



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA MOLECULAR

**EFEITOS DA CLONAGEM DE ELEMENTOS DE DNA ANTI-REPRESSORES EM
VETOR DE EXPRESSÃO NA PRODUÇÃO DE ANTI-CD3 EM CHO-K1.**

PAULO HENRIQUE DE FRANCO ALCÂNTARA

Orientador: Prof^a. Andréa Queiroz Maranhão

Coorientador: Prof^o. Marcelo de Macedo Brígido

BRASÍLIA, DF
2010



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR
PÓS – GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA

**EFEITOS DA CLONAGEM DE ELEMENTOS DE DNA ANTI-REPRESSORES EM
VETOR DE EXPRESSÃO NA PRODUÇÃO DE ANTI-CD3 EM CHO-K1**

PAULO HENRIQUE DE FRANCO ALCÂNTARA

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

Dissertação apresentada ao
Departamento de Biologia Celular
do Instituto de Ciências Biológicas
da Universidade de Brasília como
requisito parcial à obtenção do
grau de Mestre em Biologia
Molecular

Brasília – DF
2010

Banca Examinadora:

Prof^a. Dra. Andréa Queiroz Maranhão – Orientadora

Prof. Dr. Marcelo de Macedo Brígido – Co-orientador

Prof^a. Dra. Maria de Fátima dos Santos – UnB (membro externo)

Prof. Dr. Márcio José Poças Fonseca - UnB

Prof^a. Dra. Ildinete Silva Pereira - UnB

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

Agradecimentos

Gostaria de agradecer todo o conjunto do Laboratório de Biologia Molecular da UnB, especialmente a Professora Andrea Maranhão, pela excelente orientação e pelo zelo dedicado a seus alunos, o Professor Marcelo Brígido, que além de abrir as portas do laboratório também colaborou como co-orientador, e os colegas do grupo de Imunologia Molecular, que tornaram o ambiente subterrâneo do Minhocão muito mais agradável.

Também quero agradecer as pessoas que me incentivaram e estimularam a continuar meus estudos além da graduação, principalmente os meus pais que priorizam a minha educação e a dos meus irmãos acima de tudo! Aproveito para recordar com gratidão os outros familiares (irmãos, tios, primos, avós), os amigos (do Colégio Militar de Brasília e da Fundação Logosófica) e a namorada, Isadora, a qual me estimulou a finalizar a redação dessa dissertação. Agradeço também o pensador humanista González Pecotche, pelos conhecimentos que guiam muitos dos meus passos rumo ao arquétipo de ser humano que quero ser.

Agradeço a Deus, não aquele imposto pelas crenças, mas o que eu aprendi a conhecer por meio do conhecimento. Esse Deus (o verdadeiro) me concedeu a prerrogativa de viver e evoluir conscientemente, e entendo que a conclusão desse mestrado, mais que um curso de pós-graduação, foi uma oportunidade de aperfeiçoamento.

Sumário

Índice de Figuras	viii
Índice de Tabelas	ix
Lista de Abreviaturas	x
Resumo	xiii
Abstract	xiv
Introdução	1
1.1 Estrutura da cromatina em eucariotos	1
1.2 Elementos funcionais na modulação da expressão gênica em eucariotos	4
1.3 Produção de proteínas terapêuticas em células de mamíferos	6
1.4 Anticorpos como biofármacos	10
1.5 Modelo experimental	14
Objetivos	15
2.1 Objetivo Geral	15
2.2 Objetivos Específicos	15
Materiais e Métodos	16
3.1 Materiais	16
3.1.1 Células	16
3.1.2 Plasmídios	16
3.1.3 Oligonucleotídeos	17
3.1.4 Soluções estoques de inibidores de proteases	19
3.1.5 Meios de cultura para bactérias	20
3.1.6 Meios de cultura e soluções para cultura de células de mamíferos	21
3.1.7 Soluções e tampões de uso geral	22
3.1.8 Soluções e material para preparo de células competentes e transformação bacteriana	22
3.1.9 Soluções para preparação de DNA plasmidial	23
3.1.10 Enzimas e tampões de endonucleases de restrição	24
3.1.11 Enzimas e reagentes de outras reações enzimáticas utilizadas em DNA	25
3.1.12 Soluções e reagentes para eletroforese em gel de agarose	27
3.1.13 Anticorpos utilizados nos ensaios de ELISA	27

3.1.14 Soluções e materiais para ELISA _____	28
3.1.15 Marcadores moleculares para DNA _____	28
3.1.16 Kits comerciais _____	29
3.2 Métodos _____	30
3.2.1 Extração e quantificação de DNA cromossomal de leucócitos do sangue periférico humano _____	30
3.2.2 Reações em cadeia da polimerase (PCR) _____	30
3.2.2.1 Amplificação por PCR dos elementos anti-repressores _____	30
3.2.2.2 Adição de adeninas nas extremidades dos amplicons _____	31
3.2.3 Análise de DNA plasmidial em gel de agarose _____	31
3.2.4 Eluição de fragmentos de DNA de gel de agarose _____	32
3.2.5 Ligação de fragmentos de DNA _____	33
3.2.6 Transformação bacteriana _____	33
3.2.6.1 Preparo de células competentes _____	33
3.2.6.1 Eletroporação _____	34
3.2.7 Preparação plasmidial em pequena escala _____	34
3.2.8 Digestão do DNA plasmidial com enzimas de restrição _____	35
3.2.9 Sequenciamento dos elementos anti-repressores _____	35
3.2.10 Cultura de células de mamíferos _____	36
3.2.10.1 Congelamento de células CHO – Criopreservação _____	36
3.2.10.2 Descongelamento de células CHO _____	36
3.2.10.3 Tripsinização, passagem das células e formação da monocamada celular _____	37
3.2.10.4 Estimativa do número de células viáveis por meio de contagem em câmara de Neubauer _____	38
3.2.10.5 Transfecção de células CHO utilizando o reagente Lipofectamine LTX _____	38
3.2.10.6 Seleção de células transfectadas utilizando Geneticina (G418) _____	39
3.2.10.7 Isolamento de clones estáveis produtores de anticorpos recombinantes _____	40
3.2.11 ELISA (<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>) _____	41
Resultados e Discussão _____	42
4.1 Isolamento dos elementos anti-repressores a partir do genoma humano _____	42
4.1.1 Reações de amplificação e adenilação dos elementos anti-repressores _____	42
4.1.2 Clonagem dos elementos anti-repressores em pGEM-T Easy _____	45

4.1.3 Sequenciamento dos elementos anti-repressores em pGEM-T Easy	47
4.2 Clonagem em vetor de expressão em células de mamífero	56
4.2.1 Otimização do promotor CMV	56
4.2.1 Clonagem dos elementos anti-repressores	58
4.3 Transfecção em CHO-K1 e seleção de clones estáveis	61
4.4 Análise da expressão gênica	63
Conclusão e Perspectivas	65
Referências Bibliográficas	67

Índice de Figuras

Figura 1. Esquemática da dinâmica do estado de compactação da cromatina _____	3
Figura 2. Diagrama esquemático de uma molécula de IgG secretada _____	10
Figura 3. Nomenclatura de anticorpos recombinantes obtidos por engenharia genética _____	11
Figura 4. Esquemática da estrutura de oligossacarídeos no motivo Fc de IgG humana _____	12
Figura 5. Desenho esquemático das interações entre oligossacarídeos adicionados à região Fc de um anticorpo _____	13
Figura 6. Análise eletroforética da integridade do DNA genômico extraído de células sanguíneas humanas _____	42
Figura 7. Obtenção por PCR dos elementos anti-repressores _____	44
Figura 8. Construção do vetor pGEM-T Easy elemento anti-repressor _____	46
Figura 9. Confirmação dos clones contendo os elementos 35 e 40 clonados no plasmídeo pGEM –T Easy _____	47
Figura 10. Esquemática do alinhamento dos clones recombinantes em relação às sequências do <i>GenBank</i> _____	48
Figura 11. Localização cromossômica do clone 1 e do elemento anti-repressor 40 no genoma humano _____	50
Figura 12. Alinhamento do elemento 40 e do clone 1 com o cromossomo 14 humano _____	51
Figura 13. Alinhamento do clone 1 e do elemento 40 ao longo do genoma humano _____	52
Figura 14. Detalhamento da região flanqueadora do elemento 40 no cromossomo 14 humano _____	54
Figura 15. Estratégia de construção do vetor pCO anti-CD3 FvFc humanizado _____	57
Figura 16. Perfil de restrição do vetor pCO anti-CD3 FvFc humanizado _____	58
Figura 17. Estratégia de construção dos vetores pCO35 anti-CD3 FvFc humanizado e pCO40 anti-CD3 FvFc humanizado _____	59
Figura 18. Perfil de restrição do vetor pCO35 anti-CD3 FvFc humanizado _____	60
Figura 19. Perfil de restrição do vetor pCO40 anti-CD3 FvFc humanizado _____	61
Figura 20. Mecanismo de ação do sítio de entrada ribossomal interno (IRES) em um processo de tradução _____	62

Índice de Tabelas

Tabela 1. Características dos elementos de DNA moduladores da expressão heteróloga em células de mamíferos _____	6
Tabela 2. Anticorpos monoclonais recombinantes aprovados para comercialização _____	7
Tabela 3. Oligonucleotídeos sintéticos utilizados _____	17

Lista de abreviaturas

ADCC	Citotoxicidade celular mediada por anticorpos
ATP	Nucleotídeo trifosfato de adenosina
Amp ^R	Gene de resistência à ampicilina (β -lactamase)
BSA	Albumina bovina sérica
°C	Grau Celcius
CD	Marcador de superfície celular (<i>Cluster of differentiation</i>)
CH	Cadeia constante pesada de anticorpo
CHO	Células de ovário de <i>hamster</i> chinês
CMV	citomegalovírus
IA	Intron A
CL	Cadeia constante leve de anticorpo
dNTPs	Mistura de desoxirribonucleotídeos trifosfatos adenosina, citidina, guanosina, timidina
dH ₂ O	Água destilada
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ELISA	Ensaio de ligação imunoenzimática
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo
Fab	Fragmento (de anticorpo) de ligação ao antígeno
Fc	Fragmento (de anticorpo) cristalizável (porção constante)
FDA	<i>Food and Drug Administration</i> (EUA)
Fv	Fragmento (do anticorpo) variável
g	Gramma
g	Força gravitacional
h	Hora
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
kb	Kilobase

L	Litro
nm	Nanometro
M	Molar
mA	Miliampère
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mRNA	Ácido ribonucléico mensageiro
ms	Milisegundo
ng	Nanograma
OD	densidade ótica
ori	Origem de replicação
pb	Par de base
PBMC	Células mononucleares do sangue periférico
RT – qPCR	Transcrição reversa seguida de PCR quantitativa
PBS	Tampão salina fosfato
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pH	Potencial hidrogeniônico
pmol	picomol
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonato
SFB	Soro fetal bovino
TE	Tampão Tris/EDTA
rpm	Rotações por minuto
RNA	Ácido ribonucléico
RNAse	Ribonuclease
scFv	Fragmento variável (de anticorpo) de cadeia única
SDS	Sódio Duodecil Sulfato
Tris	Tri (hidroximetil) aminometano
U	Unidade enzimática
V	Volts
v	Volume
VH	Domínio variável da cadeia pesada de um anticorpo
VL	Domínio variável da cadeia leve de um anticorpo
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosídeo

μF	Micro Faraday
μg	Micrograma
μL	Microlitro
μm	Micrômetro
μM	Micromolar
τ	Tempo de passagem da corrente elétrica
Ω	Unidade de medida da resistência elétrica (ohm)
HAT	Histona acetil-transferase
HDAC	Histona deacetilase
HMT	Histona methyl-transferase
HP1	Proteína de heterocromatina 1
LCR	Região de controle do <i>locus</i>
cHS4	Sítio 4 hipersensível de β -globina de galinha
MAR	Região associada a matriz
STAR	Elemento antirepressor e estabilizador
GFP	Proteína florescente verde
SEAP	Fosfatase alcalina secretada
SV40	Vírus de símio 40
U-2OS	Célula de osteosarcoma humana
IFN- γ	Interferon γ

Resumo

Nos últimos anos o grupo de Imunologia Molecular da Universidade de Brasília tem humanizado anticorpos de interesse clínico visando a sua aplicação terapêutica. A produção de proteínas terapêuticas como essas é de grande interesse para a indústria biofarmacêutica. Com intuito de produzir glicoproteínas estáveis, têm-se utilizado células de mamíferos como sistema de expressão heteróloga, pois estas possuem uma maquinaria pós-transcricional necessária para estabilizar biomoléculas complexas. No entanto, a produção de tais moléculas é geralmente dificultada pela imprevisibilidade e instabilidade da expressão ao longo do tempo. Isso se deve à alta probabilidade de silenciamento dos transgenes ao serem integrados na cromatina das células de mamíferos. Uma das alternativas para contornar esse problema é o melhoramento de vetores de expressão com o emprego de pequenos elementos de DNA (menores que 2100 pares de bases) que atuam como anti-repressores. No presente trabalho foram isolados quatro elementos de DNA humanos semelhantes às sequências dos elementos anti-repressores 35 e 40 identificados por Kwaks e colaboradores em 2003. Um elemento semelhante ao anti-repressor 35 e outro semelhante ao anti-repressor 40 foram clonados no vetor de expressão em células de mamíferos pMIREs anti-CD3 FvFc humanizado (Silva *et al.*, 2009). O elemento anti-repressor 35 apresentou vários alinhamentos no cromossomo 7 humano. Já o elemento 40 pôde ser alinhado com diversas regiões de vários cromossomos, destacando-se os alinhamentos nos cromossomos 14 e 22. Esses elementos de DNA são sequências repetitivas presentes ao longo do genoma humano. Além disso, substituiu-se o promotor de citomegalovírus (CMV) deste mesmo vetor por um promotor CMV otimizado contendo a sequência do intron A (IA). As novas construções de vetores foram transfectadas em células de ovário de *hamster* chinês (CHO) e clones estáveis foram isolados para posterior caracterização da produção de anticorpos.

Devido a sua similaridade com sequências anti-repressoras e o seu predomínio em regiões subcentroméricas, sugere-se que os elementos de DNA isolados sejam importantes na modulação da cromatina exercendo atividade anti-repressora. Outra hipótese é que, devido ao fato de serem elementos repetitivos no genoma humano, tais elementos podem ter sua origem em regiões altamente transcritas de retrotransposons.

Abstract

Recently, the Molecular Immunology group of Universidade de Brasília has humanized clinical antibodies aiming their therapeutic applications. These therapeutic proteins production is of great interest to the biopharmaceutical industry. In order to produce stable glycoproteins, mammalian cells have been used as heterologous expression system since they possess post-translational machinery to stabilize those complex biomolecules. However, the production of such molecules is often hampered down by the unpredictability and instability of expression over time. This is due to the high probability of silencing of transgenes integrated into the chromatin of mammalian cells. One way to overcome this problem is the use of small elements of DNA (less than 2100 base pairs) that act as anti-repressors. In this work we have isolated four DNA human elements similar to the anti-repressors 35 and 40 sequences identified by Kwaks and collaborators in 2003. An element similar to the anti-repressor 35 and other similar to the anti-repressor 40 were cloned into the expression vector for mammalian cells pMIRE5 humanized anti-CD3 FvFc (Silva et al., 2009). The anti-repressor element 35 presented several alignments on human chromosome 7. Moreover, the element 40 was aligned with different regions on several chromosomes, particularly on chromosomes 14 and 22. These DNA elements are repetitive sequences present throughout the human genome. Additionally, we substituted the vector cytomegalovirus (CMV) promoter by the optimized CMV promoter containing the intron A (IA) sequence. These new vectors constructions were transfected into Chinese hamster ovary cells (CHO) and stable clones were isolated to access the antibody production.

Due to its similarity to anti-repressor sequences and its prevalence in sub centromeric regions, it is suggested that the isolated DNA elements are important in the chromatin modulation by exerting anti-repressor activity. Another hypothesis is that, due to the fact that they are repetitive elements in the human genome, these elements may have their origin in retrotransposon's highly transcribed regions.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Estrutura da cromatina

No genoma dos organismos eucarióticos, o DNA se encontra complexado a diversas proteínas (principalmente a histonas). Tal complexo é chamado de cromatina. As histonas são proteínas ricas em aminoácidos básicos, principalmente arginina e lisina, que se associam ionicamente aos grupamentos fosfato do DNA, e são classificadas em H1, H2A, H2B, H3 e H4 (revisto por Garcia *et al.*, 2007). Particularmente, as histonas H3 e H4 são bastante conservadas nos eucariotos, o que sugere que tais proteínas exerçam uma função básica para a vida desses organismos.

A unidade fundamental de organização da cromatina é o nucleossomo, caracterizado por duas voltas de DNA dupla hélice ao redor de um octâmero de histonas (duas cópias de cada uma das H2A, H2B, H3 e H4), mais um DNA espaçador associado à histona H1. As cadeias laterais das histonas estão sujeitas a modificações enzimáticas que alteram a carga elétrica líquida e a conformação da proteína. Tanto os deslocamentos dos nucleossomos ao longo do DNA quanto as modificações enzimáticas das histonas interferem nas propriedades estruturais e funcionais da cromatina (revisto por Lelièvre, 2009).

Dependendo dessas modificações das histonas, dois graus de compactação de cromatina podem ser distinguidos – a eucromatina e a heterocromatina. A eucromatina é a região em que o complexo DNA-proteína se encontra mais frouxo, enquanto que a heterocromatina é a região mais compactada. O grau de compactação da cromatina é algo dinâmico, variando de acordo com as necessidades metabólicas da célula. Os genes localizados na região de heterocromatina são geralmente reprimidos ou silenciados (Dillon e Festenstein, 2002; Kwaks e Otte, 2006), enquanto os genes da região de eucromatina estão mais livres ao acesso da maquinaria de transcrição e, portanto, podem ser facilmente expressos. Dessa maneira, regulando as propriedades estruturais da cromatina, as células eucarióticas são capazes de controlar a sua expressão gênica (Garcia *et al.*, 2007).

Um exemplo claro da importância do controle da expressão realizado no nível de cromatina é a diferenciação celular, como é o caso da supressão do gene *ARHI* na diferenciação celular em câncer de mama (Feng *et al.*, 2007). A partir de um único genoma pode-se gerar uma grande variedade de tecidos diferenciados como consequência da expressão seletiva de genes. No entanto, os mecanismos de controle dessa expressão seletiva ainda precisam ser totalmente entendidos (revisto por Lelièvre, 2009).

Nos últimos anos, o estudo da regulação da expressão gênica tem sido bastante intensificado, especialmente aquela realizada pelas modificações da cromatina, visto que há um grande interesse na produção de proteínas heterólogas em organismos eucariotos. A fim de desvendar os mecanismos da expressão seletiva de genes, é importante ampliar o conhecimento sobre os elementos da maquinaria nuclear responsáveis pelo remodelamento da cromatina (Lelièvre, 2009).

O entendimento de fenômenos epigenéticos permite buscar relações entre as alterações sofridas pelas proteínas da cromatina e os níveis de transcrição de genes. Acetilações, metilações, fosforilações e ubiquitinações nos resíduos de lisina e serina localizados na extremidade amino-terminal das histonas exercem enormes impactos na ativação e inativação de genes (Peterson e Laniel, 2004; Margueron *et al.*, 2005). Dessa forma, os estudos em epigenética têm avançado no campo da regulação gênica, indo além da regulação exercida por promotores e *enhancers*. As informações obtidas a partir das combinações de modificações em histonas têm sido chamadas de “*histone code*” (Jenuwein e Allis, 2001). Para exemplificar, a lisina 27 de histonas H3 serve de sítio de ancoragem ao complexo policomb (Montgomery *et al.*, 2005), o que favorece a formação de heterocromatina e significa para a célula o silenciamento da expressão naquela região do DNA.

Outro exemplo é o estado em que se encontra a lisina 9 presente na cauda das histonas. A adição de um grupamento acetil (positivamente carregado) pela enzima HAT (*histone acetyltransferase*) na lisina 9 permite o afrouxamento dos nucleossomos e favorece, assim, a transcrição dos genes dessa região da cromatina (Figura 1A). Por outro lado, a deacetilação da lisina por meio da ação de HDAC (*histone deacetylase*) promove a compactação da cromatina (Figura 1B). À lisina deacetilada ainda pode-se adicionar um grupamento metil pela enzima HMT (*histone methyl transferase*). A lisina 9 metilada, por sua vez, é sítio para ligação do complexo protéico de heterocromatina HP1 (*heterochromatin protein 1*), um potente repressor associado a cromatina (Figura 1C). Como pode ser observado, o grau de compactação da cromatina envolve um balanço entre histonas acetiladas e histonas metiladas (revisto por Kwaks e Otte, 2006).

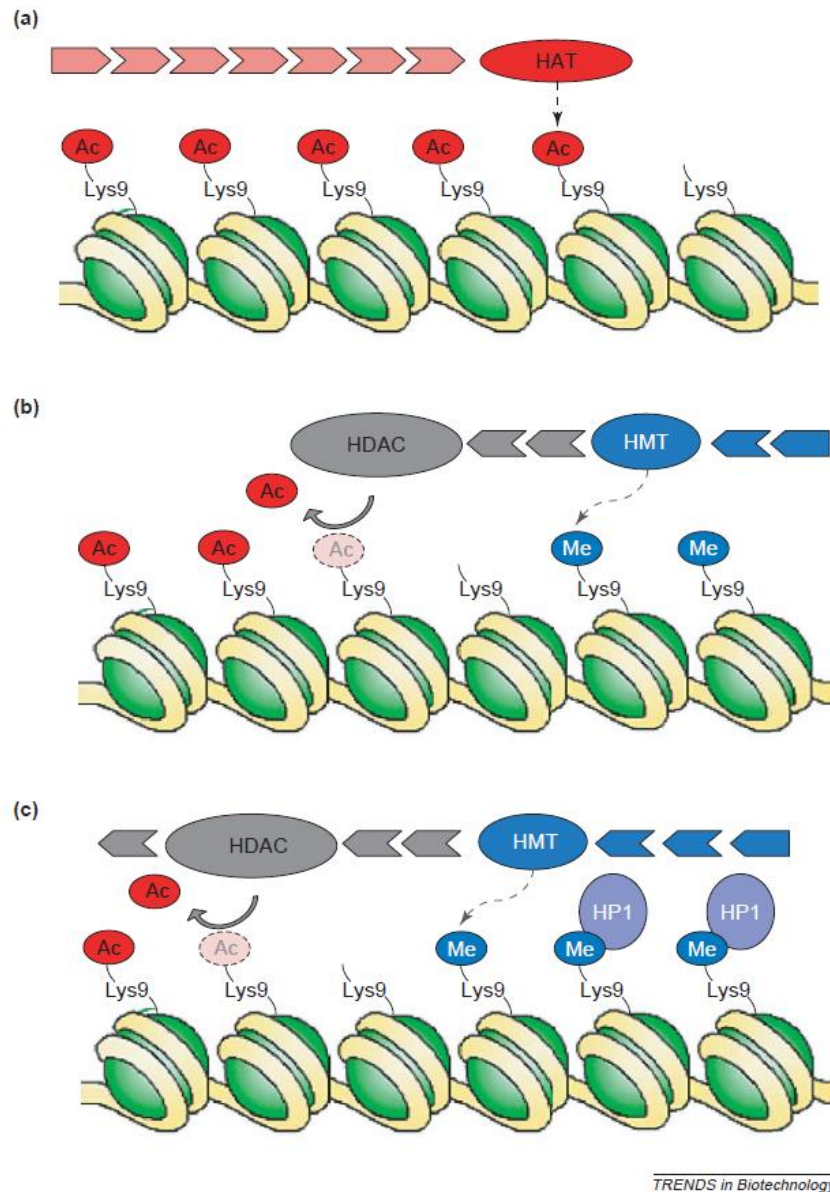


Figura 1. Esquemática da dinâmica do estado de compactação da cromatina. (Kwaks e Otte, 2006) A enzima HAT (*histone acetyltransferase*) promove a acetilação da lisina 9 das histonas do nucleossomo, o que promove o relaxamento da cromatina e permite o acesso da maquinaria de transcrição a essa região do DNA (A). A deacetilação promovida pela enzima HDAC (*histone deacetylase*) favorece a compactação da cromatina, particularmente quando se segue com a adição de grupos metil por parte da enzima HMT (*histone metyltransferase*) (B). A proteína HP1 (*heterochromatin protein 1*) ancora-se na lisina 9 metilada e reprime a expressão dos genes nessa região da cromatina (C).

Com a ampliação do conhecimento acerca das modificações sofridas pelas histonas, há uma expectativa de se desenvolver técnicas de modificação da cromatina na qual está integrado o gene de interesse, e assim aumentar a taxa de produção da proteína desejada.

1.2. Elementos funcionais na modulação da expressão gênica em eucariotos.

Uma estratégia para o aumento da produção de proteínas heterólogas é baseada na clonagem de elementos de DNA reguladores nas construções de vetores de expressão. Tais elementos devem exercer alguma atividade em *cis* no sentido de ativar a expressão. Um elemento de DNA ideal para utilização em vetores deve possuir as seguintes características:

- a) ter um tamanho razoável, caso seja muito extenso o vetor pode se tornar instável e muito grande para a clonagem;
- b) seu efeito deve ser dependente do número de cópias transfectadas/transformadas, ou seja, um maior número de cópias integradas no genoma deve corresponder a um aumento da expressão do gene;
- c) deve garantir uma estabilidade na produção protéica ao longo das gerações de células;
- d) deve ser, preferencialmente, universalmente aplicável, de maneira que possa ser utilizado em diversas linhagens celulares e com diferentes promotores.

Um dos elementos de DNA regulatórios conhecido é a região de controle do *locus* (LCR) que por um lado confere estabilidade de expressão e proporciona uma produção dependente do número de cópias integradas do gene recombinante, mas por outro lado é um elemento muito extenso e sua aplicabilidade é tecido específica (Tabela 1). A LCR de β -globina humana, por exemplo, só funciona em células derivadas de linhagens eritropoiéticas. Na tentativa de encontrar elementos menores, pode-se utilizar o sítio 4 hipersensível de β -globina de galinha (cHS4), sítio de 1,2 kb da LCR da β -globina de galinha. Embora mantenha a estabilidade da produção, perde a sua capacidade de expressão dependente do número de cópias e seu efeito continua sendo tecido específico (revisto por Kwaks e Otte, 2006).

Para contornar a dificuldade da ação tecido específica, existe a possibilidade de utilização de regiões de promotores de genes expressos ubiquamente. Conhecidos como UCOEs (*ubiquitous chromatin opening elements*), esses fragmentos de DNA podem ser utilizados em diversas linhagens eucarióticas, conferem um aumento e estabilidade da expressão heteróloga, mas sua extensão é relativamente grande quando comparada com os demais elementos de DNA utilizados nas construções de vetores de expressão em células de mamíferos (Tabela 1) (revisto por Kwaks e Otte, 2006).

Outro elemento de DNA bastante estudado recentemente é a região associada a matriz

(MAR). Tais elementos estão envolvidos na estruturação topológica da cromatina associada a matriz nuclear e, por esse motivo, acredita-se que eles regulem a acessibilidade dos genes presentes nessa região da cromatina. MARs operam independentemente do promotor ou da linhagem celular, aumentam os níveis de expressão e sua estabilidade, mas não apresentam correlação entre a produção e o número de cópias integradas no genoma da célula hospedeira (Tabela 1) (Kwaks e Otte, 2006; Galbete *et al.*, 2009).

Novos elementos de DNA envolvidos na modulação da expressão gênica foram identificados por Kwaks e colaboradores, em 2003. Esse grupo publicou um trabalho no qual desenvolveram um método para identificar elementos de DNA presentes no genoma humano capazes de exercer função anti-repressora sobre a ação das proteínas de heterocromatina HP1 e HP2C. Tais elementos foram denominados STAR (*stabilizing and antirepressor elements*) (Tabela 1). No total, foram isolados 65 elementos, sendo 10 deles avaliados separadamente no referido estudo. Basicamente, os pesquisadores clonaram cada um desses elementos de DNA flanqueando um gene de resistência a zeocina e analisaram os efeitos dessas construções transfectadas em CHO-K1. Como resultado, observou-se um aumento significativo na transcrição do gene de resistência. Além disso, houve um maior número de colônias que produziam a proteína de interesse, o que aumenta as chances de obter clones estáveis. Outro aspecto importante dos elementos anti-repressores estudados é que suas extensões não excedem 2100 pares de bases e, portanto, não inviabilizavam a sua clonagem em vetores de expressão (Kwaks *et al.*, 2003).

Em uma análise mais detalhada, os autores focaram a atenção no elemento 40, por ter apresentado os melhores resultados nos primeiros testes (maior taxa de transcrição, maior número de clones sobreviventes e crescimento mais rápido das colônias). Com uma extensão de 1031 pb, o efeito anti-repressor do elemento 40 apresentou bons resultados também nos testes seguintes tais como: aumento nos níveis de produção de diferentes proteína heterólogas (GFP, SEAP), sob o controle de diferentes promotores (CMV, SV40 E UB6) e em diferentes linhagens celulares (CHO-K1 e U-2OS). A produção heteróloga dos transfectomas ainda apresentou uma forte correlação com o número de cópias integradas no genoma e, na ausência do agente seletivo, a produção se manteve estável ao longo de 60 gerações.

Diante desses resultados, sugere-se que os elementos anti-repressores podem interferir na propagação do padrão de deacetilação e metilação das histonas, o que caracterizaria um estado reprimido da cromatina induzido pelas proteínas de heterocromatina. A interferência nesse nível molecular básico explicaria a capacidade anti-repressora nos diversos experimentos realizados (Kwaks *et al.*, 2003).

Posteriormente, em 2005, Kwaks e colaboradores fusionaram o domínio p300 da proteína HAT (*histone deacetylase*) à proteína LexA e o direcionaram ao promotor viral CMV e ao promotor celular UB6 obtendo melhores níveis de produção de uma proteína repórter. O sucesso da pesquisa ainda foi reforçado com a utilização de elementos anti-repressores flanqueando o gene repórter a qual, combinada com a utilização do domínio HAT, resultou em maiores níveis de expressão e estabilidade.

Com isso, a utilização de elementos de DNA com atividade anti-repressora representa uma valiosa ferramenta na produção de proteínas terapêuticas em sistemas de cultura de células de mamíferos.

Tabela 1. Características dos elementos de DNA moduladores da expressão heteróloga em células de mamíferos.

Elemento	Tamanho (kb)	Aumento da expressão	Estabilidade da expressão	Especificidade tecidual	Dependência do número de cópias
LCR	16	Sim	Sim	Sim	Sim
cHS4	1,2 – 2,4	Não	Sim	ND	Não
UCOE	2,5 – 8	Sim	Sim	Não	ND
MARs	~3	Sim	Sim	Não	ND
STAR	0,5 – 2	Sim	Sim	Não	Sim

ND: não determinado

(Adaptado de Kwaks e Otte, 2006)

1.3. Produção de proteínas terapêuticas em células de mamíferos

Proteínas terapêuticas têm representado um importante e crescente segmento da indústria farmacêutica com mais de 80 bilhões de dólares em vendas em todo o mundo (Pilbrough *et al.*, 2009). Com isso, há um grande interesse nas pesquisas relacionadas à produção de proteínas recombinantes nos diversos sistemas de expressão existentes. No caso das proteínas recombinantes voltadas a aplicação clínica, a indústria optou por utilizar como sistemas de expressão as culturas de *Escherichia coli* e de células de mamíferos, sendo a célula de ovário de hamster chinês (*Cricetulus griseus*) – CHO – a linhagem celular mais comum (revisado por Andersen e Krummen, 2002).

Em uma revisão publicada em 2002 por Chu e Robinson, foi mostrado que de janeiro de 1996 a novembro de 2000, 21 dos 33 produtos biotecnológicos licenciados pela FDA (*U.S. Food and Drug Administration*) eram produzidos em culturas de células de mamíferos, sendo 7

deles em CHO, e desde então diversos resultados clínicos foram positivos (Andersen e Reilly, 2004). Especialmente anticorpos monoclonais recombinantes tornaram-se uma importante classe de proteínas terapêuticas, atualmente contando com mais de 150 produtos em teste clínico e 22 diferentes produtos aprovados para comercialização (van Berkel et al., 2009).

Tabela 2. Anticorpos monoclonais recombinantes aprovados para comercialização.

Genérico	Fabricante	Nome comercial	Descrição	Data de aprovação
Muromonab-CD3	Ortho Biotech	Orthoclone OKT3	Murino, IgG2a, anti-CD3	14/09/92
Abciximab	Centocor	ReoPro	Quimérico, IgG1, anti-GPIIb/IIIa; Fab	22/12/94
Rituximab	Genentech	Rituxan	Quimérico, IgG1 κ , anti-CD20	26/11/97
Daclizumab	Hoffmann-La Roche	Zenapax	Humanizado, IgG1 κ , anti-CD25	10/12/97
Basiliximab	Novartis	Simulect	Quimérico, IgG1 κ , anti-CD25	12/05/98
Palivizumab	MedImmune	Synagis	Humanizado, IgG1 κ , Vírus respiratório	19/06/98
Infliximab	Centocor	Remicade	Quimérico, IgG1 κ , anti-fator de necrose tumoral (TNF α)	24/08/98
Trastuzumab	Genentech	Herceptin	Humanizado, IgG1 κ , anti-HER2	25/09/98
Gemtuzumab ozogamicin	Wyeth Madison	Mylotarg	Humanizado, IgG4 κ , anti-CD33; imunotoxina	17/05/00
Alemtuzumab	Genzyme Cambridge	Campath-1H	Humanizado, IgG1 κ , anti-CD52	07/05/01
Ibritumomab tiuxetan	Biogen Idec	Zevalin	Murino, IgG1 κ , anti-CD20; Radioterapia (Ítrio 90)	19/02/02
Adalimumab	Abbott Deerfield Park	Humira	Humano, IgG1 κ , anti-TNF α	31/12/02
Omalizumab	Genentech	Xolair	Humanizado, IgG1 κ , anti-IgE	20/06/03

Tositumomab-I131	Corixa	Bexxar	Murino, IgG2a λ , anti-CD20; Radioterapia (Iodo 131)	27/06/03
Efalizumab	Genentech	Raptiva	Humanizado, IgG1 κ , anti-CD11a	27/10/03
Cetuximab	Imclone Systems	Erbitux	Quimérico, IgG1 κ , anti-receptor de fator de crescimento epidérmico	12/02/04
Bevacizumab	Genentech	Avastin	Humanizado, IgG1, anti-fator de crescimento endotelial vascular	26/02/04
Natalizumaba	Biogen Idec	Tysabri	Humanizado, IgG4 κ , anti- α 4-integrina	23/11/04
Arcitumomab	Immunomedics	CEA-Scan	Murino, Diagnóstico por imagem para carcinoma colorretal	28/06/96
Imciromab Pentetate	Centocor	Myoscint	Murino, Diagnóstico por imagem para necrose miocárdica.	03/07/96
Capromab Pendetide	Cytogen Corp.	ProstaScint	Murino, Diagnóstico por imagem para carcinoma de próstata. Radiomarcção Índio 111	28/10/96
Nofetumomab	Boehringer Ingelheim	Verluma	Murino, Diagnóstico por imagem para Cancer de pulmão.	20/08/96

A explicação para o fato de a maioria desses produtos serem produzidos em células de mamífero é simples. Muitas proteínas de interesse farmacológico são estruturalmente complexas e requerem modificações pós-traducionais semelhantes às dos seres humanos para desempenharem suas funções *in vivo* com eficiência (Pilbrough *et al.*, 2009). Especialmente a produção de anticorpos inteiros em células de mamífero se faz necessária para o correto dobramento da proteína, ponto crítico para a atividade do medicamento. Desse modo, as maquinarias de glicosilação de proteínas, fosforilação, formação de pontes-dissulfeto e outras modificações pós-traducionais encontram-se disponíveis naturalmente em células de mamíferos (Butler, 2005). Essas modificações pós-traducionais são importantes para as células no tocante às propriedades das proteínas nativas como estabilidade da molécula,

citocalização, reconhecimento de ligantes, atividades biológicas, regulação da meia vida, e imunogenicidade (Walsh e Jefferis, 2006). Portanto, essas propriedades também devem ser consideradas na produção de proteínas heterólogas, principalmente visando a redução dos riscos de imunogenicidade causada pelas modificações não humanas, em particular a glicosilação (Schirrmann *et al*, 2008). Embora a glicosilação realizada pela célula CHO seja diferente da realizada pelo ser humano, as diferenças não afetam a segurança na utilização de proteínas recombinantes produzidas nesses sistemas de expressão (Schirrmann *et al*, 2008). Prova disto é a utilização segura de fator VIII recombinante produzido em CHO e purificado por cromatografia de afinidade pela Aventis Pasteur, aprovada para o tratamento de hemofilia A (Walsh e Jefferis, 2006). Com tudo isso, as células de mamíferos se tornaram os sistemas de expressão mais adequadas do que outros tipos celulares na produção de moléculas complexas para serem utilizadas como biofármacos (Wurm, 2004).

No entanto, os baixos níveis e a instabilidade da expressão heteróloga são desafios para a utilização das células de mamíferos na produção de proteínas terapêuticas (Kwaks e Otte, 2006). Isso se deve, principalmente, ao fato de que grande parte do genoma de células de mamíferos está na forma de heterocromatina e, com isso, há uma grande possibilidade de integração do transgene nessas regiões silenciadas ou próximas a elas (Kwaks *et al.*, 2003). Até recentemente, os maiores níveis de expressão em células de mamíferos estavam em torno de 5g/L, o que representava um terço da produção em bactérias e fungos (Wurm, 2004; Gerngross, 2004; Baez *et al* 2005).

Em alguns casos clínicos, como, por exemplo, na utilização de alguns anticorpos monoclonais, são necessárias grandes doses do medicamento (Andersen e Reilly, 2004). Com a baixa taxa de produção da proteína recombinante e a demanda de grandes doses do medicamento, o tratamento se torna muito caro, inviabilizando a comercialização do produto.

Para otimizar essa relação de custo-benefício, pesquisas buscam desenvolver novos métodos de produção. Alguns deles são: alterações na temperatura de cultivo celular (Shi *et al*, 2005); utilização de derivados de aminoácidos em meio de cultura (Chang *et al.*, 1999) e de compostos químicos, como o butirato de sódio (inibidor da histona deacetilase) (Jiang e Sharfstein, 2008); aperfeiçoamento da seleção dos clones mais produtores (van Blockland *et al.*, 2007); engenharia de vetores de expressão, entre outros.

1.4. Anticorpos como biofármacos

A estrutura básica de uma molécula de imunoglobulina G (IgG) nativa é composta por duas cadeias polipeptídicas leves e duas cadeias pesadas. Cada cadeia leve possui um domínio variável (VL) e um domínio constante (CL) enquanto que cada cadeia pesada possui um domínio variável (VH) e três domínios constantes (CH1, CH2, CH3). Uma cadeia leve e uma pesada se associam por ponte dissulfeto formando um monômero. Por sua vez, dois monômeros idênticos se associam por ponte dissulfeto e formam um homo-dímero. Toda essa estrutura apresenta três motivos protéicos: dois Fab (*fragment antigen binding*) e um Fc (*fragment crystallizable*). O motivo Fab contém a porção variável de uma IgG e é responsável pela ligação ao antígeno. Já o motivo Fc é responsável pelas respostas efetoras como, por exemplo, fagocitose, citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC) e ativação do sistema complemento (Figura 2)

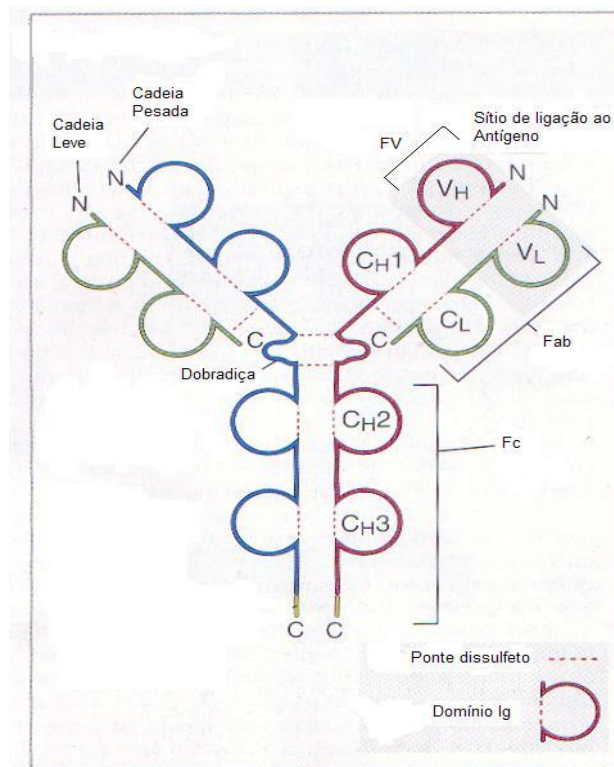


Figura 2. **Diagrama esquemático de uma molécula de IgG secretada.** (Adaptado de Abbas e Lichtman, 2003).

Com o avanço da tecnologia de engenharia de anticorpos, as imunoglobulinas utilizadas como fármacos vêm assumindo diversos formatos (Figura 3). Dependendo da

aplicabilidade, os anticorpos recombinantes podem conter apenas fragmentos de um anticorpo nativo, o que facilita a sua produção devido a sua menor complexidade. Fragmentos de Fab, scFv ou *diabodies* são alguns desses exemplos e podem, inclusive, serem produzidos em organismos procaríotos mantendo a sua atividade ligante ao antígeno e assim cumprir a sua função (Schirrmann *et al*, 2008).

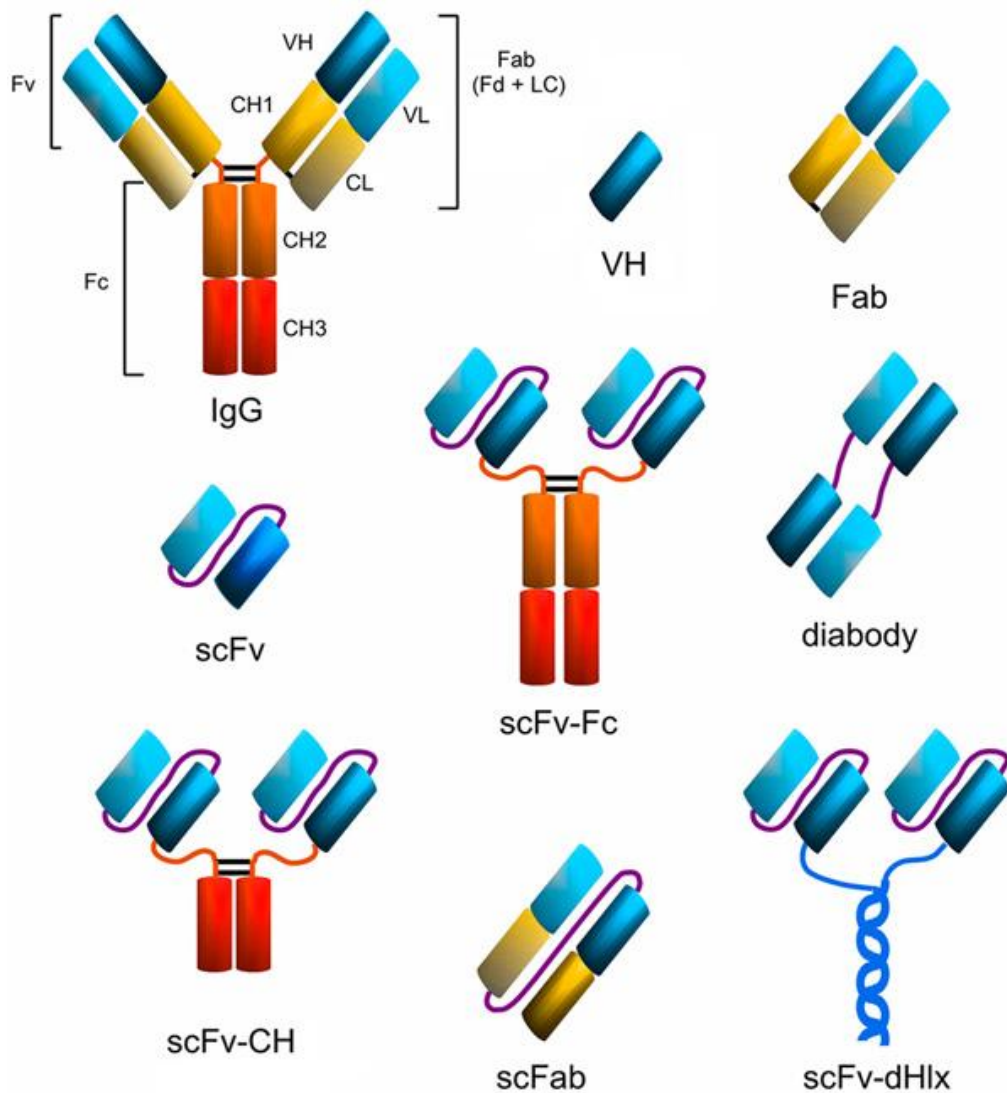


Figura 3. Nomenclatura de anticorpos recombinantes obtidos por engenharia genética. Imunoglobulina nativa IgG e derivadas. Siglas: VH, variável pesada; VL, variável leve; CL, constante leve; CH, constante pesada; Fv, fragmento variável; Fc fragmento cristalizável, Fab, fragmento de ligação ao antígeno; dHlx hélices anfipáticas para dimerização dos fragmentos scFv. Em roxo encontram-se os *linkers* peptídicos artificiais (Schirrmann *et al*, 2008).

No entanto, em alguns casos, a resposta efetora também é de interesse clínico. Todas as células do sistema imunológico possuem receptores de Fc (FcR) presentes na superfície

celular que, ao se ligar a região Fc de um anticorpo, desencadeia uma resposta efetora. Tais receptores, por sua vez, dependem do reconhecimento da estrutura tridimensional da região Fc da imunoglobulina. Como já foi dito anteriormente, as modificações pós-traducionais dos anticorpos são essenciais para a conformação da proteína e mais especificamente a conformação da região Fc está diretamente associada a ligações covalentes de oligossacarídeos na asparagina 297, presente no domínio CH2 (Figura 4) (Walsh e Jefferis, 2006).

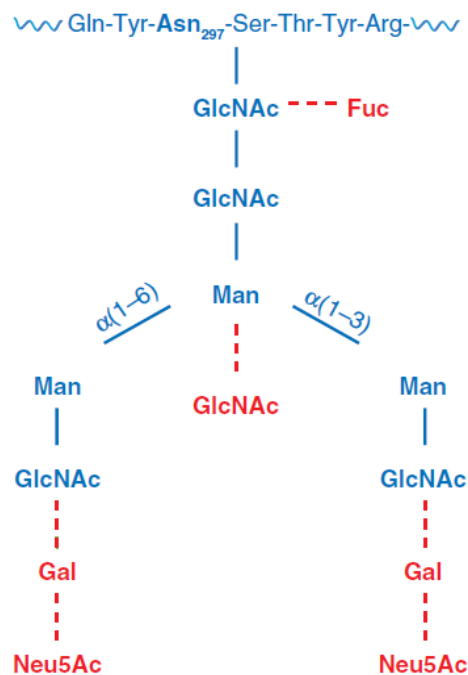


Figura 4. Esquematização da estrutura de oligossacarídeos no motivo Fc de IgG humana (Wash e Jefferis, 2006). A asparagina 297 é glicosiliada com a adição de um heptasacarídeo (estrutura básica em azul) ao qual são adicionados outros resíduos de açúcar (vermelho) formando ramificações diversas.

A adição de diferentes estruturas de açúcar nas proteínas confere a heterogeneidade das estruturas tridimensionais das glicoproteínas. Da mesma forma, a deleção dos resíduos de açúcar provoca uma mudança conformacional na região Fc que impede o seu reconhecimento pelos receptores de Fc (Figura 5) (Arnold *et al.*, 2007).

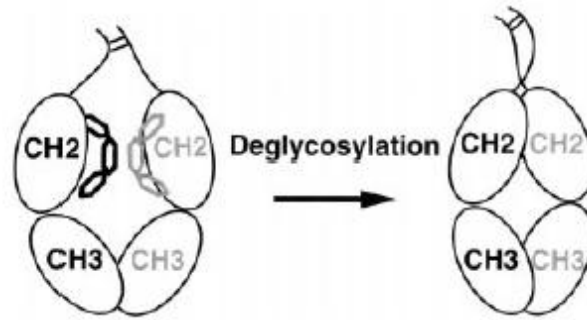


Figura 5. Desenho esquemático das interações entre oligossacarídeos adicionados à região Fc de um anticorpo (Radaev e Sun, 2001).

No caso do anticorpo anti-CD3 recombinante, proteína utilizada no tratamento e prevenção de rejeição de tecidos transplantados, sugere-se que a região Fc seja responsável pelo efeito anti-inflamatório desse medicamento. Enquanto que a região Fab desse anticorpo se liga a proteína CD3 na superfície dos linfócitos T reativos e induz a inativação dessas células – prevenindo, assim, a rejeição – por outro lado a região Fc se liga a receptores de Fc de outras células do sistema imunológico desencadeando a supressão da resposta efetora.

Uma via de modulação da resposta efetora foi observada em testes *in vitro* com células mononucleares de sangue periférico (PBMC) onde anticorpos FvFc anti-CD3 humanizados induziram tais células a aumentarem a produção de citocinas supressoras do sistema imune, como IL-10, e a reduzirem a produção da citocina pró-inflamatória IFN- γ (Silva et al., 2009). Quando os níveis de IFN- γ são inferiores aos níveis de IL-10, as vias de sinalização anti-inflamatórias são predominantes (Herrero *et al.*, 2003). Esse resultado sugere que os anticorpos anti-CD3 humanizados tenham o potencial de induzir um microambiente anti-inflamatório favorecendo o desenvolvimento de condições imunoreguladoras por meio da ativação dos mecanismos supressores de IL-10 (Silva *et al.*, 2009).

Nesse mesmo estudo, também foi avaliado a capacidade dos anticorpos anti-CD3 humanizados de induzir a transcrição do gene de FOXP3, um fator de transcrição envolvido na atividade supressora de células T regulatórias. Por meio de PCR quantitativa, foi observado um aumento tardio (após 192h de incubação com o anticorpo anti-CD3 humanizado) da quantidade do transcrito de FOXP3 em PMBC (Silva *et al.*, 2009). A expressão estável de FOXP3 está correlacionada com a indução de atividade supressora de células T regulatória (Wang *et al.*, 2007).

Outro importante resultado obtido *in vitro* com o anticorpo anti-CD3 humanizado produzido por Silva e colaboradores foi a baixa indução mitogênica das PBMC em relação a

utilização do anticorpo anti-CD3 murino OKT3 (único anticorpo anti-CD3 aprovado para utilização clínica até o momento). Novamente é a estrutura da região Fc que está relacionada ao potencial mitogênico desses anticorpos. Quando o FcR de uma célula efetora reconhece a região Fc de um anticorpo ligado ao seu antígeno, essa interação molecular ativa a proliferação celular e reforça a resposta pró-inflamatória, o que não é desejável nos casos de prevenção da rejeição de órgãos transplantados. No caso do referido anticorpo humanizado, a região Fc pode ter apresentado baixa afinidade pelo receptor de Fc presentes nos fagócitos (Silva *et al.*, 2009) e, dessa forma, não estimulou a proliferação celular.

Portanto, sugere-se que a modulação da resposta efetora, o potencial mitogênico e a indução da diferenciação de linfócitos T em linfócitos T regulatórios possam estar relacionados às vias de sinalização desencadeadas pelo reconhecimento do anticorpo anti-CD3 pelas células do sistema imune. Os resultados obtidos com o anticorpo anti-CD3 humanizado são compatíveis com um perfil imunoregulador (Silva *et al.*, 2009) e as vias de sinalização que prevalecem são as imunossupressoras, podendo ser esses os mecanismos de indução de tolerância a transplantes.

1.5. Modelo Experimental

Nos últimos anos, o grupo de Imunologia Molecular da UnB tem produzido proteínas recombinantes de interesse clínico visando a sua aplicação terapêutica. Já foram produzidos anticorpos humanizados anti-CD18, anti-Z22 (Ruggiero, 2002) e anti-CD3 (Silva *et al.*, 2009), e também fatores plasmáticos humanos, como o fator VIII e IX (Campos-da-Paz *et al.*, 2008). Em todos os casos, o sistema de expressão utilizado foi células de mamíferos e o promotor do vetor de expressão heteróloga foi o promotor de CMV. Com isso, busca-se agora meios para o aumento dos níveis e da estabilidade na produção protéica, tais como o melhoramento do vetor com a clonagem de anti-repressores, visando ao fim a produção em larga escala e a comercialização desses biofármacos.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Obter os elementos anti-repressores da transcrição 35 e 40 (identificados por Kwaks e colaboradores) e testar os efeitos da sua clonagem na produção em do fragmento de anticorpo FvFc anti-CD3 humanizado em CHO-K1.

2.2. Objetivos específicos

- ✓ Amplificar por PCR elementos de DNA anti-repressores a partir do genoma humano
- ✓ Caracterizar esses elementos quanto à sua sequência, localização e identidade com os fragmentos anteriormente reportados por Kwaks
- ✓ Substituir o promotor CMV do vetor de expressão heteróloga em célula de mamíferos pMIREs anti-CD3 FvFc humanizado por um promotor CMV otimizado
- ✓ Clonar os elementos anti-repressores no vetor de expressão em célula de mamífero
- ✓ Transfectar células CHO e estabelecer clones estáveis produtores da proteína recombinante
- ✓ Avaliar os efeitos das novas construções plasmidiais na produção do anticorpo anti-CD3

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Materiais

3.1.1. Células

- Linhagens de *Escherichia coli*

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

DH 5 α (Invitrogen[®]) – F' */endA1 hsdR17(r_K⁻m_K⁺) supE44 thi⁻¹ recA1 gyrA (Nal^r) relA1 D(lacIZYA-argF)U169 deoR (F80dlacD(lacZ)M15)*.

Essas linhagens foram utilizadas nos procedimentos de isolamento de elementos de DNA anti-repressores.

- Linhagens de células de mamífero

CHO-K1: Linhagem celular derivada da subclonagem de uma célula epitelial de ovário de *hamster* Chinês (CHO) parental, iniciada pela biópsia de um ovário da fêmea adulta do *hamster* Chinês *Cricetulus griseus*. São células epiteliais que crescem aderidas a superfície e necessitam de suplementação de soro fetal bovino e prolina ao meio de cultura. Número ATCC: CCL-61.

3.1.2. Plasmídios

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

- **pGFP/NEO** – 11,2 kb. Possui promotor de timidina quinase (pTK), NEO^R, múltiplos sítios de clonagem, sinal de poliadenilação TkpA, promotor pRSV-LTR, sinal de poliadenilação SV40polyA, origem de replicação *ori* e gene da β-lactamase (*bla*). Utilizado em transfecções como controle da eficiência de transfecções.

- **pMIREs anti CD3 FvFc humanizado** – 7,7 kb. Contém Amp^R, ori ColE1, múltiplos sítios de clonagem, promotor pCMV, peptídeo sinal de imunoglobulina, genes da imunoglobulina FvFc anti CD3, sítio de entrada ribossomal interno (IRES), NEO^R, sinal de poliadenilação SV40polyA, origem de replicação *ori* e gene da β-lactamase (*bla*). Utilizado para clonagem de um promotor CMV otimizado e de elementos de DNA anti-repressores. (Silva, 2008)

- **pUC57 promotor CMV otimizado (GenScript)**– 4,6 kb. É formado pelos múltiplos sítio de clonagem, promotor CMV otimizado sintetizado quimicamente (inserto), gene lacZ, gene da β-lactamase (*bla*), origem de replicação *rep*. Utilizado para extrair o promotor CMV otimizado.

3.1.3. Oligonucleotídeos

Os oligonucleotídeos foram fornecidos pela IDT® e solubilizados em água Mili-Q para concentração de uso de 10 μmoles/μL. A Tabela 2 mostra as sequências de cada um dos oligonucleotídeos.

Tabela 3. Oligonucleotídeos sintéticos empregados neste trabalho.

Oligo	Sequência	Utilização
M13 Universal	5' GTAAAACGACGGCCACT 3'	Sequenciamento dos elementos de DNA clonados em pGEM-T Easy.
M13 Reverso	5' CAGGAAACAGCTATGAC 3'	Sequenciamento dos elementos de DNA clonados em pGEM-T Easy.
Elemento 4 3'	5' CTGGAATGAGAGGCTGAAGG 3'	Amplificação do elemento 4 por PCR a partir do genoma humano.

Elemento 4 5'	5' GTGCGGGTCTTAACAAAAGG 3'	Amplificação do elemento 4 por PCR a partir do genoma humano.
Elemento 7 3'	5' TGGGTGACAGAGCAAGACTG 3'	Amplificação do elemento 7 por PCR a partir do genoma humano.
Elemento 7 5'	5' TATCCTGAGTGCATGGATGG 3'	Amplificação do elemento 7 por PCR a partir do genoma humano.
Elemento 35 3'	5' GCAAACGAATCCAGCAGTA 3'	Amplificação do elemento 35 por PCR a partir do genoma humano.
Elemento 35 5'	5' ACTGTGATGCCTCCAGCTTT 3'	Amplificação do elemento 35 por PCR a partir do genoma humano.
Elemento 40 3'	5' ATAGGGGGAAAGCCTCTTGA 3'	Amplificação do elemento 40 por PCR a partir do genoma humano.
Elemento 40 5'	5' GGCCATATTTGAAGGTGCTG 3'	Amplificação do elemento 40 por PCR a partir do genoma humano.
Kwaks40 clone 1 3'	5' AAAGTTTGTCTTCCATCCAG 3'	Sequenciamento de uma região interna do clone 1 correspondente ao elemento 40.
Kwaks40 clone 1 5'	5' TTCAGATACTGTCTTCATGC 3'	Sequenciamento de uma região interna do clone 1 correspondente ao elemento 40.
Kwaks40 clone 2 3'	5' AAAGTTTGTCTTCAATCCAG 3'	Sequenciamento de uma região interna do clone 2 correspondente ao elemento 40.
Kwaks40 clone 2 5'	5' TTCAGATATTGTCTTCATGC 3'	Sequenciamento de uma região interna do clone 2 correspondente ao elemento 40.

VHCd3humanizado Realtime Foward	5' CCTGACGAACCCAGTGCATA 3'	Quantificação do mRNA correspondente à porção codificadora do VH
VHCd3humanizado Realtime reverse	5' GTTCAATCCGGTGCTGAGGT 3'	Quantificação do mRNA correspondente à porção codificadora do VH
VLCd3humanizado Realtime Foward	5' TCGGTACCAGAGCCAGAACC 3'	Quantificação do mRNA correspondente à porção codificadora do VL
VLCd3humanizado Realtime Reverse	5' AGGTCAAGCTCCTCGTCTGC 3'	Quantificação do mRNA correspondente á porção codificadora do VL
Fc(Ch2Ch3IgG1) Realtime Foward	5' CTGCTCTTGTCCACGGTGAG 3'	Quantificação do mRNA correspondente à porção codificadora do Fc
Fc(Ch2Ch3IgG1) Realtime Reverse	5' GGCAGCCGGAGAACAACACTAC 3'	Quantificação do mRNA correspondente à porção codificadora do Fc

3.1.4. Soluções estoques de inibidores de proteases

PMSF (*Phenilmethylsulfonyl Fluoride*) 0,1 M

Solubilizado em isopropanol e estocado a temperatura ambiente por até 1 ano. É um inibidor de serino e tiol proteases como, por exemplo, tripsina, quimiotripsina, trombina, papaína etc. Adicionar a uma concentração final de 1 mM.

EDTA (Ácido Tetracético Etilenodiamina) 0,5M

Solubilizado em água, pH 8-9, estocado a 4°C por até 6 meses. É um inibidor de metaloproteases. Adicionar a uma concentração final de 5 mM.

Azida Sódica – Solução estoque 100X

Azida sódica 5% (p/v)

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

3.1.5. Meios de cultura para bactérias

Meio LB (*Luria-Bertani*)

Peptona de caseína	1,000% (p/v)
Extrato de levedura	0,500% (p/v)
NaCl	1,000% (p/v)
pH 7,0.	

Meio LB ágar

Meio LB adicionado de ágar bacteriológico a 1,400% (p/v).

Meio SB (*Super- Broth*)

Peptona de Caseína	3,000% (p/v)
Extrato de Levedura	2,000% (p/v)
MOPS	1,000% (p/v)
pH 7,0	

Meio SOB

Bacto-triptona	2,000% (p/v)
Extrato de levedura	0,500% (p/v)
NaCl	0,060% (p/v)
KCl	0,002% (p/v)
pH 7,0.	

Meio SOC

Meio SOB	98 mL
Solução estoque de Mg ²⁺ 2 M	1 mL
Solução estoque de glicose 2 M	1 mL

Após dissolver os reagentes em água destilada, todos os meios de cultura foram autoclavados a 120°C por 15 minutos.

3.1.6. Meios de cultura e soluções para cultura de células de mamíferos

Meio Ham-F12 com L-glutamina a 2 mM (Gibco[®], n^o catálogo: 21700-026)

Meio Base	1 pacote
NaHCO ₃	1,176 g
dH ₂ O q.s.p	1,000 L
pH 7,2	

Meio de Congelamento de Células

Meio Ham-F12 com L-glutamina	
Soro Fetal Bovino	20% (v/v)
DMSO	5% (v/v)

Solução salina balanceada (HBSS – Hank's Balanced Salt Mixture) (HyClone[®], n^o catálogo: SH30015.01)

Mistura base	1 pacote
NaHCO ₃	0,350 g
dH ₂ O q.s.p	1,000 L
pH 7,4	

Tripsina-EDTA (Invitrogen[®], n^o catálogo: 27250-018)

Tripsina	2,500 g
EDTA	0,380 g
HBSS qsp	1,000 L
pH 8,0	

Soro Fetal Bovino (LGC Biotecnologia[®], n^o catálogo: 10-bio500)

Estocar de -5 a -20 °C.

Adicionado ao meio de cultura Ham-F12 com L-glutamina à concentração de 10% ou 20% (v/v).

Azul de Tripán

Corante Azul de Tripán	400 mg
PBS pH 7,2 q.s.p.	100 mL

Reagente de transfecção Lipofectamine™ LTX (Invitrogen, nº de catálogo 15338-500)

É um lipídeo catiônico cuja formulação específica permite a transfecção de diversas linhagens de células de mamífero.

3.1.7. Soluções e tampões de uso geral

Tampão TE

Tris-HCl pH 8,0	10 mM
EDTA pH 8,0	1 mM

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

NaCl	1,50 M
Na ₂ HPO ₄	0,10 M
NaN ₃	0,02% (p/v)

Tampão PBS-T 1X, pH 7,4

PBS 1X acrescido de Tween 20 na concentração final de 0,10% (v/v)

3.1.8. Soluções e material para preparo de células competentes e transformação bacteriana

Solução estoque de glicose 2 M

Esterilizada por filtração e estocada a 4°C.

Solução estoque de Mg 2 M

MgCl ₂	1 M
MgSO ₄	1 M

Esterilizada por filtração e estocada a 4°C.

Glicerol 10% (v/v)

Esterilizado por filtração e estocada a 4°C

Solução de X-Gal

Solução de 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactosídeo (X-Gal) dissolvido em N,N-dimetilformamida em solução estoque de 2,5%. Solução armazenada a -20°C e protegida da luz. Usada no meio de cultura na proporção de 1:100.

Solução de IPTG

Solução de isopropil-tio- β -D-galactosídeo (IPTG) dissolvido em água em solução estoque de 100 mM e esterilizado por filtração em membrana Millipore de 0,22 μm . Usada no meio de cultura na proporção de 1:1000

Ampicilina

A ampicilina liofilizada foi ressuspendida em água destilada na concentração de 20 a 50 mg/mL. Após a ressuspensão, ela foi esterilizada por filtração em membrana Millipore de 0,22 μm . Após a filtração, foi estocada a -20°C e protegida da luz. Antibiótico utilizado como marca de seleção para plasmídios transformados em células de *E. coli*

Cubetas de eletroporação (Gene Pulser/MicroPulser Cuvettes, Biorad[®], n^o catálogo: 165-2086)

3.1.9. Soluções para preparação de DNA plasmidial

Solução I

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

Solução II

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

Solução III

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

RNase A

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

Clorofane

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

Clorofil

Clorofórmio	24 v
Álcool isoamílico	1 v
Equilibrado com 0,25 v de tampão TE	

Acetato de amônio 7,5 M

Utilizada para precipitação de DNA.

Glicogênio

Glicogênio	20 mg/mL
------------	----------

Utilizado para precipitação de DNA.

3.1.10. Enzimas e tampões de endonucleases de restrição**Ezimas de restrição (New England Biolabs[®])**

Sbf I

Xma I

Not I

Hind III

Sac II

Tampões de Endonucleases de Restrição (New England Biolabs®)

NEB 1

Bis-Tris-propano-HCl pH 7,0	10 mM
MgCl ₂	10 mM
DTT (ditiotreitól)	1 mM

NEB 2

Tris-HCl pH 7,9	10 mM
MgCl ₂	10 mM
DTT (ditiotreitól)	1 mM

NEB 3

Tris-HCl pH 7,9	150 mM
MgCl ₂	10 mM
NaCl	100 mM
DTT (ditiotreitól)	1 mM

NEB 4

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

3.1.11. Enzimas e reagentes de outras reações enzimáticas utilizadas em DNA

- Ligase

T4 DNA ligase (Invitrogen®, n° catálogo 15224-041) – 5U /μl

- Polimerases

Platinum® *Taq* DNA Polymerase (Invitrogen®, n° catálogo 10966-018) – 5U /μl

Taq DNA Polimerase (Cenbiot/RS) – 2U /μl

Elongase Enzyme (Invitrogen®, n° catálogo 10480-010)

rTth Polymerase XL (GeneAmp, n° catálogo N8080193)

- Fosfatase Alcanina

Shrimp Alkaline Phosphatase – SAP (Promega[®], n^o catálogos M8201) – 1U/μl

Tampão de Reação da Enzima T4 DNA Ligase 5X– Invitrogen

Tris-HCl Ph 7,6	250mM
MgCl ₂	50mM
ATP	5mM
DTT	5mM
Polietileno Glicol (PEG)-8000	25% (p/v)

Tampão de Reação da Taq DNA Polimerase 10X - CENBIOT/RS

Tris-HCl	0,1M
KCl	0,5M
BSA	0,1% (p/v)

Tampão A da enzima Elongase 5X – Invitrogen

Tris-SO ₄ pH 9.1	300 Mm
(NH ₄) ₂ SO ₄	90 mM
MgSO ₄	5 mM

Tampão B da enzima Elongase 5X – Invitrogen

Tris-HCl ph 9,1	300 mM
(NH ₄) ₂ SO ₄	90 mM
MgSO ₄	10 mM

Tampão SAP (Fosfatase alcalina de camarão) 10 X - Promega[®]

Tris-HCl pH 9,0	500 mM
MgCl ₂	100 mM

Reagentes de reações enzimáticas

Mistura dNTP (Amersham Pharmacia Biotech): com dGTP, dATP, dCTP e dTTP na concentração de 10 mM cada, utilizado nas reações de PCR.

MgCl₂ (GibcoBRL): 50 mM, utilizado nas reações de PCR (concentração final de 1 mM)

3.1.12. Soluções e reagentes para eletroforese em gel de agarose

Tampão de corrida TEB 10X

Trizma base	0,89 M
Ácido Bórico	0,89 M
EDTA	0,02 M
dH ₂ O q.s.p.	1,00 L
pH 8,0	

Tampão de corrida TAE 50X

Tampão Tris-Acetato	2,00 M
Trizma-base	242,00 g
Ácido Acético Glacial	57,10 mL
EDTA pH 8,0	0,05 M
dH ₂ O q.s.p.	1,00 L

Tampão de amostra para gel de agarose 10X

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

Solução de brometo de etídeo 20.000X

Brometo de etídeo	10 mg/mL
Mantido protegido de luz.	

3.1.13. Anticorpos utilizados nos ensaios de ELISA

Anti – IgG humana (H + L) feito em cabra (Pierce® n° catálogo: 31119)

Concentração: 1,8 mg/mL

Titulação de uso: 1:1000

Anti – IgG humana (Fc específico) feito em cabra conjugado com fosfatase alcalina

(Sigma® n° catálogo: A9544)

Concentração: 1 mg/mL

Titulação de uso: 1:5000

IgG Humana (Sigma® n° catálogo: K9001)

Concentração: 1 mg/mL

Utilizado a 100 ou 120 ng/mL como padrão nos experimentos de ELISA.

3.1.14. Soluções e materiais para ELISA

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

NaCl	1,5 M
Na ₂ HPO ₄	0,1 M
NaN ₃	0,02% (p/v)

Tampão PBS-T 1X, pH 7,4

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

Tampão de Fosfatase Alcalina (APB)

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

Solução de Bloqueio

Leite em pó desnatado	5% (p/v)
Dissolvido em PBS-T 1X	

Solução Reveladora para ELISA

pNPP (para-nitro-fenil-fosfato)	1 mg/mL
Dissolvido em APB	

Placas de microtitulação de poliestireno com 96 poços com fundo chato para ELISA

(Nunc[®], Maxisorp, n^o catálogo: 456537)

3.1.15. Marcadores Moleculares para DNA

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

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

1 kb DNA Extension Ladder (Invitrogen[®] n^o. catálogo. 10511-012)

Fragmentos de DNA em pb: vector bands; 517/506; 1.018; 1.636; 2.036; 3.054; 4.072; 5.090/5.000; 6.108; 7.126; 8.144; 10.000; 15.000; 20.000; 40.000.

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

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

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

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

3.1.16. Kits comerciais

QIAGEN Plasmid Maxi Kit 25 – Para preparação plasmidial em larga escala (Qiagen[®], n.º. catálogo 12163).

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

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

Wizard[®] Genomic DNA Purification Kit – Para extração de DNA cromossomal de leucócitos de sangue periférico humano (Promega, n.º. catálogo A1120)

Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-up System – Para limpeza dos plasmídios obtidos em preparações caseiras e para limpeza de produtos de PCR (Promega[®] n.º. catálogo A9281)

3.2. Métodos

3.2.1. Extração e quantificação de DNA cromossomal de leucócitos do sangue periférico humano

Coletou-se 2 mL de sangue humano doados por um voluntário e por meio do Wizard Genomic DNA Purification Kit extraiu-se o DNA cromossomal dos leucócitos seguindo o protocolo fornecido pelo fabricante. Foi realizado, inclusive, o tratamento com RNase A, procedimento opcional do protocolo. Ao final todo o DNA foi ressuspendido em um volume de 400 µL da solução de reidratação fornecida no kit.

Uma amostra do DNA extraído foi diluída 10X em água miliQ e procedeu-se a leitura da absorbância no comprimento de luz de 260 nm no espectrofotômetro GeneQuant pro RNA/DNA Calculator da Amersham Pharmacia Biotech.

3.2.2. Reações em cadeia da polimerase (PCR)

3.2.2.1. Amplificação por PCR dos elementos anti-repressores

- Desenho dos iniciadores

Baseado nas sequências anti-repressoras depositadas por Kwaks e colaboradores no *GenBank*, desenhou-se quatro iniciadores cada um com 20 pares de bases (Tabela 2). Os segmentos escolhidos para amplificação foram os elementos 35 (número de acesso: AY190754) e 40 (número de acesso: AY190756).

- Sistema de reação para amplificação do elemento 35

Montou-se o sistema de reação contendo: 127 ng de DNA molde; ambos os primers Elemento 35 3' e Elemento 35 5' a 0,3 µM; dNTP equimolar 1 mM; MgCl₂ a 2,5 mM; tampão de reação da Platinum *Taq* DNA Polimerase a 1X (Invitrogen); 2,5U da enzima Platinum *Taq* DNA Polimerase (Invitrogen) e água miliQ para totalizar 50 µL de reação.

- Sistema de reação para amplificação do elemento 40

Montou-se o sistema de reação contendo: 127 ng de DNA molde; ambos os primers Elemento 40 3' e Elemento 40 5' a 0,3 μ M; dNTP equimolar 2 mM; $MgCl_2$ a 4 mM; tampão de reação da *Taq* DNA Polimerase a 1X (Cenbiot); 2U da enzima *Taq* DNA Polimerase (Cenbiot) e água miliQ para totalizar 50 μ L de reação.

- Programação do termociclador da marca ThermoHybaid

Ambos sistemas de reação foram submetidos à seguinte programação do termociclador da marca ThermoHybaid: 94°C por 5 minutos (hot start); 35 ciclos com as seguintes características: desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 54°C por 1,5 minutos e extensão a 72°C por 2,5 minutos; mais 10 minutos a 72°C para finalização da extensão e, ao final, manter a 4°C indefinidamente. Os produtos das duas PCRs foram analisados por eletroforese em gel de agarose 0,8% (p/v).

3.2.2.2. Adição de adeninas nas extremidades dos amplicons

Os produtos da PCR de amplificação dos elementos anti-repressores foram submetidos a uma reação de adenilação para facilitar a ligação desses fragmentos de DNA ao vetor pGEM-T Easy (Promega). Para isso foi realizada uma nova PCR contendo 30 μ L do produto das respectivas PCRs; dATP a 0,125 mM; $MgCl_2$ a 2 mM; tampão da *Taq* DNA Polimerase a 1X (Cenbiot), 2U da enzima *Taq* DNA Polimerase (Cenbiot/RS) e água miliQ para totalizar 50 μ L de reação. A programação do termociclador foi apenas 72°C por 30 minutos e manter a 4°C ao final.

3.2.3. Análise de DNA plasmidial em gel de agarose (Azevedo *et al.*, 2003)

Todos os géis eram preparados com agarose entre 0,7 e 1,5% (p/v) em tampão TEB 1X com 0,5 μ g/mL de brometo de etídeo. Marcadores moleculares e as amostras de DNA com tampão de amostra para gel de agarose eram aplicadas no gel e submetidas à eletroforese em tampão TEB 0,5X, como descrito por (Sambrook e Russel, 2001). Nos casos em que se pretendia extrair o DNA do gel de agarose, substituiu-se o tampão TEB por TAE. Para visualização do DNA incidia-se luz ultravioleta no gel utilizando-se um transluminador (Pharmacia-LKB[®]) e a imagem era digitalizada em aparato de fotodocumentação.

3.2.4. Eluição de fragmentos de DNA de gel de agarose (Barbas III *et al.*, 2001)

- 1 - Preparava-se um gel de agarose 0,7% (p/v) feito com tampão TAE.
- 2 - Após a aplicação do DNA no gel, submetia-se a eletroforese com voltagem baixa (valor da voltagem depende das dimensões da cuba de eletroforese) até que a banda de DNA correspondente ao fragmento a ser eluído estivesse isolada das demais bandas.
- 3 - Com auxílio de luz ultravioleta, cortava-se a banda de DNA de interesse e a colocava em uma bolsa de Parafilm.
- 4 - Selava-se a bolsa de Parafilm e a incubava a -20°C por 30 minutos.
- 5 - Com o gel de agarose congelado, o mesmo era macerado. Quanto mais eficiente fosse a trituração do gel enquanto estivesse congelado, maior o rendimento da eluição.
- 6 - O líquido que foi obtido com o processo de trituração e o gel triturado eram transferidos para uma coluna ultrafree-DA da Millipore (unidade de pré-filtro de $0,45\ \mu\text{m}$ adaptada em um tubo de 1,5mL.)
- 7 - O sistema era centrifugado a $12.000\ x\ g$ por 10 minutos a temperatura ambiente.
- 8 - Para aumentar o rendimento, adicionava-se $50\ \mu\text{L}$ do tampão EB (Elution Buffer da Qiagen) pré aquecido a 50°C e novamente o sistema era centrifugado nas mesmas condições anteriores. Depois disso, a agarose retida na coluna era descartada.
- 9 - Ao líquido coletado no tubo de 1,5ml, adicionava-se $0,5\text{V}$ de acetato de amônio $7,5\text{M}$; $2,5\text{V}$ de etanol absoluto ; $20\ \mu\text{g}$ de glicogênio e incubava-se durante a noite a -20°C para precipitar o DNA contido nesse líquido.
- 10 - No dia seguinte, as amostras eram centrifugadas a $12.000\ x\ g$ por 45 minutos a 4°C para sedimentar o DNA.
- 11 - Descartava-se o sobrenadante e adicionava-se $200\ \mu\text{L}$ de etanol 70% (v/v) gelado (cuidando para não perturbar o sedimento) para lavar o DNA.
- 12 - O sistema era novamente centrifugado a $12.000\ x\ g$ por 15 minutos a 4°C .
- 13 - Descartava-se o sobrenadante, adicionava-se $200\ \mu\text{L}$ de etanol absoluto (cuidando para não perturbar o sedimento) e repetia-se o passo 12.
- 14 - O sobrenadante era descartado, e o sedimento era deixado à temperatura ambiente por cerca de 15 minutos para evaporar o etanol.
- 15 - O sedimento era ressuspenso em volumes adequados de tampão TE.

3.2.5. Ligação de fragmentos de DNA

As concentrações de DNA (vetor: inserto) utilizadas nos sistemas de ligação variavam de acordo com o experimento a ser realizado, sendo normalmente em uma razão molar de 1:3 ou 1:5 e aplicando-se a fórmula:

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

As reações de ligação foram realizadas de acordo com instrução do fabricante da T4 DNA Ligase (Invitrogen). Após incubação de 16 horas a 4°C, as reações foram utilizados para transformar células de *E. coli* competentes (previamente tratadas)

3.2.6. Transformação bacteriana (Azevedo *et al.*, 2003)

3.2.6.1. Preparo de células competentes

- 1- Inoculava-se uma colônia isolada da célula de interesse em 10 mL de meio SB (no caso de linhagens celulares portadoras de genes de resistência, pode-se acrescentar o antibiótico de interesse nesse primeiro passo). Esse pré-inóculo era mantido a 37° sob agitação de 220 rpm por aproximadamente 16 horas.
- 2- Inoculava-se 1 mL do pré-inóculo em 500 mL de meio SB contendo 2,5 mL da solução estoque de glicose 2M e 2,5 mL da solução estoque de Mg 2M. Incubava-se a 37°C a 220 rpm até a cultura atingir uma OD_{600nm} de 0,7 a 0,9.
- 2- Centrifugava-se a 3.000 *x g* por 20 min a 4°C, desprezando-se o sobrenadante e mantendo sempre a célula gelada a partir desse momento.
- 3- O sedimento era ressuspendido em 25 mL de glicerol 10% estéril gelado e a seguir adicionava-se mais 75 mL de glicerol 10% gelado.
- 4- Centrifugava-se a 3.000 *x g* por 20 min a 4°C, repetindo-se a etapa anterior.
- 5- O sedimento era ressuspendido em 25 mL de Gilcerol 10% estéril gelado e submetido a última centrifugação a 3.000 *x g* por 20 min a 4°C.
- 6- O sedimento final era ressuspendido em 1 a 2 mL de glicerol 10% e as células eram aliquotadas a cada 100 µL, congeladas em banho de gelo seco com etanol e armazenadas imediatamente a -80°C.

3.2.6.2. Eletroporação (Azevedo *et al.*, 2003)

- 1- Para a transformação, o plasmídeo era adicionado a uma alíquota de célula competente e todo esse conteúdo era imediatamente colocado na cubeta de eletroporação (BioRad®) previamente resfriada.
- 2- A eletroporação era feita seguindo os seguintes parâmetros elétricos: 2,5 kV, 25 μ F e 200 Ω , no aparelho Gene Pulser com Pulser Controller da BioRad. O τ esperado (tempo de duração da corrente elétrica que atravessa a cubeta) nessas condições é de 4,0 a 5,0 milisegundos.
- 3- Imediatamente após o choque a cubeta era lavada com 3 mL de meio SOC e o meio era recolhido para um tubo de centrifugação de 50 mL.
- 4- Após uma incubação de 1 h a 37°C e 220 rpm, diluições da transformação eram semeadas em placas contendo LB-ágar, ampicilina a 200 μ g/mL. As placas eram mantidas na estufa a 37°C por 16 horas.

Por se tratar de eventos ocorridos em dias distintos, utilizou-se diferentes linhagens celulares para cada vetor obtido.

3.2.7. Preparação plasmidial em pequena escala (Azevedo *et al.*, 2003)

- 1- Coletava-se 3,0 mL de cultura de células de *E. coli*, transformadas com o plasmídeo de interesse, crescidas em meio LB/Amp (150 μ g/mL) durante aproximadamente 16 horas a 37°C, por meio de duas centrifugações de 5 min a 5000 rpm em microtubos de 1,5 mL, sendo o sobrenadante desprezado a cada centrifugação.
- 2- Ressuspendia-se o sedimento em 200 μ L de Solução I. Incubava-se as amostras no gelo por 5 min.
- 3- Adicionava-se 400 μ L de Solução II e as amostras eram homogeneizadas, invertendo-se gentilmente o tubo várias vezes. Incubava-se à temperatura ambiente por 5 min.
- 4- Adicionava-se 300 μ L de Solução III, o mesmo procedimento de homogeneização era realizado e a amostra era incubada no gelo por 10 min.
- 5- Centrifugava-se a 12000 rpm por 15 min a 4°C.
- 6- O sobrenadante era transferido para outro microtubo de 1,5 mL contendo 5 μ L de RNase A e incubado por 1 a 2 hora a 37°C.

- 7- Adicionava-se 300 μ L de clorofane e, após forte homogeneização, centrifugava-se por 5 min a 5000 rpm à temperatura ambiente, a fase aquosa era coletada para outro tubo.
- 8- Adicionavam-se 300 μ L de clorofil e repetia-se o mesmo procedimento anterior de homogeneização, centrifugação e coleta.
- 9- Adicionava-se 2,0 v de etanol absoluto gelado e incubava-se a -20°C por no mínimo 2 horas.
- 10- Centrifugava-se a 12000 rpm por 45 min a 4°C . Desprezava-se o sobrenadante.
- 11- Adicionava-se 1 mL de etanol 70% gelado e centrifugava-se novamente a 12.000 rpm por 15 min a 4°C .
- 12- Secava-se o sedimento por exposição ao ar.
- 13- O sedimento era ressuspenso em 50 μ L de TE. E as amostras conservadas a -20°C

3.2.8. Digestão do DNA plasmidial com enzimas de restrição

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

3.2.9. Sequenciamento dos elementos anti-repressores

Após ter sido realizada uma análise de restrição, os plasmídios eram sequenciados utilizando-se o sequenciador automático MegaBACE 500Plus (Molecular Dynamics[®]). Eram utilizadas de 150 a 200 ng do vetor, 10 picomoles do oligonucleotídeo apropriado e o kit “DyeEnamic ET DYE Terminator Cycle Sequencing”.

As sequências obtidas por meio do sequenciamento automático eram analisadas, utilizando-se ferramentas de bioinformática: Phred e CAP3 disponíveis na página: www.biomol.unb.br. Depois da análise de qualidade, as sequências eram submetidas à ferramenta de procura de alinhamentos básicos locais (BLAST, do inglês, *Basic Local Alignment Search Tool*, www.ncbi.nlm.nih.gov/blast) para análise de identidade com sequências já depositadas no *GenBank*. As sequências também eram manipuladas e analisadas com sequências depositadas em um banco de dados pessoal utilizando o programa BioEdit Sequence Alignment Editor (Hall, 2007).

3.2.10. Cultura de células de mamíferos

Durante todo o cultivo, as células eram mantidas em meio Ham-F12 (pH 7,2) com 10% a 20% de soro fetal bovino (SFB) e incubadas em estufa a 37°C, 5% de CO₂ e 70% de umidade. A observação das células eram feitas em microscópio invertido de contraste de fase NIKON DIAPOH,

3.2.10.1. Congelamento de células CHO – Criopreservação (Ruggiero, 2002)

- 1– As células em cultura aderente eram lavadas com HBSS. Após esse procedimento, era adicionado um volume suficiente de Tripsina EDTA para cobrir toda a superfície de crescimento celular para que as células se soltassem da garrafa de cultura.
- 2– A suspensão celular era então transferida para um tubo de centrifuga de 50 mL, ao qual se adicionava um volume igual de meio Ham-F12 acrescido de 10% de Soro fetal bovino (SFB) para a inativação da tripsina, que é nociva as células.
- 3– As células eram centrifugadas a 130 x g por 8 minutos.
- 4– O sobrenadante era descartado e o sedimento era ressuscitado no meio de congelamento de células.
- 5– As células eram distribuídas em alíquotas de 500 µL em criotubos.
- 6– Os criotubos eram incubados a 4°C por 30 minutos, depois a – 20°C por 30 minutos e depois a – 80°C durante a noite. As células poderiam permanecer estocadas a esta temperatura ou ser transferidas para a estocagem em nitrogênio líquido.

3.2.10.2. Descongelamento de células CHO (Ruggiero, 2002)

- 1 – Os criotubos eram transferidos para um banho de 37°C até o total descongelamento das células.
- 2 – Imediatamente todo o conteúdo de cada criotubo era transferido para um tubo de centrífuga de 15mL contendo 3-5mL de HBSS e centrifugado a 130 x g por 8 minutos.

3 – O sobrenadante era descartado e o sedimento era ressuspensionado em 1mL de meio Ham-F12 acrescido de % SFB.

4 – As células eram adicionadas em densidade de 2×10^2 células por garrafa de 25cm^2 em meio Ham-F12 acrescido de 20% SFB.

5 – A partir do momento que as células apresentaram crescimento visível da população, passou-se a utilizar meio Ham-F12 acrescido de 10% SFB e, no caso de descongelamento de clones transfectados, passou-se a adicionar o agente seletivo na devida concentração.

3.2.10.3. Tripsinização, passagem das células e formação de monocamada celular (Ruggiero, 2002)

Quando as células atingiam confluência entre 90% e 100%, ou seja, quando praticamente toda superfície da placa de cultura estava ocupada por células, a cultura celular deveria ser repicada.

1– O meio de cultura da garrafa era descartado.

2– Eram adicionados 5 mL de tripsina EDTA a garrafa de cultura de 25cm^2 (guardar as devidas proporções no caso de utilização de outros frascos de cultura de dimensões variadas)

3– Após 3 minutos, as células começaram a se descolar da superfície da garrafa. O descolamento das células era acompanhado por visualização a olho nu. Alternativamente, incubava-se a 37°C durante esses 3 minutos para melhor atividade da tripsina.

4– A tripsina era neutralizada com cerca de 5 mL de meio acrescido de 10% de SFB.

5– A suspensão celular era transferida para tubos falcon de 50 mL, e centrifugados a $130 \times g$ por 8 minutos.

6– O sobrenadante era descartado e o sedimento ressuspensionado em 3 mL de meio acrescido de SFB.

8– Era transferida toda a população células por garrafas de 75cm^2 ou 150cm^2 contendo 10 mL ou 30 mL de meio acrescido de SFB.

3.2.10.4. Estimativa do número de células viáveis por meio de contagem em câmara de Neubauer (adaptado de Spector *et al.*, 1998)

- 1– As células eram tripsinizadas e sedimentadas da mesma forma descrita anteriormente (ver passos de 1 a 5 no item anterior) e o sedimento era ressuspendido em 1mL de meio de cultura.
- 2– Uma amostra da suspensão celular era diluída na solução de corante Azul de Tripán totalizando 50 a 100 µL finais. O fator de diluição variava entre 5 e 20, ou seja, diluía-se a amostra entre 5 e 20 vezes, dependendo da quantidade de células estimada a olho nu no sedimento do passo anterior.
- 3– A câmara de Neubauer era montada, e nela aplicava-se um volume de 10 µL da mistura suspensão celular e corante.
- 4– As células eram observadas em microscópio óptico (na objetiva com aumento de 40 vezes) e contadas nos quadrantes. As células viáveis apresentavam-se com coloração clara (não corada). Já as células não viáveis têm a membrana celular mais permeável e, por isso, o corante entra nas células, tornando-as azuis. Em seguida, era utilizada a fórmula:

$$\frac{\text{número de células contadas} \times \text{fator de diluição} \times 10^4}{\text{número de quadrantes contados}} = \text{n}^\circ \text{ de células / mL}$$

3.2.10.5. Transfecção de células CHO utilizando o reagente Lipofectamine LTX (Invitrogen)

- 1 – Em uma placa de cultura de 6 poços foram semeadas cerca de 2×10^5 células por poço, adicionando-se em seguida 2 mL de meio contendo SFB 10%.
- 2 – As células foram incubadas em estufa a 37°C, 5% de CO₂ e 70% de umidade durante a noite. No dia seguinte, a confluência estava entre 60% a 70%.
- 3 – Para cada poço, diluiu-se 5 µg de DNA em 500 µL de Ham-F12 (sem soro) e em seguida adicionou-se 10 µL de lipofectamina LTX. Esse sistema foi homogeneizado suavemente e incubado por 30 minutos a temperatura ambiente para a formação do complexo

lipofectamina-DNA (como controle foi preparado um sistema semelhante, porém sem DNA). Enquanto isso, o meio de cultura era trocado por meio de cultura fresco.

4 – Após este período, todo volume contendo o complexo lipofectamina-DNA foi adicionado gota a gota sobre vários pontos distintos do poço

8 – As células foram incubadas a 37°C com 5% de CO₂ e 70% de umidade.

10 – No tempo de 24 e 48 horas pós-transfecção as células do poço transfectado com o vetor pGFP eram observadas ao microscópio invertido para determinar a eficiência de transfecção.

3.2.10.6. Seleção de células transfectadas utilizando Geneticina (G418)

Como os vetores utilizados para expressão das proteínas recombinantes apresentam o gene de resistência a geneticina (NEO^R), após o processo de transfecção foi possível fazer a seleção das células transfectadas e eliminação daquelas que não estavam produzindo as proteínas recombinantes.

1- Após 48h da transfecção o meio de cultura de todos os poços era substituído por meio de cultura fresco acrescido de geneticina a uma concentração final de 600 µg/mL, inclusive o poço com as células não transfectadas utilizadas como controle.

2- O meio de cultura a partir de então era trocado a cada 48h nas mesmas condições descritas anteriormente e visualizava-se, ao microscópio ótico, a morte celular no poço controle de células não transfectadas.

3- Quando era constatado a ocorrência de morte das células não transfectadas (elas mudam sua morfologia de elípticas para esféricas e perdem a aderência à placa de cultura) permanecia-se mais uma semana com o procedimento descrito acima e a partir de então as células eram consideradas selecionadas e somente células transfectadas estavam presentes no poço.

As células selecionadas por esse método apresentam diferentes níveis de produção da proteína heteróloga devido a integração randômica do gene recombinante no cromossomo. Portanto esse conjunto de células, contendo clones diversificados, chama-se “população mista”. Tais populações mistas foram expandidas e alíquotas foram congeladas (conforme descrito anteriormente) para futuros experimentos.

3.2.10.7. Isolamento de clones estáveis produtores de anticorpos recombinantes

- 1- A partir de uma população mista de clones estáveis, semeou-se placas de Petri próprias para cultivo de tecido com 10, 20 e 40 células por placa em meio Ham-F12 acrescido de SFB 10% e G418 a 600 µg/mL
- 2- As células foram incubadas a 37°C com 5% de CO₂ e 70% de umidade por 4 dias, trocou-se o meio e incubou-se por mais 4 dias, de modo que, depois de sucessivas gerações, cada clone desse origem a uma colônia visível a olho nu.
- 3- As colônias que visivelmente estavam isoladas eram marcadas e observadas ao microscópio para verificar se de fato estavam isoladas.
- 4- O meio de cultura era então descartado e a placa era lavada com HBSS para retirada de restos de SFB.
- 5- Com auxílio de uma pinça pegava-se pequenos cilindros de vidro (PYREX Cloning cylinders – Corning Incorporated) e os colocava sobre uma graxa de silicone para vedação (da marca VETEC, nº catalogo 000597.05 - própria para cultura de tecidos), de modo que a base do cilindro ficasse impregnada com a graxa. Em seguida, os cilindros eram fixados na placa de cultura, pressionando-os levemente com o dedo, de maneira que as colônias fossem isoladas uma das outras.
- 6- Em cada poço formado pelo cilindro de vidro, acrescentava-se 60 µL de tripsina EDTA e incubava-se a 37°C por 3 minutos. Assim, as colônias eram tripsinizadas individualmente.
- 7- Cada colônia era então passada para um poço na placa de 24 poços contendo Ham-F12, 10% SFB e G418 a 600 µg/mL.
- 8- As colônias de clones estáveis foram expandindo-se isoladamente até que se obteve células suficientes para congelar alíquotas e para fazer ensaios biológicos.

3.2.11. ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*) (Silva *et al*, 2009)

Eram realizados ensaios do tipo ELISA sanduíche para detecção e quantificação das proteínas recombinantes. Após cada lavagem as placas de microtitulação (Nunc[®]) eram invertidas sobre uma pilha de papel toalha e batidas vigorosamente até a retirada completa das soluções presentes. Durante as incubações as placas permaneciam cobertas para evitar a evaporação das soluções. Os anticorpos utilizados estão detalhados no item 3.1.12 dos Materiais.

1- Os poços de interesse na placa eram sensibilizados com 150 µL por poço com o anticorpo anti-IgG humana H+L feito em cabra, diluído em PBS 1X 1:1.000, durante 2 horas a temperatura ambiente.

2- Lavava-se 3X com PBS - T 1X, 200 µL por poço.

3- Bloqueava-se com 200 µL por poço de solução de bloqueio, durante 2 horas a temperatura ambiente ou durante a noite a 4°C.

4- Lavava-se 3X com PBS - T 1X e adicionava-se o sobrenadante de cultura das células transfectadas ou os FvFcs purificados. Eram feitas diluições seriadas de fator comum 3 das proteínas em PBS, onde o volume final era de 100 µL por poço e títulos de 1:1; 1:3; 1:9; 1:27; 1:81 e 1:243. A mesma diluição era realizada para todas as amostras. Como padrão utilizava-se IgG humana purificada na concentração especificada nos materiais (diluída na mesma solução/meio que as proteínas recombinantes). As reações eram feitas em duplicatas. Incubava-se por 2 horas a temperatura ambiente.

5- Lavava-se 3X com PBS - T 1X e incubava-se com 150 µL por poço do anticorpo anti-Fc humano conjugado a fosfatase alcalina na diluição de 1:5.000 por 2 horas a temperatura ambiente.

6- Lavava-se 3X com PBS - T 1X e uma vez com tampão para fosfatase alcalina (APB).

7- Revelava-se com 100 µL por poço de pNPP (para-nitro-fenil-fosfato) 1 mg/mL dissolvido em APB. Incubava-se de 20 a 30 min. A partir daí a absorbância era lida no leitor de ELISA “*Microplate Reader BioRad*[®]” modelo 450 a um comprimento de onda de 405 nm.

Os cálculos de concentração eram feitos baseados na curva padrão de IgG humana, sempre desconsiderando os poços brancos (com PBS 1X em todas as etapas).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Isolamento dos elementos anti-repressores a partir do genoma humano

4.1.1. Reações de amplificação e de adenilação dos elementos anti-repressores

A extração do DNA genômico humano a partir do tecido sanguíneo gerou 400 μL de DNA molde em uma concentração final de 127 $\text{ng}/\mu\text{L}$. Essa quantificação foi dada pelo espectrofotômetro e calculada partindo dos dados de absorbância no comprimento de onda de 260nm. A amostra diluída 10 vezes apresentou a absorbância de 0,022 A no comprimento de onda especificado.

No entanto, não é possível verificar a integridade da estrutura primária do DNA cromossomal por espectrofotometria e, portanto, uma amostra da extração foi diluída 10 vezes e analisada por eletroforese em gel de agarose (Figura 6). Dessa forma foi possível detectar a presença de fitas de DNA de alto peso molecular o que possibilitou a sua utilização como DNA molde para a amplificação de elementos anti-repressores.

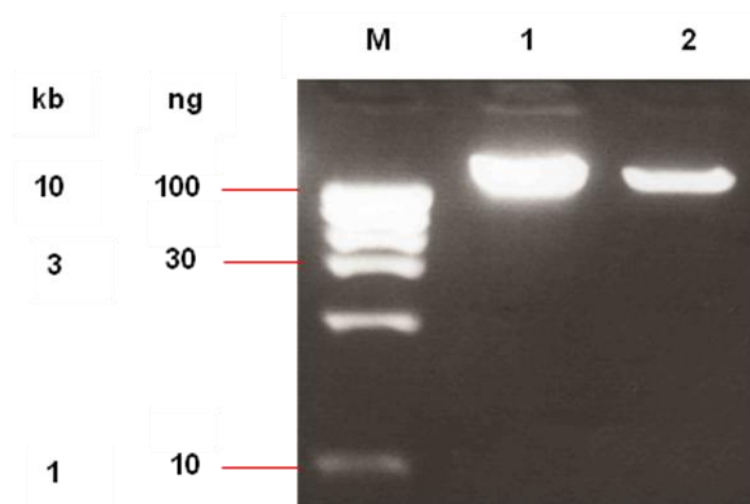


Figura 6. Análise eletroforética da integridade do DNA genômico extraído de células sanguíneas humanas. Uma amostra da extração de DNA foi diluída 10 vezes e submetida a eletroforese em gel de agarose 1.5% (p/v). Nas linhas 1 e 2 foram aplicados, respectivamente,

9 μL e 4 μL da amostra. Os números ao lado da foto se referem ao tamanho e a massa de DNA das bandas do marcador High Mass Ladder (Invitrogen), aplicado na linha M.

A partir dos resultados obtidos por Kwaks e colaboradores em 2003, onde se obteve significativo melhoramento do processo de produção heteróloga com a utilização do elemento 40 nos vetores de expressão em células de mamíferos, escolhemos isolar esse elemento de DNA a partir do genoma humano. Além dele, buscamos isolar também os elementos 4, 7 e 35. No presente trabalho, foram escolhidos os elementos 40, 35 e 7 por terem apresentado, respectivamente, o primeiro, segundo e terceiro melhores resultados nos testes iniciais de Kwaks e colaboradores em 2003. Já o elemento 4 foi escolhido aleatoriamente entre os elementos anti-repressores que apresentaram resultados intermediários.

Os iniciadores para as PCRs foram desenhados de forma a amplificar a região contendo um elemento anti-repressor mais alguns pares de bases adjacentes, tanto a montante quanto a jusante. Dessa forma, os produtos obtidos nas PCRs deveriam ser um pouco maiores do que os elementos anti-repressores, diferença esta que não pode ser resolvida por eletroforese. Considerou-se, portanto, que os amplicons referentes aos elementos 4, 7, 35 e 40 seriam os de aproximadamente 2 kb, 2,5 kb, 1 kb, 1,5 kb, respectivamente.

Várias tentativas de amplificação por PCR foram realizadas até ajustar os parâmetros de cada reação para se obter um único produto. Na reação de amplificação do elemento 35, no entanto, outros fragmentos também foram amplificados, além daquele previsto (Figura 7A) Tal dificuldade poderia ser contornada empiricamente alterando novamente as concentrações dos reagentes, como a concentração de MgCl_2 , ou aumentando a temperatura de anelamento dos *primers* para aumentar a especificidade. Porém, como a reação produziu uma grande massa de um fragmento de aproximadamente 1 kb, a alternativa escolhida foi a de isolamento do fragmento majoritário do gel por *freeze squeeze* (secção 3.2.4 de material e métodos) para separar do gel de agarose apenas a banda de interesse. Já a especificidade da reação de amplificação do elemento 40 foi maior. A reação produziu apenas um fragmento cuja banda da eletroforese corresponde ao tamanho esperado (Figura 7B).

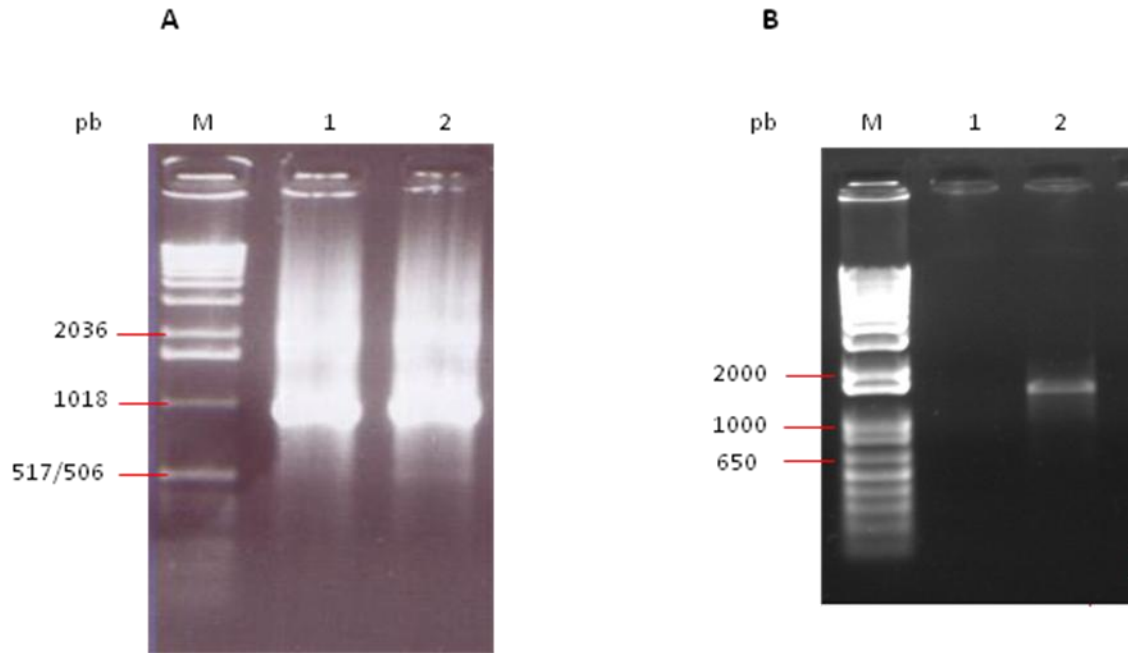


Figura 7. Obtenção por PCR dos elementos anti-repressores. (A) Amplificação do elemento 35 sendo que na linha M está o marcador 1kb Extension Ladder (Invitrogen) e as linhas 1 e 2 contêm, respectivamente, 5 μ L e 9 μ L do produto da PCR. (B) Na reação de PCR do elemento 40 produziu-se apenas fragmentos de aproximadamente 1,5 kb, conforme o previsto. Na linha 1 analisou-se uma amostra do controle (PCR sem o DNA molde); na linha 2 há 4 μ L da PCR completa; e na linha M utilizou-se o marcador 1 kb Plus Ladder (Invitrogen). Os números ao lado das fotos representam o número de pares de bases dos fragmentos presentes em cada banda.

Quanto aos elementos 4 e 7, não se obteve sucesso em suas amplificações por PCR. Embora a enzima polimerase utilizada seja capaz de amplificar fragmentos de DNA ainda maiores do que os elementos 4 e 7, foram realizadas novas tentativas com enzimas especializadas na amplificação de fragmentos extensos como a Elongase (Invitrogen) e a polimerase rTth XL (GeneAmp). O trabalho então prosseguiu apenas com os elementos 35 e 40.

Os amplicons obtidos pelas PCRs foram purificados utilizando-se o Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-up System (Promega) e, em seguida, foram feitas várias tentativas de clonagem dos fragmentos de DNA no vetor pGEM-T Easy. No início variou-se inúmeras vezes a razão inserto:vetor, mas não tivemos sucesso. No entanto, a eficiência das clonagens melhorou após a adição de uma cauda de adenina (pA) nas extremidades dos fragmentos amplificados por meio de uma nova reação de PCR. Tal reação foi realizada pela enzima *Taq* DNA polimerase (Cenbiot/RS) que apresenta menor fidelidade e é capaz de adicionar

inespecificamente o nucleotídeo disponível na reação sem a necessidade de um DNA molde, devido à sua atividade de terminal deoxinucleotidil transferase (TdT). Com isso, acrescentou-se à reação apenas dATP e ajustou-se o tamponamento e o volume final da reação. Após a reação de adenilação, os produtos obtidos foram purificados utilizando-se o mesmo kit citado acima.

4.1.2. Clonagem dos elementos anti-repressores em pGEM-T Easy

Os produtos da PCR adenilados foram, em seguida, submetidos a clonagem no vetor p-GEM T easy por meio da reação de ligação com T4 DNA ligase (Invitrogen). A adição da adenina nas extremidades do inserto favorece o pareamento das extremidades pA do inserto com a timina presente nas extremidades do vetor comercial pGEM-T Easy (Figura 8).

Tal vetor comercial está submetido ao controle do operon lac para a transcrição dos seus genes, o qual permanece reprimido na ausência de lactose. Na presença de um sinal externo, um indutor, o repressor se dissocia e então a transcrição do gene é permitida. Um dos genes a ser transcrito é o da β -galactosidase, enzima que cataboliza a lactose. Porém, o sistema de ligação do vetor pGEM-T Easy possui o sítio de clonagem no meio do gene da β -galactosidase, o que promove o truncamento do gene caso haja uma clonagem de um inserto (Figura 8), no caso o próprio elemento de DNA amplificado por PCR. Ou seja, as bactérias que forem transformadas com o vetor contendo o inserto produzirão uma β -galactosidase truncada, incapaz de metabolizar a lactose. Já os microorganismos transformados pelo vetor sem inserto sintetizarão a enzima perfeitamente. Na presença do IPTG e X-GAL, contidos no meio de cultura sólido, as colônias já transformadas apresentam colorações diferentes dependendo do vetor que cada célula recebeu na transformação. O IPTG é um β -galactosídeo que atua como indutor do operon lac mas não é substrato da β -galactosidase. Já o X-GAL é um análogo à lactose e atua apenas como substrato da enzima. Assim, as colônias que possuem a enzima perfeita (transformadas com o vetor pGEM-T Easy vazio) metabolizam o X-GAL e adquirem uma coloração azul. Por outro lado, as colônias com a enzima truncada (transformadas com o vetor com o inserto) não conseguem degradar o substrato e permanecem com a coloração branca. Além disso, o vetor pGEM-T Easy possui o gene de resistência à ampicilina como marcador seletivo. Dessa forma, com a ampicilina, o X-GAL e o IPTG, é possível selecionar dentre as diversas células transformadas aquelas que provavelmente receberam o vetor pGEM-T Easy contendo o elemento anti-repressor como seu inserto.

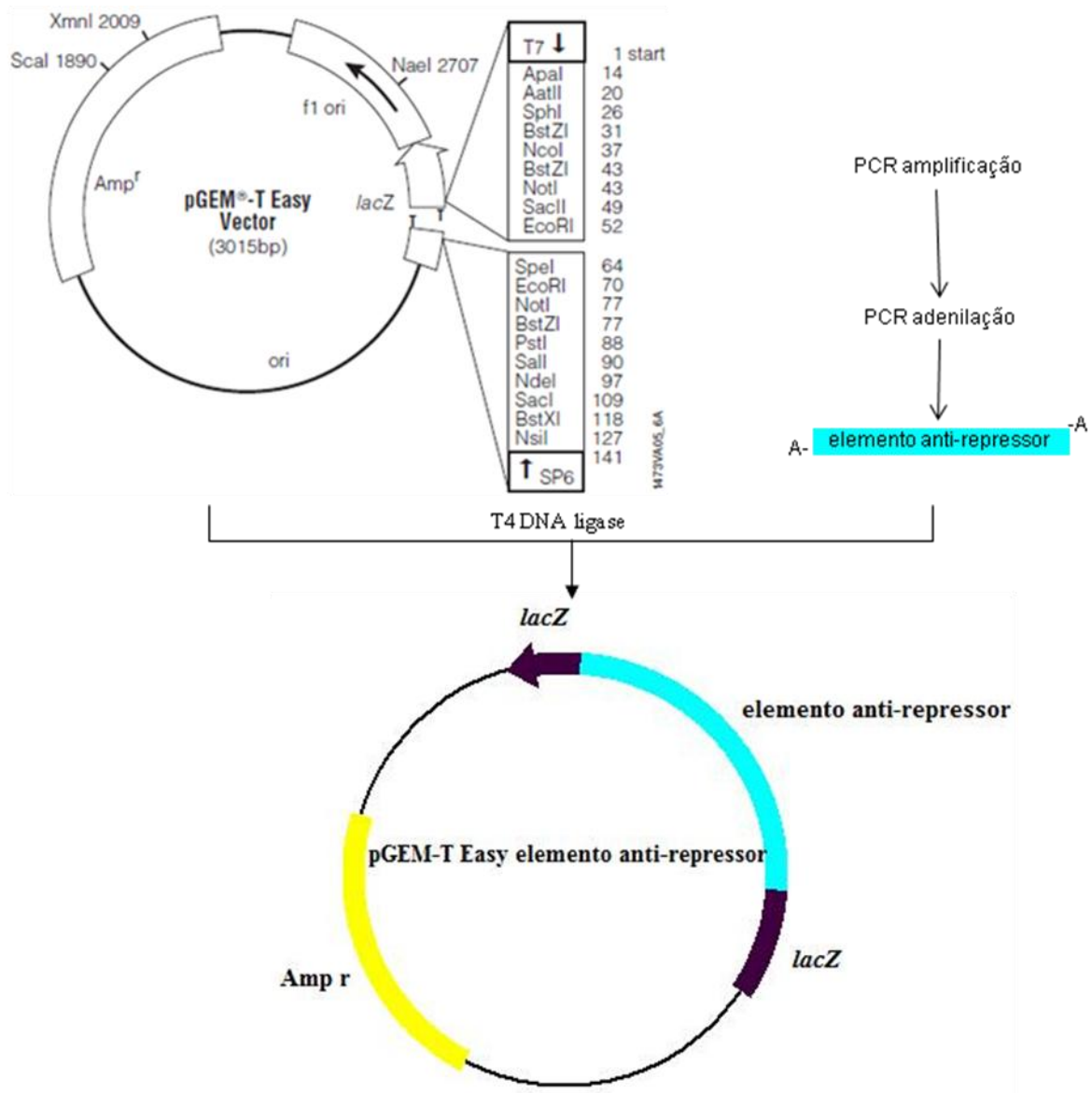


Figura 8. Construção do vetor pGEM-T Easy elemento anti-repressor. Aos elementos anti-repressores amplificados por PCR foram adicionadas adeninas em suas extremidades por meio de nova PCR. As adeninas despareadas facilitaram a ligação dos elementos de DNA ao vetor comercial pGEM-T Easy (Promega) cujas extremidades contêm timinas despareadas. Siglas – *lacZ*: operon *lac*. *Amp^r*: região codificadora de β -lactamase.

Após o período de incubação do sistema de ligação, células *E. coli* competentes foram transformadas por eletroporação. Para o vetor pGEM-T Easy elemento 35 utilizou-se a linhagem DH5 α e para o vetor pGEM-T Easy elemento 40 utilizou-se XL-1 Blue. Quanto à variável tempo (τ) foi de 1,06 ms para a transformação com o elemento 35 e de 4,26 ms com o elemento 40. Mesmo com o tempo de eletroporação abaixo do esperado para a construção do elemento 35, as células transformadas foram semeadas em meio LB ágar contendo X-

GAL, IPTG e ampicilina. No dia seguinte, algumas colônias que cresceram e apresentaram-se com coloração branca, ou seja, aquelas que receberam o vetor contendo o elemento anti-repressor, essas células foram inoculadas em meio LB com ampicilina e submetidas a preparação plasmidial em pequena escala utilizando-se a técnica de lise alcalina conforme descrito na metodologia.

Após a minipreparação dos plasmídios, procedeu-se a digestão dos vetores preparados com a enzima *EcoR* I para confirmação da clonagem a partir da liberação de um fragmento de aproximadamente 1 kb ou 1,5 kb correspondentes aos elementos 35 e 40, respectivamente. Com a análise do perfil de restrição em gel de agarose 0,8% (p/v) verificou-se a existência de quatro clones que provavelmente continham os elementos anti-repressores: dois com o elemento 40, que chamamos de clone 1 e clone 2; e dois com o elemento 35, clone 3 e clone 4 (Figura 9).

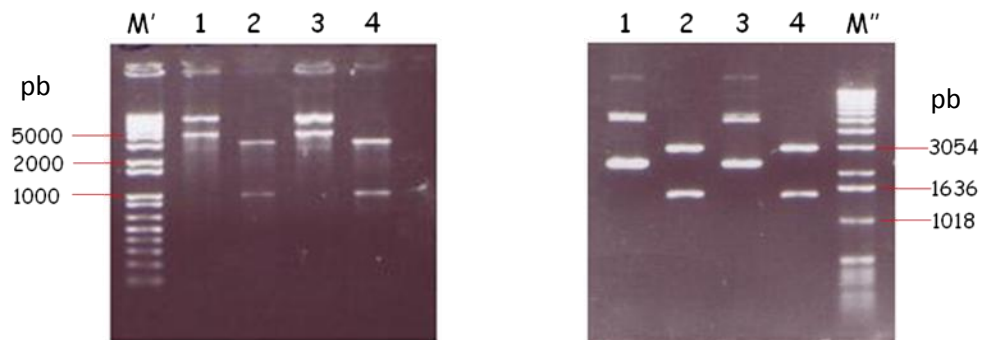


Figura 9. Confirmação dos clones contendo os elementos 35 e 40 clonados no plasmídio pGEM-T Easy. Gel de agarose 0,8% (p/v). À esquerda o resultado do elemento 35 e à direita encontra-se o resultado do elemento 40, ambos digerido pela enzima de restrição *EcoR* I (BioLabs). As linhas ímpares contêm o clone intacto enquanto que as linhas pares contêm o DNA digerido. Os números ao lado da foto se referem ao tamanho das bandas dos marcadores 1 kb Plus Ladder (Invitrogen) na linha M' e 1 kb Extension Ladder (Invitrogen) na linha M''.

4.1.3. Sequenciamento dos elementos anti-repressores

Essas quatro preparações plasmidiais foram submetidas a uma purificação por meio do kit Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-up System (Promega). Esse cuidado é importante para garantir uma boa qualidade dos dados gerados no próximo passo, que foi o sequenciamento. Os dois clones referentes ao elemento 35 foram totalmente sequenciados na primeira tentativa

utilizando-se os *primers* M13 Universal e M13 Reverso. Por outro lado o sequenciamento dos dois clones correspondentes ao elemento 40 apresentou uma cobertura de 83% e 89% de toda a extensão dos insertos utilizando-se os mesmos *primers* (posteriormente foram completamente sequenciados). Mesmo com as sequências incompletas dos clones referentes ao elemento 40 já foi possível compará-los e afirmar que se tratavam de elementos de DNA similares ao elemento 40 depositado no *GenBank*. No entanto o sequenciamento de toda a extensão do inserto era importante para as futuras análises tais como a identificação de prováveis sítios de ligação de proteínas e de regiões de formação de estruturas secundárias no DNA. Desenhou-se, então, mais quatro iniciadores para completar o sequenciamento desses insertos (Tabela 2, secção 3.1.3 de materiais e métodos).

Com os dados do sequenciamento completo dos quatro clones isolados e com o auxílio do software BioEdit Sequence Alignment Editor, comparou-se a sequência dos clones entre si, além de serem comparados individualmente com a sequência do banco de dados (Figura 10). Com apenas 3 nucleotídeos diferentes, o clone 1 foi o que apresentou o maior percentual de identidade (99,8%) comparado com o elemento 40, enquanto que houve identidade de 91,8% para o clone 2. Entre os clones do elemento 35, os percentuais de identidade foram menores com 79,3 % para o clone 3 e 92,0% para o clone 4. Tratam-se, portanto, de elementos distintos o que poderia ser explicado pela variabilidade genética natural da população humana ou poderiam ser repetições de regiões do DNA que geraram cópias distintas.

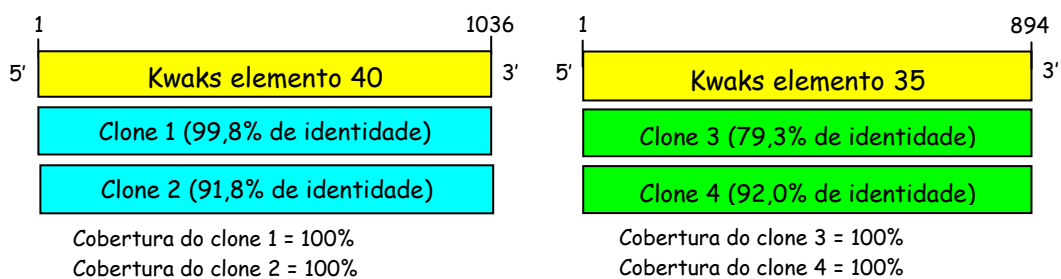


Figura 10. Esquematização do alinhamento dos clones recombinantes em relação às sequências do *GenBank*. As barras amarelas representam as sequências depositadas no banco de dados (números de acesso: AY190756 para o elemento 40 e AY190754 para o elemento 35). As barras azuis e verdes representam os fragmentos isolados com seus respectivos nomes. Os números encontrados acima das barras amarelas indicam as posições de nucleotídeos em relação à sequência do banco de dados. As porcentagens de identidade indicam a proporção de bases de cada fragmento que pareceu perfeitamente com a primeira sequência. A porcentagem de cobertura indica a porção da sequência de Kwaks que alinhou com os clones obtidos.

Mesmo não sendo os mesmos elementos de DNA isolado por Kwaks e colaboradores, todos os fragmentos isolados apresentam regiões idênticas ao elemento 40 ou elemento 35 do banco de dados. Sendo assim, as sequências isoladas neste trabalho são, em potencial, anti-repressores.

Portanto, os clones *pGEM-T Easy* elemento 40 clone 1 e *pGEM-T Easy* elemento 35 clone 4 foram escolhidos para dar continuidade ao trabalho devido à maior identidade com os anti-repressores do banco de dados.

Agora com a ferramenta BLAST, submetemos ambos os clones selecionados e as sequências do *GenBank* ao alinhamento com o genoma humano com o objetivo de identificar a localização cromossômica desses segmentos de DNA. Em um primeiro momento, utilizamos o algoritmo megablast para encontrar alinhamentos com o banco de dados “*Human genomic plus transcript*”. Com esses parâmetros encontram-se os alinhamentos de alta similaridade.

O melhor alinhamento encontrado, ou seja, o maior score obtido, ocorreu na região 14q11.1 (braço longo do cromossomo 14 – número de acesso NT 026437.12) tanto para o clone 1 quanto para o elemento 40 do *GenBank* (Figura 11). No seu alinhamento, o clone 1 apresentou score de 2621 bits, 99% de identidade (1430/1435) e 2 gaps. O elemento 40 do banco de dados apresentou score de 1905 bits, 100% de identidade e nenhum gap (Figura 12). É importante observar que, se considerássemos apenas a região de cobertura da sequência do banco de dados, haveria apenas duas ocorrências de não pareamento do clone 1 com o cromossomo 14, o que aumentaria ainda mais a similaridade entre essas sequências. Esses dados sugerem que o clone 1 e o elemento 40 do *GenBank* são o mesmo elemento anti-repressor e que as diferenças encontradas entre eles são resultados da variabilidade genética.

Ambas sequências também foram alinhadas com a fita negativa de outra região do cromossomo 14, também localizada na região 14q11.1. O clone 1 apresentou score de 2543 bits, identidade de 98% (1418/1436) e 9 gaps e o elemento 40 do banco de dados apresentou score 1844 bits, identidade de 99% (1021/1031) e 6 gaps. Outro alinhamento ocorreu no cromossomo 22, mais precisamente na região 22q11.1 (número de acesso NT 028395.3) (Figura 11). Nesse alinhamento, o clone 1 apresentou score de 2590 bits, 99% de identidade (1425/1435) e 5 gaps, e o elemento 40 apresentou score 1888 bits, 99% de identidade (1028/1031) e nenhum gap.

O clone 1 também apresentou outros 22 alinhamentos ao longo do genoma humano. Exatamente esses mesmos alinhamentos também foram obtidos na análise do elemento 40 do *GenBank* (Figura 13). O alinhamento de tais sequências com mais de uma região do genoma

humano sugere tratar-se de elementos repetitivos ou cópias imperfeitas desse elemento anti-repressor.

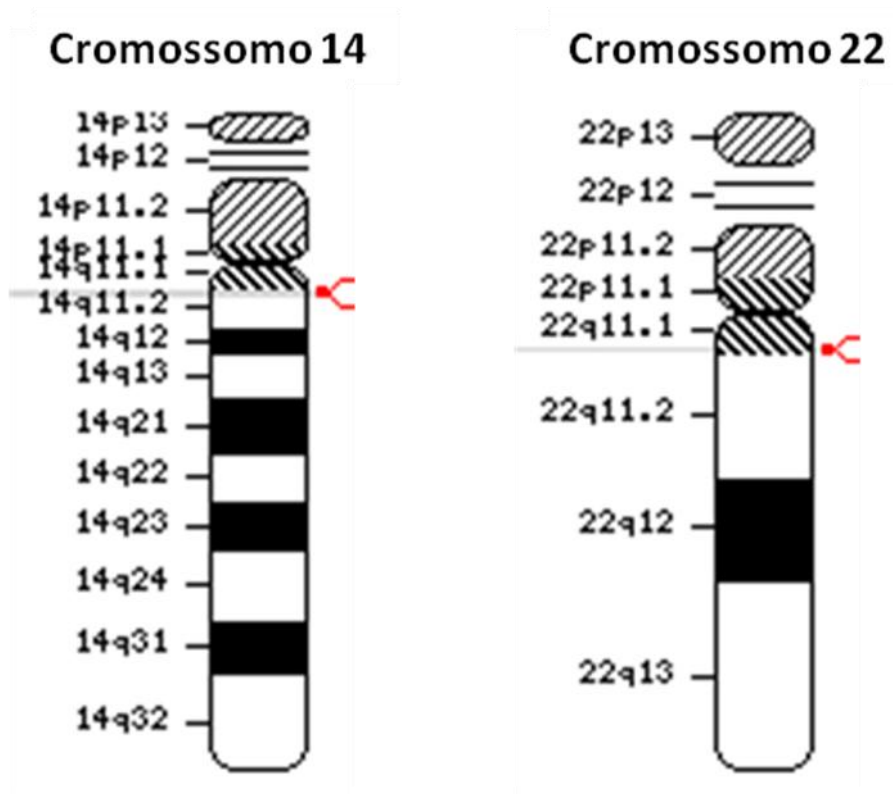


Figura 11. Localização cromossômica do clone 1 e do elemento anti-repressor 40 no genoma humano. No cromossomo 14 foram encontrados dois alinhamentos na região 14q11.1. Também foi obtido um alinhamento na região 22q11.1 do cromossomo 22 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>)


```

      10      20      30      40      50      60      70      80
cromossomo 14  TGGCCATATTTGAAGGTGCTGTGATTCAAACCTGTGAGCGAGATAAAGCAGCAGATCAAGAAAGCACTCCGGCTCCAGAA
Elemento 40    .....
Clone 1      .....

      90      100     110     120     130     140     150     160
cromossomo 14  GGAGCCTTCCAGGCCAGCTTTGAGCATAAGCTGCTGATGAGCAGTGAGTGTCTTGAGTAGTGTTCAGGGCAGCATGTTAC
Elemento 40    .....
Clone 1      .....

      170     180     190     200     210     220     230     240
cromossomo 14  CATTTCATGCTTGACTTCTAGCCAGTGTGACGAGAGGCTGGAGTCAGTCTCTAGAGAGTTGAGCAGCTCCAGCCTTAGAT
Elemento 40    .....
Clone 1      .....

      250     260     270     280     290     300     310     320
cromossomo 14  CTCCCAGTCTTATGCGGTGTGCCATTGCTTTTGTGTCTGCAGTCCCCCTGGCCACCCAGTAACAGTTCTGGGATCTAT
Elemento 40    .....
Clone 1      .....

      330     340     350     360     370     380     390     400
cromossomo 14  GGGAGTAGCTTCCCTTAGTGAGCTTTCCCTTCAAATACTTTGCAACCAGGTAGAGAAGTTTGGAGTGAAGGTTTTGTTCTT
Elemento 40    .....
Clone 1      .....

      410     420     430     440     450     460     470     480
cromossomo 14  CGTTTCTTCACAATATGGATATGCATCTTCTTTGAAAAATGTTAAAGTAAATTACCTCTCTTTTCAGATACTGTCTTCAT
Elemento 40    .....
Clone 1      .....

      490     500     510     520     530     540     550     560
cromossomo 14  GCGAACTTGGTATCCTGTTTCCATCCCAGCCTTCTATAAACCAGTAACATCTTTTTTGAACCAGTGGGTGAGAAAGACA
Elemento 40    .....
Clone 1      .....

      570     580     590     600     610     620     630     640
cromossomo 14  CCTGGTCAGGAACGCGGACCACAGGACAACCTCAGGCTCACCCACGGCATCAGACTAAAGCAAACAAGGACTCTGTATAA
Elemento 40    .....
Clone 1      .....

      650     660     670     680     690     700     710     720
cromossomo 14  AGTACCGGTGGCATGTGATTTAGTGGAGATGCAGCCTGTGCTCTGCAGACAGGGAGTCAACACAGACACTTTTCTATAAAT
Elemento 40    .....
Clone 1      .....

      730     740     750     760     770     780     790     800
cromossomo 14  TCTTAAGTGCTTTGAATGTTCAAGTAGAAAGTCTAACATTAAATTTGATTGAACAATTGTATATTCATGGAATATTTTGG
Elemento 40    .....
Clone 1      .....

      810     820     830     840     850     860     870     880
cromossomo 14  AACGGAATACCAAAAAATGGCAATAGTGGTCTTTCTGGATGGAAGACAAACTTTTCTTCTTTAAAAATAAATTTTATTTT
Elemento 40    .....
Clone 1      .....

      890     900     910     920     930     940     950     960
cromossomo 14  ATATATTTGAGGTTGACCACATGACCTTAAGGATACATATAGACAGTAAACTGGTTACTACAGTGAAGCAAATTAACATA
Elemento 40    .....
Clone 1      .....

      970     980     990     1000    1010    1020    1030    1040
cromossomo 14  TCTACCATCGTACATAGTTACATTTTTTTGTGTGACAGGAACAGCTAAAATCTACGTATTTAACAAAACTCCTAAAGACA
Elemento 40    .....
Clone 1      .....

```

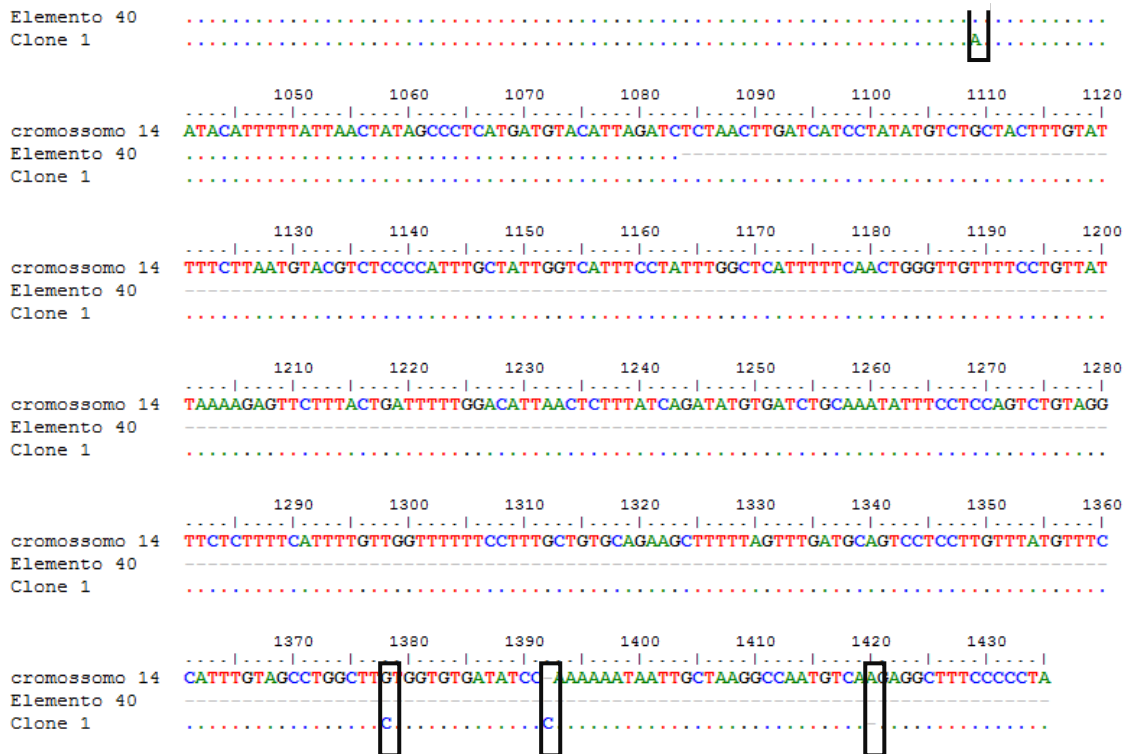


Figura 12. Alinhamento do elemento 40 e do clone 1 com o cromossomo 14 humano. O elemento 40 alinhou os 1031 pb com 100% de identidade e sem gaps. O clone 1, com 1435 pb, alinhou-se com 99% de identidade e 2 gaps (nas posições 1392 e 1420). Os pontos que houveram despareamento estão destacados nos retângulos.

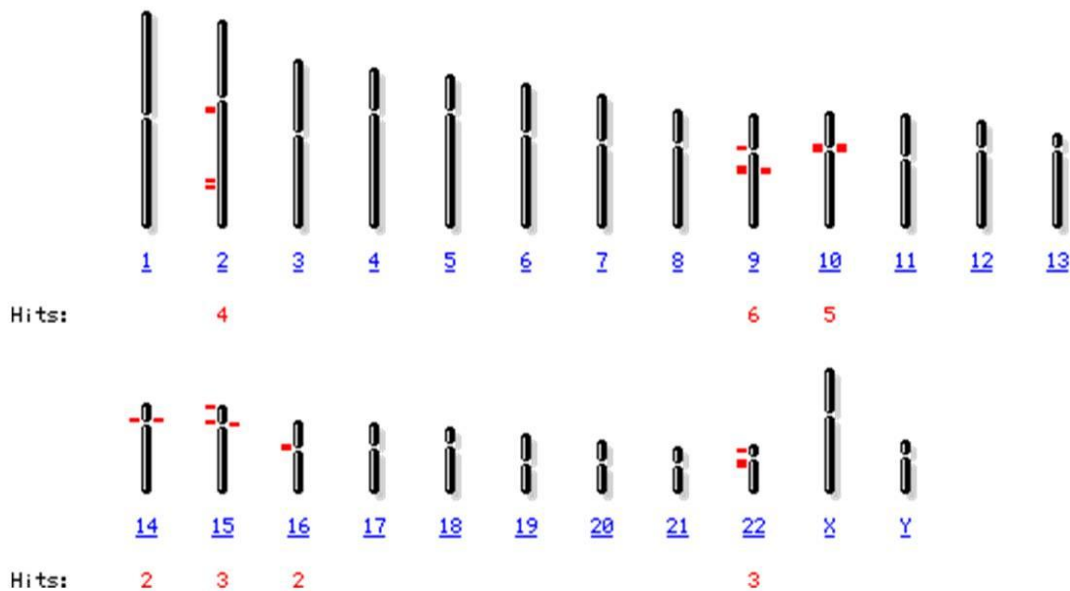


Figura 13. Alinhamentos do clone 1 e do elemento 40 ao longo do genoma humano. Tanto os alinhamentos obtidos com o clone 1 como os obtidos com o clone 40 foram exatamente os mesmos (indicados pelos pontos vermelhos). O número de cada cromossomo encontra-se em azul. Os números na fileira “Hits” indicam a quantidade de diferentes alinhamentos encontrados em cada cromossomo (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>).

É interessante observar que os melhores alinhamentos obtidos pela ferramenta BLAST estão localizados em regiões próximas ao centrômero. Esse fato é mais uma evidência de que os elementos de DNA estudados também podem desempenhar um papel anti-repressor *in vivo*, ao promover a modulação da cromatina dessa região do cromossomo. Essa hipótese já havia sido enunciada por Kwaks e colaboradores ao afirmarem que tais elementos são conservados. A atividade anti-repressora de elementos de DNA localizados em regiões pericentroméricas também foi sugerida por Kim e colaboradores. O efeito de elementos de DNA repetitivos, localizados na região pericentromérica do cromossomo 8 humano, foi testado na expressão de transgenes em células de eritroleucemia de camundongo (MEL). Esses elementos de DNA, conhecidos como DNA gama-satélite humano, são unidades repetitivas em tandem de 220 pb constituídas por oito repetições e apresentaram efeitos anti-repressores na expressão de um gene reporter. A conservação estrutural de DNA gama-satélite em regiões pericentromérica da maioria dos cromossomos de primatas (entre eles os humanos) sugere que esses elementos de DNA desempenhem papéis estruturais e funcionais relacionados ao centrômero. Foi proposto, então, que o papel primário do DNA gama-satélite possa ser a prevenção do avanço da heterocromatina centromérica sobre os braços dos cromossomos. Também pode desempenhar a função de separação de domínios específicos de eucromatina e heterocromatina (Kim *et al.*, 2009).

Em uma análise mais detalhada da região do cromossomo 14 na qual obteve-se os melhores alinhamentos, foram encontradas dois genes de proteínas hipotéticas flanqueando os elementos anti-repressores (Figura 14). Do lado 5' encontra-se o suposto gene XR_015133.2 e na outra extremidade encontra-se XP_002343304 na extremidade 3'.

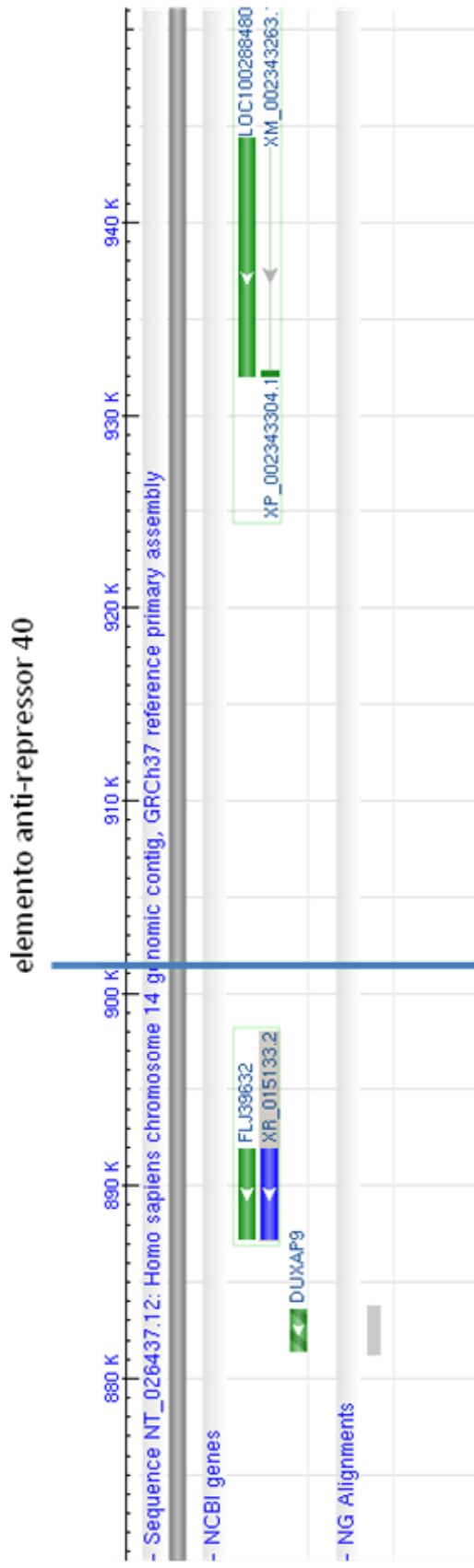


Figura 14. Detalhamento da região flaqueadora do elemento 40 no cromossomo 14 humano. O elemento anti-repressor 40 encontra-se flaqueado pelos genes de proteínas hipotéticas XR_015133.2 em sua extremidade 5' e XP_002343304 na extremidade 3' (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>).

As sequências do clone 4 e do elemento 35 do *GenBank* também foram submetidas ao alinhamento com o genoma humano. Utilizando-se o algoritmo megablast e o banco de dados do genoma humano não foi possível obter um alinhamento. No entanto, baseado na publicação de Kwaks e colaboradores, na qual conseguiram um alinhamento do elemento 35 com o cromossomo 7, buscou-se o alinhamento de cada elemento de DNA apenas na sequência do cromossomo 7 (número de acesso NC_000007) por meio da ferramenta blast2seq. Dessa forma encontramos alinhamentos do clone 4 com mais de 1000 sequências do cromossomo 7, todos eles com alta identidade entre as sequências. Esses mesmos resultados foram obtidos nos alinhamentos com o anti-repressor 35 do *GenBank*. Além disso, a sequência do clone 4 alinhou com uma sequência codificadora de transcriptase reversa. O conjunto dessas informações sugere que esse elemento de DNA faça parte de um grupo pertencente a uma superfamília viral. Esse grupo é constituído de sequências repetidas intercaladas longas conhecidas como LINES (*long interspersed repeated sequences*). Estas sequências são derivadas de transcritos de RNA polimerase II. Uma minoria desses elementos no genoma é completamente funcional, podendo transpor-se de maneira autônoma, enquanto os outros elementos exibem mutações e, assim, somente são transpostos como resultado da ação de um elemento autônomo que age em *trans*. LINES e SINES (*short interspersed repeated sequences*) correspondem a uma parte significativa do DNA repetitivo de genomas animais chegando a ocupar 50% do DNA total (Lewin, 2009).

Em experimentos distintos, Kwaks e colaboradores isolaram algumas sequências mais de uma vez e sugeriram que o número de elementos anti-repressores fosse limitado (Kwaks *et al.*, 2003). Por outro lado, com os dados obtidos neste trabalho pode-se sugerir que o fato de serem elementos repetitivos fez com que esses elementos fossem isolados em eventos distintos.

Foi feita, então, uma preparação em larga escala dos clones *pGEM-T Easy* elemento 40 clone 1 e *pGEM-T Easy* elemento 35 clone 4 foram com o QIAGEN Plasmid Maxi Kit 25.

4.2. Clonagem em vetor de expressão em células de mamífero

4.2.1. Otimização do promotor CMV

O passo seguinte foi otimizar o vetor de expressão pMIRE5 anti-CD3 FvFc humanizado. Tal vetor de expressão fora previamente utilizado para a transfecção de CHO-K1. Nesta ocasião, atingiu-se níveis de produção em torno de 140 a 150 ng/mL em uma garrafa de cultura de 150 cm² contendo uma população mista, ou seja, em uma população contendo clones que produzem variados níveis do anticorpo anti-CD3 (Silva, 2008). Esses níveis de produção são similares aos dados da literatura para sistemas de expressão heteróloga em células aderidas utilizando vetores com o promotor CMV (Li, *et al.*, 2007).

Para o aperfeiçoamento desse vetor, retirou-se o promotor CMV original do vetor e clonou-se um promotor CMV otimizado (sintetizado quimicamente pela Genscript) entre os sítios *Sbf* I e *Xma* I. Tal clonagem deu origem ao plasmídeo pCO anti-CD3 FvFc humanizado com 8595 pb (Figura 15). Para confirmação da clonagem, foi realizada uma análise do perfil de restrição dos clones obtidos com a digestão dos mesmos com a enzima *Hind* III (Figura. 16). Além de possuir sítios de restrição de interesse do grupo, esse novo promotor contém o intron A do gene imediatamente precoce 1 do CMV, que, segundo resultados do grupo (Quilici, 2008) e dados da literatura, garante uma maior produção protéica. A regulação da síntese protéica por introns começa no DNA, ao favorecer a remodelagem da cromatina e assim favorecer a ligação de elementos reguladores da transcrição e da RNA polimerase II. Além disso, após a retirada do intron do transcrito primário pela maquinaria de *splicing*, algumas proteínas desta maquinaria permanecem associadas ao mRNA indicando o seu amadurecimento completo, o que garante uma maior estabilidade da molécula e permite a sua migração do núcleo para o citoplasma (Le Hir *et al.*, 2003).

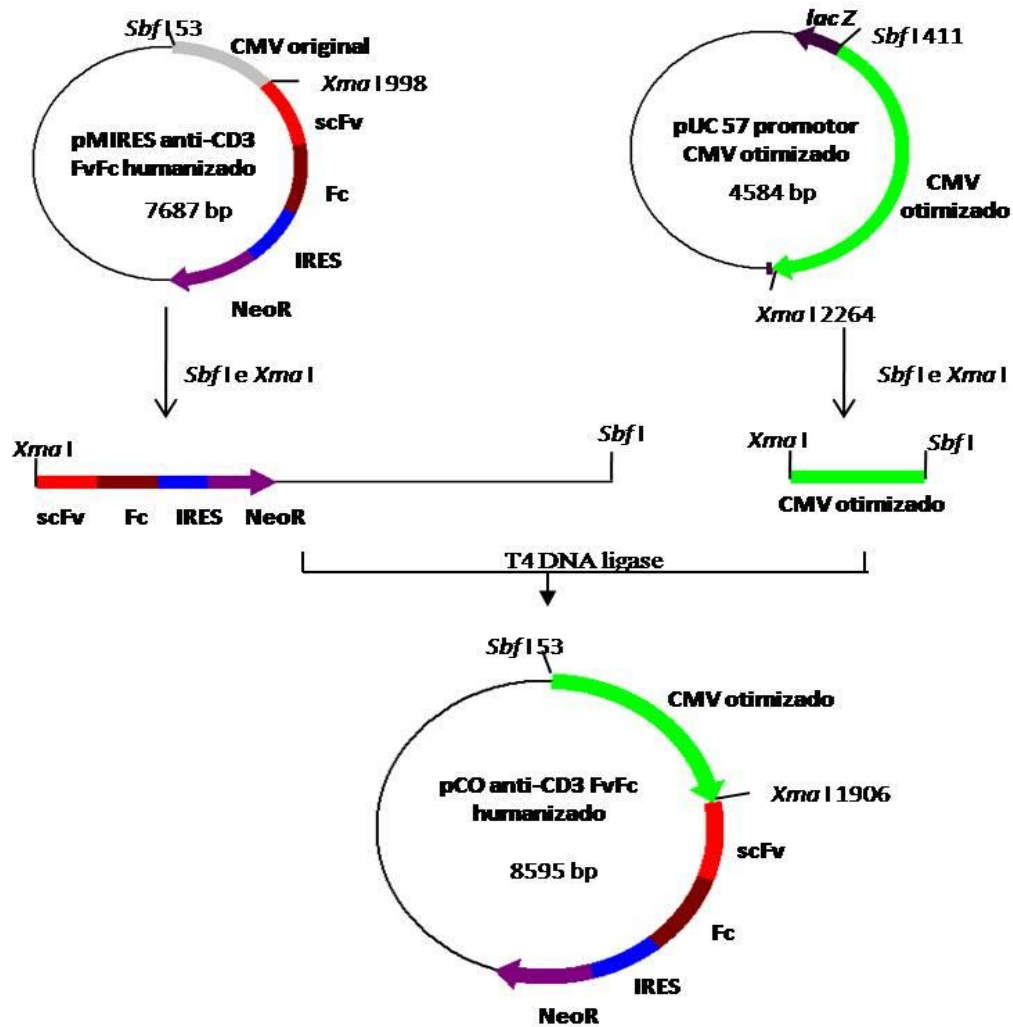


Figura 15. Estratégia de construção do vetor pCO anti-CD3 FvFc humanizado. A região do promotor CMV original do vetor pMIREs anti-CD3 FvFc humanizado foi retirada pela digestão com as enzimas *Xma*I e *Sbf*I. Com essas mesmas enzimas, retirou-se o promotor CMV otimizado, o qual havia sido previamente sintetizado quimicamente e clonado no vetor comercial pUC57. A ligação do vetor pMIREs anti-CD3 FvFc humanizado sem promotor ao fragmento de P_{CMV} otimizado deu origem ao vetor pCO anti-CD3 FvFc humanizado. Siglas – CMV: promotor de citomegalovírus. scFv: fragmento variável cadeia simples. Fc: fragmento cristalizável. IRES: sítio de entrada ribossomal interno. NeoR: gene de resistência ao antibiótico G418. *lac*Z: operon *lac*.

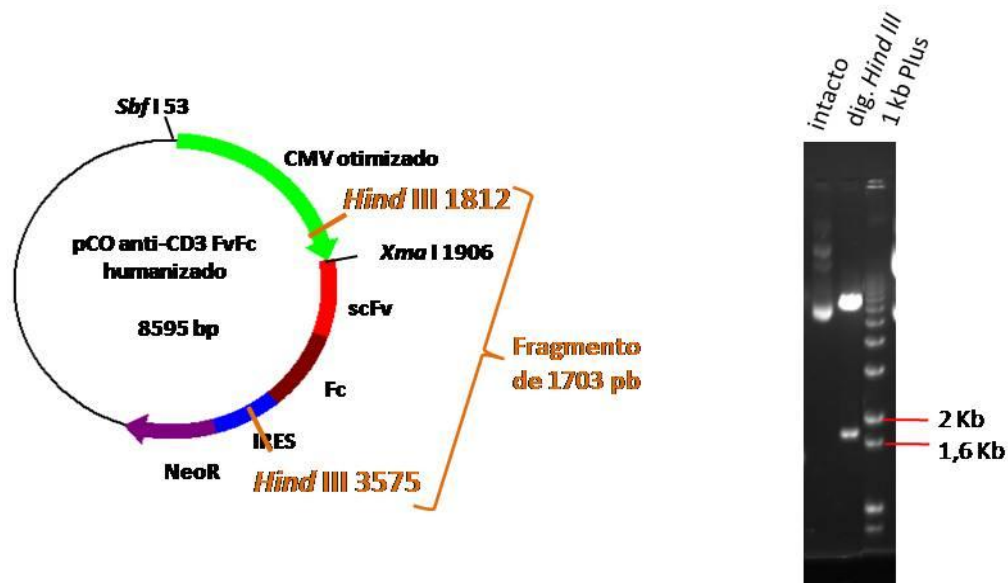


Figura 16. Perfil de restrição do vetor pCO anti-CD3 FvFc humanizado. À esquerda, esquema da digestão do vetor pela enzima de restrição *Hind* III (BioLabs) e o fragmento de DNA esperado após a digestão. À direita, o resultado obtido analisado por eletroforese em gel de agarose 0,8% (p/v). Na sequência foram aplicadas a amostra intacta, o vetor digerido e o marcador 1 kb Plus Ladder (Invitrogen). Os números ao lado da foto se referem ao tamanho das bandas do marcador.

4.2.2. Clonagem dos elementos anti-repressores

Com o vetor pCO em mãos, o próximo passo foi clonar os elementos anti-repressores no vetor de expressão pCO. Cada um dos elementos foi clonado separadamente. Por meio da digestão em *Not* I dos vetores *pGEM-T Easy* elemento 40 clone 1 e *pGEM-T Easy* elemento 35 clone 4 liberou-se os fragmentos correspondentes aos anti-repressores. Já o vetor pCO possui um único sítio *Not* I no promotor otimizado. O pCO foi então linearizado em *Not* I, defosforilado com a enzima SAP (Promega) e, em seguida, clonou-se os elementos de DNA anti-repressores. Obteve-se assim dois clones do vetor pCO35 anti-CD3 FvFc humanizado e cinco clones do vetor pCO40 anti-CD3 FvFc humanizado (Figura 17).

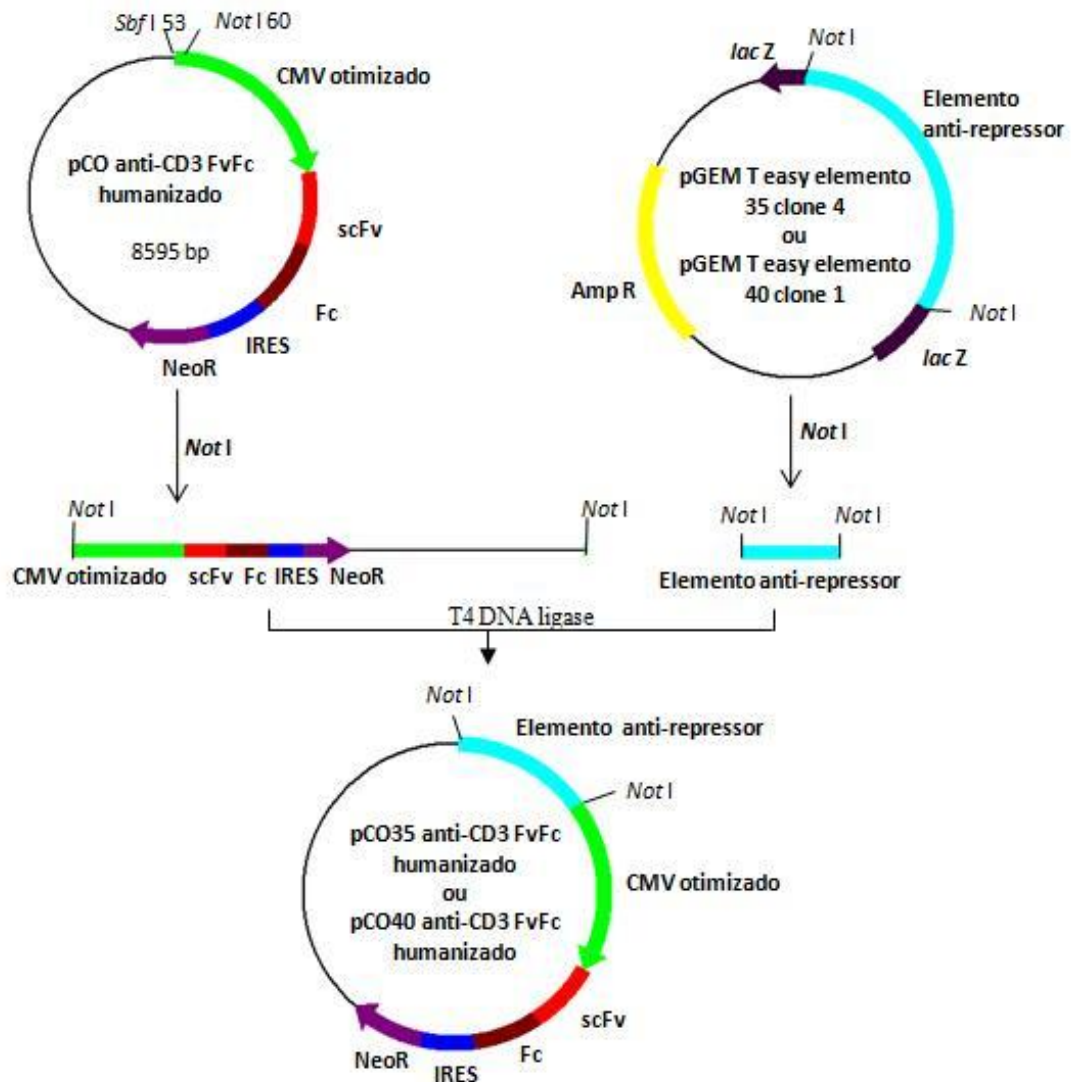


Figura 17. **Estratégia de construção dos vetores pCO35 anti-CD3 FvFc humanizado e pCO40 anti-CD3 FvFc humanizado** Os elementos anti-repressores foram obtidos a partir da digestão com *Not I* dos vetores *pGEM-T Easy* elemento 35 clone 4 e *pGEM-T Easy* elemento 40 clone 1. A mesma digestão foi realizada no plasmídio pCO anti-CD3 FvFc humanizado, o que linearizou tal vetor. Por meio da ligação com a enzima T4 DNA ligase clonou-se os elementos anti-repressores, dando origem aos vetores pCO35 anti-CD3 FvFc humanizado (9600 pb) e pCO40 anti-CD3 FvFc humanizado (10058 pb). Siglas – CMV: promotor de citomegalovírus. scFv: fragmento variável cadeia simples. Fc: fragmento cristalizável. IRES: sítio de entrada ribossomal interno. NeoR: gene de resistência ao antibiótico G418. *lac Z*: operon *lac*. Amp r: região codificador de β-lactamase.

Como a estratégia de clonagem foi feita utilizando-se apenas o sítio de restrição *Not I*, existia a possibilidade de clonar mais de uma cópia do elemento anti-repressor e também a possibilidade de clonar os insertos no sentido inverso em relação a sequência do banco de dados. Portanto foi feito um perfil de restrição de um clone de pCO35 anti-CD3 FvFc humanizado com a enzima *Sac II* para determinar o sentido da clonagem (Figura 18). Pelo mesmo motivo, um clone do vetor pCO40 anti-CD3 FvFc humanizado foi digerido com *Hind*

III (Figura 19). Com essas digestões, foi possível afirmar que, nos dois casos analisados, o elemento de DNA anti-repressor foi clonado no sentido inverso em relação a sequência depositada no banco de dados por Kwaks e colaboradores, e que apenas uma cópia foi clonada em cada vetor. O fato de haver apenas uma cópia dos elementos de DNA nas construções obtidas significa vetores menores (9600 pb para o pCO35 anti-CD3 FvFc humanizado e 10058 pb para o pCO40 anti-CD3 FvFc humanizado), o que facilita as transfecções em célula de mamíferos. Quanto ao sentido invertido das clonagens obtidas, tal fato pode ser interessante para verificar se há alterações na produção protéica influenciada pela orientação em que o elemento anti-repressor foi clonado. A princípio acredita-se que o efeito anti-repressor seja na cromatina localizada nas proximidades de tais elementos de DNA e assim a sua orientação não interfere na sua atividade anti-repressora. Nas próprias construções de Kwaks e colaboradores, por exemplo, os elementos anti-repressores flanqueavam o gene recombinante, ou seja, o elemento localizado a jusante exercia o seu efeito anti-repressor sobre um gene localizado na sua extremidade 5'. O mesmo efeito é esperado nas construções obtidas no presente trabalho.

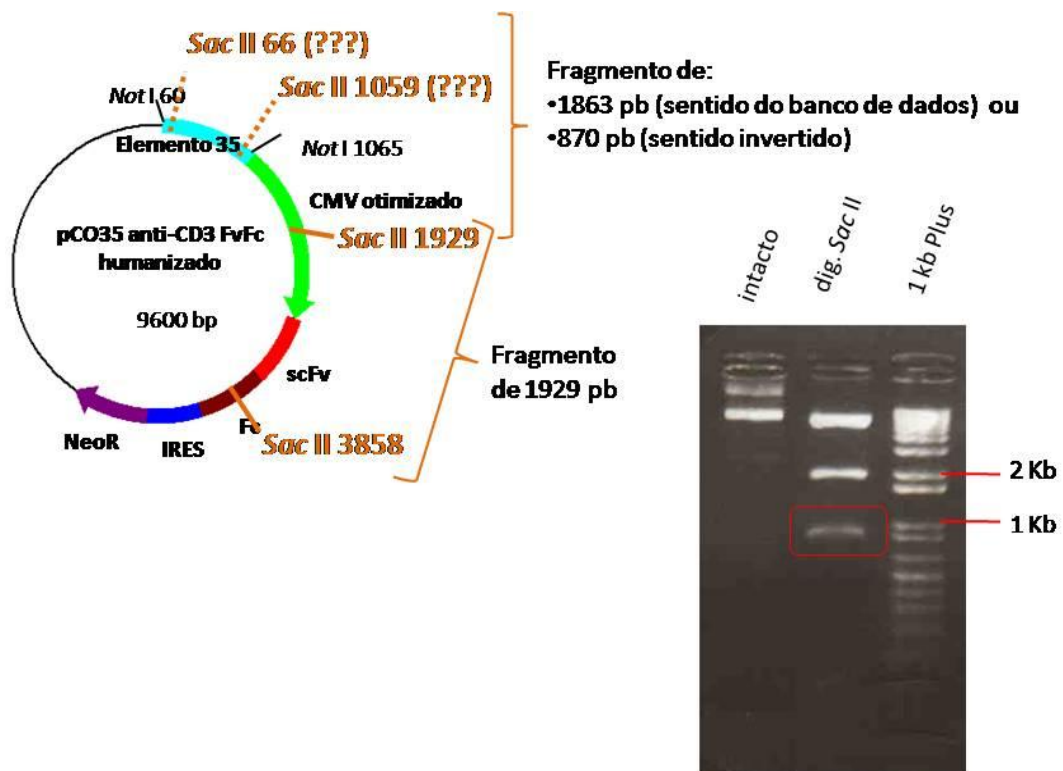


Figura 18. Perfil de restrição do vetor pCO35 anti-CD3 FvFc humanizado. À esquerda, esquema da digestão do vetor pela enzima de restrição *Sac* II (BioLabs) e, dependendo do sentido de clonagem do elemento 35, as diferentes possibilidades de fragmentos de DNA esperados após a digestão. À direita, o resultado obtido analisado por eletroforese em gel de agarose 0,8% (p/v). Na sequência foram aplicadas a amostra intacta, o vetor digerido e o marcador 1 kb Plus Ladder (Invitrogen). Os números ao lado da foto se referem ao tamanho das bandas do marcador.

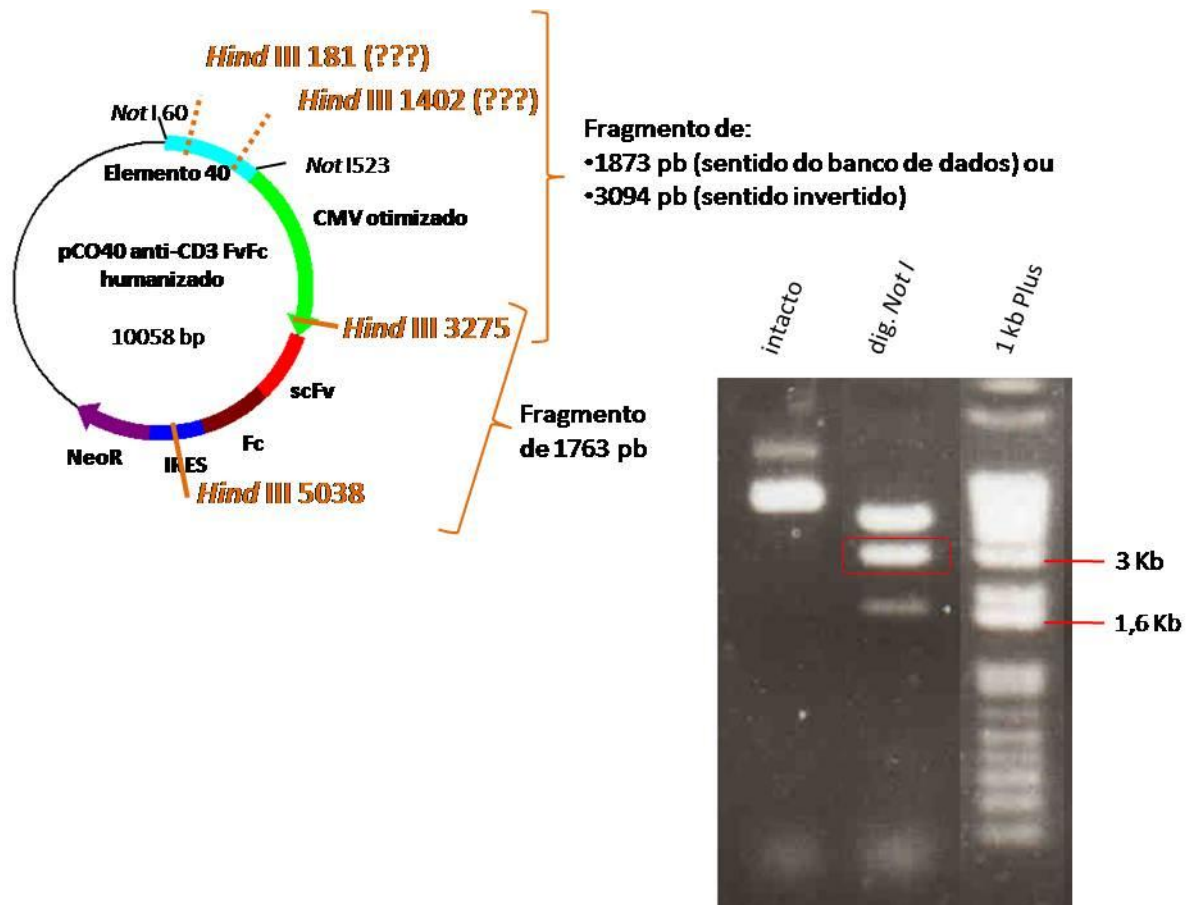


Figura 19. Perfil de restrição do vetor pCO40 anti-CD3 FvFc humanizado. À esquerda, esquema da digestão do vetor pela enzima de restrição *Hind* III (BioLabs) e, dependendo do sentido de clonagem do elemento 40, as diferentes possibilidades de fragmentos de DNA esperados após a digestão. À direita, o resultado obtido analisado por eletroforese em gel de agarose 0,8% (p/v). Na sequência foram aplicadas a amostra intacta, o vetor digerido e o marcador 1 kb Plus Ladder (Invitrogen). Os números ao lado da foto se referem ao tamanho das bandas do marcador.

4.3. Transfecção em CHO-K1 e seleção de clones estáveis

Para testar os efeitos dos elementos anti-repressores na produção de proteína heteróloga em células de mamíferos, transfectou-se células CHO-K1, por meio do kit comercial Lipofectamine LTX (Invitrogen), com cada um dos seguintes vetores:

- pMIREs anti-CD3 FvFc humanizado;
- pCO anti-CD3 FvFc humanizado;
- pCO35 anti-CD3 FvFc humanizado e
- pCO40 anti-CD3 FvFc humanizado.

Depois de 24 horas de transfecção, adicionou-se meio de cultura contendo o antibiótico geneticina G418 (Pierce) na concentração de 600 µg/mL e, dessa maneira, as células não transfectadas morreram após seis dias. Isso porque o gene de resistência a esse agente seletivo, o gene NeoR, está presente apenas nas construções dos vetores de expressão.

Além disso, os clones transfectados que apresentaram uma baixa expressão do gene NeoR também morreram, o que foi de nosso interesse, visto que a baixa expressão do gene de resistência reflete a baixa expressão do gene do anticorpo, e com isso facilita-se a seleção de clones estáveis mais eficientes na produção da imunoglobulina anti-CD3. Essa correlação entre os níveis de expressão desses dois genes é explicada pela própria construção dos vetores de expressão. Nessas construções, ambos os genes são transcritos em um único mRNA dicistrônico, sendo que, na região intercistrônica, há um elemento de RNA conhecido como IRES (*internal ribosome entry site*). Tal elemento apresenta uma estrutura secundária capaz de se ligar ao ribossomo e iniciar a tradução do *cistron* a jusante. Dessa forma, a iniciação da tradução ocorre independentemente em duas regiões distintas desse mRNA (no cap e no IRES) e, conseqüentemente, produz as duas proteínas concomitantemente (Figura 20). Embora o elemento IRES possua uma eficiência de iniciação da tradução menor do que a do cap 5', esse fato nos permite afirmar que os clones sobreviventes a pressão seletiva, que produzem quantidades suficientes de moléculas de resistência a geneticina, provavelmente expressam quantidades ainda maiores do anti-corpo anti-CD3.

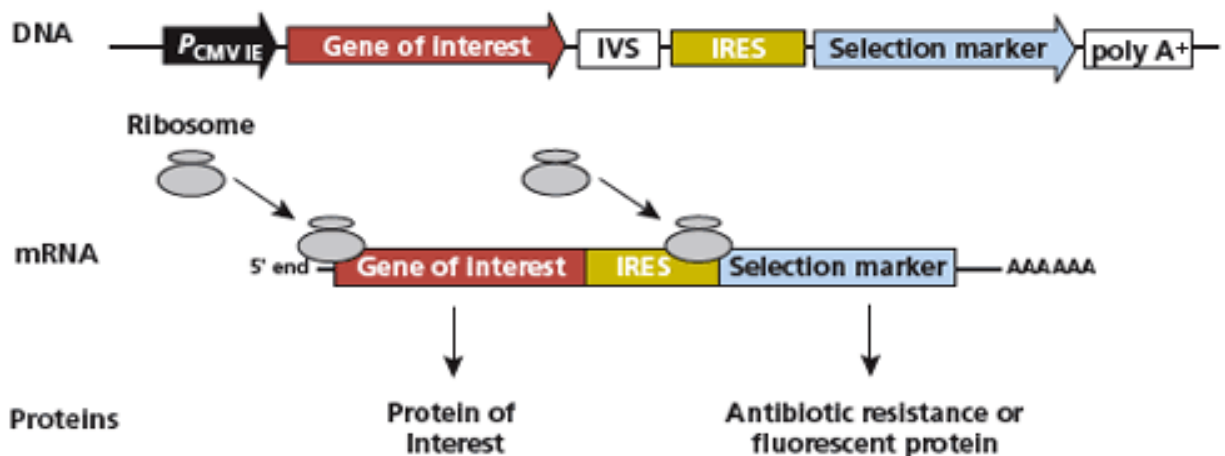


Figura 20. Mecanismo de ação do sítio de entrada ribossomal interno (IRES) em um processo de tradução. Pcmvie: promotor. Gene of interest: gene de interesse. Selection marker: marca seletiva. IVS: íntron sintético. Poly A: sinal de poliadenilação (Clontech).

Com isso, sobreviveram apenas os transfectomas mais eficientes constituindo, assim, populações mistas. Em seguida, semeou-se placas de Petri para cultura de tecidos com 10 a 40 células de cada uma das populações mistas de modo que, depois de sucessivas gerações, cada clone deu origem a uma colônia. Tais colônias puderam ser vistas a olho nu depois de 10 dias de cultivo e, portanto, foram facilmente identificadas aquelas que cresceram afastadas de outras colônias. Com a visualização ao microscópio, confirmou-se se de fato uma determinada colônia estava isolada e, sendo assim, fixou-se um pequeno cilindro de vidro na placa de Petri para a tripisinização individual de cada colônia. Os clones isolados foram expandidos primeiramente em placas de 24 poços e posteriormente em garrafas de 25 cm². Ao todo foram isolados 2 clones de pMIREs anti-CD3 FvFc humanizado, 11 clones de pCO anti-CD3 FvFc humanizado, 4 clones de pCO40 anti-CD3 FvFc humanizado e 4 clones de pCO35 anti-CD3 FvFc humanizado.

Os clones isolados apresentaram diferentes velocidades de expansão celular, sendo que muitos deles expandiram lentamente. Esse crescimento lento pode ser um indício de clones que produzem altos níveis do anticorpo de interesse em detrimento de sua expansão. Não foi observada uma correlação entre a expansão e o tipo de construção utilizada em cada clone isolado.

4.4. Análise da expressão gênica

Com o intuito de mensurar a expressão do gene recombinante, buscou-se quantificar os níveis de anticorpo anti-CD3 humanizado secretado no meio de cultura. Para tanto, foram realizados testes de ELISA.

Para uma expansão mais rápida dos clones isolados, passou-se a utilizar meio de cultura acrescido de 20% de soro fetal bovino, tendo em vista que no soro há fatores de crescimento. Por outro lado, as imunoglobulinas presentes no soro podem se ligar aos anticorpos utilizados no ELISA e, dessa forma, diminuir a sensibilidade do ensaio dificultando a detecção do anti-CD3.

Portanto, os clones isolados foram cultivados até atingirem confluência de 60%, quando passamos a cultivá-los em meio de cultura contendo soro fetal bovino low IgG. Em seguida, a produção protéica foi acumulada por 5 dias de cultivo e, depois disso, o sobrenadante de cultura foi coletado para a realização dos ensaios de ELISA.

No entanto, foi necessário padronizar o protocolo de ELISA e vários ajustes foram

feitos. Após inúmeras tentativas, não foi possível detectar a proteína. Como alternativa de análise da expressão gênica, foram desenhados seis iniciadores para quantificar o mRNA correspondente à regiões codificadoras do anticorpo anti-CD3 humanizado (Tabela 2, secção 3.1.3 de materiais e métodos). A reação de PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR) será feita em um futuro próximo.

CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

Neste trabalho foram isolados elementos de DNA similares às sequências de elementos anti-repressores do *GenBank*. O alinhamento do elemento similar ao anti-repressor 35 com mais de mil regiões do cromossomo 7 e o fato de haver um gene de transcriptase reversa contido nesse elemento de DNA, sugerem que tal sequência seja ou já fora um retrotransposon. O elemento 40 também é um elemento repetitivo espalhado ao longo do genoma humano e a sua predominância em regiões subcentroméricas próximas a janelas de leitura de proteínas hipotéticas sugere que esses elementos possam influenciar os níveis de expressão dos genes localizados próximos a heterocromatina. Em ambos os casos, os resultados obtidos são indícios de que esses elementos de DNA possuem atividade anti-repressora ao modular a cromatina.

Estes elementos têm o potencial de otimizar a expressão gênica, sendo alvos interessantes para o estudo mais aprofundado e posterior construção de vetores para expressão de proteínas heterólogas de interesse comercial.

Com os resultados obtidos nesse trabalho, abrem-se perspectivas de novos ensaios biológicos com o objetivo de ampliar o conhecimento acerca desses elementos anti-repressores. Algumas dessas perspectivas são:

- Clonar no vetor de expressão os elementos anti-repressores 35 e 40 no mesmo sentido das sequências depositadas no *GenBank* para uma comparação com as construções já obtidas. Dessa forma será possível verificar se o sentido da clonagem interfere no efeito anti-repressor desses elementos de DNA. Também pode-se clonar duas sequências anti-repressoras, uma a montante e outra a jusante do gene de interesse, de forma a flanquear a região do DNA a ser transcrita. E em seguida, transfectar e selecionar clones estáveis utilizando todas essas novas construções;
- Utilizar a técnica de *southern blot* para verificar se o vetor foi integrado no genoma da célula;
- Analisar quantitativamente e ao longo do tempo a transcrição dos genes recombinantes por meio de RT-qPCR de todos os clones selecionados. Com essa metodologia pode-se verificar o efeito anti-repressor especificamente nos níveis de transcrição;

- Analisar a estabilidade do transgene medindo a produção de anti-CD3 de todos os clones selecionados, por meio do teste de ELISA;
- Extrair e analisar o DNA genômico de um transfectoma estável após sucessivas gerações para saber se houve algum evento biológico na região de integração do gene de interesse como, por exemplo, uma translocação;
- Por fim, abre-se a perspectiva de identificação e estudo de novos elementos anti-repressores e a elucidação dos mecanismos moleculares de tais elementos.

O aumento na eficiência de produção de proteínas heterólogas para fins terapêuticos visa a diminuição do custo de sua produção, o que conseqüentemente reflete na redução do custo do tratamento de pacientes. Além disso, a ciência prevê que, em um futuro próximo, os medicamentos de origem biológica serão personalizados, ou seja, serão produzidos especificamente para um paciente de acordo com as suas condições fisiológicas. Para que isso se torne viável, é interessante buscar tecnologias que aumentem a eficiência de produção recombinante, tal como o uso dos elementos anti-repressores.

Por fim, as células de mamíferos também são utilizadas como sistemas de expressão heteróloga de produtos biotecnológicos utilizados em vacinas e em testes de diagnóstico e, com isso, a produção dessas proteínas também pode ser beneficiada com a utilização dos elementos anti-repressores.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbas, A. K. e Lichtman, A. H. Cellular and Molecular Immunology: W.B. Saunders. 2003.
- Andersen, D.C., Krummen L. Recombinant protein expression for therapeutic applications. Curr Opin Biotechnol, v.13, n.2, Apr, p. 117-123. 2002.
- Andersen, D.C., Reilly, D.E. Production technologies for monoclonal antibodies and their fragments. Curr Opin Biotechnol, v.15, n.5, Oct, p.456-462. 2004.
- Arnold, J. N., Wormald, M. R., Sim, R. B., Rudd, P. M. e Dwek, R. A. The impact of glycosylation on the biological function and structure of human immunoglobulins. Annu Rev Immunol, v.25, p.21-50. 2007.
- Azevedo, M. O.; Felipe, M. S. S.; Brígido, M. M.; Maranhão, A. Q. e De-Souza, M. T. Técnicas Básicas em Biologia Molecular. 1ª edição. Editora UnB. 2003.
- Baez, J., Olsen, D., Polarek, J.W. Recombinant microbial systems for the production of human collagen and gelatin. Appl. Microbiol. Biotechnol., v.69, n.3, Dec, p.245–252. 2005. Epub 2005 Nov 15.
- Barbas III, C.F.; Burton, D. R.; Scott, J. K. e Silverman, G. J. Phage display: a Laboratory Manual. 1ª edição. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA. 2001
- Butler, M. Animal cell cultures: recent achievements and perspectives in the production of biopharmaceuticals. Appl Microbiol Biotechnol, v.68, n.3, Aug, p.283-291. 2005.
- Campos-da-Paz, M., Costa, C. S., Quilici, L. S., de Carmo Simões, I., Kyaw, C. M., Maranhão, A. Q., Brígido, M. M. Production of recombinant human factor VIII in different cell lines and the effect of human XBP1 co-expression. Mol Biotechnol. v. 39, n. 2, Jun, p.155-158. 2008.
- Chatenoud, L. CD3-specific antibody-induced active tolerance: from bench to bedside. Nat Rev Immunol, v.3, n.2, Feb, p.123-132. 2003.
- Chu, L., Robinson, D.K. Industrial choices for protein production by large-scale cell culture. Curr Opin Biotechnol, v.12, n.2, Apr, p. 180-187.2001.
- Dillon, N. and Festenstein, R. Unravelling heterochromatin: competition between positive and negative factors regulates accessibility. Trends Genet., v.18, n.5, May, p.252-258. 2002.
- Feng W., Lu Z., Luo R. Z., Zhang X., Seto E., Liao W. S., Yu Y. Multiple histone deacetylases repress tumor suppressor gene ARHI in breast cancer. Int J Cancer, v.120, n. 8, Apr, p. 1664–1668. 2007.

- Galbete, J. L., Buceta, M. Mermod, N. MAR elements regulate the probability of epigenetic switching between active and inactive gene expression. Mol Biosyst, v.5, n.2, Feb, p. 143-150. 2009.
- Garcia, B.A., Shabganowitz, J., Hunt, D.F.. Characterization of histones and their post-translational modifications by mass spectrometry. Curr Opin Chem Biol., v.11, n.1, Feb, p.66-73. 2007. Epub 2006 Dec 6.
- Gerngross, T.U. Advances in the production of human therapeutic proteins in yeasts and filamentous fungi. Nat. Biotechnol, v.22, n.11, Nov, p.1409–1414. 2004.
- Hall, T. BioEditi: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Carlsbad: Ibis Biosciences 2007.
- Herrero, C., Hu, X., Li, W. P., Samuels, S., Sharif, M. N., Kotenko, S., et al. Reprogramming of IL-10 activity and signaling by IFN- γ . J Immunol, v. 171, n. 10, Nov, p. 5034-5041. 2003.
- Jenuwein, T. and Allis, C.D. Translating the histone code. Science, v.293, n.5532, Aug, p.1074–1080. 2001.
- Jiang Z., Sharfstein S. T. Sodium butyrate stimulates monoclonal antibody over-expression in CHO cells by improving gene accessibility. Biotechnol Bioeng, v.100, n.1, May, p.189-194. 2008.
- Kim J. H., Ebersole T., Kouprina N., Noskov V. N., Ohzeki J., Masumoto H., Mravinac B., Sullivan B. A., Pavlicek A., Dovat S., Pack S. D., Kwon Y. W., Flanagan P. T., Loukinov D., Lobanekov V., Larionov V. Human gamma-satellite DNA maintains open chromatin structure and protects a transgene from epigenetic silencing. Genome Res, v. 19, n.4, Apr, p. 533-544. 2009.
- Kwaks, T. H., Sewalt, R. G., van Blokland, R., Siersma, T. J., Kasiem, M., Kelder, A., Otte, A. P. Targeting of a histone acetyltransferase domain to a promoter enhances protein expression levels in mammalian cells. J Biotechnol, v.115, n.1, Jan, p. 35-46. 2005
- Kwaks, T.H. and Otte, A.P. Employing epigenetics to augment the expression of therapeutic proteins in mammalian cells. Trends Biotechnol, v.24, n.3, Mar, p.137-142. 2006. Epub 2006 Feb 7.
- Kwaks, T.H., Barnett, P., Hemrika, W., Siersma, T., Sewalt, R.G., Satijn, D.P., Brons, J.F., van Blokland, R., Kwakman, P., Kruckeberg, A.L., Kelder, A., Otte, A.P. Identification of anti-repressor elements that confer high and stable protein production in mammalian cells. Nat Biotechnol., v.21, n.5, May, p.553-558. 2003. Epub 2003 Apr 7.
- Le Hir, H., Nott, A., Moore, M.J. How introns influence and enhance eukaryotic gene expression. Trends in Biochemical Sciences. v.28, n.4, Apr, p.215-220. 2003.

- Lelièvre, S. A., Contributions of extracellular matrix signaling and tissue architecture to nuclear mechanisms and spatial organization of gene expression control. Biochim Biophys Acta, v.1790, n.9, Sep, p. 925-935. 2009.
- Lewin, B. Genes IX. Artmed. 2009.
- Li, J., Menzel, C., Meier, D., Zhang, C., Dubel, S. e Jostock, T. A comparative study of different vector designs for the mammalian expression of recombinant IgG antibodies. J Immunol Methods, v.318, n.1-2, Jan 10, p.113-124. 2007.
- Margueron, R., Trojer, P., Reinberg, D. The key to development: interpreting the histone code? Curr. Opin. Genet. Dev., v.15, n.2, Apr, p.163–176. 2005.
- Montgomery, N.D., Yee, D., Chen, A., Kalantry, S., Chamberlain, S.J., Otte, A.P., Magnuson, T. The murine polycomb group protein Eed is required for global histone H3 lysine-27 methylation. Curr. Biol, v.15, n.10, May, p.942–947. 2005.
- Nelson, D. L. e Cox, M. M. Lehninger Princípios de Bioquímica. 4ª edição. Savier. 2006.
- Peterson, C.L. and Laniel, M.A. Histones and histone modifications. Curr. Biol, v.14, n.14, Jul, p.R546–R551. 2004.
- Pilbrough, W., Munro, T. P., Gray, P., Intracloal protein expression heterogeneity in recombinant CHO cells. PLoS One, v.4, n.12, Dec, p. e8432. 2009.
- Quilici, L. S. Estudo de elementos moduladores da expressão gênica em diferentes linhagens de células de mamíferos. Dissertação de Mestrado. Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília, Brasília, 2008.
- Radaev, S. e Sun, P. D. Recognition of IgG by Fcγ receptor. The role of Fc glycosylation and the binding of peptide inhibitors. J Biol Chem, v.276, n.19, May 11, p.16478-16483. 2001.
- Ruggiero, L. A. Clonagem e expressão de anticorpos recombinantes em célula de ovário de hamster chinês (CHO) em cultura. Dissertação de Mestrado. Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília, Brasília, 2002.
- Sambrook, J. e Russel, D. W. Molecular Cloning – a laboratory manual. 3ª edição. Cold Spring Harbor, Nova York: Cold Spring Harbor Laboratory. 2001.
- Schirrmann T., Al-Halabi L., Dubel S., Hust M. Production systems for recombinant antibodies. Front Biosci v.1, n. 13, p.4576–4594. 2008.
- Shi, M., Xie, Z., Yu, M., Shen, B., Guo, M., Controled growth of Chinese hamster ovary cells and high expression of antibody-IL-2 fusion proteins by temperature manipulation. Biotechnology Letters, v. 27, n. 23-24, Dec, p. 1879-84. 2005.
- Silva, H. M. Caracterização da atividade ligante e da função efetora de Anticorpos humanizados Anti-CD3 Humano. Dissertação de Mestrado. Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília, Brasília, 2008.

- Silva, H. M., Vieira, P. M., Costa, P. L., Pimentel, B. M., Moro, A. M., Kalil, J., Maranhão, A. Q., Coelho, V., Brígido, M. M. Novel humanized anti-CD3 antibodies induce a predominantly immunoregulatory profile in human peripheral blood mononuclear cells. Immunol Lett, v.125, n. 2, Aug-Jun, p. 129-136. 2009.
- Spector, D. L., R.D., G. e Leinwand, L. A. Cells: a laboratory manual. New York: CSHL press. 1998. 1.1-2.13 p.
- van Berkel, P.H., Gerritsen, J., Perdok, G., Valbjørn, J., Vink, T., van de Winkel, J.G., Parren, P.W. N-linked glycosylation is an important parameter for optimal selection of cell lines producing biopharmaceutical human IgG. Biotechnol Prog, v.25, n. 1, Jan-Feb, p.244-251. 2009.
- van Blokland HJ, Kwaks TH, Sewalt RG, Verhees JA, Klaren VN, Siersma TK, Korse JW, Teunissen NC, Botschuijver S, van Mer C, Man SY, Otte AP. A novel, high stringency selection system allows screening of few clones for high protein expression. J Biotechnol, v.128, n.2, Feb, p.237-245. 2007.
- Walsh, G., Jefferis R. Post-translational modifications in the context of therapeutic proteins. Nat Biotechnol, v.24, n.10, Oct, p.1241-1252. 2006
- Wang, J., Ioan-Facsinay, A., van der Voort, E. I., Huizinga, T. W., Toes, R. E. Transient expression of FOXP3 in human activated nonregulatory CD4+ T cells. Eur J Immunol, v. 37, n. 1, Jan, p. 129-138. 2007.
- Wurm, F. M. Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. Nat Biotechnol, v.22, n.11, Nov, p.1393-1398. 2004.