Universidade de São Paulo
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
Departamento de Química
Programa de Pós-Graduação em Química

“Clonagem e Expressão dos Domínios 2 e 3 do Receptor KDR (VEGFR-2) Humano”

Leila Spínola e Castro

Dissertação apresentada à Faculdade de
Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
da USP, como parte das exigências para a
obtenção do título de Mestre em Ciências,
Área: **Química**

**RIBEIRÃO PRETO - SP
2009**

Universidade de São Paulo
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
Departamento de Química
Programa de Pós-Graduação em Química

“Clonagem e Expressão dos Domínios 2 e 3 do Receptor KDR (VEGFR-2) Humano”

Leila Spínola e Castro

Orientador: Prof. Dr. Richard John Ward

Dissertação apresentada à Faculdade de
Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
da USP, como parte das exigências para a
obtenção do título de Mestre em Ciências,
Área: **Química**

RIBEIRÃO PRETO - SP

2009

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca Central da Coordenadoria
do *Campus* de Ribeirão Preto / USP

Castro, Leila Spínola e

Clonagem e Expressão dos Domínios 2 e 3 do Receptor KDR
(VEGFR-2) Humano

82p. : il. ; 30cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de
Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP – Área de
concentração: Química.

Orientador: Richard John Ward.

1. KDR. 2. Lys49PLA2. 3. Proteína.

Dedico este trabalho

A Deus, “porque Dele, por Ele e para Ele são todas as coisas.”

A minha mãezinha e ao meu paizinho por esse amor incondicional. Vocês são os
melhores pais que existem! Amo muito vocês!

Ao Danilo, meu socorro em meio ao tumulto, meu sorriso em meio às lágrimas. Você
é abençoadamente especial e eu te amo!

AGRADECIMENTOS

A Deus, Dono de toda a sabedoria, discernimento e criatividade. Só em Ti Senhor, encontrei força suficiente para chegar até o fim.

Ao Prof. Dr. Richard John Ward, do Departamento de Química da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto-FFCLRP/USP, pela oportunidade e pela confiança. Muito obrigada professor, foi uma grandiosa experiência.

Ao Prof. Dr. Arthur Henrique Cavalcante de Oliveira e ao Prof. Dr. Celso Teixeira Mendes Junior, ambos do Departamento de Química da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto-FFCLRP/USP, pela participação e contribuição em meu exame de qualificação.

Ao Prof. Dr. Tony Paulino Paiva, da UFTM-CEFOPES e Universidade de Uberaba, e ao Prof. Dr. Arthur Henrique Cavalcanti de Oliveira, da FFCLRP/USP, pela disponibilidade em participarem e enriquecerem a banca avaliadora da minha dissertação.

Ao Prof. Dr. Pietro Ciancaglini, da FFCLRP/USP, pela simpatia e por disponibilizar a utilização de seu laboratório sempre que necessário.

A Profa. Dra. Aparecida Maria Fontes, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-FMRP/USP, pela doação da amostra de cDNA (HUVEC) para a realização de indispensáveis experimentos deste trabalho.

A Profa. Dra. Maria Helena Goldmann e a sua aluna Andréa, da FFCLRP/USP, pela colaboração com o sequenciamento de amostras de DNA.

A Tânia Paula Aquino Defina, do Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos da FMRP/USP, pelo auxílio no sequenciamento das amostras de DNA.

Aos técnicos Ivana Aparecida Borin e Milton Rosa Alves da FFCLRP/USP pelo auxílio e disposição constantes.

Aos funcionários do Departamento de Química da FFCLRP-USP e aos secretários Lâmia, Bel, Maria, Sônia, André e Jalmei pela atenção nos assuntos burocráticos.

Aos amigos do laboratório Lica, Carlinha, Paty, Lica, Lucas, Gilvan, Davi, Laila, Plínio, Gisele, João e Vinícius pelos momentos de trabalho e pelas risadas.

A todos os professores, funcionários e colegas do Departamento de Química da FFCLRP.

Aos funcionários do Laboratório de Resíduos Químicos (LRQ) do Campus da USP-Ribeirão Preto pelo tratamento, recuperação e/ou descarte dos resíduos gerados nesse trabalho.

Aos meus amados pais por permanecerem a meu lado mesmo sem concordarem com minhas decisões. Sei que posso contar com vocês para tudo e a qualquer momento. Muito obrigada por serem como são!

Aos meus irmãos Elyas e Bethel por serem meus amigos em tempo integral. Amo vocês!

Aos meus fofíssimos sobrinhos: Mateus, Nelson, Gabriel, Ana Beatriz e Elyas Junior, verdadeiros presentes que o Senhor concedeu para alegrar minha vida. Amo e sou apaixonada por vocês!

Ao Danilo, meu companheiro amado e fiel ajudador.

A minha “mãedrinha” Evilásia pelo amor e incansável carinho.

A minha amiga e irmã Marie Chantal por me levar de volta ao Caminho que traz Vida e pelos sábios ensinamentos.

A Tassi, Deza, Déa e todas as outras amadas primas e primos, pelo incentivo e amizade.

Ao meu cunhadinho José Carrasco e a minha cunhadinha Gislaine Fiuza Bulgarelli Spínola pelo apoio.

A Tati Lopes pela paciência em ensinar e esclarecer minhas dúvidas, até mesmo nas madrugadas de trabalho. Tati, obrigada por ser amiga de verdade!

Ao Prof. Luiz Garcia por incomparável competência no ensinamento, pela atenção e carinho. *"You are so beautiful"*!

Ao amigo Dr. Roberto Ruller pelas experientes dicas e críticas.

As minhas amigas Raquel e Renata "Vermelhinha" pela parceria, confiança mútua, ajuda e também por me reprimirem quando necessário. Poderíamos escrever um livro!

As amigas, Vivian Cipriano, Juzinha Alponi, Júlia Fonseca e Simone Barbosa por dividirem momentos importantes e auxiliarem nessa caminhada.

A toda família Veiga e Spínola pelas orações e apoio.

SUMÁRIO

ABREVIATURAS.....	iv
ÍNDICE DE FIGURAS.....	vii
ÍNDICE DE TABELAS.....	ix
NOMENCLATURA, CLASSIFICAÇÃO E ESTRUTURA DOS AMINOÁCIDOS.....	x
RESUMO.....	xiii
ABSTRACT.....	xiv
1. INTRODUÇÃO	
1.1 Angiogênese.....	15
1.2 Fator do Crescimento Endotelial Vascular (VEGF).....	16
1.3 Receptores do Fator do Crescimento Endotelial Vascular (VEGFR).....	20
1.4 Inibidores do Fator do Crescimento Endotelial Vascular.....	21
1.5 Sequências codificadoras de proteínas.....	23
1.6 Sequências codificadoras de proteínas sintéticas.....	24
2. OBJETIVOS	
2.1 Objetivo Geral.....	27
2.2 Objetivos Específicos.....	27
3. MATERIAIS E MÉTODOS	
3.1 cDNA do transcrito que codifica para o VEGF.....	28
3.2 Idealização dos oligonucleotídeos iniciadores para a amplificação do cDNA.....	29
3.3 Obtenção do DNA referente aos domínios 2 e 3 do KDR partindo do cDNA por PCR.....	29
3.4 Análise do produto de amplificação no gel de agarose.....	31
3.5 Purificação do produto de PCR.....	31
3.6 Clonagem no vetor pJET™.....	32
3.7 Preparo das células DH5a competentes.....	33
3.8 Transformação Bacteriana (<i>E. coli</i> DH5a).....	34
3.9 Extração do DNA plasmidial.....	36
3.10 Sequenciamento de nucleotídeos de DNA.....	37
3.11 Digestão enzimática do vetor pJET™ + domínios 2 e 3 do KDR com <i>NdeI</i> e <i>BamHI</i>	38
3.12 Clonagem da sequência codificadora em vetor pET28a (Novagen) para expressão em sistema bacteriano.....	39
3.12.1 Características do vetor pET28a.....	39

3.12.2 Preparo do vetor.....	40
3.12.2.1 Digestão do vetor.....	40
3.13. Ligação do DNA ao vetor pET28a.....	41
3.14 Transformação e Extração de DNA.....	41
3.15 Sequenciamento de nucleotídeos de DNA.....	42
3.16 Expressão de proteínas heterólogas em linhagem <i>E. coli</i> BL21.....	42
3.16.1 Preparo de células BL21 competentes.....	42
3.16.2 Expressão da proteína em função do tempo de indução.....	43
3.16.3 Eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	44
3.17 Criação da sequência <i>in frame</i> do DNA que codifica os domínios 2 e 3 do KDR.....	44
3.18 Alteração das regiões flangeadoras do <i>constructo</i> 2 e 3 do KDR.....	50
3.19 Proteína Verde Fluorescente (GFP).....	51
3.20 Digestão do fragmento codificador do <i>constructo</i> 2 e 3 do KDR e ligação ao vetor pGFPuv.....	53
3.21 Multiplicação e extração do DNA da ligação (pGFPuv + <i>constructo</i> 2 e 3 do KDR).....	54
3.22 Reação de sequenciamento.....	54
3.23 Mutagênese Sítio Dirigida.....	54
4. RESULTADOS	
4.1 Amplificação do cDNA (HUVEC) do KDR.....	57
4.1.1 Sub-clonagem para expressão da proteína resultante.....	59
4.1.2 Expressão da proteína resultante em bactéria <i>E. coli</i> BL21.....	62
4.2 Montagem da sequência codificadora para os domínios 2 e 3 do KDR.....	64
4.2.1 Seleção dos clones em pGFPuv.....	66
4.2.2 Análise da sequência sintética.....	69
5. DISCUSSÃO.....	72
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	78
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	79

ABREVIATURAS

µg – Micrograma

µL – Microlitro

A – Adenina

AMP1 – Programa para amplificação de DNA, utilizando termociclador

AMP8 – Programa para amplificação de DNA, utilizando termociclador

APS – Persulfato de amônio

ASP – Aspartato

ATG – Adenina, timina, guanina

ATP – Adenosina trifosfato

BthTx-I – Bothropstoxina I

C – Citosina

cfu/mL – Unidade formadora de colônia/mililitro

Ca²⁺ – Íon cálcio

CaCl₂ – Cloreto de cálcio

cDNA – DNA complementar

dATP – desoxiadenosina trifosfato

dCTP – desoxicitosina trifosfato

dGTP – desoxiguanosina trifosfato

DH5a - Linhagem de células da bactéria *E.coli*

DNA – Ácido desoxirribonucleico

dNTP – Desoxirribonucleotídeo trifosfato

DTT – Ditionitrito

dTTP – desoxitimina trifosfato

ECM – Matriz extracelular

EDTA – Ácido etilenodiaminotetracético

EXT – Programa para extensão de DNA, utilizando termociclador

Flk-1 – *Fetal liver kinase*

Flt-1 – *Fms-like tyrosine kinase*

fMol - Femtomol

G – Guanina

GET – tampão TRIS, glicose, EDTA

GenBank – Banco de Dados de sequências nucleotídicas

GFP – Proteína verde fluorescente

Glu – Glutamato

h – hora(s)

HCl – Ácido clorídrico

HDM – meio de cultura triptona + extrato de levedura

HUVEC – *Human Umbilical Vein Endothelial Cells*

IPTG – Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosídeo

kb – kilo base

KC₂H₃O₂ – Acetato de potássio

KCl – Cloreto de potássio

KDR – Receptor domínio quinase
KDRbp – Proteína ligada ao KDR
L1 – Oligonucleotídeo 5'-ATGGCTAGCGTTATTTATGTG-3'
L147 – Oligonucleotídeo 5'-GAACGTTTCCCTGTGTGCGC-3'
L527 – Oligonucleotídeo 5'-CATTTGCTACCGGACTGAG-3'
LB – Meio de cultura *Luria-Bertani*
Lys – Lisina
Lys49PLA2 – Fosfolipase A2 com uma lisina na posição 49
M-CSF – Fator estimulador de formação de colônias de macrófagos
mg/mL – Miligrama/mililitro
MgCl₂ – Cloreto de magnésio
min. – Minuto(s)
mL – Mililitros
mM – Milimol (ar)
mmol.L⁻¹ – Milimol/litro
mRNA – RNA mensageiro
NaCl – Cloreto de sódio
NaOH – Hidróxido de sódio
ng/μL – nanograma/microlitro
°C – Graus Celsius
OD₆₀₀ – Densidade Óptica em 600 nm
ORF – Open reading frame
pb – Pares de bases
PCR – Reação em cadeia da polimerase
PDGF – Fator de crescimento derivado de plaquetas
pET – Plasmídeo para expressão pela T7 RNA Polimerase
pGFPuv – Plasmídeo proteína verde fluorescente
pH – Potencial hidrogeniônico
PIGF-1 – Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1
PIGF-2 – Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 2
PIPES – Piperazina-N,N'-bis(ácido 2-etanosulfônico)
pJETTM1.2 – Plasmídeo termoestável para clonagem
PLA2 – Fosfolipase 2
pmol/μL – Picomol/microlitro
RNA – Ácido ribonucléico
RNase – Ribonuclease
rpm – Rotação por minuto
RTK – Receptores tirosina quinase
RT-PCR – Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction
s – Segundo(s)
SDS – Dodecilsulfato de sódio
SDS-PAGE – Eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida
svVEGF – O mesmo que VEGF-F
T – Timina

T.f – *Trimeresurus flavoviridis*
TBE – Tampão Tris-Borato-EDTA
TE – Tampão Tris, EDTA
TEMED – Tetrametiletilenodiamino
Tris – Tris[hidroximetil]aminometano
tRNA – RNA transportador
Trp – Triptofano
U – Unidade de enzima
UFC/mL – Unidade formadora de colônia por microlitro
U/μL – Unidade/microlitro
VEGF – Fator de crescimento endotelial vascular
VEGF121 – Isoforma 121 de VEGF
VEGF145 – Isoforma 145 de VEGF
VEGF165 – Isoforma 165 de VEGF
VEGF183 – Isoforma 183 de VEGF
VEGF189 – Isoforma 189 de VEGF
VEGF206 – Isoforma 206 de VEGF
VEGF-A – Fator de crescimento endotelial vascular tipo A
VEGF-B – Fator de crescimento endotelial vascular tipo B
VEGF-C – Fator de crescimento endotelial vascular tipo C
VEGF-D – Fator de crescimento endotelial vascular tipo D
VEGF-E – Fator de crescimento endotelial vascular tipo E
VEGF-F – Fator de crescimento endotelial vascular tipo F
VEGFR – Receptor de VEGF
VEGFR-1 – Receptor 1 de VEGF
VEGFR-2 – Receptor 2 de VEGF
VEGFR-3 – Receptor 3 de VEGF
VPF – Fator vascular de permeabilidade
ZnCl₂ – Cloreto de zinco

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Representações da fita dos domínios do receptor de VEGF-A.....	19
Figura 2: Representação em fita da estrutura da proteína VEGFR-2.....	19
Figura 3: Família de VEGF e seus receptores (VEGFR).....	21
Figura 4: Vetor pJET TM 1.2/ <i>blunt</i> usado no sistema de seleção positiva para clonagem de elevada eficiência de produtos de PCR gerados com a polimerase de DNA <i>Pfu</i> , a Taq Polimerase de DNA ou outras polimerases de DNA termoestáveis.....	33
Figura 5: Vetor pET28a.....	40
Figura 6: Sequência nucleotídica do KDR retirada do <i>GenBank</i> AAC16450.1, utilizada como referência para a criação do <i>constructo</i> 2 e 3 do KDR.....	45
Figura 7: Alinhamento da sequência de nucleotídeos do cDNA com a sequência do gene sintético proposto para os domínios 2 e 3 de KDR 12.....	47
Figura 8: Esquema dos oligonucleotídeos utilizados para a construção da sequência sintética dos domínios 2 e 3 do KDR.....	48
Figura 9: Esquema simbolizando a sequência nucleotídica dos domínios 2 e 3 do KDR.....	49
Figura 10: Mapa do pGFPuv.....	52
Figura 11: Representação da ligação do <i>constructo</i> 2 e 3 do KDR ao vetor pGFPuv.....	53
Figura 12: Amplificação do cDNA de HUVEC utilizando os oligonucleotídeos KDR23 <i>forward</i> e KDR23 <i>reverse</i>	57
Figura 13: Banda purificada da amostra do DNA resultante da amplificação do cDNA de HUVEC utilizando os oligonucleotídeos KDR23 <i>forward</i> e KDR23 <i>reverse</i>	58
Figura 14: Análise eletroforética em gel de agarose a 1% do produto da digestão pJET1.2 + domínios 2 e 3 do KDR.....	59
Figura 15: Análise em banco de dados da sequência amplificada.....	60
Figura 16: Análise eletroforética em gel de agarose a 1%.....	61
Figura 17: Análise eletroforética em gel de agarose a 1% do produto da digestão do clone pET28a + domínios 2 e 3 do KDR pelas enzimas <i>NdeI</i> e <i>BamHI</i>	62

Figura 18: Expressão da proteína recombinante domínios 2 e 3 do KDR em função do tempo de indução com IPTG.....	63
Figura 19: Teste de solubilidade da proteína recombinante.....	64
Figura 20: Análise eletroforética em gel de agarose a 1% do DNA sintético correspondente aos domínios 2 e 3 do KDR.....	65
Figura 21: Análise eletroforética em gel de agarose a 1% do DNA sintético correspondente aos domínios 2 e 3 do KDR após alteração da temperatura de anelamento.....	66
Figura 22: Resultado da transformação do clone pGFPuv + <i>constructo</i> 2 e 3 do KDR em bactérias DH5 α na presença de ampicilina em meio de cultura.....	67
Figura 23: Análise eletroforética em gel de agarose a 1 %.....	68
Figura 24: Análise eletroforética em gel de agarose a 1% dos produtos da digestão enzimática <i>HindIII/XbaI</i> de pGFPuv + <i>constructo</i> 2 e 3 do KDR.....	69
Figura 25: Alinhamento da sequência projetada referente aos domínios 2 e 3 de KDR com a sequência obtida no sequenciamento da clonagem do <i>constructo</i> 2 e 3 do KDR em vetor pGFPuv.....	70
Figura 26: Análise gráfica das deleções (A) e das substituições (B) apresentadas na sequência sintética que codifica os domínios 2 e 3 do KDR.....	71

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a amplificação por meio de PCR.....	29
Tabela 2: Oligonucleotídeos sintéticos baseados no <i>GenBank</i> AAC16450.1 que codificam a sequência correspondente aos domínios 2 e 3 do KDR.....	46
Tabela 3. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a realização da mutagênese sítio dirigida.....	55

Nomenclatura, classificação e estrutura dos 20 aminoácidos encontrados em sistemas biológicos

Não polares

Aromáticos

Polares não carregados

Serina
(Ser)
(S)

Treonina
(Thr)
(T)

Cisteína
(Cys)
(C)

Glutamina
(Gln)
(Q)

Prolina
(Pro)
(P)

Asparagina
(Asn)
(N)

Positivamente carregados

Histidina
(His)
(H)

Lisina
(Lys)
(K)

Arginina
(Arg)
(R)

Negativamente carregados

Aspartato
(Asp)
(D)

Glutamato
(Glu)
(E)

RESUMO

Em condições patológicas como o câncer, a angiogênese, ou seja, o crescimento de novos vasos a partir de uma rede vascular pré-existente, resulta numa maior oxigenação e nutrição das células e, conseqüentemente, num rápido crescimento do tumor [1]. Uma variedade de fatores estimulam a angiogênese, entre eles o Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF) e seus receptores (VEGFR). O VEGF é uma proteína homodimérica cujas atividades biológicas são reguladas através da ligação com seu próprio receptor domínio quinase (*kinase domain receptor* – *KDR*). Dos sete domínios extracelulares de “*lg-like*” no KDR, apenas os domínios dois e três são necessários para uma ligação de alta afinidade com o VEGF. Yamazaki e colaboradores, em 2005, relataram que um componente protéico designado KDRbp (*KDR-binding protein*) da peçonha da serpente *Agkistrodon piscivorus piscivorus* liga-se ao domínio extracelular de KDR com alta afinidade, resultando no bloqueio subnanomolar de VEGF. Yamazaki *et.al.* demonstrou que KDRbp exibe a sequência de aminoácidos da região N-terminal e de fragmentos enzimaticamente digeridos da sequência peptídica de KDR-bp é idêntica a Lys-49-fosfolipase A_2 , um homólogo inativo da fosfolipase A_2 , no qual a Lys-49 substitui Asp-49. Diante disso, este trabalho teve por objetivo a síntese funcional de uma sequência de nucleotídeos correspondente aos domínios 2 e 3 do Receptor-2 do Fator do Crescimento Endotelial Vascular *in vitro* que, ao ser expressa em bactéria *Escherichia coli* (*E.coli*), permita aplicações otimizadas de seus *códons*.

O cDNA (HUVEC) de KDR que serviu de molde para a amplificação pela reação em cadeia da polimerase para a obtenção do DNA de 675 pares de bases (pb) que codificam 225 aminoácidos correspondentes aos domínios 2 e 3 de KDR. Visando a otimização do uso de *códons* da construção do DNA que podem prontamente aperfeiçoar os *códons* para a expressão da proteína em todo o organismo do hospedeiro, no caso, a bactéria *Escherichia coli* (*E.coli*), foi desenhada e sintetizada uma sequência codificadora para os domínios 2 e 3 do KDR (*constructo* 2 e 3 do KDR). O *constructo* 2 e 3 do KDR obtido por PCR foi expresso em *E.coli* BL21 usando o vetor de expressão pET28a.

A técnica de obtenção de uma sequência de nucleotídeos partindo do cDNA correspondente a sequência desejada é bastante utilizada por sua praticidade de manipulação e rapidez no resultado. A ORF (*open reading frame*) que codifica para a proteína de interesse foi clonada em vetor pET28a e a expressão foi induzida por IPTG. A análise da expressão foi monitorada e observado o sucesso devido a obtenção de proteína de 25 kDa expressos.

Palavras chave: Receptor Domínio Quinase (KDR); PLA2Lys49; Proteína.

ABSTRACT

In pathologic conditions as cancer, angiogenesis can be stimulated with new blood-vessel formation, oxygenation, and nutrition, leading to a rapid growth of tumor. A variety of factors can stimulate angiogenesis. Among these factors, there is vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors (VEGFR). VEGF is homodimeric protein which biological activities are regulated by their kinase domain receptor – KDR. From the seven KDR Ig-like domains, only domains 2 and 3 are necessary for a VEGF high-affinity binding. Yamazaki *et.al.* 2005, report that a protein component designated as KDR-binding protein (KDR-bp) from the venom of eastern cottonmouth (*Agkistrodon piscivorus piscivorus*) binds to high affinity extracellular KDR resulting in subnanomolar block of VEGF. Yamazaki *et.al.* demonstrated that KDR-bp exhibits the N-terminal amino acid sequence region, and enzymatically digested fragments of KDR-bp peptide sequence, which is identical to Lys-49-phospholipase A₂, an inactive homologue of phospholipase A₂ where Lys-49 replaces Asp-49. Herein, this work aimed the functional synthesis of a nucleotide sequence corresponding to domains 2 and 3 from Receptor-2 of vascular endothelial growth factor *in vitro* expressed in *Escherichia coli* (*E.coli*), it allows to applications optimized of its *códons*.

The cDNA (HUVEC) of KDR was used as amplification model by polymerase chain reaction to obtain the DNA of 675 base pairs that codify 225 amino acids related to domains 2 and 3 of KDR. A codifying sequence for domains 2 and 3 of KDR (construct 2/3 KDR) was designed and synthesized for optimal use of DNA construction codons, which are readily able to improve the expression codons of the proteins thorough the host organism, in this case bacteria *Escherichia coli* (*E.coli*). The construct2/3 KDR obtained by PCR was expressed in *E.coli* BL21 with expression vector pET28a.

The technique to obtain a nucleotide sequence from cDNA related to the desired sequence is largely used due to easy manipulation and rapid time to results. The codifying ORF (*open reading frame*) for the target protein was cloned in pET28a vector and expression was induced by IPTG. The expression analysis was monitored and success was observed due to 25 kDa of protein expressed.

Key words: Kinase Domain Receptor (KDR); PLA2Lys49; Protein.

INTRODUÇÃO

1.1. Angiogênese

O sistema circulatório nos vertebrados consiste em uma rede de vasos sanguíneos e é essencial para o desenvolvimento e manutenção de todos os tecidos do corpo. Através dos vasos sanguíneos os tecidos recebem oxigênio e nutrição, removem o dióxido de carbono (CO_2) e metabólitos finais tais como uréia e ácido láctico. Em condições patológicas como o câncer, a angiogênese, ou seja, o crescimento de novos vasos a partir de uma rede vascular pré-existente resulta numa maior oxigenação e nutrição das células e, conseqüentemente, num rápido crescimento do tumor [1].

A angiogênese envolve diferenciação, proliferação e migração das células endoteliais que conduzem a formação de uma nova rede de vasos [2] e está associada a diversos processos patológicos que incluem não somente o câncer, mas também a proliferação da retinopatia do diabético (complicação ocular da *Diabetes mellitus*) e degeneração macular. A angiogênese patológica necessária para a ativação do crescimento tumoral persiste com a aquisição inicial do fenótipo angiogênico que é um traço comum no mecanismo para o desenvolvimento de vários tipos de tumores sólidos e hematopoiéticos [3, 4]. Nas últimas décadas, estudos revelaram uma variedade de fatores que estimulam a angiogênese, entre eles o Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF) e seus receptores (VEGFR) [5].

O VEGF é um polipeptídeo que exerce potente efeito sobre o sistema vascular, incluindo a habilidade de induzir o crescimento de novos vasos sanguíneos, o aumento da permeabilidade vascular e de edema [6], resultando em extensão do tecido atingido pela isquemia após um infarto do miocárdio [7]. VEGF

consiste, portanto, num fator específico e crítico para as células endoteliais vasculares que se derivaram de artérias, veias e vasos linfáticos, pois induz a angiogênese, aumentando a oxigenação e a disponibilidade nutritiva para a proliferação do tumor. A angiogênese, por sua vez, induz a microvascularização que se expande pelos tecidos e forma estruturas capilares no colágeno [7].

No câncer, o rompimento da proteína VEGF da barreira vascular pode potencializar o extravasamento das células cancerígenas, causando metástase difundida. Dessa forma, a obstrução da permeabilidade vascular promove inibição dos efeitos de VEGF que podem reduzir ferimentos do tecido após a doença isquêmica e minimizar as propriedades invasoras das células do tumor [7].

Estudos mostram que a maioria dos agentes que inibem o VEGF ou seus receptores são bem tolerados, tanto em monoterapias como em combinação com a quimioterapia padrão [8]. Assim, os inibidores de VEGF e VEGFR são extensamente usados para controle de uma variedade de tumores no mundo todo. Entretanto, após tratamento extensivo, o tecido e os vasos do tumor podem sofrer mudanças e adquirir resistência a estas drogas [9].

1.2. Fator do Crescimento Endotelial Vascular (VEGF)

O VEGF também estimula a vasculogênese (desenvolvimento de novos vasos durante a fase embrionária), regula a vascularização, age como um fator vascular de permeabilidade e remodelador angiogênico e promove a sobrevivência de células endoteliais, evitando a apoptose destas células e a regressão dos vasos [10]. Além disso, tem um papel crítico no desenvolvimento e na manutenção da rede vascular de tumores que, por sua vez, expressam o VEGF promovendo o crescimento e a

metástase tumoral. Embora o VEGF induza a angiogênese, ele também auxilia na desobstrução da barreira vascular em doenças teciduais [11]. A mediação do VEGF na permeabilidade vascular direciona o acúmulo de barreira de fibrina em torno do tumor e circunda com limites as propriedades malignas desse tecido. O crescimento do tumor é atenuado *in vivo* por antibióticos anti-VEGF, já que VEGF reduz a isquemia e o edema [7].

O fator do crescimento endotelial vascular, ao contrário de outros fatores de crescimento, é capaz de induzir o extravasamento de proteína e, provavelmente, suas propriedades angiogênicas são mediadas, em parte, como indução do escape de proteínas do plasma, conforme proposto por investigações precedentes que revelaram um aumento na permeabilidade microvascular como etapa crucial na angiogênese associada a tumores e feridas [7]. A distribuição do tecido de receptores de VEGF inclui células do músculo vascular liso, osteoblastos, miócitos cardíacos, miofibroblastos, neurônios e várias células tumorais [12].

A família de VEGF pertence a mesma superfamília do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e os membros dessa família possuem estrutura homodimérica com 8 resíduos conservados de cisteína em um peptídeo monomérico. A família de VEGF tem 7 membros: VEGF-A (também comumente conhecido como VEGF) [13], VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, fatores 1 e 2 do crescimento (PlGF-1 e PlGF-2) e VEGFs derivados do veneno de serpentes, tal como “*T.f.*” (*Trimeresurus flavoviridis*) svVEGF. Todos os membros, exceto VEGF-E e o svVEGF, são codificados no genoma mamífero. VEGF-A desenvolve um papel importante na vasculogênese e na formação de vasos sanguíneos de células progenitoras, assim como na angiogênese [1]. VEGF-C e VEGF-D são os ligantes de VEGFR-3, o qual é expresso predominantemente no endotélio linfático. Estudos em

modelos experimentais esclareceram que VEGF-C e VEGF-D promovem o linfangiogênese do tumor e a metástase linfática. As famílias do VEGF e de VEGFR é o sistema responsável pela regulação do endotélio vascular e linfático e igualmente exercem um papel chave na formação do tumor com a ativação da angiogênese e da linfangiogênese [8].

O gene humano de VEGF-A é situado no cromossomo 6p21.3 e organizado em 8 *éxons*, separados por 7 *íntrons*. O processamento do transcrito de um único gene de VEGF pode resultar na produção de 6 isoformas: VEGF121, VEGF145, VEGF165, VEGF183, VEGF189 e VEGF206 [8]. VEGF121 é deficiente na atividade de ligação com heparina por causa de sua propriedade ácida, estando livre para difundir no espaço extracelular. Devido à sua atividade e potência biológica, VEGF165 é a isoforma predominante de VEGF. Embora VEGF165 seja segregado igualmente, uma fração significativa está limitada à superfície da célula e à matriz extracelular (ECM). A maior parte de VEGF189 e VEGF206 é destinada a ECM por causa de sua afinidade elevada pela heparina. Outra isoforma biologicamente ativa, VEGF145, tem sido identificada recentemente [8].

VEGF-A é produzido por células malignas e não-malignas em resposta a hipóxia, inflamação, fatores de crescimento e citocinas [8] e consiste numa proteína homodimérica (**Figura 1**) cujas atividades biológicas são reguladas através da ligação com seu próprio receptor domínio quinase (*kinase domain receptor* - KDR) [10].

Fonte: <http://www.uff.br/rvq/article/viewArticle/62/108>

Figura 1: Representações da fita dos domínios do receptor de VEGF-A. Proteína homodimérica da família dos fatores de crescimento da cistina, com homologia limitada da sequência do fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGF).

Os efeitos biológicos do VEGF-A parecem ser exercidos, principalmente, por meio da ligação ao receptor-2, que é expresso, predominantemente, nas células endoteliais vasculares (**Figura 2**).

Fonte: <http://pymol.sourceforge.net/>

Figura 2: Representação em fita da estrutura da proteína VEGFR-2. Em ambas as figuras A e B, azul e verde representam o dímero de VEGF-A, amarelo e roxo representam o domínio 2 de KDR (cada monômero de VEGF-A contribui para a ligação ao KDR).

1.3. Receptores do Fator do Crescimento Endotelial Vascular (VEGFR)

Os receptores de VEGF pertencem a uma subfamília dos receptores tirosina quinase (RTK) [14] e são classificados em três: VEGFR-1 (Flt-1), um fraco estimulador da angiogênese; VEGFR-2 (KDR ou Flk-1), o mais importante para a angiogênese e VEGFR-3, ligado à proliferação dos vasos linfáticos [5, 15].

Nos seres humanos, VEGFR-1 e VEGFR-2 são compostos por 1338 e 1356 aminoácidos, respectivamente, e são constituídos por quatro regiões: o domínio ligante-ligante extracelular, o domínio transmembrana, o domínio da tirosina quinase e a região carboxiterminal. VEGFR-1 e VEGFR-2 são homólogos em sua estrutura e os domínios extracelulares dos VEGFR apresentam homologia às porções variáveis das imunoglobulinas (“Ig-like”) [15, 16].

Fuh *et al* mostraram, em 1998, que duas moléculas de KDR ligam-se a um dímero de VEGF e que a dimerização é o mecanismo clássico de ativação do receptor tirosina quinase (Figura 2). Os receptores tirosina quinases interagem com o fator estimulador de formação de colônias de macrófagos (M-CSF) e *steel factor* (fator de célula-tronco). A interação ocasiona uma dimerização do receptor tirosina quinase, permitindo que os seus dois domínios citoplasmáticos fosforilem-se, um ao outro, em múltiplos resíduos tirosina. Quando VEGF-A tem somente uma região obrigatoriamente funcional, não pode dimerizar o receptor *in vitro* [17].

Experimentos com KDR indicaram que, dos sete domínios extracelulares de “Ig-like”, apenas os domínios dois e três são necessários para uma ligação de alta afinidade com o VEGF-A [18]. O segundo e o terceiro domínios extracelulares semelhantes à imunoglobulina estão associados com a ligação ao VEGF-A,

enquanto os domínios quatro a sete estão envolvidos na dimerização. A ligação do VEGF-A ao receptor-2 e a consequente homodimerização do receptor são essenciais para estimular a sinalização intracelular, o que é vital para a atividade do VEGF-A. O receptor-2 do VEGF também é receptor do VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E e VEGF-F embora o significado fisiológico destes ainda esteja pouco definido (Figura 3) [16].

Fonte: Tammela, T., *et al.*, 2005.

Figura 3: Família de VEGF e seus receptores (VEGFR). Os VEGFR são caracterizados por sete imunoglobulinas (“Ig-like”) como domínios extracelulares e um domínio intracelular do tipo tirosina quinase. VEGF-A liga-se e ativa VEGFR-1 e VEGFR-2, mas não VEGFR-3.

1.4. Inibidores do Fator do Crescimento Endotelial Vascular

O VEGF e seu receptor KDR são reguladores centrais para a formação de vasos sanguíneos [19]. Várias alternativas terapêuticas para antagonizar ou inibir a função do VEGF estão sendo atualmente investigadas. Algumas delas já estão na fase III dos ensaios clínicos e sua combinação com agentes quimioterápicos também

está sendo estudada [8]. Os tratamentos incluem grandes moléculas, tais como anticorpos de inibição de VEGF e dos VEGFR, além de formas solúveis dos VEGFR, peptídeos e moléculas pequenas, tais como inibidores do transporte de transdução do sinal [8].

Yamazaki *et al*, em 2005, relataram que um componente protéico designado KDRbp (KDR-binding protein) da peçonha da serpente *Agkistrodon piscivorus piscivorus* liga-se ao domínio extracelular de KDR com alta afinidade, resultando no bloqueio subnanomolar de VEGF. Neste estudo, Yamazaki demonstrou que a sequência de aminoácidos da região N-terminal e os fragmentos enzimaticamente digeridos da sequência peptídica de KDR-bp são idênticos aos da Lys49-fosfolipase A2, um homólogo inativo da fosfolipase A2, no qual a Lys49 substitui Asp49 [19].

As fosfolipases A2 são enzimas interfaciais que catalisam especificamente a hidrólise das ligações ácido-éster na posição *sn*-2 de glicerofosfolipídios liberando, como produto da hidrólise, ácidos graxos e lisofosfolipídio [20]. As PLA2 são encontradas na natureza tanto intra como extracelularmente, apresentando diversas funções desde danificação das membranas celulares, como é o caso das PLA2 dos venenos, até uma função no padrão da regulação da resposta inflamatória e agregação de plaquetas como, por exemplo, as PLA2 de mamíferos [21]. A bothropstoxina I (BthTx-I) é uma Lys49PLA2 isolada do veneno de *Bothrops jararacussu* que apresenta uma substituição do aminoácido ácido aspártico por lisina na posição 49 do sítio ativo, impedindo a ligação do co-fator Ca^{2+} , com a consequente perda do ciclo catalítico produtivo. As Lys49PLA2 existem na forma homodimérica em solução no pH 7,0 [22, 23] e a estabilização do dímero são devidas às interações hidrofóbicas e eletrostáticas entre os aminoácidos Glu12,

Trp77 e Lys80 de cada monômero [24].

Considerando-se este fato, supõe-se que a ligação de Lys49PLA2 ao KDR também não é diretamente dependente do aminoácido na posição 49, sendo, portanto, independente da atividade fosfolipásica. Apesar da ausência da atividade catalítica, as Lys49PLA2 apresentam propriedades farmacológicas variadas como miotoxicidade [25], formação de edema, neurotoxicidade pré e pós-sináptica, cardiotoxicidade, agregação de plaquetas [26] e atividade bactericida [11]. Embora sejam ainda pouco conhecidos os mecanismos através dos quais as PLA2s causam tais efeitos, sabe-se que a função catalítica não é necessária para algumas destas propriedades farmacológicas. Embora seja desconhecido se KDR está envolvido na manifestação de miotoxicidade e no efeito de edema das Lys49PLA2 [19], a interação proteína/receptor pode ser estudada por métodos de clonagem de proteínas.

1.5. Sequências codificadoras de proteínas

Em Genética Molecular, uma *open reading frame* (ORF) é uma porção do organismo do genoma que contém uma sequência de bases que poderiam potencialmente codificar uma proteína, ou seja, a região do gene que vai desde o primeiro ATG a ser traduzido até o códon de terminação. Os pontos de início e fim de uma dada ORF não são equivalentes as extremidades do RNA mensageiro (mRNA), mas estão, normalmente, contidas na sequência do mesmo. Dentro de um gene, ORFs estão localizadas entre o início (iniciação do *códon*) e o fim (*terminal do códon*) do código sequencial [27].

A existência de uma ORF, especialmente quando extensa, geralmente é uma boa indicação da presença de um gene na sequência. Neste caso, a região terminal é parte da sequência que será traduzida pelo ribossomo, e se o DNA for eucarioto, a região terminal poderá apresentar lacunas chamadas *íntrons*. No entanto, ORF curtas também podem ocorrer com pequena frequência fora dos genes. Normalmente, ORF fora dos genes não são muito longas e terminam após alguns *códons* [28].

É comum, nos eucariotos, que a ORF seja interrompida por um ou mais trechos de DNA não posteriormente traduzidos, pois serão retirados do conjunto do processo de maturação do mRNA. Este mecanismo de retirada de segmentos de DNA não codificantes, chamados *íntrons*, é conhecido como *splicing* [27].

1.6. Sequências codificadoras de proteínas sintéticas

O DNA complementar (cDNA) é uma molécula de DNA sem *íntrons*, diretamente transcrita de uma molécula de mRNA funcional. O processo de cDNA passa pelo isolamento de uma molécula de mRNA funcional das células, adição de transcriptase reversa (que cataliza a síntese de uma cadeia simples de DNA a partir de um molde de mRNA), nucleotídeos livres e a união de uma enzima que degrada o mRNA que serviu de molde com DNA polimerase capaz de catalisar a formação da cadeia complementar de DNA [29].

Em 1977, quando cientistas produziram a primeira proteína humana em uma bactéria, a expressão das proteínas em sistemas heterólogos introduziu um papel crucial na indústria biotecnológica. Até então, somente a sequência de aminoácidos

da somatostatina fora descoberta, o que ocorreu após a síntese do gene da somatostatina usando oligonucleotídeos em vez de clonagem de genoma humano [30].

Anos mais tarde, a maioria dos genes passaram a ser clonados de bibliotecas de cDNA ou diretamente por meio da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) do organismo de origem [28].

Como todas as outras formas de informação, o DNA pode ser escrito e lido, e sua leitura é feita por meio do arranjo de sua sequência e sua escritura é feita pela síntese do gene. Durante a última década, a Biologia Molecular focalizou em ler e em analisar sequências naturais do DNA. Em contraste, o campo emergente da Biologia Sintética busca descobrir informações genéticas, criando desse modo genes artificiais, proteínas, processos biológicos e organismos [31].

O uso dos *códons* de uma ORF pode causar limitações na expressão heteróloga de uma proteína, especialmente nos casos onde os genes externos são expressos em um hospedeiro em que o uso dos *códons* em genes altamente expressados em bactéria não se assemelha ao uso dos *códons* na espécie do qual o gene estrangeiro foi originado [32]. Nesses casos, a substituição de *códons* raros no gene introduzido pode aumentar o rendimento consideravelmente. Além disso, a re-colocação de *códons* raros pode diminuir a possibilidade de incorporações inadequadas e proteger a proteína do renovelamento precoce [32].

O nível de expressão de proteínas é uma causa determinante para o uso de *códons* em todas as espécies estudadas até agora, já que os *códons* são sempre utilizados na transcrição de mRNA; os genes que são altamente expressos tendem a usar uma pequena quantidade de *códons* que correspondem a espécie mais

abundante do tRNA. Isto minimiza o risco de deleção do tRNA durante a tradução. Este fenômeno é de importância prática para a expressão, especialmente quando o gene expresso tiver muitos *códons* que são usados raramente no hospedeiro. Nesses casos, os *códons* (ou a disponibilidade de tRNA) podem ser fatores limitantes para o rendimento. Para superar este problema, os *códons* raros presentes no gene podem ser substituídos por *códons* que correspondem à espécie mais abundante do tRNA, aumentando, assim, o rendimento da expressão da proteína [32]. A espécie que utiliza *códon* como estratégia de otimização provou ser útil para expandir a expressão e inclui tanto procariotos quanto eucariotos uni e multicelulares. Além disso, o uso de *códons* raros pode ter consequências negativas para a expressão, à exceção apenas da quantidade de proteína obtida. A qualidade da proteína expressa é dependente dos *códons*, porque os *códons* raros são associados a uma maior possibilidade de incorporações errôneas. Diversas pesquisas relatam a qualidade diminuída do produto expresso devido aos *códons* raros. Em resumo, existem argumentos suficientes para substituir *códons* raros para expressão [32].

Visando a otimização dos *códons* para a expressão da proteína em bactéria *Escherichia coli* (*E.coli*), foi desenhada e sintetizada uma sequência codificadora para os domínios 2 e 3 do KDR (*constructo 2 e 3 do KDR*), com a finalidade de alcançar resultados experimentais similares aos obtidos com o produto da amplificação do cDNA de *Human Umbilical Vein Endothelial Cells* (HUVEC) do KDR.

OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Este trabalho teve por objetivo a síntese funcional de uma sequência de nucleotídeos correspondente aos domínios 2 e 3 do Receptor-2 do Fator do Crescimento Endotelial Vascular *in vitro* que, ao ser expressa em bactéria *Escherichia coli* (*E.coli*), permita aplicações otimizadas de seus *códons*.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Amplificação da sequência correspondente aos domínios 2 e 3 do KDR, tendo como respaldo a sequência de VEGFR-2 encontrada no *GenBank* AAC16450.1;
- ✓ Clonagem do produto da reação de amplificação correspondente a sequência dos domínios 2 e 3 do KDR em vetor de clonagem pJETTM1.2;
- ✓ Sub-clonagem da sequência correspondente aos domínios 2 e 3 do KDR em vetor de expressão pET28a;
- ✓ Expressão da proteína correspondente aos domínios 2 e 3 do KDR em *E.coli*;
- ✓ Construção da sequência codificadora sintética correspondente ao DNA dos domínios 2 e 3 do KDR;
- ✓ Alteração das regiões flangeadoras da sequência dos domínios 2 e 3 do KDR para a inserção dos sítios de clivagem pelas enzimas de restrição *HindIII* e *XbaI*;
- ✓ Clonagem da sequência codificadora sintética dos domínios 2 e 3 do KDR em vetor de expressão pET28a.

MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. cDNA do transcrito que codifica para o VEGF

O processo se inicia pela extração do mRNA. Do ponto de vista bioquímico, este processo é semelhante ao processo de extração de DNA, porém o RNA é muito lábil, sujeito a ação das RNase do próprio organismo e de praticamente qualquer fluido biológico, inclusive a água não auto-clavada. Tomadas as devidas precauções, pode-se obter uma apreciável quantidade de RNA praticamente a partir de qualquer célula eucariota.

O procedimento adotado pelo laboratório coordenado pela pesquisadora do Centro Regional de Hemoterapia do Hemocentro de Ribeirão Preto e Professora Doutora da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo – FMRP/USP, Aparecida Maria Fontes, para a produção de DNA de fita dupla a partir de mRNA, a primeira etapa de construção envolve a produção de um DNA complementar utilizando a técnica de RT-PCR. Neste procedimento, inicialmente foi sintetizada a fita simples de cDNA, utilizando o kit *ThermoScript RT-PCR System* (Invitrogen), com o iniciador oligo (dT), conforme resumidamente descrito abaixo:

Foram utilizados 4 µg de RNA total obtidos a partir de HUVEC (*Human Umbilical Vein Endothelial Cells*), 1 µL do oligo iniciador 50 pmol/µL, 10 mM de dNTP e água livre de RNase, para um volume final de 12 µL. Esta mistura foi incubada por 5 min. a 65 °C, seguido de banho de gelo por 3 min. Em seguida, foi adicionado tampão 5 vezes concentrado em relação a concentração final da enzima transcriptase reversa, 0.1 M de DTT, RNA 40 U/µL e água livre de RNase. Posteriormente, a amostra foi transferida para um termociclador, incubada por 60 min. a 50 °C e a reação foi interrompida por incubação a 85 °C durante 5 min. Por

fim, foi adicionada a amostra 1 μL de RNase, seguido de incubação por 20 min. a 37 °C. A amostra foi armazenada a uma temperatura de -20 °C até o momento de uso.

3.2. Idealização dos oligonucleotídeos iniciadores para a amplificação do cDNA

Com base na sequência de DNA correspondente aos domínios 2 e 3 do KDR que possui 225 aminoácidos, foram idealizados os oligonucleotídeos iniciadores, tendo como referência a sequência encontrada no *GenBank* AAC16450.1 para amplificar a matriz de leitura aberta (ORF) predita do gene a ser estudado (**Tabela 1**).

Tabela 1. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a amplificação por meio de PCR.

Nome do Primer	Sequência do primer	Temperatura de anelamento
KDR23F	5'-TACCGGGAAACTCATATGGCCTCGGTC-3'	73 °C
KDR23R	5'-GGCTTCCACCAGGGATCCTTAGCCACTTCC-3'	76 °C

Para a amplificação do cDNA foi utilizado o programa AMP1: desnaturação a 95 °C/1minuto; anelamento a 50 °C/1 minuto e extensão a 72 °C/2 min.

3.3. Obtenção do DNA referente aos domínios 2 e 3 do KDR partindo do cDNA por PCR

Os componentes envolvidos nesta reação são basicamente os mesmos do

processo de replicação que ocorre no interior das células: DNA que contém o segmento a ser amplificado, nucleotídeos (A, T, C e G), enzima DNA polimerase e dois iniciadores (pequenos oligonucleotídeos complementares ao DNA alvo). A reação ocorre em um termociclador que, por meio de sucessivas mudanças de temperatura, direciona as três etapas da reação:

1. Desnaturação: ocorre a separação da dupla fita de DNA molde por meio da elevação da temperatura para 94 °C.

2. Anelamento: uma vez separadas as fitas de DNA, a temperatura da reação é reduzida para 50 °C e os iniciadores anelam-se um em cada fita molde, nas respectivas sequências complementares vizinhas à região alvo da amplificação.

3. Extensão: eleva-se a temperatura para 72 °C para que a enzima Taq DNA polimerase posicione-se junto aos iniciadores que se anelaram anteriormente e inicie a duplicação da fita molde, adicionando os nucleotídeos que contenham as bases nitrogenadas complementares à fita molde.

Após o término destes passos, todo o ciclo é repetido (desnaturação a extensão) por várias vezes até que se obtenha uma quantidade razoável do DNA a ser amplificado.

Foram realizadas amplificações utilizando cDNA (HUVEC) de KDR, combinado com os oligonucleotídeos específicos para a obtenção do gene em estudo nesse trabalho (Tabela 1). Especificamente para a reação desta etapa, foi utilizado um programa de amplificação com 30 ciclos, cada um composto de uma etapa de desnaturação durante 1 min. a 95 °C, uma de anelamento durante 1 min. a 50 °C e uma de extensão durante 2 min. a 72 °C, utilizando a enzima Taq DNA

Polimerase (Invitrogen).

3.4. Análise do produto de amplificação no gel de agarose

O produto da reação de amplificação por meio de RT-PCR do DNA correspondente aos domínios 2 e 3 do KDR foi aplicado em gel de agarose 1% e a banda de DNA de interesse de 700 pb foi identificada através da marcação com brometo de etídeo (0.5 mg/mL) e, com um corte usando bisturi, foi isolada do gel para ser purificada.

3.5. Purificação do produto de PCR

Na solubilização do gel de agarose, para cada unidade (massa) de gel foram adicionados três volumes de tampão de ligação (3:1 massa/volume) e a mistura foi incubada por 15 min. a 55 °C, agitando-se levemente a cada minuto. Em seguida, foi adicionado o volume de 500 mL de etanol anidro e o tubo contendo a amostra, que possui uma coluna de purificação, foi agitado várias vezes. Após a centrifugação por 1 minuto a 12000 rpm, o sobrenadante foi descartado. A coluna foi lavada com 700 µL de tampão de lavagem (solução tamponada), centrifugada novamente por 1 minuto a 10000 rpm e o processo repetido para a retirada do tampão de lavagem residual. A coluna foi inserida em um novo tubo de 1.5 mL e a amostra de DNA foi eluída pela adição de 30 µL de tampão de eluição (10 mM Tris, pH 8,0). Após incubação por 1 minuto a temperatura ambiente, a amostra foi centrifugada por 1 minuto a 10000 rpm. O DNA eluído foi armazenado a -20 °C.

3.6. Clonagem no vetor pJET™

O kit de clonagem CloneJET™PCR é um sistema avançado de seleção positiva para a clonagem de elevada eficiência de produtos de PCR gerados com a polimerase de DNA *Pfu*, a Taq Polimerase de DNA ou outras polimerases de DNA termoestáveis. Adicionalmente, todos os outros fragmentos do DNA, “*blunt*” (corte cego) ou “*sticky-end*” (corte coesivo), podem ser clonados com sucesso usando o kit. A vantagem deste sistema é a clonagem feita de forma rápida e eficiente.

A reação de amplificação foi feita utilizando a Taq DNA Polimerase True Start (Fermentas) que adiciona um nucleotídeo A ao final da extremidade 3' (3'-dA). Para a retirada de 3'-dA, foi realizada uma reação com por 10 µL de tampão de reação 2X, 2 µL do produto purificado de PCR (etapa 3.4), 1 µL da enzima DNA *blunting* e 17 µL de água esterilizada. Esta reação foi incubada a 70 °C por 5 min. e resfriada brevemente em banho de gelo.

Para a realização da reação de ligação, utilizou-se 1 µL do vetor de clonagem pJET1.2/*blunt* (50 ng/µL) e 1 µL da enzima T4 DNA ligase (5 U/µL), seguida de incubação durante 5 min. a 22 °C, cujo rendimento de clones positivos foi superior a 99%. O kit caracteriza um vetor positivo pJET1.2/*blunt* de seleção de clonagem. O vetor contém o gene letal da enzima limitante que é interrompido pela ligação de uma inserção do DNA no local de clonagem. Em consequência, somente as células com plasmídeo de recombinação podem propagar. Este vetor contém o promotor T7 para a transcrição da inserção *in vitro* (**Figura 4**).

Fonte: <http://www.fermentas.com/catalog/kits/clonejetpcrclon.htm>

Figura 4: Vetor pJETTM1.2/*blunt* usado no sistema de seleção positiva para clonagem de elevada eficiência de produtos de PCR gerados com a polimerase de DNA *Pfu*, a Taq Polimerase de DNA ou outras polimerases de DNA termoestáveis.

De acordo com tais características, visando otimizar a obtenção de clones positivos, o fragmento de cDNA, devidamente purificado, foi ligado em vetor pJETTM, conforme as especificações do fabricante. O volume de 30 µL da reação de ligação foi utilizado no procedimento de transformação em células da linhagem DH5a.

3.7. Preparo das células DH5a competentes

Inicialmente uma amostra de um estoque de células foi inoculada em placa contendo meio LB sólido (triptona 0.5%; extrato de levedura 0.5%; NaCl 1% e ágar 1.5%) e incubada por 12 h a 37 °C. Uma colônia dessa placa foi lançada em 5 mL de meio LB líquido (triptona 0.5%; extrato de levedura 0.5% e NaCl 1%) e incubada por mais 12 h sob agitação de 180 rpm e 37 °C, para o crescimento na forma de pré-

inóculo. O pré-inóculo foi lançado em 500 mL de meio LB líquido e incubado novamente sob as mesmas condições de agitação e temperatura. O crescimento das células foi monitorado em espectrofotômetro até a cultura ter atingido a densidade óptica de 0.3 em 600 nm, o que corresponde uma densidade celular de 3×10^7 UFC/mL [33].

As células foram então transferidas para dois tubos de centrifuga, incubadas em banho de gelo por 5 min, centrifugadas a 12000 rpm por 10 min na temperatura de 4°C (Solvall 5C 5B). O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi re-suspenso em 100 mL de tampão de competência (CaCl₂ 60 mM, PIPES 10 mM e glicerol 15%). Seguiu-se, então, mais uma etapa de centrifugação e de re-suspensão do precipitado sob as condições descritas anteriormente, sendo que, posteriormente, as células foram incubadas em banho de gelo por 30 min. Após uma nova centrifugação, o precipitado foi re-suspenso em 12 mL de tampão e as células foram distribuídas em alíquotas de 300 µL e estocadas a -70 °C.

3.8. Transformação Bacteriana (*E. coli* DH5a)

O fenômeno conhecido como transformação bacteriana é de importância central na Biologia Molecular. Por esse processo, é possível a introdução de plasmídeos carregando genes de outros organismos fabricados ou naturais dentro das bactérias, que podem então expressar estes genes [34]. O processo de transformação envolve a introdução de DNA exógeno nas células bacterianas e este DNA passa então a fazer parte do material genético da bactéria, podendo ser herdado pelas novas células todas as vezes que a bactéria se multiplicar. Através da

manipulação genética pode-se criar um caráter presente na bactéria que passará a ser hereditário. No entanto, para permitir que o DNA plasmidial seja inserido nas

células bacterianas, estas devem apresentar condições fisiológicas especiais. Este estado fisiológico especial é chamado de competência. Uma bactéria competente é aquela que está apta a receber DNA exógeno.

A competência pode ocorrer naturalmente ou pode ser produzida através de diferentes técnicas. Estas técnicas envolvem tratamento com cloreto de cálcio e mudanças bruscas de temperatura. Os íons de metal e as mudanças bruscas de temperatura alteram a permeabilidade da parede celular fazendo com que estas células permitam a entrada de DNA exógeno através da membrana celular. As bactérias competentes são bastante frágeis e devem ser manuseadas com cuidado. A quantidade de células transformadas por 1 µg de DNA é chamada eficiência da transformação [34]. Na prática, pequena quantidade de DNA é usada (5 a 100 ng) uma vez que muito DNA pode inibir a transformação.

A transformação celular foi feita conforme protocolo estabelecido pelo Laboratório de Estrutura e Função de Proteína (LEFP) do Departamento de Química da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo – FFCLRP/USP: para 200 µL de células competentes com densidade óptica (D.O.) de 0.6, foram adicionados 30 µL da ligação pJET™/domínios 2/3 do KDR. Outra reação foi realizada, paralelamente, com a mesma mistura presente, exceto o DNA plasmidial, e esta foi utilizada como controle negativo para o experimento.

Cada uma das misturas foi submetida a um ciclo térmico (30 min em banho de gelo, 90 s a 42 °C, 2 min em banho de gelo) e, então, adicionou-se para cada reação 900 µL de meio LB líquido e 10 µL de glicose 2 mM. As misturas foram

incubadas por 1 h a 200 rpm e 37 °C, para regeneração das células. Após a regeneração das células transformadas e centrifugadas, retirou-se 900 µL do

sobrenadante, o pellet de bactéria foi re-suspenso e, enfim, lançado em placa contendo meio LB sólido e 100 µg/mL de ampicilina (para seleção do plasmídeo em bactérias gram-positivas), sendo incubados para crescimento por 12 h a 37 °C.

3.9. Extração do DNA plasmidial

Após o crescimento das células transformadas em placa de Petri, uma colônia foi inoculada em 3 mL de meio LB líquido com 100 µg/mL de ampicilina e cultivada por 12 h. A cultura foi centrifugada por 5 min a 12000 rpm e o sobrenadante foi descartado. O precipitado celular foi re-suspendido em tampão GET (Tris 25 mM; pH 8,0; glicose 50 mM; EDTA 10 mM), seguido da adição de 200 µL da solução de lise (NaOH 0.2 N; SDS; pH 7,2) e 150 µL de C₂H₃KO₂ 3 M. Centrifugou-se a amostra por 10 min. a 12000 rpm, transferiu-se o sobrenadante para tubos limpos, adicionou-se 1 mL de etanol absoluto e, então, tais tubos foram deixados à -70 °C por 1 h.

Em seguida, centrifugou-se a amostra por 5 min. a 12000 rpm. Ao precipitado, adicionou-se 1 mL de etanol 70%, centrifugou-se sob as mesmas condições, e mais uma vez descartou-se o sobrenadante. Em seguida, esperou-se que o precipitado secasse totalmente a temperatura ambiente, para então ser re-suspendido em 100 µL de RNase (200 µg/mL) e incubado a 37 °C por 3 h. Adicionou-se 50 µL de fenol equilibrado com Tris-HCl pH 8,0 e, após centrifugação, por 10 min. a 12000 rpm, a fase aquosa foi transferida para um novo tubo.

A precipitação do DNA foi realizada adicionando-se 10% de acetato de sódio 3 M (pH 5,2) correspondente a 10% do volume da amostra e 2,5 vezes o volume da amostra de etanol absoluto gelado. A mistura foi deixada por 1 h a -70 °C, e posteriormente foi centrifugada por 10 min a 12000 rpm com descarte do sobrenadante. O precipitado foi lavado com 1 mL de etanol 70%, centrifugado, e após novo descarte do sobrenadante, secado por 5 min a 65 °C, sendo re-suspendido em 20 µL de TE (Tris 10 mM; pH 8,0; EDTA 1 mM).

3.10. Sequenciamento de nucleotídeos de DNA

Após extração do DNA plasmidial foi realizado as reações para sequenciamento automático (Sequenciador ABI 377-18) utilizando-se o kit (ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reacton, com AmpliTaq DNA Polymerase, FS – *Perkin-Elmer*). Misturou-se 1 µL de solução “Big Dye” (mix contendo; finalizador A-Dye marcado com dicloro[R6G], finalizador C-Dye marcado com dicloro[ROX], finalizador G-Dye marcado com dicloro[R110], finalizador T-Dye marcado com dicloro[TAMRA], desoxinucleosídeos trifosfatos (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), DNA polimerase AmpliTaq, com pirofosfatase termoestável), 3 µL de tampão 2,5 X (200 mM Tris; 5 mM MgCl₂; pH 9,0), 200 ng de DNA, 3-5 pMoles do iniciador para seqüenciamento opcional 5’ ou 3’ do gene, completando o volume final de 10 µL com água esterilizada.

Em seguida, a solução foi deixada sob as seguintes condições em termociclador: 1 – 96 °C por 2 min, 2 – 50 °C por 15 s, 3 – 60 °C por 4 min. Os ciclos

de 1 a 3 foram repetidos 40X, e após o final da polimerização, a temperatura foi estabilizada a 10 °C. As amostras foram precipitadas e lavadas, para isso transferiu-se o volume das reações para recipientes de maior volume (1,5 mL), onde foram adicionados 80 µL de isopropanol 75%, misturou-se e deixou-se incubando por 15

min a temperatura ambiente. Fez-se uma centrifugação por 20 min a 12000 rpm e descartou-se o sobrenadante e ao precipitado foi adicionado 1 mL de etanol 70%, centrifugado novamente por 10 min a 12000 rpm descartando-se novamente o sobrenadante e o precipitado foi deixado secar por alguns min, sendo re-suspendido em 4 µL de tampão “Loading 2x formamida” (10X TBE; 90% formamida e 0,5% azul de bromofenol), e incubado a 96 °C por 2 min. As amostras foram aplicadas em gel de sequenciamento padrão 4.25% (18 g uréia; 5,3 mL acrilamida 40%; 0,5 g de resina; 5 mL TBE 10X, 250 µL APS 10% e 35 µL de TEMED) e analisadas, após corrida durante 2 h no sequenciador automático ABI 377-18.

Os plasmídeos foram sequenciados nas direções “*forward*” e “*reverse*” com o auxílio dos oligonucleotídeos iniciadores pJET1.2 Forward Sequencing Primer 5'-CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC-3' e pJET1.2 Reverse Sequencing Primer 5'-AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG-3'.

3.11. Digestão enzimática do vetor pJET™ + domínios 2 e 3 do KDR com *NdeI* e *BamHI*

A digestão da dupla fita do fragmento amplificado e do vetor foi realizada a 37 °C durante 4 h com 5 U da enzima *NdeI* e 5 U da enzima *BamHI* (Fermentas), formando extremidades coesivas, isto é, deixando bases despareadas, em uma das

extremidades (*overhang*) 5' [35]. Em seguida, foi inativada por aquecimento a 85 °C por 20 min. O DNA digerido foi aplicado em gel de agarose 1 % e purificada com uso do *kit GENE CLEAN – MP Biomedicals USA*, segundo as normas do fabricante, e re-suspendida em 30 µL de água esterilizada para, então, sub-clonar o fragmento em

vetor de pET28a.

3.12. Clonagem da sequência codificadora em vetor pET28a (Novagen) para expressão em sistema bacteriano

3.12.1. Características do vetor pET28a

O vetor pET28a (**Figura 5**) possui duas sequências que codificam caudas de histidina tanto na região N-terminal quanto na região C-terminal da proteína, uma origem de replicação (455 pb), as regiões do promotor, a sequência referente ao *operon* da lactose, *lac I* (1079 pb) e o gene que confere resistência a Kanamicina (812pb). Os promotores do T7 RNAPolimerase consistem em uma sequência altamente conservada de 23 pb que marca o local da iniciação da transcrição (+1) e estende por 3'-17 a 5'+6. Além disso, apresenta também uma região com múltiplos sítios de clonagem, que podem ser clivados por enzimas de restrição.

Fonte: Adaptado Novagen <http://eshop.emdchemicals.com/is-bin/INTERSHOP>

Figura 5: Vetor pET28a. Note as sequências codificadoras do operon *lac* (*lacI*), a sequência que confere resistência a Kanamicina (*kan*) e a origem de replicação (*ori*). As enzimas *NdeI* e *BamHI* marcadas indicam a localização das sequências clivadas para a inserção do gene de interesse (domínios 2/3 do KDR) juntamente a sequência da cauda de 6 Histidinas), também previamente clivada com as mesmas enzimas (adaptado, Novagen).

3.12.2. Preparo do vetor

O vetor foi preparado segundo o protocolo comum para a maioria dos DNAs preparados no LEFP:

1. Preparo das células competentes DH5a, item 3.6;
2. Transformação bacteriana, nesse caso, em *E.coli* DH5a FSB – item 3.7;

3. Extração de DNA plasmidial utilizando o protocolo descrito no item 3.8.

3.12.2.1. Digestão do vetor

O vetor pET28a foi digerido a 37 °C durante 4 h com 5 U da enzima *NdeI* e 5 U de *BamHI* (Promega) e inativou-se a digestão a 80 °C durante 20 min. Em seguida, foi feita a desfosforilação das extremidades 5' do vetor pET28a para impedir a re-circularização do vetor linear durante a reação de ligação. Para isso, utilizou-se 20 µL do vetor linear (contendo 200 ng de DNA), 10 µL do tampão de reação 10X (50 mM Tris-HCl pH 9,3 a 25 °C; 1 mM de MgCl₂; 0,1 mM de ZnCl₂; 1mM de espermidina), 5 U da enzima CIAP (Calf intestinal alkaline phosphatase) e água esterilizada suficiente para completar o volume de 100 µL.

3.13. Ligação do DNA ao vetor pET28a

O fragmento purificado, após a digestão da ligação pJETTM + a sequencia correspondente aos domínios 2 e 3 do KDR com as enzimas *NdeI* e *BamHI*, foi ligado ao vetor pET28a desfosforilado. Para a ligação foi utilizada uma proporção de 3 partes de fragmento para 1 parte de vetor na presença de 1U da enzima T4 DNA ligase (Promega) a 16 °C por 18 h. A solução de ligação foi usada na transformação da bactéria *E.coli* da linhagem DH5a competentes, na presença de 10 µg/mL de kanamicina.

3.14. Transformação e Extração de DNA

A ligação pET28a + a sequência correspondente aos domínios 2 e 3 do KDR foi multiplicada e realizou-se a extração do DNA em células DH5a FSB (descrito anteriormente), conforme protocolo estabelecido no LEFP.

3.15. Sequenciamento de nucleotídeos de DNA

As reações de sequenciamento foram realizadas conforme descrito anteriormente no item 3.10. Os plasmídeos foram sequenciados nas direções “*forward*” e “*reverse*” com o auxílio dos oligonucleotídeos iniciadores T7 *promoter* 5'-TTATGCTGAGTGATATCCCTTAA-3' e T7 *terminator* 5'-GCTAGTTATTGCTCAGCGG-3'.

3.16. Expressão de proteínas heterólogas em linhagens *E. coli* BL21

3.16.1. Preparo de células BL21 competentes

As bactérias foram crescidas em uma placa contendo 34 µg/mL do antibiótico cloranfenicol por 16 h. Posteriormente, inoculou-se uma colônia isolada em 3 mL de meio HDM (15 g de triptona, 25 g de extrato de levedura pH = 7,5), a qual foi mantida a 37 °C por 16 h (pré-inóculo).

Inicialmente, 400 µL do pré-inóculo foi inoculado em 40 mL de meio HDM e deixado sob agitação de 200 rpm a 37 °C até atingir densidade óptica igual a 0,6 no comprimento de onda de 600 nm. As bactérias foram centrifugadas a 3.500 rpm

por 6 min, re-suspensas em 40 mL de MgCl_2 0,1 M; centrifugadas, re-suspensas em 20 mL de CaCl_2 0,1 M e centrifugadas e re-suspendidas em 4 mL de CaCl_2 .

As bactérias permaneceram por 40 min em banho de gelo e foram aliquotadas com a adição de glicerol 80% até o momento do uso.

3.16.2. Expressão da proteína em função do tempo de indução

A linhagem de *E. coli* BL21 competente foi transformada com: pET28a (controle positivo), pET28a + domínios 2 e 3 do KDR e sem qualquer vetor (controle negativo). Foram utilizados 100 μL de solução contendo *E. coli* BL21 competente. Os produtos foram introduzidos na bactéria por choque térmico de 30 min. em banho de gelo, seguido de 5 min. em banho maria a 37 °C. Após este procedimento, as bactérias cresceram por 1 h a 37 °C em 1,0 mL de meio de cultura HDM. Em seguida, as células foram centrifugadas (Centrífuga Eppendorf, modelo 5415 R) a 2000 rpm por 5 min, o sobrenadante foi descartado e as bactérias re-suspensas em 100 μL de meio de cultura, que foram transferidas para placas de Petri com meio de cultura HDM com 1,5% de ágar; 40 $\mu\text{g/mL}$ de kanamicina e 34 $\mu\text{g/mL}$ de cloranfenicol (Sigma) e mantidas por 16 h a 37 °C.

Após incubação por 16 h, uma colônia isolada foi pré-inoculada em 3 mL de meio HDM que, após 16 h de crescimento, foi inoculada em 100 mL de meio HDM com 10 μL de kanamicina 40 $\mu\text{g/mL}$ e 10 μL de cloranfenicol 34 $\mu\text{g/mL}$, sob agitação de 200 rpm a 37 °C até atingir a densidade óptica 0,6 no comprimento de onda de 600 nm, quando, então, 1 mL de cultura foi coletado (amostra sem indução) e o restante induzido com 1 mM de isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo (IPTG)

(Promega). Foi coletado 1 mL de cultura a cada h (até 6 h) e cada amostra foi centrifugada a 12000 rpm por 3 min. O precipitado foi re-suspendido em 100 µL de tampão de amostra para proteína (3,8 mL de água; 1 mL de Tris-HCl 0,5M; pH=6,8; 0,8 mL de glicerol; 1,6 mL de SDS 10%; 0,4 mL de 2-betamercaptoetanol; 0,4 mL de azul de bromofenol 1%) e um volume correspondente à 0,15 unidades de OD₆₀₀, foi analisado por SDS-PAGE.

3.16.3. Eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE)

A eletroforese é um dos métodos mais convenientemente empregados para a separação e análise qualitativa de moléculas. O gel mais comum para proteínas é o de poliacrilamida (PAGE) com SDS (dodecilsulfato de sódio) adicionado. O gel é composto por polímeros intercalados de acrilamida e bis-acrilamida para formar uma fina malha cruzada dos compostos e, visto que suas cargas estão igualadas negativamente pelo SDS, as proteínas são separadas pelo seu peso molecular. Assim, as moléculas peptídicas menores atravessam a malha mais rapidamente que as de maior tamanho em direção ao pólo positivo do campo elétrico [24].

Para análise em gel de poliacrilamida da proteína, foi feito um gel de 12% desnaturante, o qual foi preparado por polimerização de uma mistura de acrilamida/bis-acrilamida na razão 29:1, em um tampão (0,3 M Tris-HCl; pH 6,8), com 0,05% de persulfato de amônio + 0,007% TEMED. A polimerização foi feita em cuba de eletroforese e as amostras das proteínas submetidas a um campo elétrico de 30 V. A corrida durou em torno de 3 h e, no fim do processo, o gel foi corado com *Comassie Blue* (Sigma); 0,1% *Comassie* R-250; 50% metanol; 7% ácido acético; utilizados para a coloração de proteínas, otimizando a visualização das frações eluídas da coluna de cromatografia [24].

3.17. Criação da sequência *in frame* do DNA que codifica os domínios 2 e 3 do KDR

Muitos estudos foram realizados para melhorar a expressão de genes clonados, incluindo a otimização das condições do crescimento do hospedeiro.

Apesar dos avanços, não se conseguiu contornar um problema subjacente significativo: a sequência do DNA usada para codificar uma proteína em um organismo frequentemente difere no uso de *códons* que seria usada para codificar a mesma proteína em outro organismo [31].

Dado que as proteínas são produzidas a partir da informação contida no DNA, uma vez conhecido o gene, pode-se deduzir a sequência de aminoácidos que codifica determinada proteína e, da mesma maneira, os *códons* correspondentes aos mesmos aminoácidos. A opção por trabalhar com uma sequência sintética de DNA justifica-se pela possibilidade de retirar *códons* raros, evitando a inserção de *íntrons*, o que pode acontecer quando se utiliza DNA humano.

A sequência correspondente aos domínios 2 e 3 do KDR foi montada à partir da sequência de aminoácidos de KDR encontrada no *GenBank* AAC16450.1. A **Figura 6** mostra os nucleotídeos correspondentes a sequência de aminoácidos desta proteína. A sequência sintética inicia no nucleotídeo 632 da sequência encontrada no *Genbank*, que corresponde ao aminoácido A₁₁₀ e termina no nucleotídeo 1307, correspondente ao aminoácido G₃₃₅.

632-ggcctcgggtcatttatgtctatgttcaagattacagatctccatttattg-681
682-cttctgttagtgaccaacatggagtcgtgtacattactgagaacaaaaac-731
732-aaaactgtggtgattccatgtctcgggtccatttcaaactctcaacgtgtc-781

```

782-actttgtgcaagatacccagaaaagagatttgttcctgatggtaacagaa-831
832-tttcctgggacagcaagaagggtttactattcccagctacatgatcagc-881
882-tatgctggcatggtcttctgtgaagcaaaaattaatgatgaaagttacca-931
932-gtctattatgtacatagttgtcgttgtagggatataggatttatgatgtgg-981
982-ttctgagtcctgtcatggaattgaactatctgttgagaaaagcttgct-1031
1032-ttaaattgtacagcaagaactgaactaaatgtggggattgacttcaactg-1081
1082-ggaatacccttcttcgaagcatcagcataagaaacttgtaaaccgagacc-1131
1132-taaaaaccctgtctgggagtgaagatgaagaaatttttgagcaccttaact-1181
1182-atagatggtgtaacccggagtgaaccaaggattgtacacctgtgcagcatc-1231
1232-cagtgggctgatgaccaagaagaacagcacatttgtcagggccatgaaa-1281
1282-aaccttttgttgcttttgggaagtggc-1307

```

Figura 6: Sequência nucleotídica do KDR retirada do *GenBank* AAC16450.1, utilizada como referência para a criação do *constructo* 2 e 3 do KDR.

A ORF clonada é, em geral, incompleta e não contém o ATG inicial, necessitando, portanto, acrescentar um ATG para garantir a síntese de proteína a partir do mensageiro. A **Tabela 2** mostra os oligonucleotídeos criados com o objetivo de adquirir a sequência criada com base no *GenBank* AAC16450.1.

Tabela 2: Oligonucleotídeos sintéticos baseados no *GenBank* AAC16450.1 que codificam a sequência correspondente aos domínios 2 e 3 do KDR.

Oligo	Sequência 5'® 3'	Pares de Bases
Na	ACTTCAAGCTTGGCCATGGGCCATATGGCTAGCGTTATTTATGTGTACGT	50
Nb	TATTTATGTGTACGTTCAAGGACTACCGTTCTCCGTTTCATTGCAAGCGTAT	50
Nc	CCGTTTCATTGCAAGCGTATCCGATCAGCACGGCGTGGTGTACAT	44
Nd	CAGCACGGCGTGGTGTACATCACCGAAAAACAAAACAAGACTGT	44
Ne	CACCGAAAAACAAAACAAGACTGTGGTTATTCCTTGCTGGGTTCCATTT	50
Nf	TGCCTGGGTTCCATTTCTAACCTGAACGTTTCCCTGTGTGCGCGTTAT	48
N1	AAATACGATAGCCAACGACTACCACAATGTACATGATAGACTGGTAGGAT	50
N2	GATAGACTGGTAGGATTCATCATTGATCTTTGCTTCACAGAAGACCAT	48
N3	GCTTCACAGAAGACCATGCCCCGCTAGGAGATCATATAGGACGGGAT	47
N4	CATATAGGACGGGA TGGTGAAACCTTTCTTGCTGTCCCAAGAAAT	45
N5	TCTTGCTGTCCCAAGAAATACGGTTACCATCCGGGACGAAGCGTTTT	47
N6	CCGGGACGAAGCGTTTTTCCGGATAACGCGCACACAGGGAACGT	45
Ca	CGTTGGCTATCGTATTTACGATGTGGTTCTGTCCCCGTCCCACGGCATT	49
Cb	CCCCGTCCCACGGCATTGAGCTGTCCGTGGGTGAAAACTGGTGCT	46
Cc	GGGTGAAAACTGGTGCTGAACTGTACGGCTCGCACCGAACTGAACGT	48
Cd	CGCACCGAACTGAACGTCGGTATCGATTTCAATTGGGAATACCCGT	46
Ce	CAATTGGGAATACCCGTCCAGCAAACACCAACATAAGAACTGGT	45

Cf	AAGAAACTGGTGAACCGCGACCTGAAAACCTCAGTCCGGTAGCGAAAT	47
C1	CGATGGTCAGGGTGCTCAGGAACTTTTTTCATTTTCGCTACCGGACT	45
C2	ACAGGCCCTGGTCGCTGCGCGTCACGCCGTCGATGGTCAGGGTGCT	46
C3	CAGGCCGGAGGAAGCCGCGCAAGTATACAGGCCCTGGTCGCT	42
C4	ACACGCACGAAGGTAGAGTTTTTCTTGGTCATCAGGCCGGAGGAAGCCGC	50
C5	GCCGAATGCAACGAACGGTTTCTCGTGTACACGCACGAAGGTAGAG	46
C6	CCTCTCTAGAGCGGATCCGGTTCCGCCGCTGCCGAATGCAACGAACGG	48
STOP	TAGAGCGGATCCTCAGCCGC	20

A **Figura 7** mostra esquematicamente estas propriedades do plasmídeo e a consequente proteína recombinante gerada pela clonagem.

A sequência completa dos domínios 2 e 3 do KDR possui 225 aminoácidos (675 pares de bases), porém, foram adicionados 51 pares de bases ao DNA sintético do mesmo, referentes à região iniciadora e à região *stop códon*, totalizando 726 pb.

sintetico	GCTAGCGTTATTTATGTGTACGTTACGGACTACCGTTCTCCGTTTCATTGCAAGCGTATCC	60
cDNA	GCCTCGGTCATTATATGTCTATGTTCAAGATTACAGATCTCCATTATTTGCTTCTGTTAGT	60
	** ** *	
sintetico	GATCAGCACGGCGTGGTGTACATCACGAAAAACAAAAACAAGACTGTGGTTATTCCTTGC	120
cDNA	GACCAACATGGAGTCGTGTACATTACTGAGAACAAAAACAAGACTGTGGTGTATTCCATGT	120
	** ** *	
sintetico	CTGGGTTCCATTCTAACCTGAACGTTTCCCTGTGTGCGCGTTATCCGGAAAAACGCTTC	180
cDNA	CTCGGGTCCATTTCAAATCTCAACGTGTCACTTTGTGCAAGATACCCAGAAAAAGAGATTT	180
	** ** *	
sintetico	GTCCCGGATGGTAACCGTATTTCTTGGGACAGCAAGAAAGGTTTCACCATCCCGTCCTAT	240
cDNA	GTTCCGTGATGGTAACAGAAATTTCTGGGACAGCAAGAAAGGCTTTACTATTCCAGCTAC	240
	** ** *	
sintetico	ATGATCTCCTACGCGGGCATGGTCTTCTGTGAAGCAAAGATCAATGATGAATCCTACCAG	300
cDNA	ATGATCAGCTATGCTGGCATGGTCTTCTGTGAAGCAAAGATTAATGATGAAAGTTACCAG	300

sintetico	TCTATCATGTACATTGTGGTAGTCGTTGGCTATCGTATTTACGATGTGGTTCTGTCCCG	360
cDNA	TCTATTATGTACATAGTTGTCGTTGTAGGGTATAGGATTTATGATGTGGTTCTGAGTCCG	360

sintetico	TCCCACGGCATTGAGCTGTCCGTGGGTGAAAACTGGTGTGAACTGTACGGCTCGCACC	420
cDNA	TCTCATGGAATTGAACTATCTGTTGGAGAAAAAGCTTGTCTTAAATTGTACAGCAAGAACT	420
	** ** *	
sintetico	GAACTGAACGTCGGTATCGATTTCAATTGGGAATACCCGTCCAGCAAAACACCAACATAAG	480
cDNA	GAACTAAATGTGGGATTGACTTCAACTGGGAATACCCTTCTTCGAAAGCATCAGCATAAG	480

sintetico	AAACTGGTGAACCGCGACCTGAAAACTCAGTCCGGTAGCGAAATGAAAAAGTTCTGAGC	540
cDNA	AAACTTGTAAACCGAGACCTAAAAACCCAGTCTGGGAGTGAGATGAAGAAATTTTGTAGC	540
sintetico	ACCCTGACCATCGACGGCGTGACGCGCAGCGACCAGGGCCTGTATACTTGCGCGGCTTCC	600
cDNA	ACCTTAACCTATAGATGGTGTAAACCGGAGTGACCAAGGATTGTACACCTGTGCAGCATCC	600
	*** * ** *	
sintetico	TCCGGCCTGATGACCAAGAAAACTCTACCTTCGTGCGGTACACGAGAAACCGTTTCGTT	660
cDNA	AGTGGGCTGATGACCAAGAAAGAACAGCACATTTGTGAGGGTCCATGAAAAACCTTTTGT	660
	** *****	
sintetico	GCATTGCGCAGCGGC	675
cDNA	GCTTTTGGAAAGTGGC	675
	** ** *	

Figura 7: Alinhamento da sequência de nucleotídeos do cDNA e sequência do gene sintético proposto para os domínios 2 e 3 do KDR. Esta figura mostra os códons de nucleotídeos que foram modificados para minimizar códons raros.

Foram sintetizados oligonucleotídeos para montar duas sequências (A-L e M-Z) correspondentes às duas metades da sequência codificadora dos domínios 2 e 3 do KDR, obtidas com auxílio da reação em cadeia da polimerase. Cada uma das sequências foi sub-dividida em sequências de 40 a 50 pares de bases (A-F e G-L; M-R e S-Z). As sequências são apresentadas no sentido 5' → 3', entretanto A-F e M-

R referem-se à região N-terminal e G-L e S-Z referem-se à região C-terminal (**Figura 8**).

Figura 8: Esquema dos oligonucleotídeos utilizados para a construção da sequência sintética dos domínios 2 e 3 do KDR. Sequências (A-L e M-Z) correspondentes às metades da sequência codificadora. **(I)** Sequência A-L: sequência A-F, referente a região N-terminal e sequência G-L, referente à região C-terminal. **(II)** Sequência M-Z: sequência M-R, referente à região N-terminal e sequência S-Z, referente à região C-terminal.

A construção de uma sequência de DNA, em uma versão homóloga mais resistente ou mais sensível a mutações, pode ser ensaiada, experimentalmente, por meio de esquemas mutacionais derivados da análise de genes homólogos [36]. Desta maneira, a sequência nucleotídica dos domínios 2 e 3 do receptor-2 do VEGF foi desenhada mediante informações do *GenBank* AAC16450.1 (**Figura 9**).

Figura 9: Esquema simbolizando a sequência nucleotídica dos domínios 2 e 3 do KDR. (A) A sequência possui 726 pares de bases, incluindo 8 aminoácidos (nt) aleatórios e 1 Metionina colocados como região iniciadora e a região *stop códon*, composta por 8 aminoácidos. **(B)** Sequências (A-L e M-Z) correspondentes às metades da sequência codificadora dos domínios 2 e 3 do receptor-2 do VEGF.

A síntese da sequência codificadora para os domínios 2 e 3 do KDR foi realizada com auxílio da técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), onde duplas de oligonucleotídeos (FG, EH, DI, CJ, BK, AL, RS, QT, PU, OV, NX, MZ) foram adicionadas a cada cinco ciclos de PCR (um ciclo envolve três etapas: 1 min. de desnaturação a 96 °C, 1 min. de hibridização a 55 °C e 1 min. de extensão ou síntese a 72 °C).

Para a reação de amplificação do fragmento, contendo a sequência codificadora para os domínios 2 e 3 do Fator do Crescimento Endotelial Vascular, foram desenhados oligonucleotídeos iniciadores (Invitrogen) inserindo-se sítios de clivagem pelas enzimas de restrição *HindIII* e *XbaI*, *NdeI* e *BamHI*. Utilizou-se, para a reação de PCR, 1U de Taq polimerase Platinum (Invitrogen), 1µg de DNA sintético, 5 µL de dNTP 10 pmol/µL, 5 µL de cada iniciador 5 pmol/µL e 5 µL MgCl₂ 5 mmol.L⁻¹. A reação foi feita da seguinte maneira: 2 min a 94 °C, seguidos de 30 ciclos de 1 min a 94 °C (desnaturação); 1 min a 55 °C, temperatura específica do iniciador (anelamento); e 2 min a 72 °C (extensão). Os produtos de PCR foram

observados em géis de agarose 1%, corados com brometo de etídeo e purificados com “kit” GeneClean (Q-BIOgene). As sequências nucleotídicas dos fragmentos foram obtidas utilizando-se a reação de sequenciamento com sonda “Big Dye” v.2 (conforme instruções do fabricante, ver item 3.10) sendo determinadas com o sequenciador “Genetic Analyzer” 3100 (Applied Biosystems). Para as clonagens, os fragmentos foram digeridos com as enzimas *HindIII* e *XbaI* (Promega), segundo protocolo do fabricante.

3.18. Alteração das regiões flanqueadoras do *constructo* 2 e 3 do KDR

A sequência codificadora para o *constructo* 2 e 3 do KDR, montada com base na sequência genômica de DNA encontrada no *GenBank* AAC16450.1, contém 242 aminoácidos, portanto, 726 nucleotídeos. Para alterar a sequência do mapa de restrição dos domínios 2 e 3 do KDR foram desenhados oligonucleotídeos iniciadores contendo sítios de restrição para as enzimas *HindIII* (extremidade 5') e *XbaI* (extremidade 3').

O desenho da sequência codificadora foi criado de forma a eliminar os códons raros, já que estes podem inserir *íntrons*, o que pode causar alterações na sequência nucleotídica desejada. Do mesmo modo, foram adicionados *códons* específicos para que fossem transcritos os aminoácidos na mesma ordem que aqueles encontrados na sequência encontrada no *GenBank* AAC16450.1.

Na região N-terminal foram adicionados sítios específicos das enzimas *HindIII* (TTCGAA), *NcoI* (GGTACC) e *NdeI* (GGTATA). Uma sequência de oito nucleotídeos (nt) aleatórios, TSSLAMGH mais uma Metionina (M), foi colocada como iniciadora

para evitar a quebra entre as regiões específicas das enzimas.

Na região 3' da sequência codificadora dos domínios 2 e 3 do KDR foi inserido um sítio de restrição para a enzima *Bam*HI (GGATCC). Outra finalidade da inserção do sítio de restrição é facilitar a exposição da região *stop códon* para posterior retirada da mesma, permitindo a introdução do fragmento no plasmídeo pET28a.

3.19. Proteína Verde Fluorescente (GFP)

A proteína verde fluorescente, mais conhecida por GFP (abreviatura do inglês *green fluorescent protein*), é uma proteína produzida pelo cnidário *Aequorea victoria* que emite fluorescência na zona verde do espectro visível. O gene que codifica esta proteína foi isolado e atualmente é utilizado na produção de proteínas de fusão, constituídas por um gene de interesse fundido com o da GFP, de modo a monitorizar, por exemplo, a localização dessa proteína *in vivo*. Desta forma, a GFP funciona como um gene repórter, ou seja, como um marcador fluorescente. A GFP do cnidário possui dois picos de excitação em 475 nm e 395 nm. O seu pico de emissão é a 509 nm, na zona verde do espectro visível (**Figura 10**) [37].

Fonte: <http://www.clontech.com/images/pt/PT3055-SEQ.pdf>

Figura 10: Mapa do pGFPuv. A seta indica o local onde foram inseridos os sítios de clivagem para as enzimas de restrição.

A presença da proteína GFP (produzida pelo gene GFP) faz com que a colônia da bactéria que tem em seu interior este plasmídeo seja fluorescente. Os sítios de restrição das enzimas utilizadas para cortar o plasmídeo se localizam imediatamente ao 5', região onde está o gene que codifica a proteína GFP. Assim, quando um fragmento de DNA exógeno é introduzido nesta região e a fase de leitura do fragmento é a mesma da GFP, uma proteína de fusão é produzida pela célula, sendo constituída pela proteína codificada pelo fragmento clonado na região N-terminal e a GFP na região C-terminal. Uma vez ligado um inserto ao plasmídeo, é preciso averiguar se os clones obtidos estão em fase de leitura com a GFP. Cabe ressaltar que os plasmídeos vazios conferem a mesma resistência ao antibiótico que o plasmídeo ligado ao fragmento, por isso deve-se selecionar várias colônias fluorescentes para o próximo passo. O procedimento do passo seguinte baseia-se no crescimento de clones em placas de Petri na presença de ampicilina e posterior reprodução em tubos de ensaio contendo meio LB líquido e ampicilina. Em seguida, é realizada a extração do DNA plasmidial (item 3.9).

3.20. Digestão do fragmento codificador do *constructo* 2 e 3 do KDR e ligação ao vetor pGFPuv

Tanto o *constructo* 2 e 3 do KDR quanto o vetor pGFPuv foram digeridos com as enzimas de restrição *Xba*I e *Hind*III para posterior sub-clonagem em vetor de expressão pET28a. A reação de digestão do fragmento sintético de DNA foi realizada em volume final de 50 μ L com tampão E (6 mM de Tris-HCl, 6 mM de cloreto de magnésio, 100 mM de cloreto de sódio, 1 mM de DTT, pH 7.5), 1 mM de albumina do soro bovino (BSA) e 1 U de cada uma das enzimas de restrição (*Xba*I e *Hind*III – Promega). A mistura foi incubada por 3 h a 22 °C, seguida de inativação da atividade catalítica por 15 min. a 65 °C.

A reação de ligação foi feita na proporção molar 3:1 fragmento/vetor respectivamente, anteriormente digeridos, na presença de 0.5 U de T4 DNA ligase e 1X do tampão apropriado (6 mM de Tris-HCl, 6 mM de cloreto de magnésio, 100 mM de cloreto de sódio, 1 mM de DTT, pH 7.5) em volume final de 10 μ L (**Figura 11**).

Após a ligação, células DH5a foram transformadas usando o protocolo FSB como descrito no item 3.8.

Figura 11: Representação da ligação do *constructo* 2 e 3 do KDR ao vetor pGFPuv.

3.21. Multiplicação e extração do DNA da ligação (pGFPuv + *constructo* 2 e 3 do KDR)

A ligação foi multiplicada e realizou-se a extração do DNA em células DH5aFSB (descrito anteriormente), conforme protocolo estabelecido no LEFP.

3.22. Reação de Sequenciamento

As sequências obtidas foram alinhadas com a sequência fornecida pelo banco de dados *GenBank* e o resultado final, apresentado sob a forma de eletroferograma, confirmou, de fato, ser a origem de replicação pGFPuv.

3.23. Mutagênese Sítio Dirigida

Todo o processo para gerar os mutantes necessários baseou-se em sequências de PCR e monitorado através de análise em gel de agarose 1%, corados com brometo de etídio (0.05 µg/mL).

Para todas as reações, utilizou-se pGFPuv + *constructo* 2 e 3 do KDR como molde para realizar as mutações nas posições diversas onde houve deleção ou alteração de alguma base nitrogenada e/ou onde houve ou não troca de aminoácido. Para a realização da mutagênese sítio dirigida foi preciso lançar mão de três oligonucleotídeos: L1, L147 E L527 (**Tabela 3**).

Tabela 3. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a realização da mutagênese sítio dirigida.

Nome do Primer	Sequência do primer	Temperatura de anelamento
L1	5'-ATGGCTAGCGTTATTTATGTG-3'	55 °C
L147	5'-GAACGTTTCCCTGTGTGCGC-3'	66 °C
L527	5'-CATTTGCTACCGGACTGAG-3'	61 °C

A reação em cadeia da polimerase foi realizada em três etapas:

Primeira Etapa: nesta etapa, foi incorporada e amplificada à fita dupla de DNA o oligo L1 e o oligo L527. Para tanto, foi utilizada a mistura de 10 µL tampão de PCR (20 mM Tris-HCl; pH 8,4; 50 mM KCl), 10 pMol do oligo L1, 10 pMol do oligo L527, 2.5 mM dNTPmix, 1 mM MgCl₂, 1 fMol do clone pGFPuv + *constructo 2* e 3 KDR linearizado, 2.5 U de Taq DNA Polimerase – (Platinum-Promega) completando-se o volume com água esterilizada para 50 µL. A reação inicial ocorreu em miniciclador (Mastercycle Gradient - Eppendorf) onde foi efetuado o programa AMP8, que consistiu dos seguintes passos:

1 – 94 °C por 2 min.;

2 – 94 °C por 1 min.;

3 – 50 °C por 1 min.;

4 – 72 °C por 2 min. com 25 ciclos de repetição a partir do passo 2.

O fragmento com o tamanho específico para cada mutação gerada foi analisado e extraído do gel de agarose 1%, com posterior purificação com Kit GeneClean (Q-BIOgene).

Segunda Etapa: chamada de reação de extensão, pois consiste em estender e completar a sequência do fragmento de DNA mutado gerado na etapa 1. Foi feita a reação com 1 mM $MgCl_2$, 1X tampão de PCR, 2.5 mM dNTPmix, 2.5 U de Taq DNA polimerase, 1 fMol de vetor pGFPuv + *constructo* 2 e 3 do KDR linearizado, 1 pMol do fragmento mutante amplificado na primeira etapa, completando-se o volume final para 50 μ L com água esterilizada. A reação foi colocada novamente no miniciclador, desta vez utilizando o programa EXT para a extensão do DNA, que consistiu em:

1 – 96 °C por 2 min.;

2 – 96 °C por 1 min.;

3 – 55 °C por 30 s;

4 – 72 °C por 1 min. sendo os ciclos repetidos 5x a partir do passo 2.

Terceira Etapa: é a reação que seleciona e amplifica somente a fita de DNA híbrido que contenha a mutação, utilizando, para tanto, o oligo que é complementar a uma porção de L1. Na reação adicionaram-se dois oligos: 20 pMol de L1 (5'-terminal) e 20 pMol de L527 (3'-terminal), quando, posteriormente, seguiu-se novamente o programa de amplificação descrito na primeira etapa.

O fragmento, de aproximadamente 726 pb, foi extraído e purificado em gel de agarose 1% com Kit GeneClean (Q-BIOgene). A amostra foi, então, digerida com enzimas *HindIII* e *XbaI* (10 U cada) por 3 h a 37 °C e as enzimas inativadas submetidas a uma temperatura de 65 °C por 15 min. Analisou-se o fragmento de 726 pb em gel nativo de agarose 1%, com posterior extração do fragmento com o Kit de extração Kit GeneClean (Q-BIOgene) e quantificação em biofotômetro (Eppendorf).

RESULTADOS

Os resultados foram divididos em duas etapas: a primeira mostra aqueles obtidos por meio do produto da amplificação do cDNA (HUVEC) do KDR e, em seguida, os obtidos por meio da sequência sintética do DNA correspondente aos domínios 2 e 3 do KDR.

4.1. Amplificação do cDNA (HUVEC) do KDR

A amplificação do cDNA (HUVEC), usando os oligonucleotídeos KDR23F e KDR23R (**Tabela 1**), foi realizada por meio da reação em cadeia da polimerase, conforme descrito nos itens 3.3 e 3.4, e seu rendimento foi avaliado em gel de agarose a 1% de acordo com a **Figura 12**.

Figura 12: Amplificação do cDNA de HUVEC utilizando os oligonucleotídeos KDR23 *forward* e KDR23 *reverse*. (M) Marcador de pares de bases de 1 kb plus (Invitrogen). (1) Fragmento amplificado: apresenta tamanho esperado, de aproximadamente 700 pb, já que ainda apresenta alguns nucleotídeos pertencentes aos oligonucleotídeos utilizados para a amplificação (KDR23F e KDR23R – Tabela 1).

O número de pares de bases do fragmento amplificado resultou no tamanho esperado de aproximadamente 700 pb, conforme a posição de anelamento dos oligonucleotídeos KDR23F e KDR23R que flanqueiam o cDNA (HUVEC) do KDR. Este resultado demonstra que o cDNA está intacto, não houve degradação no preparo do mRNA e que os oligonucleotídeos são específicos, apesar do aparecimento de três bandas fracas (~1100 pb, ~2200 pb e ~4000 pb).

A banda referente à 700 pb foi retirada do gel com auxílio de um bisturi e purificada conforme descrito no item 3.5 (**Figura 13**).

Figura 13: Banda purificada da amostra do DNA resultante da amplificação do cDNA de HUVEC utilizando os oligonucleotídeos KDR23 *forward* e KDR23 *reverse*. (M) Marcador de pares de bases de 1kb plus (Invitrogen). (1) Banda purificada do DNA resultante da amplificação do cDNA por PCR.

O DNA, correspondente aos domínios 2 e 3 do KDR, foi utilizado para a ligação ao vetor pJETTM1.2. Este vetor dispensa digestão anterior à etapa de ligação (descrito no item 3.6).

A ligação pJETTM + domínios 2 e 3 do KDR foi transformada em células DH5a

e duas colônias foram usadas para a extração do DNA. Este foi digerido pelas enzimas *NdeI* e *BamHI*. A reação de digestão foi confirmada em gel de agarose a 1% (**Figura 14**), onde foi possível observar uma banda em 675 pb, referente aos domínios 2 e 3 do KDR, e outra em 2974 pb, referente ao vetor pJETTM1.2.

Figura 14: Análise eletroforética em gel de agarose a 1% do produto da digestão pJET1.2 + domínios 2 e 3 do KDR. (M) Marcador de pares de bases de 1kb plus (Invitrogen). (1 e 2) pJETTM + domínios 2 e 3 do KDR, clone de aproximadamente 3.7 kb, sendo ~3 kb do vetor pJETTM e 675 pb do fragmento amplificado correspondente aos domínios 2 e 3 do KDR.

Após transformação em células DH5 α e extração do DNA plasmidial, os clones obtidos tiveram sua sequência nucleotídica conferida por meio de comparação com a sequência dos domínios 2 e 3 do KDR encontrada no *GenBank*.

4.1.1. Sub-clonagem para expressão da proteína resultante

Para a confirmação da provável região codificadora, a sequência resultante da amplificação do cDNA (HUVEC) do KDR, combinado com oligonucleotídeos

específicos (**Tabela 1**), foi submetida à análise comparativa com a sequência recuperada do banco de dados *GenBank* AAC16450.1 (**Figura 15**).

Figura 15: Análise em banco de dados da sequência amplificada. (KDR: sequência de nucleotídeos do KDR; cDNAamp: sequência de nucleotídeos resultante da amplificação do cDNA de KDR). Evidencia a identidade da sequência nucleotídica dos domínios 2 e 3 do KDR após amplificação do cDNA e sub-clonagem no vetor pET28a.

Na expectativa de produzir a proteína pura e, em quantidades suficientes para testes bioquímicos e biofísicos, o DNA correspondente aos domínios 2 e 3 do KDR foi sub-clonado no vetor pET28a.

Uma amostra do vetor pET28a foi analisada em gel de agarose (**Figura 16A**) e, em seguida, foi realizada a digestão com as enzimas *NdeI* e *BamHI* deste mesmo

vetor e de uma amostra do DNA amplificado, sendo avaliadas em gel de agarose a 1% (**Figura 16 B**).

Figura 16: Análise eletroforética em gel de agarose a 1%. **(M)** Marcador de pares de bases de 1 kb plus (Invitrogen). **(A)** (1 e 2) Vetor pET28a sem digestão. Observam-se duas bandas: uma correspondente a forma circular e uma correspondente a forma linear (~5369pb). **(B)** (1) Produto da digestão do DNA amplificado correspondente aos domínios 2/3 do KDR pelas enzimas *NdeI* e *BamHI*; (2) Vetor pET28a digerido pelas enzimas *NdeI* e *BamHI*.

As duas bandas do gel da figura 16B foram purificadas (item 3.5) e o DNA foi ligado ao vetor de expressão pET28a na proporção 1:3 vetor/fragmento. O DNA da ligação foi transformado em bactéria *E.coli* e foi realizada a extração do DNA que, na sequência, passou por uma digestão enzimática com *NdeI* e *BamHI* para a confirmação da obtenção do clone por meio da liberação de um fragmento com tamanho correspondente ao da sequência de DNA dos domínios 2 e 3 do KDR (**Figura 17**).

Figura 17: Análise eletroforética em gel de agarose a 1% do produto da digestão do clone pET28a + domínios 2 e 3 do KDR pelas enzimas *NdeI* e *BamHI*. (M) Marcador de pares de bases de 1 kb plus (Invitrogen). (I) Bandas referentes ao vetor pET28a (5369 pb) e ao DNA correspondente aos domínios 2 e 3 do KDR (675 pb).

4.1.2. Expressão da proteína resultante em bactéria *E.coli* BL21

As bactérias *E. coli* linhagem BL21 foram transformadas com a construção de pET28a + domínios 2 e 3 do KDR e, como controle interno, foi utilizado DNA do vetor pET28a na transformação. As culturas de 100 mL de meio HDM foram inoculadas com as colônias provenientes das transformações. Ao atingir 0.6 de densidade óptica em 660nm, 1mM de IPTG foi adicionado às culturas para a indução da expressão da proteína recombinante. Na análise da expressão em função do tempo, demonstrada na **Figura 18**, observa-se o aumento considerável da banda correspondente à proteína heteróloga correspondente aos domínios 2 e 3 do KDR, cujo tamanho é de aproximadamente 25 kDa nos intervalos de 1 a 6 h de indução quando comparado com a cultura não induzida (NI). Para a expressão desta proteína, o tempo estabelecido foi de 6 h.

Figura 18. Expressão da proteína recombinante domínios 2 e 3 do KDR em função do tempo de indução com IPTG. A ORF que codifica para a proteína de interesse foi clonada em vetor pET28a (Novagen) e a expressão foi induzida por 1mM de IPTG. A análise da expressão foi monitorada pela retirada de alíquotas das bactérias em intervalos de 1 h durante 6 h (1h-6h), as quais foram analisadas em gel SDS-PAGE 12%. **PM**) Marcador de peso molecular de proteína 6H (Sigma-Aldrich). **(NI)** cultura da bactéria *E.coli* não induzida. **(C-)** vetor pET28a vazio.

A visualização da proteína recombinante domínios 2 e 3 do KDR por meio da coloração por Coomassie Blue confirmou a expressão dessa proteína. Em seguida, foi testada a solubilidade da proteína em gel de poliacrilamida a 12%. Este teste revela se a proteína é solúvel ou forma corpo de inclusão (**Figura 19**).

Figura 19: Teste de solubilidade da proteína recombinante. (S) Proteína solúvel. **(C)** Corpo de inclusão. **(M)** Marcador de peso molecular de proteína 6H (Sigma-Aldrich).

4.2. Montagem da sequência codificadora para os domínios 2 e 3 do KDR

A sequência correspondente aos domínios 2 e 3 do KDR foi montada a partir da sequência de aminoácidos de KDR encontrada no *GenBank* AAC16450.1 e é composta por 675 pb, porém, a sequência sintética possui 51 pares de bases adicionais equivalentes aos 17 aminoácidos acrescentados nas extremidades 3' e 5' (totalizando 726 pb) para incluírem os sítios para as enzimas de restrição necessárias para separar a porção desejada para a clonagem e sub-clonagem.

As sequências A-L e M-Z, obtidas após reação em cadeia da polimerase descrita no item 3.17 deste trabalho, foram confirmadas por meio da visualização de duas bandas de aproximadamente 360 pb em gel de agarose a 1%, sendo que uma banda está relacionada à sequência A-L e outra à sequência M-Z (**Figura 20**).

Figura 20: Análise eletroforética em gel de agarose a 1% do DNA sintético correspondente aos domínios 2 e 3 do KDR. **(M)** Marcador de pares de bases de 1kb plus (Invitrogen). **(1)** Sequência A-L do DNA sintético (366 pb); **(2)** Sequência M-Z do DNA sintético (360 pb) ; **(3)** Sequência A-Z do DNA sintético (726 pb).

Na tentativa de otimizar a reação amplificada (**Figura 21**), a temperatura de anelamento (etapa 2 do programa utilizado pela reação em cadeia da polimerase) foi alterada de 55 °C para 34 °C no momento da adição da dupla “FG” de oligonucleotídeos, já que o oligonucleotídeo denominado “F” apresenta temperatura média bastante distinta dos demais oligonucleotídeos.

Figura 21: Análise eletroforética em gel de agarose a 1% do DNA sintético correspondente aos domínios 2 e 3 do KDR após alteração da temperatura de anelamento. (M) Marcador de pares de bases de 1kb plus (Invitrogen). (1) Sequência A-L do DNA sintético (366 pb); (2) Sequência M-Z do DNA sintético (360 pb) ; (3) Sequência A-Z do DNA sintético (726 pb).

Após alteração das condições de PCR, observou-se por eletroforese em gel de agarose a 1% (**Figura 21**) um aumento da intensidade da banda correspondente ao DNA.

Separadamente, foi realizada a digestão do vetor pGFPuv e do DNA correspondente ao *constructo2/3* KDR pelas enzimas *HindIII* e *XbaI* e posterior ligação entre eles.

4.2.1. Seleção dos clones em pGFPuv

Conforme descrito no item 3.19, o vetor pGFPuv foi utilizado por apresentar a proteína GFP que faz com que a colônia da bactéria, a qual tem em seu interior este plasmídeo, seja fluorescente, auxiliando na seleção dos clones.

Após a ligação entre o vetor pGFPuv + *constructo* 2 e 3 do KDR, foi realizada a transformação em bactérias DH5 α , selecionadas pela presença de ampicilina no

meio de cultura. A **Figura 22** mostra o resultado do crescimento de colônias que apresentaram fenótipo branco e fluorescente. As colônias brancas evidenciam a ocorrência de mutação ou deleção na sequência nucleotídica causando alteração na fase de leitura e, portanto, não secretando a proteína GFP. As colônias com fenótipo fluorescente revelam que: 1- o vetor pGFPuv ligou-se ao fragmento sem que fosse alterada a fase de leitura da GFP ou 2- o vetor pGFPuv religou-se sem que fosse inserido o fragmento.

Figura 22: Resultado da transformação do clone pGFPuv + *constructo* 2 e 3 do KDR em bactérias DH5 α na presença de ampicilina em meio de cultura. Note que existem colônias com fenótipo não fluorescente (brancas), o que indica a existência de clones ausentes da inserção do fragmento no vetor pGFPuv ou em fase de leitura incorreta.

Foram selecionados aproximadamente 20 clones da placa contendo o DNA resultante da ligação vetor pGFP + *constructo* 2 e 3 do KDR (descrita no item 3.20) para a transformação e extração do DNA. Para a verificação do resultado, uma amostra de cada clone foi aplicada em gel de agarose a 1% (**Figura 23**).

Figura 23: Análise eletroforética em gel de agarose a 1%. **(M)** Marcador de pares de bases 1 kb plus (Invitrogen); **(1)** *constructo 2 e 3* do KDR digerido com *HindIII* e *XbaI* e purificado; **(2)** vetor pGFPuv digerido com *HindIII* e *XbaI* e purificado; **(3)** produto da ligação pGFP + *constructo 2 e 3* do KDR.

Em seguida, foi realizada a digestão do clone pGFPuv + *constructo 2 e 3* do KDR com as enzimas de restrição *HindIII* na extremidade 5' e *XbaI* na extremidade 3', resultando em uma banda de aproximadamente 726 pares de bases, a qual, após purificação, foi sub-clonada em vetor pET28a, conforme observado na **Figura 24**.

Figura 24: Análise eletroforética em gel de agarose a 1% dos produtos da digestão enzimática *HindIII/XbaI* de pGFPuv + *constructo 2* e *3* do KDR. (M) Marcador de pares de bases de 1 kb plus (Invitrogen). (1, 2, 3) Amostras referentes aos clones pGFPuv + *constructo 2* e *3* do KDR, após digestão com as enzimas de restrição *HindIII* e *XbaI*. O vetor pGFPuv possui 3300 pb e o *constructo 2* e *3* do KDR cerca de 726 pb.

4.2.2. Análise da sequência sintética

A confirmação da presença do fragmento correspondente aos domínios 2 e 3 do KDR nos clones selecionados foi feita pelo sequenciamento automático de DNA utilizando os oligonucleotídeos complementares à extremidade 3', pGFPuv SeqN 5'-ATGACCATGATTACGCCAAGCTT-3' e DeINdeR 5'-GCCGTTTCATGTGATCCGGA-3', nas regiões flangeadoras do gene inserido anteriormente à proteína GFP. Todas as sequências obtidas foram alinhadas com a sequência gênica do *constructo 2* e *3* do KDR presente no *GenBank* AAC16450.1. O alinhamento mostrou algumas substituições indesejáveis quando comparada com a sequência gênica original dos domínios 2 e 3 do KDR, além de deleções de algumas bases nucleotídicas

preservando, porém, a fase de leitura. Na **Figura 25** está o resultado do sequenciamento, confirmando que a proteína está em fase de leitura correta,

iniciando-se com o aminoácido metionina (M) e terminando com o códon de parada (TGA).

KDR_doms2+3_synthetic_ORF	ATGGCTAGCGTTATTTATGTGTACGTTCAGGACTACCGTTCTCCGTTTCAT
CLONE 1	ATGGCTAGCGTTATTTATGTGTACGTTCAGGACTACCGTTCTCCGTTTCAT
CLONE 2	ATGGCTAGCGTTATTTATGTGTACGTTCAGGACTACCGTTCTCCGTTTCAT
CLONE 3	ATGGCTAGCGTTATTTATGTGTACGTTCAGGACTACCGTTCTCCGTTTCAT
CLONE 4	ATGGCTAGCGTTATTTATGTGTACGTTCAGGACTACCGTTCTCCGTTTCAT
CLONE 5	ATGGCTAGCGTTATTTATGTGTACGTTCAGGACTACCGTTCTCCGTTTCAT
KDR_doms2+3_synthetic_ORF	TGCAAGCGTATCCGATCAGCACGGCGTGGTGTATCACCAGAAAACAAA
CLONE 1	TGCAAGCGTATCCGATCAGCACGGCGTGGTGTATCACCAGAAAACAAA
CLONE 2	TGCAAGCGTATCCGATCAGCACGGCGTGGTGTATCACCAGAAAACAAA
CLONE 3	TGCAAGCGTATCCGATCAGCACGGCGTGGTGTATCACCAGAAAACAAA
CLONE 4	TGCAAGCGTATCCGATCAGCACGGCGTGGTGTATCACCAGAAAACAAA
CLONE 5	TGCAAGCGTATCCGATCAGCACGGCGTGGTGTATCACCAGAAAACAAA
KDR_doms2+3_synthetic_ORF	ACAAGACTGTGGTTATTCCTTGCTGGGTTCCATTCTAACCTGAACGTT
CLONE 1	ACAAGACTGTGGTTATTCCTTGCTGGGTTCCATTCTAACCTGAACGTT
CLONE 2	ACAAGACTGTGGTTATTCCTTGCTGGGTTCCATTCTAACCTGAACGTT
CLONE 3	ACAAGACTGTGGTTATTCCTTGCTGGGTTCCATTCTAACCTGAACGTT
CLONE 4	ACAAGACTGTGGTTATTCCTTGCTGGGTTCCATTCTAACCTGAACGTT
CLONE 5	ACAAGACTGTGGTTATTCCTTGCTGGGTTCCATTCTAACCTGAACGTT
KDR_doms2+3_synthetic_ORF	TCCCTGTGTGCGCGTTATCCGAAAAACGCTTCGTCGCCGATGGTAACCG
CLONE 1	TCCCTGTGTGCGCGTTATCCGAAAAACGCTTCGTCGCCGATGGTAACCG
CLONE 2	TCCCTGTGTGCGCGTTATCCGAAAAACGCTTCGTCGCCGATGGTAACCG
CLONE 3	TCCCTGTGTGCGCGTTATCCGAAAAACGCTTCGTCGCCGATGGTAACCG
CLONE 4	TCCCTGTGTGCGCGTTATCCGAAAAACGCTTCGTCGCCGATGGTAACCG
CLONE 5	TCCCTGTGTGCGCGTTATCCGAAAAACGCTTCGTCGCCGATGGTAACCG
KDR_doms2+3_synthetic_ORF	TATTTCTTGGGACAGCAAGAAAGGTTTACCATCCCGTCTATATGATCT
CLONE 1	TATTTCTTGGGACAGCAAGAAAGGTTTACCATCCCGTCTATATGATCT
CLONE 2	TATTTCTTGGGACAGCAAGAAAGGTTTACCATCCCGTCTATATGATCT
CLONE 3	TATTTCTTGGGACAGCAAGAAAGGTTTACCATCCCGTCTATATGATCT
CLONE 4	TATTTCTTGGGACAGCAAGAAAGGTTTACCATCCCGTCTATATGATCT
CLONE 5	TATTTCTTGGGACAGCAAGAAAGGTTTACCATCCCGTCTATATGATCT
KDR_doms2+3_synthetic_ORF	CCTACGCGGGCATGGTCTTCTGTGAAGCAAGATCAATGATGAATCCTAC
CLONE 1	CCTACGCGGGCATGGTCTTCTGTGAAGCAAGATCAATGATGAATCCTAC
CLONE 2	CCTACGCGGGCATGGTCTTCTGTGAAGCAAGATCAATGATGAATCCTAC
CLONE 3	CCTACGCGGGCATGGTCTTCTGTGAAGCAAGATCAATGATGAATCCTAC
CLONE 4	CCTACGCGGGCATGGTCTTCTGTGAAGCAAGATCAATGATGAATCCTAC
CLONE 5	CCTACGCGGGCATGGTCTTCTGTGAAGCAAGATCAATGATGAATCCTAC
KDR_doms2+3_synthetic_ORF	CAGTCTATCATGTACATTGTGGTAGTCGTTGGCTATCGTATTTACGATGT
CLONE 1	CAGTCTATCATGTACATTGTGGTAGTCGTTGGCTATCGTATTTACGATGT
CLONE 2	CAGTCTATCATGTACATTGTGGTAGTCGTTGGCTATCGTATTTACGATGT
CLONE 3	CAGTCTATCATGTACATTGTGGTAGTCGTTGGCTATCGTATTTACGATGT
CLONE 4	CAGTCTATCATGTACATTGTGGTAGTCGTTGGCTATCGTATTTACGATGT
CLONE 5	CAGTCTATCATGTACATTGTGGTAGTCGTTGGCTATCGTATTTACGATGT
KDR_doms2+3_synthetic_ORF	GGTTCTGTCCCCGTCCACGGCAATTGAGCTGTCCGTGGGTGAAAAACTGG
CLONE 1	GGTTCTGTCCCCGTCCACGGCAATTGAGCTGTCCGTGGGTGAAAAACTGG
CLONE 2	GGTTCTGTCCCCGTCCACGGCAATTGAGCTGTCCGTGGGTGAAAAACTGG
CLONE 3	GGTTCTGTCCCCGTCCACGGCAATTGAGCTGTCCGTGGGTGAAAAACTGG
CLONE 4	GGTTCTGTCCCCGTCCACGGCAATTGAGCTGTCCGTGGGTGAAAAACTGG
CLONE 5	GGTTCTGTCCCCGTCCACGGCAATTGAGCTGTCCGTGGGTGAAAAACTGG

Figura 25: Alinhamento da sequência projetada referente aos domínios 2 e 3 do KDR com a sequência obtida no sequenciamento da clonagem do *constructo* 2 e 3 do KDR em vetor pGFPuv. Os círculos azuis mostram os locais onde ocorreu deleção de nucleotídeos.

Apesar de a sequência codificadora para os domínios 2 e 3 do KDR ter sido obtida com mutações e deleções de algumas bases, não houve alteração na fase de leitura dos aminoácidos que codificam a proteína.

A **Figura 26** representa o número de deleções e de substituições e a frequência com a qual elas ocorrem. Por exemplo: no gráfico **26A**, a primeira soma de deleção ocorre próxima à posição 10 pb.

Figura 26: Análise gráfica das deleções (A) e das substituições (B) apresentadas na sequência sintética que codifica os domínios 2 e 3 do KDR. Interessante observar que, embora tenham ocorrido diversas deleções e/ou alterações dos nucleotídeos, não houve mudança na fase de leitura, o que mantém a sequência *in frame*.

DISCUSSÃO

A Natureza tem o privilégio de criar novos seres por meio do processo contínuo de mutação e seleção natural e por outros mecanismos de alteração do DNA [38]. O DNA possui somente quatro bases nitrogenadas (A, T, C e G), já as proteínas são compostas por aminoácidos, dos quais existem 20 tipos diferentes. Além disso, muitos genes podem ser combinados de diversas formas para produzir proteínas diferentes. O DNA está localizado no núcleo de qualquer célula, o que facilita a sua obtenção e purificação; já as proteínas só estão presentes em alguns tipos de células, e somente em certas fases de seu desenvolvimento. Portanto, não basta enumerar a sequência de aminoácidos que forma a proteína, porque tão importante quanto a sequência é a estrutura tridimensional que ela possui, o que interfere no papel e/ou papel que ela desempenha [35].

A técnica de obtenção de uma sequência de nucleotídeos partindo do cDNA correspondente à sequência desejada é bastante utilizada por sua praticidade de manipulação e rapidez no resultado [39]. No entanto, a obtenção do cDNA de uma proteína pode, por vezes, não ser tão fácil quanto se espera. Neste caso, torna-se interessante o desenvolvimento de uma metodologia que permita a síntese de um gene por meio da combinação de oligonucleotídeos que, amplificados e estendidos, resultem em uma sequência nucleotídica que codifique uma proteína.

Um dos principais objetivos da clonagem é a expressão do segmento clonado. Em geral, entendemos por expressão do gene a proteína que ele codifica. Assim, ao clonarmos um gene qualquer, desejamos que ele possa ser expresso num outro organismo. Neste estudo foi utilizada a bactéria *E.coli* para processar a produção da proteína recombinante de forma que se possa obter grandes quantidades.

A proteína alvo desse estudo é o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), um elemento importante para muitos processos angiogênicos. A família de VEGF inclui VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, PlGF-1 e 2, e VEGF-F. VEGF-A é o regulador chave do crescimento normal e patológico do vaso sanguíneo. VEGF foi descrito, primeiramente, como um fator vascular da permeabilidade (VPF). Nos 20 anos seguintes, houve uma grande evolução na pesquisa sobre o VEGF, encontrando características moleculares deste fator que tornaram compreensíveis suas atividades biológicas e, ao mesmo tempo, delimitaram as funções de cada um de seus receptores VEGFR-1, VEGFR-2 (KDR) e VEGFR-3. Estudos mostraram que o VEGF conduz ao desenvolvimento vascular anormal e a mortalidade embrionária, enfatizando o papel crítico do VEGF no desenvolvimento do vaso sanguíneo [13].

Os receptores de VEGF (VEGFR) apresentam características dos receptores tirosina quinase, são homólogos, porém distintos. A expressão destes receptores aumenta em circunstâncias patológicas nas quais ocorre hipóxia. VEGF liga a seus receptores e estimula uma variedade de moléculas da sinalização, tendo como resultado a promoção da neovascularização [4].

Estudos realizados por Yamazaki *et al*, em 2005, mostraram um fator exógeno que antagoniza o KDR por meio de uma ligação externa com o receptor, além disso, identificaram a molécula alvo da miotoxicidade básica da fosfolipase A2 em peçonha.

As peçonhas das serpentes contêm diferentes toxinas de natureza protéica, algumas com atividade enzimática que podem atuar conjuntamente e são responsáveis pelos principais efeitos lesivos sistêmicos (como ações coagulante e

hemorrágica) e locais (como mionecrose e edema) [40]. A composição química destas proteínas tóxicas é muito variável refletindo grandes alterações em efeitos específicos e na toxicidade das peçonhas [41].

Com base nos estudos de Yamazaki, espera-se que a Lys49PLA2 seja um ligante seletivo para os receptores de VEGF, especialmente para KDR [19], o que motivou a busca por uma sequência de nucleotídeos correspondente aos domínios 2 e 3 do KDR de forma a permitir aplicações otimizadas de seus *códons*, ao ser expressa em bactéria *E. coli*.

Após a obtenção da sequência correspondente aos domínios 2 e 3 do KDR, partindo do cDNA (HUVEC) de VEGF (Figura 12), esta foi clonada em vetor de expressão pET28a. O vetor pET28a (Figura 5) carrega duas sequências codificadoras para cauda de 6 Histidinas (17pb), uma origem de replicação (455pb), regiões do promotor, a sequência referente ao operon da lactose, *lac I* (1079pb) e o gene que confere resistência a Kanamicina (812pb). Além disso, existe também uma região com múltiplos sítios de clonagem, que podem ser clivados pelas enzimas de restrição (Novagen).

O clone foi expresso em bactéria *E.coli* da linhagem BL21, conforme observado na Figura 18. Este resultado evidencia um aumento considerável da banda correspondente à proteína heteróloga correspondente aos domínios 2 e 3 do KDR, cujo tamanho é de 25 kDa nos intervalos de 1 a 6 h de indução quando comparado com a cultura não induzida (NI). Proteínas que contêm afinidade por íons metálicos podem ser separadas utilizando-se a cromatografia por afinidade a um metal quelato. Os metais são imobilizados numa resina cromatográfica por quelação. Certos aminoácidos, tais como a histidina e a cisteína, formam complexos com os

metais quelatos próximos a pH neutro.

Antes do uso, a resina é carregada com a solução de um íon metálico bivalente como Ni^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Ca^{2+} , Co^{2+} ou Fe^{2+} . O níquel é mais utilizado para proteínas com cauda de histidina. A retenção com a proteína-alvo é dependente do pH. A Sepharose, a resina usada para este tipo de cromatografia, é formada ligando-se um metal quelato a agarose.

O ácido nitriloacético (NTA) é um adsorvente quelato tetradentado, que ocupa quatro dos seis sítios ligantes na esfera de coordenação do íon metálico, deixando somente dois sítios livres para interação com a cauda de Histidina.

Quando um extrato de proteína é passado através da Sepharose, a proteína com a cauda de Histidina liga-se a ela e outras proteínas são lavadas com o tampão apropriado. A proteína desejada pode então ser recuperada numa forma altamente purificada por eluição, (quando esta é solta da matriz cromatográfica), com tampão contendo imidazol. O imidazol possui uma estrutura semelhante ao aminoácido histidina e libera, por competição, as proteínas ligadas na resina por esse aminoácido.

A etapa seguinte foi a realização de um teste de solubilidade para verificar se a proteína resultante é solúvel ou se forma corpo de inclusão. A Figura 19 revela que a proteína é solúvel, pois a banda correspondente a 25 kDa aparece na fase solúvel da cultura em meio de cultura HDM,

Com todos os resultados esperados da proteína originada partindo da amplificação do cDNA (HUVEC), iniciou-se a etapa de síntese do DNA, correspondente aos domínios 2 e 3 do KDR.

A proteína foi utilizada para monitorizar a expressão temporária da sequência

codificadora dos domínios 2 e 3 do KDR, substituindo genes repórteres ou fazendo seleção com base em antibióticos. O fato de a atividade da GFP poder ser monitorizada *in vivo*, a expressão da proteína em estudo pode ser acompanhada ao longo do tempo. Por exemplo, as proteínas fluorescentes são comumente utilizadas para determinar a localização e a dinâmica de proteínas, organismos e outros compartimentos celulares, assim como para avaliar a capacidade de expressão de diversos promotores [42].

A metodologia adotada para a obtenção dos clones, usando a sequência sintética que codifica os domínios 2 e 3 do KDR, foi a mesma usada para o produto amplificado por PCR (digestão, purificação, ligação, transformação, extração de DNA plasmidial, sequenciamento).

Os vários clones, obtidos no decorrer deste trabalho, apresentaram as mesmas características: tamanhos semelhantes em gel de agarose e deleções ou mutações quando analisadas por alinhamento dos resultados de sequenciamento. Tais eventos foram investigados e, visando evitar novos erros, oligonucleotídeos correspondentes as regiões que sofreram mutação ou deleção foram adquiridos e utilizados em mutagênese sítio dirigida através da reação em cadeia de polimerase. Porém, ainda assim, permaneceram apresentando uma sequência muito próxima, mas não idêntica aquela encontrada no banco de dados *GenBank* AAC16450.1.

Conforme observado na figura 23, apesar da permanência de trocas e deleções de alguns pares de bases, não houve alteração dos *códons*, mantendo a fase de leitura dos aminoácidos.

A figura 24 enfatiza a ocorrência das deleções e das substituições das bases nos clones criados com a sequência sintética correspondente aos domínios 2 e 3 do

KDR. Na mesma figura, fica evidente que não há permanência de tais acontecimentos em determinada posição. Esse foi o motivo para a tentativa de se obter um clone com a sequência correta de nucleotídeos por meio de mutação sítio dirigida.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

As principais contribuições deste trabalho, bem como perspectivas futuras, estão descritas a seguir:

- ✓ A amplificação do cDNA (HUVEC) e a clonagem da sequência correspondente aos domínios 2 e 3 do KDR em vetor de expressão pET28a foram bem sucedidas.
- ✓ A proteína foi observada no extrato solúvel de *E. coli*, não formando, portanto, corpo de inclusão.
- ✓ A sequência sintética que codifica os domínios 2 e 3 do KDR foi obtida com algumas alterações quando comparadas com a sequência original, encontrada no *GenBank* AAC16450.1.
- ✓ Pretende-se obter novas construções da sequência de DNA que codifica os domínios 2 e 3 do KDR utilizando mutagênese sítio dirigida, para posterior clonagem em vetor de expressão pET28a e aplicações otimizadas de seus *códons*.

REFERÊNCIAS

BIBLIOGRÁFICAS

1. Shibuya, M., *Vascular endothelial growth factor-dependent and -independent regulation of angiogenesis*. BMB Rep, 2008. **41**(4): p. 278-86.
2. Rahimi, N., *VEGFR-1 and VEGFR-2: two non-identical twins with a unique physiognomy*. Front Biosci, 2006. **11**: p. 818-29.
3. Murata, N., et al., *Anti-tumor effects of anti-VEGF siRNA encapsulated with PLGA microspheres in mice*. J Control Release, 2008. **126**(3): p. 246-54.
4. Murata, M., K. Yudoh, and K. Masuko, *The potential role of vascular endothelial growth factor (VEGF) in cartilage: how the angiogenic factor could be involved in the pathogenesis of osteoarthritis?* Osteoarthritis Cartilage, 2008. **16**(3): p. 279-86.
5. Tammela, T., et al., *The biology of vascular endothelial growth factors*. Cardiovasc Res, 2005. **65**(3): p. 550-63.
6. Shima, D.T., U. Deutsch, and P.A. D'Amore, *Hypoxic induction of vascular endothelial growth factor (VEGF) in human epithelial cells is mediated by increases in mRNA stability*. FEBS Lett, 1995. **370**(3): p. 203-8.
7. Weis, S.M. and D.A. Cheresh, *Pathophysiological consequences of VEGF-induced vascular permeability*. Nature, 2005. **437**(7058): p. 497-504.
8. Bando, H., *Vascular endothelial growth factor and bevacitumab in breast cancer*. Breast Cancer, 2007. **14**(2): p. 163-73.
9. Muller, Y.A., et al., *Vascular endothelial growth factor: crystal structure and functional mapping of the kinase domain receptor binding site*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(14): p. 7192-7.
10. Shinkai, A., et al., *Mapping of the sites involved in ligand association and dissociation at the extracellular domain of the kinase insert domain-containing receptor for vascular endothelial growth factor*. J Biol Chem, 1998. **273**(47): p. 31283-8.
11. Medford, A.R. and A.B. Millar, *Vascular endothelial growth factor (VEGF) in acute lung injury (ALI) and acute respiratory distress syndrome (ARDS): paradox or paradigm?* Thx, 2006. **61**(7): p. 621-6.
12. Lomonte, B., Y. Angulo, and C. Santamaria, *Comparative study of synthetic peptides corresponding to region 115-129 in Lys49 myotoxic phospholipases A2 from snake venoms*. Toxicon, 2003. **42**(3): p. 307-12.

13. Dvorak, H.F., et al., *Vascular permeability factor, fibrin, and the pathogenesis of tumor stroma formation*. Ann N Y Acad Sci, 1992. **667**: p. 101-11.
14. Rahimi, N., *Vascular endothelial growth factor receptors: molecular mechanisms of activation and therapeutic potentials*. Exp Eye Res, 2006. **83**(5): p. 1005-16.
15. Shibuya, M., *Differential roles of vascular endothelial growth factor receptor-1 and receptor-2 in angiogenesis*. J Biochem Mol Biol, 2006. **39**(5): p. 469-78.
16. Shibuya, M., N. Ito, and L. Claesson-Welsh, *Structure and function of vascular endothelial growth factor receptor-1 and -2*. Curr Top Microbiol Immunol, 1999. **237**: p. 59-83.
17. Fuh, G., et al., *Requirements for binding and signaling of the kinase domain receptor for vascular endothelial growth factor*. J Biol Chem, 1998. **273**(18): p. 11197-204.
18. Kiselyov, A.S., et al., *Inhibitors of VEGF receptors-1 and -2 based on the 2-((pyridin-4-yl)ethyl)pyridine template*. Bioorg Med Chem Lett, 2006. **16**(7): p. 1913-9.
19. Yamazaki, Y., et al., *Identification of vascular endothelial growth factor receptor-binding protein in the venom of eastern cottonmouth. A new role of snake venom myotoxic Lys49-phospholipase A2*. J Biol Chem, 2005. **280**(34): p. 29989-92.
20. van, D.L., H.G. de, and C.H. Heemskerk, *Hydrolysis of synthetic mixed-acid phosphatides by phospholipase A from human pancreas*. Biochim Biophys Acta, 1963. **67**: p. 295-304.
21. Kudo, I., et al., *Mammalian non-pancreatic phospholipases A2*. Biochim Biophys Acta, 1993. **1170**(3): p. 217-31.
22. da Silva Giotto, M.T., et al., *Crystallographic and spectroscopic characterization of a molecular hinge: conformational changes in bothropstoxin I, a dimeric Lys49-phospholipase A2 homologue*. Proteins, 1998. **30**(4): p. 442-54.
23. de Oliveira, A.H., et al., *A pH-induced dissociation of the dimeric form of a lysine 49-phospholipase A2 abolishes Ca²⁺-independent membrane damaging activity*. Biochemistry, 2001. **40**(23): p. 6912-20.

24. Ruller, R., et al., *Chemical denaturation of a homodimeric lysine-49 phospholipase A2: a stable dimer interface and a native monomeric intermediate*. Arch Biochem Biophys, 2003. **411**(1): p. 112-20.
25. Lomonte, B. and J.M. Gutierrez, *A new muscle damaging toxin, myotoxin II, from the venom of the snake Bothrops asper (terciopelo)*. Toxicon, 1989. **27**(7): p. 725-33.
26. Veikkola, T., et al., *Regulation of angiogenesis via vascular endothelial growth factor receptors*. Cancer Res, 2000. **60**(2): p. 203-12.
27. Lapatschek, M., et al., *Functional analysis of the env open reading frame in human endogenous retrovirus IDDMK(1,2)22 encoding superantigen activity*. J Virol, 2000. **74**(14): p. 6386-93.
28. Pluvinau, B., et al., *Cloning and molecular characterization of three arylamine N-acetyltransferase genes from Bacillus anthracis: identification of unusual enzymatic properties and their contribution to sulfamethoxazole resistance*. Biochemistry, 2007. **46**(23): p. 7069-78.
29. Marcipar, I.S., et al., *The diagnostic performance of recombinant Trypanosoma cruzi ribosomal P2beta protein is influenced by its expression system*. Protein Expr Purif, 2004. **34**(1): p. 1-7.
30. Gustafsson, C., S. Govindarajan, and J. Minshall, *Codon bias and heterologous protein expression*. Trends Biotechnol, 2004. **22**(7): p. 346-53.
31. Villalobos, A., et al., *Gene Designer: a synthetic biology tool for constructing artificial DNA segments*. BMC Bioinformatics, 2006. **7**: p. 285.
32. Fuglsang, A., *Codon optimizer: a freeware tool for codon optimization*. Protein Expr Purif, 2003. **31**(2): p. 247-9.
33. Aragao, E.A., L. Chioato, and R.J. Ward, *Permeabilization of E. coli K12 inner and outer membranes by bothropstoxin-I, A LYS49 phospholipase A2 from Bothrops jararacussu*. Toxicon, 2008. **51**(4): p. 538-46.
34. Aachmann, F.L. and T.E. Aune, *Use of cyclodextrin and its derivatives for increased transformation efficiency of competent bacterial cells*. Appl Microbiol Biotechnol, 2009. **83**(3): p. 589-96.
35. Marshall, A. and J. Hodgson, *DNA chips: an array of possibilities*. Nat Biotechnol, 1998. **16**(1): p. 27-31.

36. Quadros, C.A., et al., *Upstaging benefits and accuracy of sentinel lymph node mapping in colorectal adenocarcinoma nodal staging*. J Surg Oncol, 2008. **98**(5): p. 324-30.
37. Service, R.F., *Nobel Prize in chemistry. Three scientists bask in prize's fluorescent glow*. Science, 2008. **322**(5900): p. 361.
38. Rabin, S., *The human use of humanoid beings: chimeras and patent law*. Nat Biotechnol, 2006. **24**(5): p. 517-9.
39. Shao, Z., H. Zhao, and H. Zhao, *DNA assembler, an in vivo genetic method for rapid construction of biochemical pathways*. Nucleic Acids Res, 2009. **37**(2): p. e16.
40. Aird, S.D. and N.J. da Silva, Jr., *Comparative enzymatic composition of Brazilian coral snake (Micrurus) venoms*. Comp Biochem Physiol B, 1991. **99**(2): p. 287-94.
41. Chippaux, J.P., V. Williams, and J. White, *Snake venom variability: methods of study, results and interpretation*. Toxicon, 1991. **29**(11): p. 1279-303.
42. Kaar, W., et al., *Refolding of N(pro) fusion proteins*. Biotechnol Bioeng, 2009.
43. *GenBank* disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank/>. Acessado em 25/09/2008 às 10:03h.
44. Disponível em <http://www.uff.br/rvq/article/viewArticle/62/108>. Acessado em 20/09/2008 às 14:46h.
45. Disponível em <http://pymol.sourceforge.net/>. Acessado em 05/10/2008 às 09:25h.
46. Disponível em <http://www.fermentas.com/catalog/kits/clonejetpcrclon.htm>. Acessado em 07/09/2008 às 13:52h.
47. Disponível em <http://eshop.emdchemicals.com/is-bin/INTERSHOP>. Acessado em 25/07/2008 às 16:51h.
48. Disponível em <http://www.clontech.com/images/pt/PT3055-SEQ.pdf>. Acessado em 30/07/2008 às 08:23h.