugado a 11.000 rpm por 5 minutos a temperatura ambiente.

- O sobrenadante foi transferido para um tubo limpo, adicionado 50 μ L de acetato de amônio 7,5 M e 1 mL de etanol 100% gelado e incubados no gelo por 10 minutos.
- E realizado uma última centrifugação a 11.000 rpm por 5 minutos a temperatura ambiente.
- O sobrenadante foi descartado e o *pellet* de DNA ressuspensionado em 300 a 500 μ L de TE buffer 1X.

2.12 SEQUENCIAMENTO DOS VETORES RECOMBINANTES

Para a confirmação das sequências dos fragmentos inseridos nos plasmídeos recombinantes e a inserção das mutações sítios dirigidas, os constructos purificados foram quantificados e sequenciados em ambas as direções. À reação de sequenciamento foram adicionados:

- Tampão de sequenciamento 2,5X (TrisHCl 1M, pH 9,0 e MgCl₂).
- 100-500 ng do DNA a ser sequenciado.
- Reagente de Big Dye (Kit DNA sequencing kit - Big Dye Terminator Cycle sequencing Ready Reaction - Applied Biosystems).
- Primer RVprimer 3 (2 pmol/ μ L) que foi adicionado em um tubo (primer sense).
- Primer GLprimer 2 (2 pmol/ μ L) sendo adicionado em tubo diferente (primer antisense) ambos para o vetor pGL3-basic.

A reação foi realizada no termociclador utilizando as seguintes condições:

95 °C- 5 minutos

95 °C- 30 segundos	}	30 ciclos
50 °C- 10 segundos		
60 °C- 4 minutos		

4 °C - ∞

Para a purificação das amostras seguimos o seguinte protocolo:

- Foi adicionado 80 μ L de isopropanol (75%) na reação descrita acima, homogeneizadas e incubadas em temperatura ambiente por no mínimo 20 minutos.
- Após este período foi centrifugada a 13.000 rpm por 25 minutos.
- Então o sobrenadante (isopropanol) foi retirado por inversão, e adicionado 250 μ L de etanol (70%).
- E centrifugada novamente por 5 minutos a 13.000 rpm e o etanol removido por inversão.

- Após a retirada do etanol a amostra foi seca no Speed Vac (Eppendorf).
- Os *pellets* secos foram ressuspensos em 25 µL de TSR (Template Suppression Reagent-Applied Biosystems), homogeneizados e levemente centrifugados.
- Incubados à 95 °C por 5 minutos, para desnaturação das duplas fitas e imediatamente transferida para o gelo por 2 minutos.
- Ao terminar a etapa de purificação a amostra foi transferida para tubos próprios de sequenciamento e analisada no sequenciador automático ABI Prism™ 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

As seqüências obtidas foram comparadas com as seqüências presentes no banco de dados GenBank, utilizando o programa BLAST.

2.13 QUANTIFICAÇÃO DOS PLASMÍDEOS RECOMBINANTES PARA TRANSFEÇÃO

Antes da utilização dos plasmídeos recombinantes para reações de transfecção em células OKP estes foram cuidadosamente quantificados. Inicialmente foram digeridos com enzima de restrição em um único sítio, para que fossem linearizados. Em seguida, foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1% junto com um marcador de peso molecular e massa (“Low DNA Mass Ladder”, Invitrogen). O gel foi corado com SYBR-Green (Molecular Probes) e visualizado no Analisador de Imagens – Eagle Eye II. A imagem do gel, digitalizada, foi analisada com o programa Image Quant 5.0, sendo feita a densitometria das bandas dos plasmídeos em triplicata em relação às bandas do marcador.

2.14 CULTURA DE CÉLULAS

As células utilizadas para a análise do gene repórter da luciferase foram as OKP, uma linhagem celular de túbulo proximal de *Opossum*. Estas foram:

- Cultivadas em garrafas de 75 cm² contendo meio DMEM e 10% de soro fetal bovino, 1 mM aminoácidos essenciais, 1 mM de piruvato de sódio, 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina.
- Incubadas em atmosfera de 5% de PCO₂ a 37 °C.
- Para os subcultivos as células foram lavadas com PBS (137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM Na₂HPO₄; 2 mM KH₂PO₄) e desprendidas da garrafa com tripsina/EDTA 0.25%.

- E logo em seguida transferidas para placas de 24-poços, onde foram mantidas em meio com soro até atingir 70-80% de confluência, condição utilizada para o início das transfecções.

2.15 ANÁLISE DO GENE REPÓRTER DA LUCIFERASE

Para análise da atividade da região promotora foi utilizada a quantificação da proteína luciferase. Como descrito anteriormente, a região promotora foi inserida a montante do gene repórter da luciferase presente no vetor, controlando a taxa de transcrição e tradução deste gene e a proteína era quantificada pela luminescência emitida quando adicionado o substrato da enzima luciferase, a luciferina. Os fragmentos com mutações nos possíveis sítios de reconhecimento (Egr-1, Sp1 e Ap2), ainda não foram transfectados, apenas os fragmentos que foram realizados as deleções.

Para isso os plasmídeos recombinantes foram inicialmente transfectados nas células OKP, seguindo as recomendações do fabricante adaptado para o modelo celular utilizado. Foi realizado o seguinte protocolo:

- A um tubo foram adicionados 25 µL de meio DMEM sem soro fetal bovino.
- E 400 ng do vetor pGL3-promotor NHE3 mais 4 ng do vetor pRL-CMV que contém o gene da *Renilla luciferase*, usado como controle interno de transfecção.
- Neste mesmo tubo foi adicionado 1 µL de Plus Reagent (Invitrogen).
- Os tubos foram então agitados e incubados a temperatura ambiente por 15 minutos
- Em outro tubo foram adicionados 25 µL de meio DMEM sem soro fetal bovino e 1,5 µL de Lipofectamina (Invitrogen) (reagente utilizado para facilitar a entrada do plasmídeo recombinante nas células) sendo então incubados por 15 minutos
- Após este período, o conteúdo do tubo com vetor recombinante foi misturado ao tubo com lipofectamina e meio.
- Foram então homogeneizados e incubados por 45 minutos em temperatura ambiente.
- Enquanto isso, o meio de cultura das placas foi trocado por 200 µL de meio DMEM sem soro fetal bovino.
- Nos tubos que continham os complexos foram adicionados 200 µL de meio DMEM sem soro fetal bovino, estes foram homogeneizados e transferidos para a placa com as células e deixados por 4 horas na estufa a 37 °C

- Depois o meio de transfecção foi removido e ao poço foi adicionado 500 μ L de meio DMEM sem soro fetal bovino e permaneciam então por mais 24h em atmosfera de 5% de PCO₂ a 37 °C
- No dia seguinte as células foram lavadas com PBS.
- E logo em seguida lisadas com "*Passive Lysis Buffer*" (reagente de lise do kit Dual Luciferase Repórter Assay System – Promega).
- E posteriormente incubadas sob agitação vigorosa durante 20 minutos.
- O lisado foi armazenado no freezer à –80 °C para posterior ensaio de luciferase.

A atividade promotora de transcrição dos fragmentos de DNA foi avaliada pela atividade da enzima *Firefly luciferase* presente no lisado celular, ao adicionar o substrato da *Firefly luciferase*, a luciferina, que gera um sinal luminescente que foi medido no luminômetro LMAX (Molecular Dynamics). Para os ensaios seguimos o protocolo do kit Dual Luciferase Reporter Assay System (Promega), descrito a seguir:

- Foi adicionado 10 μ L de cada amostra (lisado celular)
- A ela foram adicionados 50 μ L do Luciferase Assay Reagent (LAR), que contém o substrato da luciferase, a luciferina, gerando um sinal luminescente.
- Após 10 segundos de incubação já dentro do equipamento, a intensidade de luz emitida foi captada pelo luminômetro.
- Após a leitura o equipamento injetava 50 μ L do Stop&Glo (reagente que contém o substrato da *Renilla Luciferase*, cujo substrato é a coelenterazina) e a intensidade de luz emitida era captada também após 10 segundos.

A atividade do promotor (região relutatória clonada) foi determinada pela razão (Firefly/Renilla) dividida pela média das razões (Firefly/ Renilla) obtidas com a transfecção do vetor não recombinante (pGL3-basic).

Para a análise da eficiência de transfecção foi utilizado o vetor pEYFP (Clontech) vazio, que contém uma proteína de fusão EYFP (uma proteína de fluorescência amarela). Durante a padronização do experimento foram testadas várias proporções DNA:lipofectamina. A fluorescência obtida foi analisada em microscópio confocal. A maior eficiência de transfecção obtida foi com a proporção de (400:1,5), onde 30% das células foram transfectadas.

2.16 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A significância estatística (P-value) foi calculada com teste *t*, utilizando o software Graph Prism version 4.0.

O nível de significância estabelecido foi de $p < 0,05$.

3 RESULTADOS

3.1 FRAGMENTOS DO PROMOTOR NHE3, ORIGINAIS E MUTADOS, PREPARADOS PARA A INSERÇÃO EM PGL3-BASIC

Em estudos preliminares de nosso laboratório, utilizando amplificação por PCR, obtivemos um segmento de DNA correspondente a 2.095 pb da região flanqueadora 5' e 55 pb do primeiro exon do gene NHE3 (fragmento -2.095 /+55). Esse segmento foi clonado em pGL3-basic, de modo a fazer com que passasse a funcionar como promotor do gene *Firefly luciferase* inserido neste vetor. Quantificando a luciferase produzida em células de túbulos proximais de opossum, OKP, transfectadas com o vetor recombinante, foi possível verificar que essa região reguladora ativava a produção de luciferase a níveis aproximadamente 25 vezes maiores que os níveis observados após a transfecção do vetor vazio. Utilizando enzimas de restrição específicas, fizemos deleções sucessivas nesse segmento de modo a obter os seguintes fragmentos: -1.196/+55, -889/+55, -889/+55 -467/+55, -152/+55 e -140/+55. A atividade promotora desses fragmentos da região 5'FS foram também avaliadas após transfecção de células OKP com os respectivos vetores recombinantes. Observamos que o segmento de maior atividade era o segmento -152/+55. Para identificar com mais precisão os elementos reguladores presentes na região promotora proximal do gene NHE3, desenhamos iniciadores para PCR que nos permitissem obter fragmentos menores do promotor proximal, de modo a identificar o segmento mínimo necessário para ativar a transcrição de NHE3. Não era mais possível usar enzimas de restrição porque não havia mais enzimas que clivassem o fragmento, mas não o vetor. Ao desenhar os iniciadores para PCR, para adequar a compatibilidade dos iniciadores “forward” e “reverse” desenhamos um primer dentro do primeiro exon que permitia a inclusão de 31 nucleotídeos do primeiro exon, ao invés de 55. Como pretendíamos analisar o promotor propriamente dito, ou seja, a região de 100 a 200 pares de base acima do sítio de início de transcrição, além dos primeiros nucleotídeos do exon 1, amplificamos por PCR, a partir do clone anterior, o segmento -157/+31, incluindo os 31 pares de base iniciais do primeiro exon no qual está presente um elemento regulatório ao qual se liga o fator de transcrição GATA. Na PCR realizada para a amplificação do referido fragmento (-157/+31) e na PCR realizada para deletar o elemento GATA, obtivemos o resultado apresentado na figura 3.

Figura 3 - PCR realizada para amplificar os segmentos da região flanqueadora 5' do gene NHE3 de rato.
 1. segmento -157/+31; 2. segmento sem o elemento GATA (-157/+35) e 3. marcador de peso molecular 25 pb DNA *ladder*.

Na figura 4, apresentamos o resultado da PCR realizada para a obtenção dos segmentos -61/+31 e -85/+31. Esses fragmentos têm 96 pb e 116 pb respectivamente.

Figura 4 - PCR realizada para amplificar os segmentos da região flanqueadora 5' do gene NHE3 de rato.
 1. segmento -65/+31; 2. segmento -85/+31 e 3. marcador de peso molecular 25 pb DNA *ladder*.

Os fragmentos -44/+31, -33/+31 e -25/+31 foram obtidos pelo pareamento de oligonucleotídeos sintetizados "*in vitro*". Estes foram posteriormente analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida. A figura 5 representa o fragmento -44/+31 e a figura 6, os fragmentos -33/+31 e -25/+31.

Figura 5 - Pareamento dos oligonucleotídeos para obtenção do segmento da região flanqueadora 5' do gene NHE3 de rato. 1. segmento -44/+31 e 2. marcador de peso molecular 25 pb DNA ladder.

Figura 6 - Pareamento dos oligonucleotídeos para obtenção dos segmentos da região flanqueadora 5' do gene NHE3 de rato. 1. marcador de peso molecular 25 pb DNA ladder; 2. -25/+31 e 3. -33/+31.

A figura 7 representa um fragmento com mutações nos possíveis sítios de ligação para os fatores de transcrição Egr1/Sp1 (-80/+31) e outro com duas mutações pontuais no sítio para Sp1 e no sítio de Ap2 (-60/+31).

Figura 7 - PCR realizada para amplificar os segmentos da região promotora de NHE3 de rato, com Inserção de mutações pontuais nos possíveis sítios de ligação. 1. segmento com mutação na sobreposição dos elementos Egr1/Sp1 (-80/+31); **2.** segmento com 2 mutações pontuais, uma no elemento Sp1 outra em Ap2 (-60/+31) e **3.** marcador de peso molecular 25 pb DNA *ladder*.

A figura 8 representa um gel de eletroforese do produto de PCR de colônia realizado para a detecção do inserto no plasmídeo. Quando não ocorre a inserção do fragmento, observamos a amplificação de apenas de um segmento do vetor vazio, correspondente a um fragmento com 120 bp (amplificados pelo RV primer e GL primer). Quando ocorre a ligação do inserto no vetor, o fragmento amplificado corresponde a um segmento do vetor mais o segmento clonado. No exemplo, o fragmento sem o elemento GATA (300bp). A PCR de colônia foi realizada em colônias de todas as placas obtidas após transformação das bactérias, já que o plasmídeo pGL3-basic não permite seleção de plasmídeos recombinantes pela alfa-complementação da enzima β -galactosidase.

Figura 8 - PCR de colônia para confirmação da presença do inserto no plasmídeo. 1. segmento do vetor vazio, correspondendo um fragmento com 120bp; 2. fragmento sem elemento GATA clonado mais o segmento do vetor (300 bp) e 3. marcador de peso molecular 25 pb DNA *ladder*.

Depois de realizada as PCR de colônias, as colônias com plasmídeo recombinante foram incubados em meio líquido; o plasmídeo foi purificado e as amostras foram sequenciadas. O resultado do sequenciamento foi comparado com as seqüências presentes no banco de dados (Genbank) através do programa BLAST. Assim, foi possível verificar facilmente a identidade entre os fragmentos em questão e a seqüência do promotor NHE3.

As seqüências obtidas através do sequenciamento, encontram-se no ANEXO D e os eletroferogramas correspondentes na Figura A.1 também em anexo.

Depois de analisados os plasmídeos recombinantes, estes foram linearizados com a enzima HindIII (Promega), para a qual existe apenas um sítio de reconhecimento no vetor, e em seguida estas amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1%, juntamente com um marcador de peso molecular e massa (“Low DNA Mass Ladder”, Invitrogen). O gel foi corado com SYBR-Green (Molecular Probes) e da imagem obtida no Analisador de Imagens foi feita a densitometria com o uso do programa Image Quant 5.0, para comparação da intensidade das bandas correspondentes às amostras e ao marcador (Figura 9).

Figura 9 - Quantificação dos plasmídeos recombinantes em triplicata. 1. marcador de peso molecular e massa “Low DNA Mass Ladder”; 2-4: pGL3-basic (vetor vazio); 5-7: -152/+55; 8-10: -157/+31; 11- 13: fragmento sem o elemento GATA; 14-16: -44/+31; 17-19: -85/+31; 20-22: -65/+31; 23-25: -33/+31 e 26-28: -25/+31.

Tendo sido feita essa quantificação (após a quantificação por espectrofotometria) para nos certificarmos da quantidade que estava sendo transfectada, realizamos a transfecção de células OKP para a análise da atividade promotora dos diferentes segmentos.

3.2 ANÁLISE DA ATIVIDADE PROMOTORA DOS DEFERENTES SEGMENTOS

Para análise da atividade promotora dos segmentos foram obtidos valores de luminescência do lisado de células OKP transfectadas com os segmentos. Os valores representam a atividade da região regulatória clonada, sendo expressos como atividade relativa Firefly/Renilla Luciferase, são as médias das duplicatas de leitura divididos pelo valor de pGL3-basic. Os valores obtidos para os segmentos -152/+55 e -157/+31 estão representados na tabela 1, e as médias e erro padrão correspondente na tabela 2 e apresentados no gráfico 1.

Tabela 1 - Valores da luminescência obtida da dosagem de Luciferase de lisado de células OKP transfectadas com os segmentos -152/+55 e -157/+31. Os valores representam a atividade relativa Firefly/Renilla Luciferase e são as médias das duplicatas de leitura divididos pelo valor de pGL3-basic.

Basic	-152/+55	-157/+31
1,401	115,27	88,47
1,580	71,22	39,94
2,050	110,39	44,29
1,168	130,73	62,58
1,331	97,98	78,67
1,175	91,50	98,08
1,030	58,19	20,05
1,270	7,85	16,79
1,120	5,57	26,22

Tabela 2 - Média e Erro Padrão das amostras basic (vetor pGL3-basic vazio), segmento -152/+55 e -157/+31

	Basic	-152/+55	-157/+31
Média	1.347	76.52	52.79
Erro Padrão	0.1035	15.09	10.14
n	9	9	9

Gráfico 1 - Atividade dos segmentos promotor-NHE3 de rato clonados em pGL3-basic, avaliada pela Atividade de Firefly luciferase em relação à atividade de Renilla luciferase, normalizada para a atividade observada com o vetor sem promotor (pGL3-basic). Analisados através de *teste t* (n=9). (#) estatisticamente diferente em relação ao pGL3-basic.

Podemos observar que o segmento -152/+55 foi mais ativo que o segmento -157/+31 (76.52 ± 15.09 vs 52.79 ± 10.14) estatisticamente não significativo, a deleção desta região retirou um possível sítio de reconhecimento do fator de transcrição Ap1/CREB. O segmento -157/+31 serviu então como base para as deleções sucessivas na extremidade 5' próxima ao sítio de início de transcrição que realizamos em seguida.

Os valores obtidos pela luminescência da dosagem de Luciferase de lisado de células OKP transfectadas com as deleções realizadas na região flanqueadora 5' do gene NHE3 de rato, estão presentes na tabela 3, médias e erro padrão na tabela 4 e o gráfico 2 corresponde a estes valores.

Tabela 3 - Valores da luminescência obtida da dosagem de Luciferase de lisado de células OKP transfectadas com os segmentos com deleções na região flanqueadora 5' do gene NHE3 de rato. Os valores representam Firefly/Renilla Luciferase e são as médias das duplicatas de leitura divididos pelo valor de pGL3-basic.

Basic	-157/+31	-85/+31	-65/+31	-44/+31	-33/+31	-25/+31
1,401	88,47	25,60	11,26	101,89	7,53	2,794
1,580	39,94	77,47	7,07	65,30	6,45	4,281
2,050	44,29	111,18	11,96	32,25	5,92	4,240
1,168	62,58	20,99	6,91	13,33	5,78	2,554
1,331	78,67	37,69	16,79	61,84	11,42	5,890
1,175	98,08	37,96	19,09	65,57	3,70	3,006
1,030	20,05	6,65	3,12	32,08	3,83	
1,270	16,79	5,62	14,73	57,38	6,06	
1,120	26,22	24,45	3,15	34,94	9,53	

Tabela 4 - Média e Erro Padrão dos dados obtidos com a luminescência dos segmentos em que foram realizadas as deleções na região flanqueadora 5' do gene NHE3 de rato.

	Basic	-157/+31	-85/+31	-65/+31	-44/+31	-33/+31	-25/+31
Média	1.347	52.79	38.62	10.45	51.62	6.691	3.794
Erro Padrão	0.1035	10.14	11.53	1.926	8.778	0.8345	0.5160
n	9	9	9	9	9	9	6

Atividade relativa Firefly/Renilla Luciferase

Gráfico 2 - Análise das atividades das deleções da região 5' do promotor-NHE3 de rato clonados em pGL3-basic, avaliada pela atividade de Firefly luciferase em relação à atividade de Renilla luciferase, normalizada para a atividade observada com o vetor sem promotor (pGL3- basic). Analisados através de *teste t*. Fragmento -25/+31 (n=6), para os demais fragmentos n=9. (∅) Estatisticamente diferente em relação à -157/+31, (*) estatisticamente diferente quando comparado entre os fragmentos e (#) estatisticamente diferente em relação ao pGL3-basic.

No gráfico 2, observamos que todos os fragmentos apresentaram diferença estatística em relação ao pGL3- basic (vetor vazio).

Ao analisar a atividade entre os segmentos, observamos que ocorreu uma redução na atividade do fragmento -85 quando comparado com -157 (52.79 ± 10.14 vs 38.62 ± 11.53), estatisticamente não significante da atividade transcricional desta região. Nesta região encontram-se possíveis sítios de reconhecimento para fatores como NF-Y e Sp1.

A retirada dos nucleotídeos entre -85 vs -65 (38.62 ± 11.53 vs 10.45 ± 1.926); -44 vs -33 (51.62 ± 8.778 vs 6.691 ± 0.8345) e -33 vs -25 (6.691 ± 0.8345 vs 3.794 ± 0.5160) reduziu estatisticamente significativa a atividade do promotor, sugerindo a presença de possíveis sítios de reconhecimento para fatores de transcrição estimulatórios para a transcrição deste gene. Entre a região de -85 a -65 existe um possível sítio de reconhecimento para os fatores de transcrição Egr-1 e Sp1, que se sobrepõe; entre as bases de -44 a -33 existem dois sítios de ligação para o fator Egr-1 e entre as bases -33 e -25 existe o elemento TATA-box não consensual.

A deleção da região compreendida entre as bases -65/+31 vs -44/+31, resultou em aumento significativo da atividade do promotor entre estes dois segmentos, e indica possível sítio de reconhecimento para fatores de transcrição que influenciam de maneira inibitória a transcrição do gene em questão, nesta região que retiramos observa-se possíveis sítios de reconhecimento para os fatores Sp1 e Ap2.

O menor segmento de -25/+31, apresentou atividade promotora estatisticamente significativa, quando comparada com o vetor vazio. O que sugere que neste segmento ainda estão presentes elementos essenciais para a montagem do complexo transcricional primário, com eficiência diminuída.

Quando comparado o fragmento de -157/+31 com todos os fragmentos que realizamos as deleções na região 5' flanqueadora, observamos que não houve diferença estatística em relação ao fragmento de -85/+31 e -44/+31, mas observamos diferença significativa quando comparado com os fragmentos de -65/+81, -33/+31 e -25/+31.

Na região do primeiro exon de NHE3 de rato existe um sítio de reconhecimento para o elemento GATA (+20 a +23). Tendo em vista que esta região foi essencial no estudo com células intestinais (CaCo-2), surgiu o interesse em investigar a atividade deste em células de túbulos proximais renais. Com base nos dados obtidos pela luminescência da mesma maneira citada acima, os dados são demonstrados na tabela 5, as médias e os erro padrão na tabela 6 e gráfico 3, corresponde a estes valores.

Tabela 5 - Valores da luminescência obtida da dosagem de Luciferase de lisado de células OKP transfectadas com os segmentos -157/+31 e o segmento sem o elemento GATA (-157/+35). Os valores representam Firefly/Renilla Luciferase e são as médias das duplicatas de leitura divididos pelo valor de pGL3-basic.

Basic	-157/+31	Sem GATA (-157/+35)
1,401	88,47	69,42
1,580	39,94	79,37
2,050	44,29	71,11
1,168	62,58	84,04
1,331	78,67	52,05
1,175	98,08	63,57
1,030	20,05	7,34
1,270	16,79	18,63
1,120	26,22	14,78

Tabela 6 - Média e Erro Padrão dos dados obtidos com a luminescência dos segmentos -157/+31 e -157/+35 (sem o elemento GATA).

	Basic	-157/+31	sem GATA
Média	1.347	52.79	51.15
Erro Padrão	0.1035	10.14	9.906
n	9	9	9

Gráfico 3 - Atividade do fragmento com deleção no elemento GATA na posição +20/+23 do promotor-NHE3 de rato clonados em pGL3, avaliada pela atividade de Firefly luciferase em relação à atividade de Renilla luciferase, normalizada para a atividade observada com o vetor sem promotor (pGL3-basic) (n=9). (#) estatisticamente diferente em relação ao pGL3-basic.

Em nosso estudo podemos observar que o elemento GATA na posição +20 a +23 no primeiro exon, parece não ser importante para a atividade transcricional do promotor, pois a deleção deste elemento não alterou a atividade deste, quando comparado com o fragmento -157/+31 que contém o elemento.

4 DISCUSSÃO

A região flanqueadora 5' (5'FS) do gene NHE3 de rato teve primeiramente analisada sua capacidade de ativar a transcrição de um gene repórter em trabalho realizado por Cano em 1996. Nesse trabalho foram avaliados 2.064 pb da região 5' FS. Como essa autora havia mapeado o sítio de início de transcrição 31 pb acima daquele confirmado posteriormente em outros laboratórios, a região 5' FS analisada correspondia na verdade a 2.095 pares de bases. Estavam também incluídos 55 pb do primeiro exon. Nesse trabalho não foi realizada a quantificação relativa da atividade promotora desse segmento em relação ao vetor vazio, mas foi demonstrado aumento de quase 3 vezes em sua atividade na presença de dexametasona, mostrando que receptores para glicocorticóides ativam a transcrição do gene NHE3. Essa mesma autora mostrou que o hormônio tireoideano T3 aumenta em 2 vezes a atividade promotora dessa região (CANO, 1999). Nesses trabalhos, a atividade promotora foi avaliada pela expressão do gene repórter cloranfenicol acetiltransferase (CAT).

Também em 1996, Kandasamy e Orłowski avaliaram também a região reguladora da transcrição de NHE3, quando clonaram em vetor contendo o gene repórter Firefly luciferase o segmento -1.380/+59. A posição +55 é um sítio de restrição para a enzima Kpn I. Esses autores também observaram aumento da atividade (15 vezes de aumento), na presença de dexametasona. Esta região regulatória apresenta sítios de reconhecimento para vários fatores de transcrição como Ap2, OCT-1/OTF-1, Sp1, NF-Y, Egr-1 e receptores para glicocorticóides e hormônio tireoideano (KANDASAMY e ORLOWSKY, 1996).

Posteriormente, em nosso laboratório, foi observado que a atividade promotora de transcrição do segmento (-2.095/+55), na ausência de estímulo com dexametasona ou hormônio tireoideano, era 25 vezes maior que a observada com o vetor vazio (pGL3-basic). Nessa ocasião, por haver incerteza em relação ao sítio de início de transcrição, foi clonado também o segmento -2095/-17 e avaliada sua capacidade de ativar a transcrição. A atividade desse segmento não difere daquela do vetor vazio, sem promotor para o gene da *Firefly luciferase*. Assim, essa região extensa, sem as seqüências vizinhas ao sítio de início de transcrição, não é capaz de promover a montagem do complexo transcricional primário, e, portanto, não induz transcrição. Isso não constitui uma surpresa, mas esses experimentos serviram para mostrar que o mapeamento do sítio de início de transcrição feito por Cano estava realmente equivocado.

Foi dado segmento aos estudos em nosso laboratório e foi observado, como referido anteriormente, que dos segmentos analisados quanto à sua capacidade de promover transcrição do gene repórter, -2.095/+55, -1.196/+55, -889/+55, -467/+55, -152/+55 e -140/+55, o segmento -152/+55 tinha maior atividade (REBOUÇAS et al., 2006). Essa atividade era aproximadamente 75 vezes superior à observada com pGL3-basic.

Em resultados publicados em 2003, Kiela e colaboradores, analisaram a atividade de diferentes segmentos da região reguladora do gene NHE3 de rato em células de cólon (Caco2): -1.360/+58, -1.194/+58, -715/+58, -450/+58, -420/+58, -320/+58, -118/+58, -81/+58, -35/+58 e -20/+58. Esses autores não observaram diferenças significativas entre as atividades dos segmentos -1.360 a -81, que variavam de 17 a 27 vezes o superior ao valor basal de luciferase. A atividade era bem menor com os segmentos -35 e -20 (KIELA et al., 2003). Como referido na apresentação dos resultados, o segmento -157/+31, no qual não foram incluídos 24 pb do primeiro exon e foram acrescentados 5 nucleotídeos da 5' FS em relação ao segmento previamente analisado -152/+55, não apresentou atividade significativamente diferente deste último. Analisando a sequência com o programa Matinspector (Genomatix), é possível identificar no segmento de 24 pb do primeiro exon, não incluído, um sítio consensual para a ligação do fator de transcrição Ap1/CREB (proteína de ativação-1/elemento responsivo a AMPc) e outro para o fator de transcrição Pax3. Como não houve diferença significativa entre as atividades dos segmentos -152/+55 e -157/+31, podemos concluir que esses elementos não participam como significativos determinantes da montagem ou da estabilidade do complexo transcricional no promotor do gene NHE3, pelo menos nas condições analisadas nesse estudo.

O segmento -85/+31 também não mostrou atividade significativamente diferente daquela do segmento -157/+31. Utilizando o programa Matinspector para a análise da região removida (-157 a -86), é possível observar elementos consensuais para 5 fatores de transcrição (CP2, PAX9, E2F, Nur (um monômero da família de receptores nucleares: nur77, nurrl e norl) e Oct-1). O fato de se observar os elementos não significa que sejam sítios reais de ligação de fatores de transcrição. Como não observamos diferença significativa na atividade dos dois segmentos do promotor em células OKP, é possível que esses elementos não estejam contribuindo para a atividade transcricional nas condições do nosso estudo. Como Kiela e colaboradores, 2003, também não observaram diferença significativa de atividade entre os segmentos -118/+58 e -81/+58 em células intestinais (CaCo2), quando foram removidos os elementos para ligação de Nur e Oct-1, é possível que esses elementos também

não participem da regulação da atividade do promotor NHE3 também em células Caco2 (KIELA et al., 2003).

A retirada dos nucleotídeos entre as posições -85 a -65 resultou em redução significativa da atividade do promotor, evidenciando que os sítios removidos sejam realmente reconhecidos por fatores de transcrição e que esses fatores são essenciais na modulação positiva da atividade transcricional do promotor do gene em células de túbulos proximais.

No segmento -85 a -65 são observados possíveis sítios de reconhecimento para Egr-1/Sp1. Malakooti, et al., em 2006, analisando o promotor do gene NHE3 humano, em célula intestinal (C2BBel), observaram que a atividade do promotor é fortemente influenciada pela ligação de Sp1 e Sp3 na região -89 a -67 (que no rato, corresponde -80 a -58). Nesta mesma região encontra-se superponível um sítio de reconhecimento para EGR1 (early growth response gene product 1). Malakooti e colaboradores observaram que, pelo menos em células intestinais, EGR1 compete com os fatores de transcrição Sp1/Sp3. Em condições basais, os fatores de transcrição Sp1/Sp3 interagem com esta região, mas a adição de PMA (forbol 12-miristato -13 acetato) induz a ligação do fator de transcrição Egr-1 neste mesmo sítio aumentando significativamente a atividade do promotor (MALAKOOTI et al., 2006). Analisando o promotor do gene NHE3 de rato, Kiela e colaboradores (2003) também relataram um sítio de ligação para proteínas Sp (-72 a -69), além de sítio para proteína AP4 (-78 a -75). Em ensaios de "gel shift" (mudança de mobilidade eletroforética), Kiela (2003) observou que o sítio Sp na posição -72/-69 (denominado pelos autores SpA) tem baixa afinidade pelos fatores transcrição Sp.

Prosseguindo com nossas deleções, observamos que com a remoção dos pares de bases compreendidos entre as posições -65 a -44, região na qual estão presentes um possível sítio de ligação para Sp (SpB), um para Ap2 e o início de outro sítio Sp (SPC), houve aumento significativo da atividade do promotor, sugerindo que esses elementos, na ausência de fatores regulatórios presentes nos 20 nucleotídeos à montante, possam ser inibitórios para a transcrição do gene de NHE3 em células de túbulos proximais renais. Malakooti et al., 2002, realizaram um estudo com região promotora de NHE3 de humano em células intestinais (C2BBel), no qual removeram os sítios de ligação para Sp1 e Ap 2 (-67 a -56), através de deleção interna no fragmento de -1004/+131, removendo 144 nucleotídeos (região de -187 a -43, onde localizam-se os sítios de reconhecimento para estes fatores), observaram uma redução de 75% em sua atividade quando comparado ao fragmento que apresentava esta região. E quando removida a sequência a montante da posição -43, resultando num fragmento de -43/+131, a atividade caiu ao nível basal observado com vetor pGL3-basic (MALAKOOTI

et al., 2002). Estes resultados em estão desacordo com o que observamos com o segmento -44/+31.

Em um estudo realizado por Su et al., em 2008, usando os mesmos constructos utilizado por Kiela em 2003, com mutações nos sítios de transcrição para Sp observou que o sítio entre -58 e -55 (SpB) tem maior afinidade pelos fatores Sp1/Sp3 que o sítio SpA (SU et al., 2008).

A família dos fatores de transcrição Sp contém 3 motivos *zinc fingers* para ligação ao DNA, no domínio C-terminal (SUSKE, 1999). O fator de transcrição Egr-1 que compete com o sítio de ligação para Sp1 também apresenta o mesmo motivo de ligação, *zinc finger*. Este motivo apresenta um ou mais átomos de zinco como componente estrutural, que interage com os resíduos de Cisteína (Cys) e Histidina (His), este é essencial para a integridade do domínio de ligação ao DNA. Essas proteínas formam dímeros e cada dedo interage com os grupos químicos presentes na *major groove* da α hélice em cada fita do DNA; essa dupla interação aumenta a especificidade desse processo de reconhecimento molecular (ALBERTS et al., 2004).

A família do fator de transcrição Ap2, é composta por 5 diferentes proteínas em humanos e camundongos, que apresentam o motivo de ligação *helix-span-helix* no domínio carboxi terminal, sendo uma região altamente conservada entre todas as proteínas Ap2, e uma região central menos conservada rica em prolina e tirosina, domínio PY. As proteínas podem formar homo ou heterodímeros. Estudos *in vitro* demonstraram que Ap2 pode se ligar em a regiões ricas em CG, com afinidade variável, e são fatores relacionados tanto com ativação como com repressão da atividade de transcrição (ECKERT et al., 2005; ZHAO et al., 2001).

Na região compreendida entre -44 e -33 estão presentes dois possíveis sítios de ligação para Egr-1 que parecem ser relevantes para a regulação positiva da transcrição do gene de NHE3 de rato, pois a remoção dos mesmos reduziu significativamente a atividade do promotor, de 51,6 para 6,7 vezes o valor basal. De acordo com nossas observações, na região promotora propriamente dita, estes elementos são os mais importantes para o aumento da eficiência da montagem do complexo transcricional primário e para o sinal de início de transcrição. Sequências de nucleotídeos à montante também são importantes, visto que a remoção de parte delas pode realmente desestabilizar o sistema, reduzindo muito a eficiência do mesmo, como observado quando removemos os 20 pares de base acima da posição -65.

Encurtando ainda mais a região promotora até a posição -25, removemos o elemento TATA-box não canônico (posição de -30 a -25). A remoção do TATA-box resultou em queda da atividade transcricional de 6,7 para 3,8 vezes o valor basal. O segmento restante

(-25/+31) ainda foi capaz de induzir transcrição, mostrando a possibilidade de ligação da RNA polimerase II junto com alguns outros fatores de transcrição primários. Isso está de acordo com a observação de Kiela e colaboradores (2003), que mostraram que o segmento -20 a +58 ainda tem atividade de transcrição superior ao basal. Mostramos anteriormente que sem os 17 primeiros pares bases à montante da posição +1 (constructo -2.095 a -17) não há montagem, nem mesmo parcial, do complexo transcricional primário.

Nossos dados diferem dos de Kiela e colaboradores (2003) em um ponto importante: a presença do TATA-box atua discreta, mas positivamente, sobre a atividade de transcrição. Aqueles autores, no entanto, observaram efeito negativo do TATA-box, uma vez que em seus experimentos o segmento -20/+58 tinha atividade como promotor, mas não o segmento -35/+58. Nesse trabalho, Kiela e colaboradores discutem inclusive a possibilidade de que a TATA binding protein (TBP) pudesse estar se ligando a outras regiões que atuam como promotor, como *Inr* (initiator elements) ou em ilhas GC. Nossos resultados mostram que TBP deve estar se ligando no TATA-box, não havendo necessidade de aventar um sítio não usual para a ligação dessa proteína que faz parte do complexo proteico TFIID (KIELA et al., 2003).

Temos citado repetidamente os trabalhos de Kiela e colaboradores, da Universidade de Arizona

(EUA), porque é o único grupo que se dedicou a analisar mais detalhadamente o promotor do gene NHE3 de rato. Esse grupo analisou também a participação no elemento GATA-box, presente na posição +20 do primeiro exon no gene NHE3 de rato, mas ausente no gene NHE3 humano. Kiela e colaboradores (2003) mostraram que o GATA-box, ao qual podem se ligar os fatores de transcrição GATA, especialmente GATA-5, é um elemento importante para a atividade do promotor do gene NHE3. O fator de transcrição GATA-5 parece agir sinergicamente com Sp3, ativando a transcrição do gene NHE3 em células da mucosa intestinal. Fatores de transcrição da família GATA (GATA-4, -5 e -6) são importantes na fase de desenvolvimento embrionário, especialmente no desenvolvimento do coração e do trato gastrointestinal.

Nós analisamos também a importância do elemento GATA para a atividade do promotor do gene NHE3 de rato em células de túbulos proximais. A deleção desse elemento não alterou a atividade do promotor, quando analisamos o segmento -157/+31, com ou sem o elemento GATA no primeiro exon. Assim, pelo menos em células de túbulos proximais, esse elemento não parece interferir, nem positiva nem negativamente, com a montagem e funcionamento do complexo transcricional primário. O elemento GATA não é um elemento conservado no primeiro exon do gene NHE3 em diferentes espécies, uma vez que não está

presente na espécie humana. Assim, não nos parece surpreendente que este não tenha relevância especial para a atividade do promotor.

Considerando os nossos resultados em conjunto, concluímos que os elementos que mais contribuem para o aumento da eficiência do promotor do gene NHE3 são elementos presentes entre as posições -44 e -33, que são sítios de ligação para Egr-1. Os 33 pares de bases imediatamente à montante do sítio de início de transcrição, incluindo o TATA-box, constituem a região na qual se monta o complexo transcricional primário, mas Egr-1 deve contribuir de forma importante para acelerar a montagem desse complexo e estabilizá-lo no local o tempo necessário para que ocorra a fosforilação da extremidade carboxi da RNA polimerase II, necessária para o início da transcrição.

5 CONCLUSÕES

Os elementos essenciais para a transcrição do gene NHE3 de rato, estão presentes entre a região -44 e -33, onde existem sítios de reconhecimento para Egr-1.

O elemento TATA-box não canônico, necessita de outros elementos de ligação como Egr-1 para estabilizar o complexo transcricional primário.

O elemento GATA no primeiro exon parece não ser importante para a transcrição em células de túbulos proximais renais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS¹

- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. Como as células lêem o Genoma: Do DNA à Proteína. In: **Biologia Molecular da Célula**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. cap 6, p. 299- 374.
- AMIN, M. R.; MALAKOOTI, J.; SANDOVAL, R.; DUDEJA, P. K.; RAMASWAMY, K. IFN-gamma and TNF-alpha regulate human NHE3 gene expression by modulating the Sp family transcription factors in human intestinal epithelial cell line C2BBel. **Am. J. Physiol. Cell Physiol.**, v. 291, n. 5, p. 887-896, 2006.
- BEZERRA, C. N.; GIRARDI, A. C.; CARRARO-LACROIX, L. R.; REBOUCAS, N. A. Mechanisms underlying the long-term regulation of NHE3 by parathyroid hormone. **Am. J. Physiol. Renal Physiol.**, v. 294, n. 5, p. 1232-1237, 2008.
- BIEMESDERFER, D.; NAGY, T.; DEGRAY, B.; ARONSON, P. S. Specific association of megalin and the Na⁺/H⁺ exchanger isoform NHE3 in the proximal tubule. **J. Biol. Chem.**, v. 274, n. 25, p. 17518-17524, 1999.
- BRANT, S. R.; YUN, C. H.; DONOWITZ, M.; TSE, C. M. Cloning, tissue distribution, and functional analysis of the human Na⁺/H⁺ exchanger isoform, NHE3. **Am. J. Physiol. Cell Physiol.**, v. 269, p. 198-206, 1995.
- CANO, A. Characterization of the rat NHE3 promoter. **Am. J. Physiol.**, v. 271, n. 40, p. 629-636, 1996.
- CANO, A.; BAUM, M.; MOE, O. W. Thyroid hormone stimulates the renal Na/H exchanger NHE3 by transcriptional activation. **Am. J. Physiol. Cell Physiol.**, v. 276, p. C102-C108, 1999.
- COLOMBANI, V.; SILVIANI, V.; MARTEAU, C., LERIQUE, B.; CARTOUZOU, G.; GEROLAMI, A. Presence of the NHE3 isoform of the Na⁺/H⁺ exchanger in human gallbladder. **Clin. Sci.**, London, v. 91, n. 2, p. 209-212, 1996.
- DONOWITZ, M.; CHA, B.; ZACHOS, N. C.; BRETT, C. L.; SHARMA, A.; TSE, C. M.; LI, X. NHERF family and NHE3 regulation. **J. Physiol.**, v. 567, n. 1, p. 3-11, 2005.
- DONOWITZ, M.; LI, X. Regulatory binding partners and complexes of NHE3. **Physiol. Rev.**, v. 87, n. 3, p. 825-872, 2007.
- ECKERT, D.; BUHL, S.; WEBER, S.; JAGGER, R.; SCHORLE, H. The Ap-2 family of transcription factors. **Genome Biol.**, v. 6, n. 246, 2005.
- FUSTER, D. G.; BOBULESCU, I. A.; ZHANG, J.; WADE, J.; MOE, O. W. Characterization of the regulation of renal Na⁺/H⁺ exchanger NHE3 by insulin. **Am. J. Physiol. Renal Physiol.**, v. 292, n. 2, p. 577-585, 2007.

¹ De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: Informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

- GIRARDI, A. C.; FUKUDA, L. E.; ROSSONI, L. V.; MALNIC, G.; REBOUCAS, N. A. Dipeptidyl peptidase IV inhibition downregulates Na⁺ - H⁺ exchanger NHE3 in rat renal proximal tubule. **Am. J. Physiol. Renal Physiol.**, v. 294, n. 2, p. 414-422, 2008.
- GOYAL, S.; VANDEN, H. G.; ARONSON, P. S. Renal expression of novel Na⁺/H⁺ exchanger isoform NHE8. **Am. J. Physiol. Renal Physiol.**, v. 284, n. 3, p. 467-473, 2003.
- HAYASHI, H.; SZASZI, K.; GRINSTEIN, S. Multiple modes of regulation of Na⁺/H⁺ exchangers. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 976, p. 248-258, 2002.
- HERBERTH, J.; ALIMOV, A. P.; WILLIAMS, J. P.; MALLUCHE, H. H.; KOSZEWSKI, N. J. PTH regulation of the human cytomegalovirus immediate-early gene promoter. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 368, n. 4, p. 977-982, 2008.
- KANDASAMY, R. A.; ORLOWSKI, J. Genomic organization and glucocorticoid transcriptional activation of the rat Na⁺/H⁺ exchanger nhe3 gene. **J. Biol. Chem.**, v. 271, n. 18, p. 10551-10559, 1996.
- KIELA, P. R.; HINES, E. R.; COLLINS, J. F.; GHISHAN, F. K. Regulation of the rat NHE3 gene promoter by sodium butyrate. **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.**, v. 281, n. 4, p. 947-956, 2001.
- KIELA, P. R.; LESUEUR, J.; COLLINS, J. F.; GHISHAN, F. K. Transcriptional regulation of the rat NHE3 gene. Functional interactions between GATA-5 and Sp family transcription factors. **J. Biol. Chem.**, v. 278, n. 8, p. 5659-5668, 2003.
- KLANKKE, C. A.; SU, Y. R.; CALLEN, D. F.; WANG, Z.; MENETON, P.; BAIRD, N.; KANDASAMY, R. A.; ORLOWSKI, J.; OTTERUD, B. E.; LEPPERT, M.; et al.,. Molecular cloning and physical and genetic mapping of a novel human Na⁺/H⁺ exchanger (NHE5/SLC9A5) to chromosome 16q22.1. **Genomics**, v. 25, p. 615-622, 1995.
- KLISIC, J.; HU, M. C.; NIEF, V.; REYES, L.; FUSTER, D.; MOE, O. W.; AMBUHL, P. M. Insulin activates Na(+)/H(+) exchanger 3: biphasic response and glucocorticoid dependence. **Am. J. Physiol. Renal Physiol.**, v. 283, n. 3, p. 532-539, 2002.
- LEE, S. H.; KIM, T.; PARK, E. S.; YANG, S.; JEONG, D.; CHOI, Y.; RHO, J. NHE10, an osteoclast-specific member of the Na⁺/H⁺ exchanger family, regulates osteoclast differentiation and survival [corrected]. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 369, n. 2, p. 320-326, 2008.
- MALAKOOTI, J.; MEMARK, V. C.; DUDEJA, P. K.; RAMASWAMY, K. Molecular cloning and functional analysis of the human Na(+)/H(+) exchanger NHE3 promoter. **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.**, v. 282, n. 3, p. 491-500, 2002.
- MALAKOOTI, J.; SANDOVAL, R.; AMIN, M. R.; CLARK, J.; DUDEJA, P. K.; RAMASWAMY, K. Transcriptional stimulation of the human NHE3 promoter activity by PMA: PKC independence and involvement of the transcription factor EGR-1. **Biochem. J.**, v. 396, n. 2, p. 327-336, 2006.
- MALO, M. E.; FLIEGEL, L. Physiological role and regulation of the Na⁺/H⁺ exchanger. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, v. 84, n. 11, p. 1081-1095, 2006.

- MILLER, R. T.; COUNILLON, L.; PAGES, G.; LIFTON, SARDET, R. P.; C.; POUYSSÉGUR, J. Structure of the 5'-flanking regulatory region and gene for the human growth factor-activatable Na/H exchanger NHE-1. **J. Biol. Chem.**, v. 266, n. 17, p. 10813-10819, 1991.
- MOE, O. W. Acute regulation of proximal tubule apical membrane Na/H exchanger NHE-3: role of phosphorylation, protein trafficking, and regulatory factors. **J. Am. Soc. Nephrol.**, v. 10, n. 11, p. 2412-2425, 1999.
- MULLER, Y. L.; COLLINS, J. F.; BAI, L.; XU, H.; GHISHAN, F. K. Molecular cloning and characterization of the rat NHE-2 gene promoter. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1442, n. 2-3, p. 314-319, 1998.
- ORLOWSKI, J.; GRINSTEIN, S. Diversity of the mammalian sodium/proton exchanger SLC9 gene family. **Pflugers Arch.**, v. 447, n. 5, p. 549-565, 2004.
- PANG, T.; WAKABAYASHI, S.; SHIGEKAWA, M. Expression of calcineurin B homologous protein 2 protects serum deprivation-induced cell death by serum-independent activation of Na⁺/H⁺ exchanger. **J. Biol. Chem.**, v. 277, n. 46, p. 43771-43777, 2002.
- RANISH, J. A.; HAHN, S. Transcription: basal factors and activation. **Curr. Opin. Genet. Dev.**, v. 6, n. 2, p. 151-158, 1996.
- REBOUCAS, N. A.; BEZERRA, C. N.; GIRARDI, A. C.; CARRARO-LACROIX, L. Mechanisms underlying the regulation of NHE3 expression by parathyroid hormone. In: ANNUAL MEETING OF AMERICAN SOCIETY OF NEPHROLOGY, 39th, 2006, San Diego. **Abstracts...** Washington: American Society of Nephrology, 2006. p. 552A-552A.
- SARDET, C.; FRANCHI, A.; POUYSSÉGUR, J. Molecular cloning, primary structure, and expression of the human growth factor-activatable Na⁺/H⁺ antiporter. **Cell**, v. 56, p. 271-280, 1989.
- SCHULTEIS, P. J.; CLARKE, L. L.; MENTEON, P.; MILLER, M. L.; SOLEIMANI, M.; GAWENIS, L. R.; RIDDLE, T. M.; DUFFY, J. J. et al.,. Renal and intestinal absorptive defects in mice lacking the NHE3 Na⁺/H⁺ exchanger. **Nat. Genet.**, v. 19, n. 3, p. 282-285, 1998.
- SLEPKOV, E. R.; RAINEY, J. K.; SYKES, B. D.; FLIEGEL, L. Structural and functional analysis of the Na⁺/H⁺ exchanger. **Biochem. J.**, v. 401, n. 3, p. 623-633, 2007.
- SUSKE, G. The Sp-family of transcription factors. **Gene**, v. 238, p. 291-300, 1999.
- TSE, C. M.; BRANT, S. R.; WALKER, M. S.; POUYSSÉGUR, J.; DONOWITZ, M. Cloning and sequencing of a rabbit cDNA encoding an intestinal and kidney-specific Na⁺/H⁺ exchanger isoform (NHE-3). **J. Biol. Chem.**, v. 267, p. 9340-9346, 1992.
- TSE, C. M.; LEVINE, S. A.; C. YUN, C. H.; MONTROSE, M. H.; LITTLE, P. J.; POUYSSÉGUR, J.; DONOWITZ, M. Cloning and expression of a rabbit cDNA encoding a serum-activated ethylisopropylamiloride-resistant epithelial Na⁺/H⁺ exchanger isoform (NHE-2). **J. Biol. Chem.**, v. 268, p. 11917-11924, 1993.

VOLTZ, J. W.; WEINMAN, E. J.; SHENOLIKAR, S. Expanding the role of NHERF, a PDZ-domain containing protein adapter, to growth regulation. **Oncogene**, v. 20, n. 44, p. 6309-6314, 2001.

XU, L.; DIXIT, M. P.; NULLMEYER, K. D.; XU, H.; KIELA, P. R.; LYNCH, R. M.; GHISHAN, F. K. Regulation of Na⁺/H⁺ exchanger-NHE3 by angiotensin-II in OKP cells. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1758, n. 4, p. 519-526, 2006.

ZHAO, F.; SATODA, M.; LICHT, J. D.; HAYASHIZAKI, Y.; GELB, B. D. Cloning and Characterization of a Novel Mouse AP-2 Transcription Factor, Ap-2 δ , with Unique DNA Binding and Transactivation Properties. **Biol. Chem.**, v. 276, n. 44, p. 40755-40760, 2001.

YAMAJI, Y.; AMEMIYA, M.; CANO, A.; PREISIG, P. A.; MILLER, R. T.; MOE, O. W.; ALPERN, R. J. Overexpression of csk inhibits acid-induced activation of NHE-3. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 92, n. 14, p. 6274-6278, 1995.

YANG, C.; BOLOTIN, E.; JIANG, T.; SLADEK, F. M.; MARTINEZ, E. Prevalence of the initiator over the TATA box in human and yeast genes and identification of DNA motifs enriched in human TATA-less core promoters. **Gene**, v. 389, n. 1, p. 52-65, 2007.

YUN, C. H.; TSE, C. M.; NATH, S.; LEVINE, S. L.; DONOWITZ, M. Structure/function studies of mammalian Na-H exchangers-an update. **J. Physiol.**, v. 482, p. 1-6, 1995.

ANEXOS

Tabela A.1 - Sequência dos iniciadores utilizados para obtenção dos segmentos da região 5' flanqueadora do gene NHE3 de rato.

Segmento	Sense	Antisense
Tamanho		
-25/+31	ACAGCAGGTACCGGCCACCCGGG	TGAGCAAAGCTTCTCTGCGCTATCCCGG
56 pb	CAGGCCTGGGGACCTGACTGCTGC	AGCTGGCAGCAGTCAGGTCCCCAGGCC
	CAGCTCCGGGATAGCGCAGAGAA	TGCCCCGGGTGGCCGGTACCTGCTGT
	GCTTTGCTCA	
-33/+31	ACAGCAGGTACCGATTAAAGGCC	TGAGCAAAGCTTCTCTGCGCTATCCCGG
64bp	ACCCGGGCAGGCCTGGGGACCTG	AGCTGGCAGCAGTCAGGTCCCCAGGCC
	ACTGCTGCCAGCTCCGGGATAGCG	TGCCCCGGGTGGCCTTTAATCGGTACCTG
	CAGAGAAGCTTTGCTCA	CTGT
-44/+31	ACAGCAGGTACCGAGGGGGCAGC	TGAGCAAAGCTTCTCTGCGCTATCCCGG
75bp	GGGATTAAAGGCCACCCGGGCAG	AGCTGGCAGCAGTCAGGTCCCCAGGCC
	GCCTGGGGACCTGACTGCTGCCAG	TGCCCCGGGTGGCCTTTAATCCCGCTGCC
	CTCCGGGATAGCGCAGAGAAGCT	CCCTCGGTACCTGCTGT
	TTGCTCA	
-65/+31	AGCAGGTACCAAGGCCCCGCCCT	AGCAAAGCTTCTCTGCGCTATCCGGAG
96bp	G	
-85/+31	AGCAGGTACCAAGTGCAGCAGCGG	AGCAAAGCTTCTCTGCGCTATCCGGAG
116bp	G	
-157/+31	AGCAGGTACCGGGGCCCAACCAA	AGCAAAGCTTCTCTGCGCTATCCGGAG
188bp	GTAGGT	
-157/+35	AGCAGGTACCGGGGCCCAACCAA	AGCAAAGCTTAGCCCTCTGCGCCCGGA
188bp	GTAGGT	GCTGGCAGC
(sem GATA)		

Para as tabelas A.1, B.1 e B.2, destacamos as bases em vermelho que correspondem aos sítios de reconhecimento para as enzimas de restrição, e bases em azul correspondem às bases adicionadas para facilitar a digestão do produto de PCR pelas enzimas de restrição. As bases em preto correspondem a sequência do promotor.

Tabela B.1 - Sequência dos iniciadores utilizados para obtenção dos segmentos da região 5' flanqueadora do gene NHE3 de rato com mutação pontual nos possíveis sítios para Egr-1/Sp1 (-80/+31).

Tamanho	Sense	Antisense
Sp1	AGCAGGTACCCGCAGCGGGGACGGGAAG	AGCAAAGCTTCTCTGCGCTATC
111bp	CGGAG	

Tabela B.2 - Sequência dos iniciadores utilizados para obtenção dos segmentos da região 5' flanqueadora do gene NHE3 de rato com inserção das mutações pontuais nos possíveis sítios para Sp1 e Ap2 (-60/+31).

Tamanho	Sense	Antisense
Sp1/Ap2	AGCAGGTACCCCAACCCCTGAAGCGGGA	AGCAAAGCTTCTCTGCGCTAT
91bp	CCGGAG	

Tabela C.1 - Reação de ligação dos produtos no vetor pGL3-Basic.

	DNA	pGL3-basic	T4 DNA Ligase (Promega)	Buffer 10X	H2O
Constructos menores	3µl	1µl	1µl	1µl	4 µl
Apa (Wild)	3µl	1µl	1µl	1µl	4µl
GATA (deletado)	3µl	1 µl	1µl	1µl	4 µl
Egr (mutado)	3µl	1µl	1µl	1µl	4 µl
SP (mutado)	3µl	1µl	1µl	1µl	6 µl

Tabela C.2 - Reações controle da ligação no vetor pGEM-T Easy (Promega) (3000 bp).

	DNA	pGEM	T4 DNA Ligase (Promega)	Buffer 10X	H2O
Controle positivo da reação de ligação	1µl	1µl	1µl	1µl	6 µl
Controle negativo da reação de ligação	----	1µl	1µl	1µl	7 µl

ANEXO D – Sequenciamentos dos plasmídeos recombinantes, o sublinhado indica a sequência apenas da região promotora de interesse que foi inserido no vetor pGL-3basic.

Fragmento -157/+31 sense:

5' GTACCTGGGGCCCAACCAAGTAGGTGGGCGTGAGCAGCACAGGCGCGAGAC
CTTCTAACGCAGCAGACTGTTTGCATTACGTGCGCAGCGGGGGCGGGAAGGCC
CGCCCTGGCGCGGGAGGGGGCAGCGGGATTAAAGGCCACCCCGGGCAGGCCTGG
GGACCTGACTGCTGCCAGCTCCGGGATAGCGCAGAGGGGCTGTGGCATTCCGGC
NCT 3'

Fragmento -157/+31 antisense:

3' CAGTACGGATGCCTCTGCGCTATCCCGGAGCTGGCAGCAGTCAGGTCCCCAGGC
CTGCCCCGGGTGGCCTTTAATCCCGCTGCCCCCTCCCGCGCCAGGGCGGGGCCTTC
CCGCCCCCGCTGCGCACGTGAATGCAAACAGTCTGCTGCGTTAGAAGGTCTCGCG
CCTGTGCTGCTCACGCCCACCTACTTGGTTGGGCCCCAGNNAAGGTNTNNT 5'

Fragmento sem o elemento GATA (-157 +35) sense:

5' CTCTATCGATAGGAGCAGGTACCCTGGGGCCCAACCAAGTAGGTGGGCGTGAG
CAGCACAGGCGCGAGACCTTCTAACGCAGCAGACTGTTTGCATTACGTGCGCAG
CGGGGGCGGGAAGGCCCCCGCCCTGGCGCGGGAGGGGGCAGCGGGATTAAAGGC
CACCCGGGCAGGCCTGGGGACCTGACTGCTGCCAGCTCCGGGCGCAGAGGGCTA
AGCTTGGCATTCCGGTACTGTTGG 3'

Fragmento sem o elemento GATA (-157 +35) antisense:

3' ACAGGATGCCNGCTTAGCCCTCTGCGCCCCGGAGCTGGCAGCAGTCAGGTCCCC
AGGCCTGCCCCGGGTGGCCTTTAATCCCGCTGCCCCCTCCCGCGCCAGGGCGGGGC
CTTCCCGCCCCCGCTGCGCACGTGAATGCAAACAGTCTGCTGCGTTAGAAGGTCT
CGCGCCTGTGCTGCTCACGCCCACCTACTTGGTTGGGCCCCAGCCTAGTGCTCCTA
TCGATAGAGAAATG 5'

As seqüências abaixo correspondem aos fragmentos com deleções sucessivas da região promotora de NHE3 de rato:

Fragmento -85/+31 bp sense:

5' GCGNTGCCGACATTTCTATTCGATAGGTACCCGTGCGCAGCGGGGGCGGGAAG
GCCCCGCCCTGGCGCGGGAGGGGGCAGCGGGATTAAAGGCCACCCGGGCAGGCC
TGGGGACCTGACTGCTGCCAGCTCCGGGATAGCGCAGAGAAGCTTGGCATTCCGG
TACTGTTGGTAAAGCCAC 3'

Fragmento -85/+31bp antisense:

3' GGATGCCCAGCTTCTCTGCGCTATCCCGGAGCTGGCAGCAGTCAGGTCCCCA
GGCCTGCCCCGGGTGGCCTTTAATCCCGCTGCCCCCTCCCGCGCCAGGGCGGGGCC
TTCCCGCCCCCGCTGCGCACGTGGTACCTATCGA 5'

Fragmento -65/+31bp sense:

5' GGGGGCGGCAAGGCCCGCCCTGGCGCGGGAGGGGGCAGCCGGATTAAAGGC
CACCCGGGCAGGCCTGGGGACCTGACTGCTGCCAGCTCCGGGATAGCGCAGAGA
AGCTTGGCATTCCGGTACTGTTGG 3'

Fragmento -65/+31bp antisense:

3' ACCGGAATCCAGCTTCTCTGCGCTATCCCGGAGCTGGCAGCAGTCAGGTCC
CCAGGCCTGCCCCGGGTGGCCTTTAATCCCGCTGCCCCCTCCCGCGCCAGGGCGGG
GCCTTGGTACCTATCGATAGAGAAATG 5'

Fragmento -44/+31bp sense:

5' GCGGGAGGGGGCAGCGGGATTAAAGGCCACCCGGGCAGGCCTGGGGACCTGA
CTGCTGCCAGCTCCGGGATAGCGCAGAGAAGCTTGGCATTCCGGTACTGTTGGT
3'

Fragmento -44/+31bp antisense:

3' ACCGGATGCCAGCTTCTCTGCGCTATCCCGGAGCTGGCAGCAGTCAGGTCCCC
AGGCCTGCCCCGGGTGGCCTTTAATCCCGCTGCCCCCTCCCGCGCCAGGGCGGGGC
CTTCCCGCCCCCGCTGCGCACGTGG 5'

Fragmento -33/+31 sense:

5' CTTACTTAGATCGCAGACTCGAGCCCCAGCAGGTACCGATTAAAGGCCACCCG

GGCAGGCCTGGGGACCTGACTGCTGCCAGCTCCGGGATAGCGCAGAGAAGCTTT
GCTCAGGGCTAGCACGCGTAAGAGCTCGGTACCTA 3'

Fragmento -33/+31 antisense:

3' TTACGCGTGCTAGCCCTGACAAAGCTTCTCTGCGCTATCCCGGAGCTGGCAGC
AGTCAGGTCCCCAGGCCTGCCCCGGGTGGCCTTTAATCGGTACCTGCTGNGGGCTC
GAGATCTGCNAACTAAGTAAG 5'

Fragmento -25/+31 sense:

5' CTTACGCGTGCTAGCCCACAGCAGGTACCGGCCACCCGGGCAGGCCTGGGGA
CCTGACTGCTGCCAGCTCCGGGATAGCGCAGAGAAGCTTTGCTCAGGGCTCGAGA
TCTGCGATCTAAGTAAGCTTGGCA 3'

Fragmento -25/+31 antisense:

3' TTAGATCGCAGATCTCGAGCCCTGAGCAAAGCTTCTCTGCGCTATCCCGGAGC
TGGCAGCAGTCAGGTCCCCAGGCCTGCCCCGGGTGGCCGGTACCTGCTGTGGGCTA
GCACGCGTAAGAG 5'

As seqüências abaixo correspondem aos fragmentos com mutações nos possíveis sítios de ligação na região do promotor do gene NHE3 de rato (as mutações estão destacadas em verde):

Fragmento -80/+31 sense com mutação em Egr1/+Sp1:

5' TCGATAGGTTACCCGCAGCGGGGACGGGAAGGCCCCGCCCTGGCGCGGGAGGG
GGCAGCGGGATTAAAGGCCACCCGGGCAGGCCTGGGGACCTGACTGCTGCCAGC
TCCGGGATAGCGCAGAGAAGCTTGGCATTCCGGTACTGTTGGTAAAG 3'

Fragmento -80/+31 antisense com mutação em Egr1/+Sp1:

3' TGCCAGCTTCTTCTGCGCTATCCCGGAGCTGGCAGCAGTCAGGTCCCCAGGCCT
GCCCCGGGTGGCCTTTAATCCCGCTGCCCCCTCCCGCGCCAGGGCAGGGCCTTCCC
GTCCCCGTGCGGTACCNTATCAATAAGAAA 5'

Fragmento -60/+31 sense com mutações em Sp1/Ap2:

5' ACCGCCGGGNCCCCCAACCCTGAAGCGGGAGGGGGCAGCGGGATTAAAGGCC

ACCCGGGCAGGCCTGGGGCACCTGACTGCTGCCAGCTCCGGGATAGCGCAGAGA
AGCNTGGCATTCCGGTACTC 3'

Fragmento -60/+31 antisense com mutações em Sp1/Ap2:

3' CGGATGCCAGCTTCTCTGCGCTATCCCGGAGCTGGCAGCAGTCAGGTCCCCAC
GCCTGCCCCGGGTGGCCTTTAATCCCGCTGCCCCCTCCCGCTTTCAGGGTTGGGGGN
GTACCTATNCGATAGAGA 5'

Figura A.1- Eletroferogramas das sequências.

Para verificar se havia sobreposições dos picos do sequenciamento e possíveis dúvidas quanto à sequência apresentada, analisamos o eletroferograma de todas as amostras. Os eletroferogramas são apresentados abaixo:

Apa Wild (-157/+31) sense

Apa Wild (-157/+31) antisense

Sem o elemento GATA (-157/+31) sense:

Sem o elemento GATA (-157/+31) antisense:

Região compreendida entre -25/+31 sense:

Região compreendida entre -25/+31 antisense:

Região compreendida entre -33/+31 sense:

Região compreendida entre -33/+31 antisense:

Região Compreendida entre (-44/+31bp) sense:

Região Compreendida entre (-44/+31bp) antisense:

Região Compreendida entre (-65/+31bp) sense:

Compreendida entre (–65/+31bp) antisense:

Região Compreendida entre (–85/+31bp) sense:

Região Compreendida entre (–85/+31bp) antisense:

GA GT GGG TCC TNC ATT TCT AT C GAT AGG T ACC C GAG C GGG G A C G G A G G C C C G C C T G G C G C G G A G G G G C A C G G G A T T A A G G C C A C C G G G C A G G C C T G G G G A C C T G A C T G C T G C A G C T C C

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110 120 130

GGG GAT AGC GCAG AGA AGC TT GGC ATT C CGGT ACT GTT GGT AAAGC CAC CAT GGT AAG ACN

140 150 160 170 180 190

TTT TGGGG C C T N N T T T CCGGA TGCC AGC TT CTCTG C C TAT C C C G G A G T G G C A G C A G T C A G G T C C C C A C G C C T G C C C G G G T G G C C T T A T C C C G C T G C C C C T C C C G C T T C A G G G T T G G G G T A C C T A T N