



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
PATOLOGIA MOLECULAR

Avaliação de elementos formadores de Z-DNA como potenciais reguladores da expressão de biofármacos em células CHO-k1

HERDSON RENNEY DE SOUSA

Orientador: Prof^o Dr. Marcelo de Macedo Brígido
Co-Orientadora: Prof^a. Dra. Andrea Queiroz Maranhão

Brasília - DF

2013

Avaliação de elementos formadores de Z-DNA como potenciais reguladores da expressão de biofármacos em células CHO-k1

HERDSON RENNEY DE SOUSA

Orientador: Prof^o Dr. Marcelo de Macedo Brígido

Co-Orientadora: Prof^a. Dra. Andrea Queiroz Maranhão

Universidade de Brasília

Faculdade de Medicina

Programa de Pós-graduação em Patologia Molecular

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia Molecular da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Patologia Molecular.

Brasília - DF

2013

Banca Examinadora:

Dra. Leila Maria Gomes Barros
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia – CENARGEN
Membro Titular

Prof^a. Dra. Ildinete Silva Pereira
UnB – Membro Titular

Prof. Dr. Marcelo de Macedo Brígido
UnB – orientador

Prof^a. Dra. Andréa Queiroz Maranhão
UnB – co-orientadora

Prof. Dr. Túlio Cesar Ferreira
UnB – Suplente

Trabalho desenvolvido no Laboratório de Biologia Molecular da Universidade de Brasília, sob orientação do Prof. Dr. Marcelo de Macedo Brígido.

EPIGRAFE

“É mais frequente que a confiança seja gerada pela ignorância do que pelo conhecimento: são os que conhecem pouco, e não os que conhecem muito, os que afirmam tão positivamente que este ou aquele problema nunca será solucionado pela ciência”. Charles Darwin (1871).

DEDICATÓRIA

Aos meus professores que me ensinaram que por mais que achamos que o nosso conhecimento já está bem profundo, estamos enganados, pois o conhecimento é algo que está sempre se renovando. Obrigado por tudo!

AGRADECIMENTOS

A Deus, em primeiro lugar por conceder coragem e saúde.

Aqui procurei reconhecer o maior número de pessoas que ajudaram, seja carregando o peso junto comigo ou através de um incentivo que levantasse a nossa moral. Essa, uma missão impossível, pois seria necessário milhares de páginas para caber tantas pessoas boas que fizeram e fazem parte de nossa vida...

A minha família, que mesmo da zona rural do Maranhão, conseguiu propiciar e oportunizar meu crescimento.

Ao Dr. Marcelo, por sua confiança em minha capacidade.

A Dra. Andrea por sua impagável orientação no desenvolvimento do projeto.

A todos os Professores do I.B e da BioMol: Jaime, Lídia, Élide, Fernando, Bergman, Kelly e José Raimundo, Werner, Chicão, George Papas, Anamélia, Wagner Fontes, Cynthia Kyaw, Marlene, Teixeira, Izabela, Sueli, Octavio, Zulmira, David, Maurício e especialmente Marcio poças e Ildinete pela amizade e orientação.

A minha namorada (minha companheira), Franciele, pela paciência, companheirismo, carinho, incentivo e dedicação em todos os momentos bons e turbulentos.

Ao menino e as meninas do Laboratório de Imunologia Molecular, Rafael, Luana, Galina, Carol, Maryani, Wanessa, Janaína, Kelly, Tay, Fernanda, Tarcila, M. Paula, Priscila, Andressa e todos os demais pela amizade e dicas valiosas.

Aos amigos do cenargen: Dra. Leila e seu marido Dr. Roberto, Michelle Guitton, Cecília, Dênis, Gleison, Wanessa Beluco, Dra Juliana Dantas, Dr. Samuel, Dr. José Roberto, Dr. Fábio, Dr. Luciano Paulino, pelas oportunidades concedidas.

Aos amigos da pmdf: cap. Andrea, cap. Luiz Fernandes, Cel. Marcelo, maj. Guerra, maj. José Henrique, ten. Henrique Borges, cap. Elias, cap. João Cintra, sgt Paulo e todos do C.O pmdf.

Aos amigos do CBMDF: coronel Gilberto Lopes (comandate geral), Maj. Átila, cap. Frota, sgt Valdemar, sgt Evandro, sgt Altemar, sgt Geovani, sub ten Eunido, sgt Pedro, sgt Nobre, Sd Felipe, Sd. Sarah e todos os militares do 2º GBM pelo incentivo e apoio; cap. Brandão (da Ed. Física), Cel. Bomfim, ten. Luis Fernandes, sub ten Wanderli, sub ten William Candido e todos os militares do Centro de Especialização e Aperfeiçoamento de Praças (Cefap).

Aos amigos do 2º pelotão (ajudaram carregar essa bola de aço, rrsrs!): soldados Taiana, R. Martins, Marcio, Tyago Luiz, Remington, Hugo, Vick Dantas, Cecilia Matos, Diego Jesus, Delvan Lima, Breno, Dantas, Leonardo Souza, Diego Souza, R.Braga, Libaino, Rodrigo Costa, Bruno, Mariana Costa, João Paulo, Thales, Cleyton, Arthur Mendes e Elinaldo.

Aos professores da Faculdade JK: Marcelo Alcântara e Vera Lúcia (Bioquímica), Luzirlane Braun (Genética), Sacha Braun (Histologia), Galiana (Sociologia), Simão Miranda (Metodologia Científica), Cristina Mosqueta (Prática de Ensino), Daniella (Inglês), Demóstenes (Bioestatística), José Netto (Imunologia e Biologia Celular), Natan Monsores (Bioética), Zé Roberto (Anatomia), Geraldo (Parasitologia), Daniela (virologia), Túlio (BioMol e Bioinformática), Gustavo Dalton (perícia criminal), especialmente Edejan Heise (Fisiologia).

A Dona Fátima e Dona Ivanildes e ao Thompson que sempre ajudaram e tiveram paciência.

Aos colegas dos outros laboratórios que também ajudaram em diversos momentos de necessidade (salvaram minha vida): Marciano, Robson, Natália, Túlio, Osmar, Vivis, Nádia, Gisele, Vinícius, Janice, Juliana, Theíssa, Bruno, Zé Carlos, Érica, Adriane, Marcos, Daniel Paiva, Fabiana Brandão, Calli e Carol.

Aos amigos antigos: Flávio, Aladino, Alex (o cavera... rrsrs), Samuel (o filósofo) e Jó (o MacGyver... kk)

Ao pessoal da secretaria da patomol: Jaqueline, especialmente Alessandro por sempre agilizar na entrega de documentos.

E obrigada a todos que, direta ou inderetamente, me ajudaram na realização deste trabalho!

Sumário

| | |
|------------------------------------------------------------------------------|------|
| Índice de Figuras..... | xiii |
| Índice de Tabelas..... | xv |
| Lista de Abreviaturas..... | xvi |
| Resumo..... | xix |
| Abstract..... | xx |
| | |
| Introdução | |
| Produção de biofármacos..... | 2 |
| Cultura de células e CHO..... | 4 |
| Conformações alternativas do DNA..... | 7 |
| Estrutura Z-DNA..... | 9 |
| Regulação da expressão gênica e o Z-DNA..... | 10 |
| Alguns mecanismos de formação de Z-DNA in vivo..... | 12 |
| Evidência da atuação de Z-DNA como regulador..... | 14 |
| Anticorpo Z22 e o Z-DNA..... | 17 |
| Promotor CMV e o Íntron A..... | 18 |
| Elemento IRES e co-expressão de cistrons..... | 22 |
| Anticorpo anti-CD3..... | 24 |
| | 27 |
| | |
| Justificativa..... | |
| | |
| Objetivos | |
| Geral e Específicos..... | 29 |
| | |
| Materiais e Métodos | |
| Materiais | |
| 1. Linhagens de bactérias..... | 31 |
| 2. Linhagem de Células de Mamíferos..... | 31 |
| 3. Plasmídios utilizados nas clonagens e transfecções..... | 31 |
| 4. Oligonucleotídeos utilizados para seqüenciamento e obtenção de Z-DNA..... | 36 |
| 5. Meios de Cultura e soluções para bactérias..... | 38 |
| 6. Meios de cultura e soluções para cultura de células de mamíferos..... | 39 |

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 7. Soluções e tampões de uso geral..... | 41 |
| 8. Soluções e material para preparo de células competentes e transformação – bactéria..... | 42 |
| 9. Soluções para extração de DNA plasmidial..... | 42 |
| 10. Tampões de Endonucleases de Restrição | 43 |
| 11. Enzimas..... | 45 |
| 12. Soluções e reagentes para eletroforese em gel de agarose..... | 45 |
| 13. Antibióticos..... | 46 |
| 14. Marcadores moleculares para DNA..... | 47 |
| 15. Kits comerciais..... | 48 |
| 16. Soluções e materiais para os experimentos com citometria de fluxo | 49 |

Métodos

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. Preparação de DNA plasmidial | |
| 1.1. Em pequena escala (adaptado de Sambrook e Russel, 2001)..... | 50 |
| 1.2. Em larga escala (adaptado de Sambrook e Russel, 2001)..... | 51 |
| 1.3.Extração de DNA plasmidial em pequena escala utilizando o kit comercial QIAprep Spin Miniprep kit (Qiagen – número de catálogo 27106)..... | 52 |
| 1.4. Extração de DNA plasmidial em larga escala utilizando o kit comercial QIAGEN Maxi Kit (QIAGEN-tip 500) (Qiagen – número de catálogo 12163)..... | 53 |
| 2. Digestão do DNA plasmidial com enzimas de restrição..... | 54 |
| 3. Análise de DNA plasmidial em gel de agarose (Sambrook e Russel, 2001)..... | 54 |
| 4. Purificação de DNA a partir de pedaços de gel de agarose com o kit comercial QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen – número de catálogo 28104) | 54 |
| 5. Eluição de fragmentos de DNA de gel de agarose..... | 55 |
| 6. Ligação de fragmentos de DNA..... | 56 |
| 7. Preparação de células competentes e transformação bacteriana | |
| 7.1. Por choque térmico-CaCl ₂ (adaptado de Maranhão, 2003)..... | 56 |
| 7.2. Por eletroporação (adaptado de Maranhão, 2003) | 57 |
| 8. Anelamento e clonagem dos oligonucleotídeos..... | 58 |
| 9. Precipitação de DNA utilizando glicogênio como carreador..... | 58 |
| 10. Seqüenciamento automático de DNA e análise de seqüências..... | 59 |
| 11. Cultura de células de mamíferos | |
| 11.1. Congelamento de células CHO – Criopreservação (Ruggiero, 2002)..... | 59 |

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 11.2. Descongelamento de células CHO (Ruggiero, 2002) | 60 |
| 11.3. Tripsinização, passagem das células e formação de monocama celular..... | 60 |
| 11.4. Estimativa do número de células por meio de contagem em câmara de Neubauer..... | 61 |
| 11.5. Determinação Viabilidade celular..... | 61 |
| 11.6. Transfecção de Células CHO utilizando o reagente JetPEI™ (Polyplus Transfection, nº de catálogo 101-01N) | 62 |
| 11.7. Transfecção de Células CHO utilizando o reagente JetPRIME™..... | 62 |
| 11.8. Transfecção utilizando o reagente Lipofectamine 2000 (Invitrogen - no de catálogo 11668019) | 63 |
| 11.9. Transfecção de células utilizando o reagente Lipofectamine LTX™ (Invitrogen, no de catálogo 15338-100)..... | 64 |
| 11.10. Teste da transfecção por quatro diferentes metodologias..... | 65 |
| 11.11. Seleção de células transfectadas utilizando Geneticina® (G418-Sulfato)..... | 65 |
| 12. Preparação das amostras para FACS (<i>Fluorescent Activated Cell Sorter</i>)..... | 65 |
| 12.1. Leitura das amostras no citômetro de fluxo..... | 66 |

Resultados e Discussão

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. Desenho do Promotor..... | 68 |
| 2. Validação através de digestão enzimática, dos vetores pCO aCD3 humanizado e pCO Δ 600 aCD3 humanizado..... | 69 |
| 3. Fusão da porção Fc de aCD3 humanizado à proteína GFP e montagem do gene de expressão no vetor pCO aCD3 humanizado..... | 72 |
| 4. Fusão da porção Fc de aCD3 humanizado à proteína GFP e montagem do gene de expressão no vetor pCO Δ 600 aCD3 humanizado..... | 77 |
| 5. Obtenção e anelamento dos elementos formadores de Z-DNA..... | 79 |
| 6. Clonagem dos elementos Z1, Z2, Z3, Z4 e Z5 nos vetores pCO Δ 600 aCD3_GFP e pCO aCD3_GFP..... | 81 |
| 7. Sequenciamento do inserto aCD3_GFP de todos os 10 vetores de expressão construídos: 5 construções pCO (pZ1, pZ2, pZ3, pZ4 e pZ5) e 5 construções pCO Δ 600 (Δ Z1, Δ Z2, Δ Z3, Δ Z4 e Δ Z5) | 85 |
| 8. Eficiência de transfecção com diferentes reagentes: Jet Pei, Jet Primer, Lipofectamina 2000 e Lipofectamina LTX..... | 86 |
| 9. Teste com BFA (inibidor de secreção protéica) sobre a eficiência e aumento da | |

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| fluorescência de células transfectadas com as novas construções..... | 87 |
| 10. Teste com diferentes concentrações de lipofectamina LTX e DNA..... | 89 |
| 11. Padronização das análises das amostras pela citometria de fluxo..... | 91 |
| 12. Z22NLS estabiliza a conformação Z-DNA e aumenta a expressão do gene repórter.. | 97 |
| Conclusão e Perspectivas | 99 |
| Referências Bibliográficas | 102 |

Índice de Figuras

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1. Diferentes Estruturas do DNA..... | 9 |
| Figure 2. Mecanismo proposto para Z-DNA acoplado a regulação da transcrição de genes regulados por BAF..... | 16 |
| Figura 3. Esquema do promotor CMV..... | 20 |
| Figura 4. Mecanismo de ação do sítio de entrada ribossomal interno (IRES, do inglês, Internal Ribosome Entry Site) em um processo de tradução..... | 23 |
| Figura 5- Esquema do vetor pMACIA scFvZ22NLS..... | 32 |
| Figura 6. Mapas do vetor pUC 57 FcGFP..... | 33 |
| Figura 7. Esquema do vetor pCO anti-CD3 FvFc humanizado..... | 34 |
| Figura 8. Mapa do vetor pCO Δ 600 antiCD3 humanizado..... | 35 |
| Figura 9. Análise do perfil de restrição do vetor pCO anti-CD3 FvFc humanizado | 70 |
| Figura 10. Análise do perfil de restrição do vetor pCO Δ 600 anti-CD3 FvFc humanizado..... | 71 |
| Figura 11. Sequência da fusão Fc_GFP..... | 74 |
| Figura 12. Esquema de clonagem da fusão Fc_GFP no vetor pCO e perfil de restrição do vetor resultante pGFP..... | 76 |
| Figura 13. Esquema de clonagem da fusão Fc_GFP no vetor pCO Δ 600 e perfil de restrição do vetor resultante Δ GFP..... | 78 |
| Figura 14. Representação esquemática dos elementos Z-DNA anelados..... | 80 |
| Figura 15. Esquema da clonagem dos elementos Z1, Z2, Z3, Z4 e Z5 nos vetores pCO Δ 600 aCD3_GFP e pCO aCD3_GFP..... | 82 |
| Figura 16. Análise da clonagem do elemento Z2 nos vetores pCO Δ 600 aCD3_GFP e pCO aCD3_GFP..... | 83 |
| Figura 17. Análise da clonagem do elemento Z3 nos vetores pCO Δ 600 aCD3_GFP e pCO aCD3_GFP..... | 83 |
| Figura 18. Análise da clonagem do elemento Z4 nos vetores pCO Δ 600 aCD3_GFP e pCO aCD3_GFP..... | 84 |
| Figura 19. Análise da clonagem do elemento Z5 nos vetores pCO Δ 600 aCD3_GFP e pCO aCD3_GFP..... | 84 |
| Figura 20. Alinhamento de um fragmento da fusão Fc_GFP..... | 85 |
| Figura 21. Porcentagem de células CHO-K1 transfectadas com uma construção, pZ1, utilizando diferentes reagentes..... | 87 |

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 22. Eficiência da transfecção utilizando 0,3 μ M de BFA em diferentes tempos de exposição utilizando a citometria de fluxo..... | 88 |
| Figura 23. Medida de MFI utilizando 0,3 μ M de BFA..... | 89 |
| Figura 24. Imagem de células transfectadas com a construções pZ1..... | 90 |
| Figura 25. Teste com diferentes concentrações de DNA..... | 90 |
| Figura 26. Teste com diferentes proporções de DNA: Regente Lipofectamina..... | 91 |
| Figura 27. Imagem das regiões dos “Gates” de análise na citometria de fluxo..... | 93 |
| Figura 28. Medida da expressão gênica através da MFI..... | 95 |
| Figura 29. Medição da expressão do gene através da MFI nas construções PCO | 96 |
| Figura 30. O efeito de anti-Z22 sobre as construções Δ Zs e pZs em relação aos controles Z2 e Z5..... | 97 |

Índice de Tabelas

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 1. Lista selecionada de produtos biológicos aprovados produzidos em linhagens de células de ovário de hamster chinês..... | 6 |
| Tabela 2. Seqüências dos oligonucleotídeos utilizados..... | 36 |

Lista de Abreviaturas

- 1X – concentração para uso normal
- 5X – cinco vezes concentrado
- ADAR1 - Enzima Desaminase de RNA-fita dupla.
- Amp^R - Gene de resistência à ampicilina (β -lactamase)
- ATP – nucleotídeo trifosfato de adenosina
- BSA – albumina bovina sérica
- C-Terminal - Extremidade carboxi – terminal
- cDNA - Ácido desoxirribonucléico complementar
- CDR - Região determinante de complementariedade
- CH - Cadeia constante pesada de anticorpo
- CHO - Células de ovário de hamster chinês
- CL - Cadeia constante leve de anticorpo
- CMV – citomegalovírus
- CO₂ - Dióxido de Carbono
- Da - Dalton
- DEPC – dietil pirocarbonato
- dH₂O - Água destilada
- DMSO - Dimetilsulfóxido
- DNA - Ácido desoxirribonucléico
- dsDNA – DNA de fita dupla
- DTT - Ditioneitol
- EDTA - Ácido etilenodiaminotetracético
- F – Faraday
- Fab - Fragmento (de anticorpo) de ligação ao antígeno
- FACS – Fluorescence Activeted Cell Sorter
- Fc - Fragmento (de anticorpo) cristalizável (porção constante)
- FDA - Food and Drug Administration (EUA)
- FITC - Fluoresceína isotiocianato
- FL-1 - Fluorescência do tipo 1
- FSC - Dispersão frontal (Forwardscattering). Parâmetro Tamanho Celular
- Fv - Fragmento (do anticorpo) varável
- GAPDH - Gliceroldeído-3-Fosfato Desidrogenase

GFP – Proteína Verde Fluorescente
h - Hora
Ig - Imunoglobulina
IL - Interleucina
kb - Kilobase
kDa - Kilodalton
L - Litro
M - Molar
m – metro
mA - Miliampère
mAb - Anticorpo Monoclonal
MFI – Mediana da intensidade de fluorescência
mg - Miligrama
min - Minuto
mL - Mililitro
MM - Massa Molecular
mM - Milimolar
mRNA - Ácido ribonucléico mensageiro
ms - Milisegundo
°C - Grau Celcius
OD – densidade ótica
OKT3 - Anticorpo monoclonal anti-CD3 clone OKT3
ori - Origem de replicação
p - Peso
p/v – razão peso/volume
pb - Par de base
PBS - Tampão salina fosfato
PCR – reação de polimerase em cadeia (do inglês Polymerase Chain Reaction)
PEG – Polietileno glicol
pH - Potencial hidrogeniônico
PMSF - Fluoreto de fenilmetilsulfonato
qPCR – PCR quantitativa
RE - Retículo endoplasmático
RNA - Ácido ribonucléico

RNase - Ribonuclease
rpm - Rotações por minuto
RT – PCR – transcrição reversa seguida de PCR
RT – qPCR – transcrição reversa seguida de PCR quantitativa
scFv - Fragmento variável (de anticorpo) de cadeia única
SDS - Sódio Duodecil Sulfato
SSC - Dispersão lateral (Side scattering). Parâmetro Granulosidade Celular
TE – tampão Tris/EDTA
Tris - Tri (hidroximetil) aminometano
U - Unidade
UTR - Região não traduzida do gene
v - Volume
V – volts
v/v – razão volume/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
Z-DNA – DNA na conformação Z
ng - Nanograma
nmol - nanomol
 μ F - Micro Faraday
 μ g - Micrograma
 μ L - Microlitro
 μ M - Micromolar
 μ m - Micrômetro
pmol - picomol
 τ – Tempo de passagem da corrente elétrica
 Ω – Unidade de medida da resistência elétrica (ohm)

Resumo

SOUSA, HR. **Avaliação de elementos formadores de z-dna como potenciais reguladores da expressão de biofármacos em células cho-k1.** [dissertação]. Brasília: Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, 2013.

Introdução: o grupo de Imunologia Molecular/UnB já produziu anticorpos recombinantes e humanizados de interesse comercial como o anti-CD18, anti-CD3, ou acadêmico como o anti-Z22, assim como fatores plasmáticos humanos. Os vetores de expressão utilizados contêm o promotor de CMV-IA. O objetivo desse trabalho foi explorar regiões formadoras de Z-DNA, e testar diretamente o papel do anticorpo estabilizador de Z-DNA (antiZ22NLS – Z22) no efeito transcricional do promotor CMV modificado (zCMV-IA). **Material e Métodos:** O primeiro passo foi reconstruir o cassete de expressão dos vetores tradicionais utilizados nesse trabalho, pCO e pCO Δ 600. Para isso, fusionamos o gene GFP ao anticorpo recombinante aCD3. Os passos seguintes foram a introdução de sequências formadoras de Z-DNA (Z1, Z3 e Z4) e controles não formadores de Z-DNA (Z2 e Z5) a montante do promotor CMV-IA. **Resultados e Discussão:** foram construídos 10 vetores de expressão: 5 construções pCO (pZ1, pZ2, pZ3, pZ4 e pZ5) e 5 construções pCO Δ 600 (Δ Z1, Δ Z2, Δ Z3, Δ Z4 e Δ Z5); transfecção de células CHO-K1 com as construções utilizando Lipofectamina LTX na proporção 1:1 de DNA e reagente LTX; Por fim co-transfecção de células com cada vetor de expressão e vetor pMacZ22NLS e como controle de cada vetor de expressão também foi feita transfecção com vetor pMac vazio. Em comparação aos controles em todas as construções a presença do pMacZ22 NLS aumentou a eficiência de transfecção. Através de citometria de fluxo se verificou aumento da MFI no gate das células GFP+ em até 25 % quando foi co-transfectado vetor com anti-Z-DNA. **Conclusão:** foi mostrado o papel de anti Z22 como indutor e estabilizador de Z-DNA e seu efeito facilitador da transcrição.

Descritores: Z-DNA; CHO; CMV; BIOFÁRMACOS; CITOMETRIA.

Abstract

SOUSA, HR. **Evaluation elements forming Z-DNA as potential regulators of the expression of biopharmaceuticals in CHO-K1 cells.** [dissertation]. Brasilia: Faculty of Medicine, University of Brasilia, 2013.

Introduction: Recombinant antibodies are now a reality in therapeutics. But its production is still a challenging issue. We have been developing expression vectors for heterologous expression of recombinant antibodies based on the CMV promotor. We had previously shown that a Z-DNA forming region upstream the promotor/enhancer enhances luciferase expression in a repórter vector. The aim of this study was to explore Z-DNA forming regions, and directly test the role of a Z-DNA stabilizing antibody on a modified CMV promoter (zCMV). Material and Methods: Initially, the GFP gene was fused with a recombinant antibody anti-CD3 and the fusion cassette was introduced in both pCO and pCO Δ 600. Then we introduced the Z-DNA forming sequences (Z1, Z3 and Z4) and control sequences (Z2 and Z5) upstream of the CMV promoter. CHO cells were transfected using Lipofectamine LTX 1:1, DNA and LTX reagent. To provide the trans acting anti-Z-DNA antibody, we cotransfect cells with the vector pMACZ22NLS, that produces a scFv of the anti-Z-DNA mAb Z22 fused to a nuclear localization signal (Intrabody). Flow cytometry was use to follow GFP expression. Results and Discussion: 10 expression vectors were constructed: 5 pCO constructs (pZ1, pZ2, pZ3, pZ4 and pZ5) and 5 pCO Δ 600 constructs (Δ Z1, Δ Z2, Δ Z3, Δ Z4 and Δ Z5); The constructions with Z-DNA forming sequences showed an improvement of expression of the reporter gene when compared to the control sequences. Moreover the co-transfection with the anti-Z-DNA vector enhances the MFI of gated GFP⁺ cells by 25%. Conclusion: The Z-DNA forming sequences improve heterologous gene expression and the presence of anti-Z-DNA in *trans* was shown to enhance the Z-DNA effect probably due to a stabilization effect.

Descriptors: Z-DNA. CHO. CMV, BIOPHARMACEUTICALS. CYTOMETRY.

Introdução

Produção de biofármacos

O mundo está em constante evolução e isso obriga a adequação de meios já empregados, adaptando-os para resolver novos problemas como, por exemplo, a utilização de ferramentas biológicas para a geração de biofármacos. Com o desenvolvimento de tecnologias de engenharia genética e com o advento da biologia molecular tornaram possíveis alterações mais precisas e mais rápidas na manipulação de genes (BORÉM, 1998).

Com a introdução da engenharia genética por Cohen e Boyer na década de 1970, ficou estabelecido o fundamento para a atual indústria da biotecnologia, que se baseia na utilização de microrganismos ou culturas de células para a produção de proteínas que podem servir como produtos biofarmacêuticos, muitas vezes referidos como biofármacos. Alguns anos mais tarde, em 1978 os pesquisadores da Genentech clonaram os genes da insulina humana e do hormônio do crescimento, e os expressaram em *Escherichia coli*, por este meio demonstraram a utilidade e aplicabilidade da engenharia genética na criação de bactérias geneticamente modificadas para produzir duas proteínas humanas (Mattanovich et al., 2012).

Somente em 1982 ocorreu a comercialização do primeiro biofármaco, a insulina humana, pela Eli Lilly, que licenciou a tecnologia da Genentech (revisto por Jens Nielsen, 2013). Em 1985 a Genentech recebeu a aprovação da FDA para comercializar o seu primeiro produto, Protropin®, o hormônio do crescimento humano para ser utilizado por crianças com deficiência desse hormônio. Em 1986 foi produzida a primeira proteína recombinante com fins terapêuticos em células de mamífero, a proteína ativadora de plasminogênio tissular humana (human tissue plasminogen activator), uma enzima que pode desfazer os coágulos de sangue em doentes com enfarto agudo do miocárdio (Wurm, 2004).

Logo após estes primeiros desenvolvimentos, muitos outros produtos foram lançados e hoje existe mais de 300 biofármacos no mercado com vendas acima de 100 bilhões de dólares (USD 100B). Além disso, os biofármacos possuem acelerada e elevada taxa de crescimento no mercado, com um aumento anual de cerca de 19%. Apenas em 2008 as vendas globais de proteínas biofarmacêutica foram de 87 bilhões de dólares e espera-se crescer até 169 bilhões de dólares em 2014 (Mattanovich et al., 2012). Nesse mercado os anticorpos monoclonais representam a

maioria (> USD18B) seguido por hormônios (>USD11B) e fatores de crescimento (>USD10B). Dados atuais revelam que existem mais de 240 anticorpos monoclonais e 120 proteínas recombinantes em ensaios clínicos (revisto por Jens Nielsen, 2013).

Cerca de 40% dos biofármacos são produzidos em culturas de células de mamíferos, principalmente em linhagens celulares de ovário de hamster chinês (células CHO), uma vez que estas permitem a produção de proteínas com padrões de glicosilação muito semelhantes às proteínas humanas. Desse modo, a existência de processos como glicosilação de proteínas, fosforilação, formação de pontes-dissulfeto e outras modificações pós-traducionais tornam a produção de proteínas com interesse comercial mais viável em células de mamífero do que em outros tipos celulares (Wurm, 2004). Os outros 30% dos produtos biofarmacêuticos são produzidos em culturas de *E. coli* enquanto que 20% são produzidas na levedura *S. cerevisiae* e o restante em células vegetais.

Uma diferença importante entre os fármacos de origem química convencional e os biofármacos está na estrutura da molécula, estas são mais pesadas, mais complexas e mais diversas, o que dificulta a caracterização completa do produto. Geralmente são homólogos às proteínas humanas ou têm um alto nível de semelhança, sendo o processo de produção muito mais complexo, onde qualquer modificação no processo de fabricação, por mínima que seja, leva a modificação no produto final que pode afetar a qualidade e a resposta do medicamento.

Tem sido fenomenal nos últimos anos a existência de diversos projetos em andamento, que visam o melhoramento, sofisticação e disponibilização de vetores para expressão de genes em células de mamíferos. Esses vetores possuem muitas aplicações, incluindo o estudo da regulação gênica, sequenciamento de DNA, clonagem molecular, produção de proteínas, expressão de antígeno para a vacinação e terapia gênica. Com isso cresceu o número de vetores disponíveis para expressão e clonagem desses genes. Por exemplo, no ano de 1998 estavam listados em Banco de Dados na Web mais de 2.600 vetores (Diciommo & Bremner, 1998). Atualmente existem mais de 4.000 vetores disponíveis na internet. Apesar da disponibilidade de vetores, a produção de proteínas recombinantes em grande escala em células de mamíferos ainda é um processo pouco eficiente.

A expressão eficiente de genes em células de mamíferos depende de muitos fatores e processos complexos estão envolvidos. A transcrição e tradução são os

principais processos que sofrem regulação por meio de elementos de controle *cis* (elemento intrínseco a molécula de ácido nucléico) e *trans* (elemento extrínseco a molécula de ácido nucléico que interagem com ela). Estudos massivos visando à otimização da expressão gênica em tipos celulares de mamíferos foram feitos desde a década de 80, culminando em produções de quantidades significativas de proteínas comerciais. Um exemplo é a produção em 1986, que tinha um rendimento de 50 mg/L de proteína recombinante. Quatorze anos depois, já se conseguia um rendimento de 5g/L de proteínas (Wurm, 2004), um avanço significativo que tornou a produção em células de mamífero um negócio mais viável. Entretanto, um dos principais obstáculos para a utilização das células de mamífero em cultura como hospedeiros de produção ainda é o alto custo para produção em larga escala quando se compara com custo da produção em leveduras e em *E. coli*. Para isso, pesquisas buscando o desenvolvimento de novos métodos para melhorar os níveis de produção de biofármacos e tentar aperfeiçoar essa relação de custo-benefício estão sendo realizadas, para que deste modo, se atinja um patamar de produção desejável. Como exemplo cita-se a chamada terceira geração de plantas transgênicas, que inclui plantas utilizadas como veículos para a produção de fármacos, como hormônios e vacinas (Giddings et al., 2000).

Cultura de células e CHO

Fundamentalmente, as células podem se desenvolver *in vitro* após dissecção e dispersão total ou parcial do tecido de origem, resultando em culturas celulares propriamente ditas, em culturas de explantes ou, mesmo, em cultura de órgãos, dependendo de seu grau de dispersão. A cultura de tecidos foi desenvolvida no início do século XX (Harrison, 1907; Carrel, 1912) como um método para estudar o comportamento de células de animais livres de variações sistêmicas que pudessem surgir *in vivo*, tanto durante a homeostase normal como sob a tensão de um experimento.

Hamster chinês (nome científico, *Cricetulus griseus*) pertence a uma família de roedores que são nativos dos desertos do norte da China e Mongólia. Eles têm sido usados na pesquisa biomédica desde que foram introduzidos pela primeira vez em laboratório no ano de 1919 para estudar pneumococos. Os esforços

subsequentes de domesticação pelo Dr. George Yerganian e outros pesquisadores, em meados do século 20, levou ao desenvolvimento de modelos de doenças hereditárias devido à endogamia, estimulando interesse em pesquisas com genética de hamster (Yerganian, 1985).

Em 1957, ao investigar a genética e utilidade de várias células somáticas, Dr. Theodore T. Puck do Departamento de Medicina da Universidade do Colorado isolou um ovário de uma fêmea de hamster chinês e estabeleceu as células em placas de cultura. Logo se tornou evidente que estas células são bastante resistentes e prestam-se facilmente no cultivo *in vitro* com tempos de geração relativamente rápidos (Tjio e Puck, 1958).

Apesar da disponibilidade de uma plenitude de linhagens de células, cerca de 70% de todas as proteínas terapêuticas recombinantes produzidas, em células de mamíferos, hoje são feitas em Células de Ovário de Hamster Chinês (CHO) (tabela 1). Atualmente a venda anual de produtos biológicos produzidos usando células CHO sozinho excedeu 30 bilhões de dólares no mundo (Jayapal et al., 2007).

Tabela 1. Lista selecionada de biofármacos aprovados pela FDA produzidos em linhagens de células de ovário de hamster chinês (Adptado de Mellado e Castilho, 2007; Jayapal et al., 2007).

| Proteína | Produto | Indicação | Companhia | Ano da 1ª aprovação |
|----------------------------------------------|--------------------------|-----------------------------------|--------------------|---------------------|
| <i>Enzimas</i> | | | | |
| α -glucosidase | Myozyme [®] | doença de Pompe | Genzyme | 2006 |
| α -L-iduronidase | Aldurazyme [®] | mucopolissacaridose I | Genzyme | 2006 |
| N-acetilgalactosamina-4-sulfatase | Naglazyme [®] | mucopolissacaridose VI | BioMarin | 2005 |
| α -galactosidase | Fabrazyme [®] | doença de Fabry | Genzyme | 2001 |
| β -glucocerebrosidase | Cerezyme [®] | doença de Gaucher | Genzyme | 1994 |
| DNAse I | Pulmozyme [®] | fibrose cística | Genentech | 1993 |
| tPA | Activase [®] | infarto agudo do miocárdio | Genentech | 1986 |
| tPA | TNKase [™] | infarto agudo do miocárdio | Genentech | 2000 |
| <i>Fatores de crescimento hematopoiético</i> | | | | |
| Eritropoetina | Aranesp [®] | anemia | Amgen | 2001 |
| G-CSF | Neutrogin [®] | neutropenia | Chugai | 1991 |
| Eritropoetina | Epogen [®] | anemia | Amgen | 1989 |
| <i>Hormônios</i> | | | | |
| hormônio luteinizante | Luveris [®] | infertilidade feminina | Serono | 2000 |
| tireotropina- α | Thyrogen [®] | diagnóstico de função da tireóide | Genzyme | 1998 |
| hormônio folículo-estimulante | Gonal-F [®] | infertilidade feminina | Serono | 1995 |
| <i>Fatores de coagulação sanguínea</i> | | | | |
| Fator XIII | Advate [®] | hemofilia A | Baxter | 2003 |
| Fator IX | Benefix [®] | hemofilia B | Genetics Institute | 1997 |
| Fator XIII | Recombinate [™] | hemofilia A | Baxter | 1992 |
| <i>Citocinas</i> | | | | |
| Interferon- β | Rebif [®] | esclerose múltipla | Serono | 1998 |
| Interferon- β | Avonex [®] | esclerose múltipla | Biogen | 1996 |
| <i>Anticorpos</i> | | | | |
| Anti-VEGF | Avastin [®] | câncer colorretal | Genentech | 2004 |
| Anti-IgE | Xolair [®] | asma | Genentech | 2003 |
| Anti-CD11a | Raptiva [®] | psoríase | Genentech | 2003 |
| Anti-TNF α | Humira [®] | artrite reumatóide | Abbott | 2002 |
| Anti-CD52 | Campath [®] | leucemia linfocítica crônica | Genzyme | 2001 |
| Anti-HER2 | Herceptin [®] | câncer de mama | Genentech | 1998 |

Receptores acoplados à proteína G e suas vias de sinalização associadas são uma classe de moléculas comumente estudadas através de expressão estável em células CHO, que contribuem para o tratamento de pacientes nos campos da anestesia, a farmacologia e a pesquisa básica de sinalização celular (Schulte, 2003). Esta capacidade em transfectar, selecionar, amplificar, e expressar proteínas heterólogas de forma estável e biologicamente ativas logo se tornou um benefício imenso para empresas biofarmacêuticas envolvidas no grande negócio da síntese de proteína terapêutica. Alguns estudos recentes neste contexto envolvem a análise dos efeitos da cafeína, pesticidas e terapias utilizadas em vários tratamentos de câncer em células de mamíferos (Fernandez, 2003).

Conformações alternativas do DNA

Nos últimos anos, foi possível resolver muitos dos enigmas que estão "escritos" na conformação do DNA, isso é um ponto de interesse biológico considerável em relação à molécula de DNA. "Esta estrutura tem características novas que são de interesse biológico considerável." Esta é a segunda frase do primeiro parágrafo do histórico artigo de Watson e Crick, "Molecular structure of nucleic acids—a structure for deoxy ribose nucleic acid" (Nature 171, 737-738, 1953).

O projeto do genoma humano estava praticamente concluído em 2003, mesmo ano em que se comemorou o 50^o aniversário da descoberta da dupla hélice do DNA. Este projeto abriu as portas para a era genômica. Hoje em dia, temos fácil acesso a bancos de dados do sequenciamento de genoma de mais de 100 organismos. No entanto, apesar do progresso tão notável na ciência do genoma, ainda estamos longe de um entendimento claro de como o DNA genômico é empacotado sem emaranhamento em um núcleo, como os genes são envolvidos na cromatina, como a estrutura da cromatina é, como é herdado da mãe para as células filhas, e como a expressão diferencial de genes está ativada num dado tipo celular. Explorar e responder a estas questões constitui uma das próximas fronteiras no século 21.

Estruturas múltiplas de DNA são encontradas no genoma, isto é, as estruturas de DNA curvos encontrados em regiões de ocorrência periódica, estruturas triplex

compostas de regiões homopurina/homopirimidina, estruturas quadruplex constituídos de sequências ricas em guanina, com a hélice de DNA orientada para a esquerda (Z-DNA) formada por uma alternância de purina/pirimidina, estruturas cruciformes formadas por repetições invertidas, e assim por diante. A implicação destas estruturas para o empacotamento do DNA e a expressão gênica tem sido argumentada. Muitas evidências circunstanciais e várias linhas de evidências diretas foram apresentadas, e estamos começando a apreciar como essas estruturas fornecem adicionais dimensões estruturais e funcionais na organização da cromatina e na expressão gênica (Sinden, 1994).

O B-DNA constitui de uma dupla hélice formada por duas cadeias antiparalelas que são mantidas juntas via pontes de hidrogênio nos pares de bases A•T e G•C (Fig. 1). Uma volta da hélice de B-DNA contém cerca de 10,5 pares de bases que estão inseridas no interior da hélice e são quase perpendiculares ao eixo helicoidal. Esse DNA existe como um cilindro de 20 Å de diâmetro, com dois sulcos principais, um maior e outro menor, como espiral em torno do cilindro. Em B-DNA a distância entre as bases (altura) é de 3,4 Å. Estudos com duplexes de oligonucleótidos em cristais mostraram significativa variabilidade, sequênciadependente, dos parâmetros estruturais que definem a estrutura da hélice B-DNA. Em um segmento de DNA curvo, por exemplo, certos parâmetros de B-DNA adicionados ao longo de um período de vários pares de bases podem produzir uma hélice de DNA permanentemente curva. A-e Z-DNA estão também em dupla hélice, mas o arranjo espacial dos pares de bases é que difere significativamente da forma B-DNA (Fig. 1).

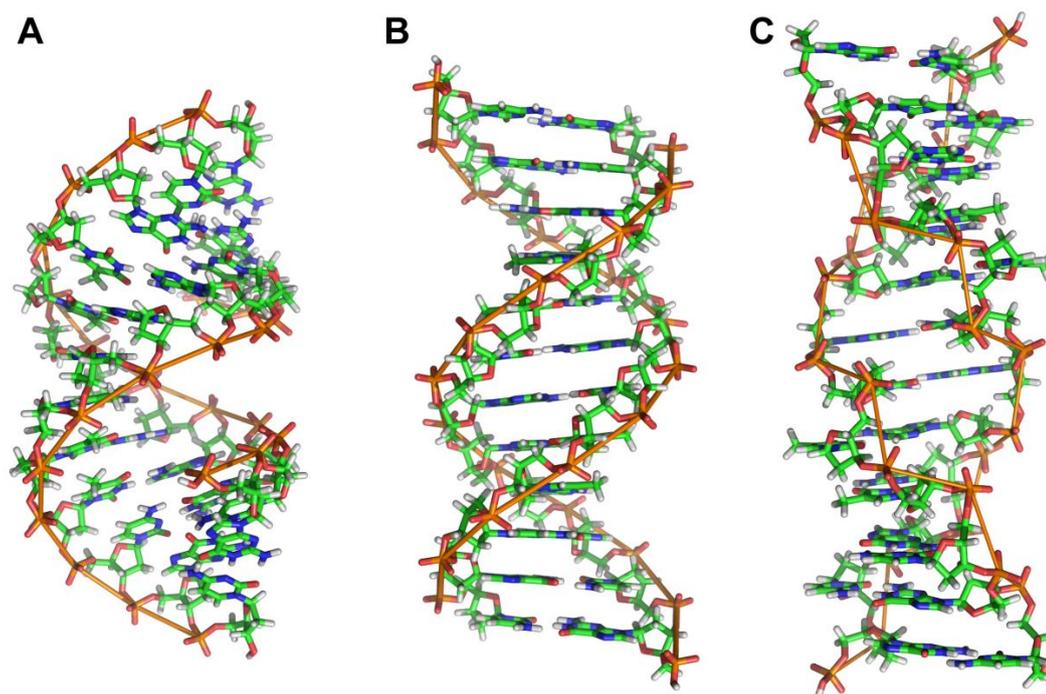


Figura 1. **Diferentes Estruturas do DNA.** A-DNA (a), dupla hélice mais curta (volta completa = 2,3Å) e larga (diâmetro = 23Å) em comparação à forma canônica B-DNA (b) que exhibe uma dupla hélice com altura de 3,32Å, diâmetro de 20Å e período menor. A forma Z-DNA (c), possui uma dupla hélice cujo o giro é para esquerda e exhibe um padrão de zig-zag no backbone da molécula, sua altura é de 45,6Å e diâmetro 18Å (Wheeler, 2007).

Estrutura Z-DNA

O Z-DNA tem atraído grande interesse no campo da química e da biologia. O entendimento do papel regulador e estabilizador de Z-DNA tornam-se um desafio frente ao seu estado dinâmico e transitório. Muito esforço tem sido feito nesse sentido, e até agora se tem mostrado essencial os mecanismos de estabilização e indução de Z-DNA *in vitro* e *in vivo*. No entanto, a indução e estabilização de Z-DNA são sempre realizadas em condições de elevada salinidade e sequênci-dependente. Através de sequências indutoras e elementos estabilizadores foram atingidos avanços no entendimento relacionado a real condição fisiológica de Z-DNA, os mecanismos e as relações estruturais na expressão gênica (Yang et al., 2012).

Z-DNA tem sido encontrada principalmente em sequências alternadas de purina- pirimidina (CG)_n e (TG)_n (Herbert et al., 1999). Devido às bases serem deslocadas para a periferia da hélice, Z-DNA é mais fino (18Å) que B-DNA (20Å), e os sulcos são equivalentes ao sulco menor de B-DNA. Para Z-DNA na sequência (CG)_n, o ângulo de torção para uma etapa de CpG é 9°, enquanto na outra é 51°, totalizando 60° na unidade de repetição de 2 pb. A repetição na hélice de Z-DNA é de 12 pb/volta e o aumento médio é de 3,7 Å/pb, em comparação com 10,5 pb/volta e 3,4 Å/pb no B-DNA. O esqueleto açúcar-fosfato segue um caminho em zigue zague ao contrário de um caminho suave encontrado no B-DNA.

As ligações glicosídicas se alternam na orientação *anti* e *syn*, as purinas assumem duas conformações : *anti* ou *syn*, já as pirimidinas , como possuem somente um anel , ocorrem apenas na conformação *anti* . Interações eletrostáticas desempenham um papel crucial na formação do Z-DNA. Por causa da orientação em zigue zague do esqueleto de açúcar, alguns grupos fosfato estão mais próximos e a repulsão eletrostática entre eles é maior do que em B-DNA. Portanto, Z-DNA é estabilizado por elevadas concentrações de sal ou cátions polivalentes, isto porque estes fazem a blindagem da repulsão interfosfato, melhor do que cátions monovalentes. Existem outros fatores que também contribuem para a estabilidade de Z-DNA como: além da sequência com alternância de purina-pirimidina, o superenovelamento de DNA é uma importante força motriz para a formação de Z-DNA, e com isso o Z-DNA é estabilizado pelas forças torcionais negativas formadas pelo aparato transcricional.

Regulação da expressão gênica e o Z-DNA

O dobramento do DNA com “supercoil” negativo é freqüentemente encontrado nas regiões de controle de transcrição (Ohyama, 2001). Muitos estudos têm identificado esse tipo de estrutura de DNA em promotores de genes de classe II. No entanto, o Z-DNA não é necessariamente limitado a promotores de genes da classe II. Promotores de genes de classe I também costumam conter esta conformação de DNA. O papel dessas conformações em transcrição eucariótica está sendo revelado gradualmente.

Como exemplo de regulação gênica, através de Z-DNA, tem-se a proteína ADAR1 que é um membro da família das deaminases cuja expressão é induzida por interferon (IFN). Por converter adeninas em inosinas, ADAR1 é uma enzima importante para induzir edição de RNA e por consequência aumento de diversidade de sequências. Nela existem dois motivos de ligação a conformação Z: Z-alfa e Z-beta. O Z-alfa pertence à família das proteínas “winged-helix”, isto é, são capazes de se ligar especificamente ao Z-DNA com K_d de ~4 nM (Oh, Kim e Rich, 2002). Uma significativa interação entre Z-alfa de ADAR1 e o DNA plasmidial superenovelado com insertos GC(13) ou GC(2)CGC(10) foi observado por microscopia de força atômica (Kim et al., 2004). Além disso, já foi demonstrado que a ligação de Z-alfa (ADAR1) induz a transição da conformação de DNA de B-para-Z quando o nível de superenovelamento nos plasmídios não era o nível de formação de estrutura de Z-DNA. Portanto a ligação de ADAR1 em uma estrutura Z-DNA conhecida pode aumentar a eficiência da edição Adenosina-para-Inosina *in vitro* (Koeris et al., 2005).

Com isso propõe-se que a proteína ADAR1 é recrutada no sítio de formação do RNA nascente, juntamente com a maquinaria de transcrição, para edição da nova fita de RNA sintetizado quando uma estrutura de Z-DNA é induzida em uma sequência apropriada pela movimentação da enzima RNA polimerase (Oh, Kim e Rich, 2002). Nessa pesquisa foi utilizado um gene repórter sob o controle de um promotor mínimo com uma sequência formadora de Z-DNA adjacente, e ficou demonstrado que a interação Z-DNA e ADAR1 aumentavam a atividade do promotor. Quando Z-alfa foi expresso na célula, ocorreu um aumento substancial da transcrição do gene repórter, e esse resultado indica que a formação de Z-DNA na região promotora é induzida ou estabilizada pela proteína ligante ao Z-DNA.

Outro exemplo ocorre com a proteína E3L de Vaccinia vírus (VV). E3L é uma proteína codificada pelo gene de resistência a IFN no VV. O domínio N-terminal da proteína E3L tem similaridade de sequência à região de Z-alfa encontrada em ADAR1 e DLM-1, mas tem baixa afinidade de ligação a Z-DNA quando comparada com suas homologas, isto devido ao resíduo Y48 no domínio Z-alfa que adota uma conformação diferente na cadeia quando requer um rearranjo para ligação ao Z-DNA. Ambos os domínios de ligação a dupla fita de RNA: Z-alfa e C-terminal são co-optados para replicação de VV em inúmeras células hospedeiras (Beattie et al.,

1996), e foi demonstrado o mesmo para patogenicidade no modelo murino (Brandt e Jacobs, 2001).

Quando E3L contém uma deleção na região N-terminal, do domínio de ligação a Z-DNA, o Vaccinia vírus é atenuado para neuropatogenicidade e falha, após instilação intranasal em camundongos C57BL/6, na infecção de pulmões ou cérebros. Pesquisadores têm considerado o uso de vírus recombinantes como vacinas para proteção contra sarampo devido ao decréscimo da neurovirulência (Brandt et al., 2005). Os VV preservam a sua patogenicidade quando os domínios ligantes a Z-DNA da proteína E3L são trocados por domínios de ligação a Z-DNA similares aos de ADAR1 e DLM (Kim et al., 2004).

Recentemente foi demonstrado que a presença da proteína E3L (ou apenas o domínio Z-alfa) aumentou a expressão do gene repórter luciferase quando elementos cis (geralmente um enhancer) de fatores de transcrição bem definidos, tais como a IL-6, o NF-AT, p53, NF-kB, AP-1 e elemento de resposta a cAMP (CRE) foram adicionados a montante da *TATA box*. A expressão de E3L, em células HeLa, aumentou fortemente a atividade de pIL-6-Luc, pNF-AT-Luc, e p53-Luc aproximadamente 10 vezes, 9 vezes e 5,5 vezes, respectivamente, implicando que E3L transativa a transcrição de IL-6, NF-AT ou p53 humanos. Também foi demonstrado ser dose-dependente a transativação por E3L sobre esses genes repórteres com a expressão crescente de E3L. Posteriormente foi visto, em um experimento dose-tempo dependente, que a proteína E3L, seu domínio Z-alfa, ou proteínas quiméricas cujo domínio Z-alfa foi trocado pelo domínio Z-alfa de ADAR1 ou DLM-1, significativamente protegem células HeLa da apoptose induzida por higromicina-B. Entretanto quando uma deleção ou a mutação de ponto era introduzida na região Z-alfa, o efeito da proteção desaparecia, indicando que a ligação a Z-DNA é essencial para essas atividades (Kwon e Rich, 2005).

Alguns mecanismos de formação de Z-DNA in vivo

As descobertas sobre Z-DNA estimularam os químicos a estudarem as mudanças conformacionais do DNA. No entanto, a relevância biológica do Z-DNA tem sido controversa desde a sua descoberta. Apesar das condições iônicas

adequadas para estabilizar o Z-DNA, em muitos experimentos, serem diferentes das condições celulares, demonstrou-se que a metilação de citosinas, e cátions divalentes, esperminas e espermidinas também podem estabilizar o Z-DNA *in vivo* (Behe e Felsenfeld, 1981). A hipótese de que o Z-DNA ocorre *in vivo* foi robustecida com a descoberta de que o superenovelamento negativo dos plasmídeos em procariotos poderia estabilizar o Z-DNA (Haniford e Pulleyblank, 1983).

Nessa perspectiva foram realizados estudos de superenovelamento em plasmídeos para determinar a energia requerida para alternar, com uma seqüência particular, da forma B para a forma Z. A energética destas conformações foi estudada para diferentes seqüências (Ellison et al., 1985). Através desse conhecimento Ellison et al. (1985) foram levados a desenvolver um algoritmo, programa Z-Hunt, que pode prever a aptidão de qualquer seqüência de DNA alternar da forma B para a forma Z. Alguns anos depois, este algoritmo foi atualizado por Champ et al. (2004) para o mapeamento de Z-DNA no cromossomo 22.

As pesquisas têm indicado uma forte associação da formação de Z-DNA com transcrição. Esta hipótese fundamenta-se no movimento da polimerase que conhecidamente gera torções na fita de DNA, positivas a frente e negativas atrás da polimerase. As topoisomerases atuam no relaxamento da superfície do DNA, mas o movimento contínuo das RNA polimerases parece provocar mais torções negativas do que as topoisomerases são capazes de relaxar. Entretanto quando a transcrição é cessada as topoisomerases rapidamente convertem o DNA de volta à conformação B. Nesse sentido o Z-DNA foi visto como uma conformação transiente, servindo de tampão para o superenovelamento negativo, que é feito e desfeito, a depender da atividade fisiológica (Yang et al., 2012).

A fim de conhecer melhor a associação entre Z-DNA e transcrição, pesquisadores utilizaram uma técnica que permite reproduzir a taxa de transcrição *in vivo*, células de mamíferos encapsuladas em microcápsulas de agarose foram tratadas com suave detergente para lisar a membrana plasmática e com isso extraíram o núcleo com transcrição e replicação ativas (Jackson, Yuan e Cook, 1988). Através de anticorpos monoclonais biotinizados contra Z-DNA, ficou demonstrado que a regulação do nível de Z-DNA no núcleo é determinada pela torção da fita de DNA. Com a presença de inibidores de topoisomerase I foi verificado aumento significativo de anti Z-DNA ligado, mostrando a relação entre

torção da fita e conformação Z (Wittig, Dorbic e Rich, 1989). Além disso, com a elevação da concentração de anti Z-DNA no núcleo celular foi verificado aumento na quantidade de Z-DNA ativo, indicando papel anti Z-DNA como estabilizador ou mesmo indutor de Z (Wittig, Dorbic e Rich, 1991).

Para examinar, em células humanas U937, a formação de Z-DNA e isolar fragmentos restritos de DNA, anticorpos marcados por meio do resíduo de biotina foram ligados ao DNA. Foi visto, através de raios ultravioletas, que o teor de Z-DNA é elevado quando a transcrição está ativa. No entanto quando essas células começam a se diferenciar e a transcrição é regulada negativamente, o teor de Z-DNA vai para níveis não detectáveis dentro de 30-60 min. Com isso mostrou-se que fragmentos de DNA eram induzidos a formar Z-DNA quando a célula estava em transcrição. Além disso, segmentos formadores de Z-DNA estavam perto das regiões promotoras de genes. (Wittig et al., 1992).

Outra pesquisa reforçou os achados anteriores ao mostrar que três regiões próximas ao promotor do gene c-MYC (conhecido protooncogene) formavam Z-DNA quando este gene era expresso, no entanto essas sequências retornavam a conformação B-DNA quando a transcrição de c-MYC era desligada (Wolfl, Wittig e Rich, 1995).

Evidência da atuação de Z-DNA como regulador

O modelo de funcionamento da enzima ADAR1, que reconhece o Z-DNA e a edição de uracilas no RNA nascente, reforça ainda mais a suposição da participação de Z-DNA como alvo de regulação e envolvimento em processos fundamentais do metabolismo da informação genética (Oh, Kim e Rich, 2002; Gagna e Lambert, 2003).

A possibilidade da participação de Z-DNA na regulação de alguns genes de mamíferos foi abordado por Liu et al. (2001). Uma extensa investigação a respeito dos genes regulados pelo fator BAF (conjunto de remodelagem de cromatina em mamíferos), análogo ao complexo SWI/SNF de leveduras, fortaleceu o papel do Z-DNA como regulador da transcrição quando acoplado com o fator nuclear I (NFI).

Naquela pesquisa, foi feita a triagem de uma biblioteca de genes que eram reguladas pelo complexo BAF em mamíferos. Foram identificados 82 sequencias de

mRNA com expressão diferenciada pela influência de BAF: 80 eram super expressadas e duas sofreram supressão pelo complexo BAF. Em seguida foi realizada a análise molecular minudenciada de um dos mRNAs super expressos, o gene do fator de crescimento estimulante de colônia-I (CSF-1), neste foi verificada a existência, imediatamente à montante do sítio consenso de NFI, um região formadora de Z-DNA clássica (com repetição CA/TG). A fim de confirmar a influência de Z-DNA na expressão de CSF-1, os pesquisadores inseriram sequências aleatórias (não indutoras de Z) em substituição a seqüência natural (repetitiva CA/TG) onde resultou em uma atividade supressora do promotor do gene CSF-1 (Liu et al. 2001).

Em outro trabalho foi examinada a possibilidade da aplicação do mecanismo de ativação do gene CSF-1, através do acoplamento da ativação de NFI por meio da indução de Z-DNA por transcrição (Figura 2), para uma ampla classe de genes regulados de maneira similar. Aqui foram identificadas no cromossomo 22 humano seqüências com um forte potencial termodinâmico para formar Z-DNA e se ligar ao NFI. Os resultados sugeriram que existe um grupo definido de genes humanos regulados pelo mecanismo de ativação acoplado ao fator de transcrição NFI de eucariotos e o Z-DNA (Champ et al., 2004).

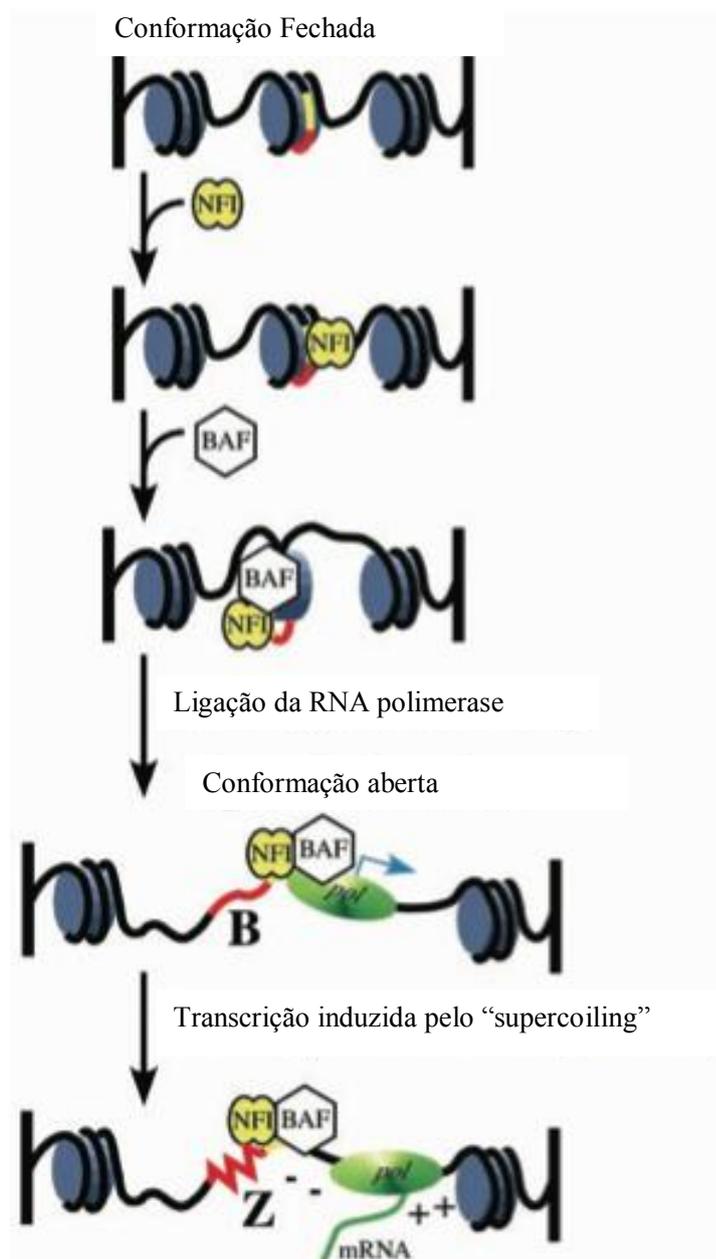


Figure 2. **Mecanismo proposto para Z-DNA acoplado a regulação da transcrição de genes regulados por BAF.** Neste modelo o fator nuclear I (NFI), de sequência consenso (amarela), é ligado em uma estrutura de cromatina compactada e inativa. A conformação fechada da cromatina é relaxada pela ligação de BAF e é ainda mais relaxada quando a RNA polimerase recrutada se liga ao complexo, tornando a cromatina totalmente aberta e ativa. A transcrição do gene, na cromatina topologicamente modificada, forma "supercoils" positivos à frente e "supercoils" negativos atrás da polimerase. Os supercoils negativos induzem uma transição para Z-DNA na região a montante (vermelho), que mantém a conformação da cromatina aberta e ativada (adaptado de Champ et al., 2004).

Anticorpo Z22 e o Z-DNA

Foi no campo da imunologia em que primeiro se demonstrou a função biológica do Z-DNA. Isto foi possível porque o Z-DNA diferentemente do B-DNA, é fortemente imunogênico. A capacidade de ligação de anticorpos em Z-DNA já foi amplamente demonstrado, tanto com anticorpos policlonais (Lafer et al., 1981) como com monoclonais (Moller et al., 1982). A partir desses estudos foi possível esclarecer diversos mecanismos relacionados a doenças auto-imunes, principalmente o lupus eritematoso sistêmico (Lafer et al., 1983).

Na década de 1980, Moller et al., demonstraram que alguns anticorpos anti-Z-DNA apresentavam variação de especificidade quanto a sequências de Z-DNA. Este fato levou a crer que o Z-DNA apresenta mais de um determinante antigênico em sua conformação, isto é, anticorpos anti-Z-DNA podem ser sequencia específico. Nesses estudos iniciais foram identificados, entre anticorpos monoclonais gerados em camundongo C57BL/6, dois principais Z44 e o Z22. Nos anos 90, Sanford e Stollar, caracterizaram os epitopos em termos estruturais.

Apenas quando a sequência nucleotídica está em perfeita alternância dG-dC o anticorpo Z44 liga-se ao Z-DNA (Nordheim et al., 1988). Já o anticorpo monoclonal Z22 se liga aparentemente a qualquer sequência Z-DNA, ou seja, reconhece o Z-DNA em variadas seqüências de bases, incluindo (dGdC)_n. (dG-dC)_n; (dT-dG)_n.(dC-dA)_n; (dG-dme5C)_n. (dG-dme5C)_n e (dG-dBr5C)_n.(dG-dBr5C)_n (Moller et al., 1982).

Estudos com padrões de metilação de DNA demonstraram que o Z22, diferentemente de Z44, não sofre influência de metilação na sua capacidade de ligação ao Z-DNA. Foi apontado ainda que o Z22 interage, pelo menos em parte, com o esqueleto fosfodiéster do DNA (Sanford e Stollar, 1990). Em 1991, Brigido e Stollar, realizaram a clonagem e sequenciamento do cDNA das porções V_L e V_H dos anticorpos Z22 e Z44. Esses anticorpos foram estudados em nível imunológico a partir da produção heteróloga na forma de scFv (Brigido et al., 1993). Nesse formato o anticorpo é produzido na forma de um fragmento de cerca de 30 kDa contendo apenas a porção variável e ligante ao antígeno do anticorpo.

Promotor CMV e o Íntron A

A primeira estratégia para produzir uma proteína recombinante é escolher uma linhagem de células produtora adequada. Em seguida é transfectar, isto é, transferir, o DNA que transporta o gene de interesse juntamente com um gene marcador de seleção para as células hospedeiras. Apenas uma pequena minoria das células transfectadas irá integrar o DNA recombinante no genoma. As células que expressam o marcador de seleção crescem e formam clones quando em condições adequadas, enquanto que as células não transfectadas são eliminadas.

No entanto, existe pouca correlação entre a seleção pela expressão do gene marcador e o nível de expressão do gene de interesse. A produtividade dos clones é imprevisível, variável e geralmente modesta. Uma vez que os melhores clones produtores não são geralmente aqueles com a maior produtividade inicial, um grande número de clones devem ser rastreados e caracterizados. Limitações podem ocorrer em vários níveis, incluindo o silenciamento transcricional, o processamento ineficiente ou aberrante do mRNA, a instabilidade do mRNA recombinante, baixa eficiência na tradução, e gargalos em modificações pós-traducionais e na secreção. Além disso, as células de mamíferos são frágeis, elas crescem lentamente e requerem meios complexos e configurações de fermentação sofisticadas para o processo de produção. Por causa das limitadas densidades celulares máximas obtidas, a produção global é uma ou mais ordens de grandeza abaixo dos valores conseguidos com os sistemas de células bacterianas, fúngicas ou de inseto. Por estas razões, o projeto de um vetor sofisticado e a elaborada adequação da célula produtora, são procedimentos de otimização utilizados para melhorar a produtividade do processo.

Na maioria dos casos, a expressão do gene de interesse é levada por fortes promotores constitutivos virais ou celulares, tais como o promotor de citomegalovírus (CMV) ou promotor do gene EF2 α , factor de alongamento tradução. Promotores de mamíferos geralmente são extremamente complexo, mas contêm duas partes básicas, sequências enhancer e uma sequência mínima de promotor. Enhancers frequentemente contêm sequências repetidas que são locais de ligação para ativadores de transcrição, cuja posição em relação ao local de início da transcrição pode ser surpreendentemente variável, e pode funcionar mesmo a jusante da região

transcrita. A sequência promotora mínima é onde liga a RNA polimerase independente dos fatores básicos da maquinaria transcricional e determina o local de início da transcrição.

Na prática, os promotores naturais são muito mais complexos, e as interações e contribuições dos diferentes elementos de transcrição têm sido raramente investigadas em detalhes. No entanto, a composição natural de promotores de mamíferos permite a construção ou adaptação para fins especiais. Em particular, para a regulação da expressão de genes, elementos enhancer do promotor CMV podem ser substituídos por sítios de ligação para ativadores de transcrição recombinantes ou regulados, tais como sítios de ligação para o transativadores regulado por tetraciclina. Além disso, enhancer específicos para a célula podem ser adicionados mesmo à jusante da unidade de transcrição para aumentar a expressão na linhagem celular de interesse.

O promotor CMV é promíscuo e pode ser utilizado em diversas linhagens celulares de origens distintas, sendo, portanto o mais utilizado nas construções do nosso grupo. O promotor CMV dirige a expressão dos gene viral IE1 (Immediate early 1), e apresenta diversas regiões regulatórias, como sítios de ligação ao fator nuclear 1 (NF1) (Chapman et al., 1991). Este gene é constituído por 4 éxons e 3 íntrons, sendo que o maior dos íntrons, o íntron A, possui o sítio mais forte de ligação a NF1 (Chapman et al., 1991). Neste mesmo estudo, observou-se que o íntron A possui ainda um sítio homólogo ao elemento regulador interno do gene da troponina I, um elemento similar a um enhancer (Figura 3). Além disso, este sítio pode também funcionar como sítio de ligação de fatores de transcrição (Chapman et al., 1991; Stinski, M.F., 1999).

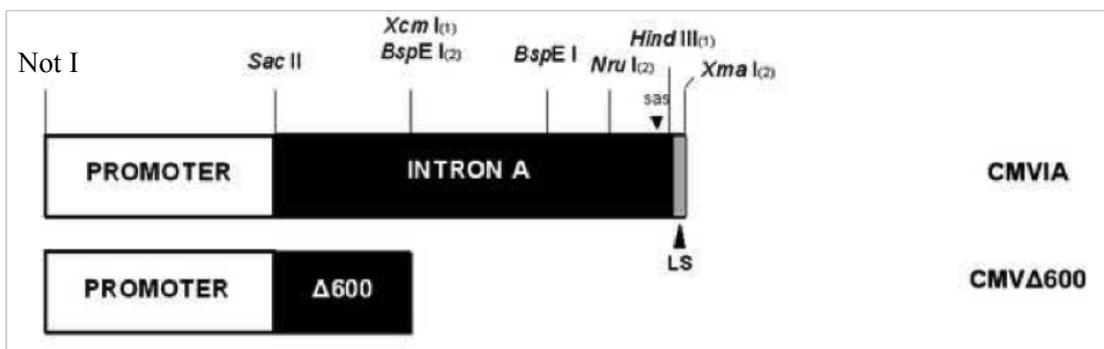


Figura 3. **Esquema do promotor CMV.** Acima mostra promotor CMV com intron A completo (CMVIA). Abaixo mostra a construção do promotor CMV com deleção de 600 pb (CMVΔ600). Os sítios de restrições utilizados para as clonagens neste promotor foram evidenciados (adaptado de Quilici, 2008).

Os íntrons são seqüências genômicas removidas durante o processamento do RNA correspondente por meio de um processo conhecido como *splicing*. Um complexo que consiste em diversas ribonucleoproteínas e pequenos RNAs nucleares (sRNA), denominado spliceossomo, é responsável por cortar as junções íntron-éxon, remover os íntrons e por fim unir as extremidades dos éxons, formando um mRNA maduro.

Atualmente, os cientistas perceberam que o *splicing* não é um evento estático, correlacionando-se com outros processos do metabolismo do RNA, como a poliadenilação do pré-mRNA e seu transporte do núcleo para o citoplasma, a tradução e o decaimento. Em outras palavras, muitas proteínas que participam da maquinaria de um determinado processo podem também fazer parte de outros, sendo que o efeito final desta interação pode ser o aumento da produção de uma proteína recombinante (Le Hir et al., 2003). Sabe-se também que os íntrons podem modificar o nível de remodelamento da cromatina, fazendo com que o DNA esteja mais acessível para a ligação da RNA polimerase II e dos fatores de transcrição associados, conseqüentemente aumentando o nível de transcrição do gene estudado. Também foi mostrado que, tanto *in vitro* quanto em camundongos transgênicos, os íntrons do gene do hormônio de crescimento de camundongo promovem um remodelamento da cromatina, permitindo um aumento de até quinze

vezes da produção da proteína comparando-se com a versão sem íntron (Liu et al., 1995).

Mediante interação de proteínas do spliceossomo com fatores de transcrição, há um melhoramento da processividade e atividade da RNA polimerase II. Estudos demonstraram que um dos componentes do spliceossomo, o snRNA U1, interage com o fator de transcrição geral TFIIF no estágio inicial da transcrição, estimulando a taxa de formação da primeira ligação fosfodiéster pela RNA polimerase II (Kwek et al., 2002). A determinação da posição do íntron também é importante para que a sua função de potencializador da expressão gênica seja alcançada. Um estudo indicou que a posição do sítio de splicing 5' em relação ao promotor é proporcional à transcrição gênica, sendo que quanto maior a distância entre estes, menor é a taxa de transcrição (Furger et al., 2002).

Diversos grupos de pesquisa, inclusive o grupo de Imunologia Molecular da Universidade de Brasília, utilizaram o íntron A com sucesso em suas construções, comparando níveis de expressão de diversos genes, como anticorpos (Xia et al., 2006), fator VIII e gp120 do HIV (Campos-da-Paz et al., 2008 e Chapman et al., 1991) e genes repórter, como a luciferase (Xu et al., 2001 e Quilici, 2008; Mariati et al., 2010).

No trabalho de Campos-da-Paz et al. (2008) foi mostrado a produção do Fator VIII biologicamente ativo em duas linhas celulares diferentes, CHO e HepG2, por transfecção transiente. Nesse estudo foram utilizados dois vetores de expressão baseados no promotor de CMV: um portador de CMV com Intron A (IA) e outra sem IA. Para as células CHO, a expressão foi melhorada pela presença de IA. Ficou sugerido que diferentes elementos de expressão podem ser utilizado para melhorar a produção de transgenes.

Em Quilici et al. (2008) foram construídos plasmídios com o promotor de CMV sem intron (pGLCMV), com intron A (IA) completo (pGLCMV) e deletado em 200 (pGLCMV Δ 200), 400 (pGLCMV Δ 400) e 600 pb (pGLCMV Δ 600), dirigindo a expressão do gene repórter da luciferase. Estas construções foram transfectadas de forma transiente em células CHO-K1, COS-7, HepG2 e HEK-293. O IA aumentou em 100 a 1.000 vezes a atividade da luciferase em relação à construção sem intron, dependendo da linhagem celular testada. Dentre as versões deletadas do intron, a construção pGLCMV Δ 200 foi a mais eficiente, aumentando de 3 a 6 vezes a

atividade da luciferase, seguida da construção pGLCMV Δ 600, cuja atividade melhorou em até 4 vezes, comparado com o IA selvagem. Entretanto, a remoção de 400 pb do IA resultou na redução da expressão gênica a níveis quase comparados aos da construção sem IA. Os dados da atividade da luciferase foram corroborados com experimentos de qRT-PCR, que relacionaram o aumento da atividade da enzima com o aumento do nível dos transcritos nas diferentes construções testadas. Foi estudado o efeito da remoção da região 5' do promotor de CMV em CHO-K1 e COS-7, que resultou em uma redução de 50% da atividade da luciferase.

Elemento IRES e co-expressão de cistrons

Uma regulação fina da expressão das duas cadeias de anticorpo é essencial para a otimização da produção de IgGs em células de mamífero. A transfecção dessas células com duas construções independentes é o procedimento menos eficiente para a obtenção de uma expressão balanceada das duas cadeias. Isso porque geralmente o sítio de integração desses vetores no DNA da célula hospedeira tem grande efeito na expressão do gene recombinante. Quando se utiliza dois vetores em uma transfecção eles podem integrar em regiões com perfis transcricionais diferentes. Assim, a integração em regiões de heterocromatina resulta em pouca ou nenhuma expressão, enquanto integração em eucromatina freqüentemente permite a expressão do gene (Wurm, 2004).

Um exemplo de construção que possibilita a expressão policistrônica é a utilização de sítios de entrada ribossomais internos (IRES, do inglês, Internal Ribosome Entry Site). Os IRES são seqüências localizadas na região 5' UTR de alguns vírus de RNA, como por exemplo os picornavírus. Ao ser adicionado entre as duas cadeias de anticorpos, o IRES possibilita a tradução dos dois genes, devido à geração de um sítio interno para entrada de ribossomos sem a necessidade de todo o aparato de iniciação da tradução presente em eucariotos. Dessa forma, a iniciação da tradução ocorre independentemente em duas regiões distintas do mRNA (no cap e no IRES). Outro exemplo da utilização do IRES é entre um gene de interesse e uma marca seletiva (Figura 4). A adição de uma marca seletiva no vetor durante uma transfecção é importante quando se pretende selecionar um clone altamente

produtor e estável. Esse é um parâmetro essencial para a produção em larga escala de proteínas recombinantes.

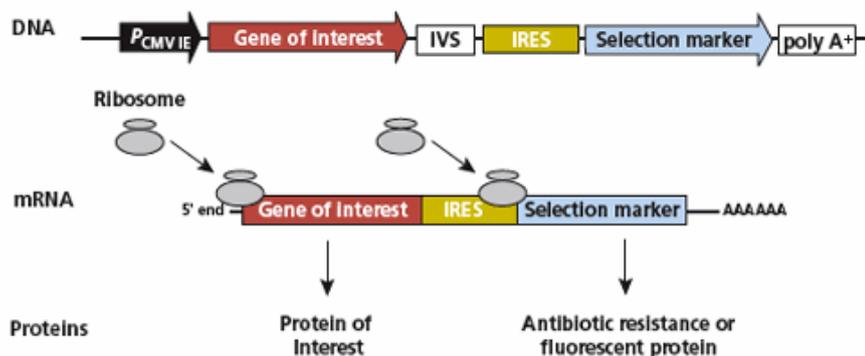


Figura 4. **Mecanismo de ação do sítio de entrada ribossomal interno (IRES, do inglês, Internal Ribosome Entry Site) em um processo de tradução.** Pcmvie: promotor. Gene of interest: gene de interesse. Selectionmarker: marca seletiva. IVS: íntronsintético. Poly A: sinal de poliadenilação (modificado do manual "RNAi & Expression Systems: IRES Bicistronic Expression Vectors" da Clontech).

A descoberta do elemento IRES gerou uma nova abordagem para a co-expressão de múltiplas cadeias polipeptídicas por possibilitar uma razão definida de cadeias leve e pesada de anticorpos (Houdebine e Attal, 1999). Usualmente, cístrons adicionados a jusante de IRES, são traduzidos com menos eficiência do que nas construções monocistrônicas, onde há a iniciação da tradução cap-dependente. Contudo, Li e colaboradores, em 2007, demonstraram que uma construção bicistrônica contendo IRES entre as duas cadeias de um anticorpo, comparada a construções monocistrônicas de cada cadeia co-transfectadas, produziram um nível de expressão de anticorpo similar e estável em longo prazo na linhagem celular CHO. Mielke e colaboradores, em 2000, demonstraram que uma construção tricistrônica para expressão de anticorpos, com um elemento IRES entre as cadeias pesada e leve de um anticorpo, e outro entre a cadeia leve e uma marca de resistência, apresentaram um nível de expressão de anticorpo maior e mais estável na linhagem celular BHK-21, ao contrário das construções monocistrônicas desse anticorpo co-transfectadas com um vetor com a marca de resistência. Sistemas como esses permitem uma expressão duradoura de proteínas recombinantes, até mesmo de proteínas complexas como anticorpos, com estabilidade em longo prazo.

Anticorpo anti-CD3

Desde 1998 o grupo de Imunologia Molecular da UnB desenvolve, juntamente com os grupos do Laboratório de Anticorpos Monoclonais do Instituto Butantan e do Laboratório de Transplantes do InCor, uma linha de pesquisa objetivando a produção de anticorpos humanizados para uso clínico. Esse projeto foi incluído dentro do Instituto de Investigação clínica (iii) e posteriormente no INCT de Imunologia Clínica (www.iii.org.br). Em consequência dessa linha de pesquisa, em 2008, foram descritos anticorpos anti-CD3 baseados em um desenho humanizado do anticorpo OKT3 (Silva et al., 2009). Esse desenho que preserva um número reduzido de resíduos de aminoácidos originais do anticorpo murino mostrou-se capaz de se ligar a linfócitos humanos. Duas versões foram produzidas e ambas são capazes de se ligar especificamente ao antígeno CD3, porém com uma capacidade baixa de competir com o mAb OKT3 original. Apesar disso, as duas versões humanizadas foram capazes de induzir um padrão de resposta antiinflamatória, *in vitro*, caracterizada pela indução de IL-10 e baixa produção de IFN- γ . Outra observação é que os anticorpos humanizados se mostraram muito pouco mitogênicos (Silva et al., 2009).

O interesse em otimizar a ligação de um anticorpo anti-CD3 recombinante humanizado, surgiu a partir da necessidade de melhorar a afinidade de ligação ao antígeno CD3 $\epsilon\gamma$, em comparação ao anticorpo parental, preservando um baixo potencial imunogênico. A humanização deste anti-CD3 foi iniciada por Fonseca, (2000).

Para verificação da manutenção da atividade ligante dos anticorpos humanizados foram construídas por Costa (2004) versões de scFvs recombinantes: duas humanizadas; três versões hemi-humanizadas; e por último, uma versão totalmente murina. Foi possível observar que a humanização da cadeia pesada realizada pela técnica de “melhor encaixe”, onde se procura sequencias similares ao anticorpo OKT3 inteiro, foi bem sucedida. A estratégia utilizada para a humanização da cadeia leve foi diferente da utilizada para humanização da cadeia pesada. Os ensaios de ligação direta utilizando citometria de fluxo mostraram que todas as

versões possuem capacidade de ligação ao antígeno, exceto a versão hemi-humanizada com o VH murino e o VL humanizado (Costa, 2004).

Com o objetivo de melhorar a capacidade e a especificidade de ligação ao antígeno CD3, foi realizado por Silva, (2009) a re-humanização da cadeia leve, utilizando a técnica de “melhor encaixe” onde foi escolhida a seqüência germinal mais similar à seqüência da cadeia leve do OKT3 para doação do arcabouço onde seriam inseridos os CDRs murinos. Foram construídas duas versões humanizadas de anticorpos recombinantes no formato de FvFc. As versões possuem uma nova cadeia variável leve humanizada e uma das duas cadeias variáveis pesadas, humanizadas anteriormente (Fonseca, 2000).

Foram desenvolvidos estudos, De Paula (2012), para identificar possíveis alterações introduzidas no processo de humanização que aumentaram a energia livre de interação, e conseqüentemente à afinidade entre o anticorpo humanizado e o antígeno CD3.

Dentre os anticorpos terapêuticos utilizados na clínica o OKT3 se destacou sendo largamente utilizado na prevenção da rejeição de órgãos transplantados, tratamento da diabetes Tipo 1 (Herold et al., 2002; Kevan, et al., 2005), psoríase e diversas doenças inflamatórias e autoimunes (Utset et al., 2002; Kohm et al., 2003).

Em modelos experimentais murinos, anticorpos anti-CD3 vêm sendo usados na prevenção da rejeição de transplante do coração (Plain et al., 1999), do modelo animal da esclerose múltipla humana (EAE, do inglês, experimental autoimmune encephalomyelitis) (Belmar et al., 2009), na artrite induzida por colágeno (Wu et al., 2010) e na doença inflamatória de Bowel (colite ulcerativa e doença de Crohn). Em humanos, testes clínicos de fase I e II em pacientes com artrite psorítica mostram que o anticorpo humanizado anti-CD3 não ligante a receptor Fc, Teplizumab, reduziu a inflamação das articulações e a dor em pacientes com a doença em estágio avançado (Utset et al., 2002).

Justificativa

Justificativa

O grupo de Imunologia Molecular trabalha com a produção de proteínas heterólogas em células de mamífero desde 2001, sendo que já foram produzidos anticorpos recombinantes e humanizados de interesse comercial como o anti-CD18 (Caldas et al., 2003), e anti-CD3 (Silva et al., 2009), ou acadêmico, como o anti-Z22 (Ruggiero, 2002); assim como os fatores plasmáticos humanos fator VIII e IX. Todos os vetores que albergam estes genes contêm o promotor de CMV, sendo este nosso modelo de estudo. Apesar da experiência com esse modelo, a produtividade ainda é limitante, e, desse modo, são necessários estudos para buscar elementos regulatórios que possam otimizar a expressão das proteínas heterólogas.

Nesse projeto propomos a otimização de um promotor CMV para expressão heteróloga nos vetores da série pMAC desenvolvidos por nosso grupo. Especificamente, demos continuidade a um projeto de pesquisa iniciado no nosso grupo onde se explorou a influência de sequências formadoras de Z-DNA a montante do promotor de CMV, na expressão de um gene repórter, à época, o gene da Luciferase (Quilici, 2008). Nesse trabalho preliminar mostramos que sequências formadoras de Z-DNA conseguiam incrementar a expressão do gene repórter. O Z-DNA é uma conformação alternativa do DNA encontrada em regiões discretas do genoma e que já foram diversas vezes associadas à estabilização do processo de transcrição (Oh et al., 2002, Rich et al., 2003). Além disso, a co-expressão em trans de um fragmento de anticorpo anti-Z-DNA fusionado a um sinal de localização nuclear (NLS), conseguia aumentar os níveis observados, apoiando o papel dessas sequências formadoras de Z-DNA no incremento da expressão heteróloga (Quilici, 2013). No presente projeto foi proposto continuar explorando novas regiões formadoras de Z-DNA, e testar diretamente o papel do anticorpo estabilizador dessa estrutura Z-DNA na atividade do promotor CMV modificado (zCMV). Para isso utilizamos dados e métodos recentemente conseguidos no grupo (Silva, 2010). Além disso, trabalhamos com um gene repórter mais próximo de nosso interesse prático, um anticorpo recombinante fusionado a GFP. Podemos assim medir os níveis de produção do anticorpo diretamente por fluorescência.

Objetivos

Objetivos

Geral

Testar o efeito da introdução de sequências formadoras de Z-DNA a montante do promotor de CMV sobre o nível de expressão e estabilidade do transgene.

Específicos

1. Montar o promotor CMV modificado em vetor de expressão;
2. Realizar a fusão do gene de fragmento de anticorpo repórter com GFP;
3. Introduzir sequências formadoras de Z-DNA no vetor de Expressão a montante do enhancer do CMV;
4. Testar a atividade das células transfectadas de forma transiente através de microscopia;
5. Co-transfectar células com vetor de expressão do gene repórter e com vetor pMACIA Z22NLS;
6. Testar a atividade das células transfectadas de forma transiente através de citometria de fluxo.

Materiais e Métodos

Materiais

1. Linhagens de bactérias

Linhagens de bacterias *Escherichia coli* utilizadas para os procedimentos de clonagem neste trabalho, os genes listados indicam alelos mutantes.

- XL1-blue (Stratagene): *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [F' *proAB lacIqZΔM15 Tn10 (Tetr)*].
- DH5α: F'/*endA1 hsdR17(rK-mK+) supE44 thi-1 recA1 gyrA (Nalr) relA1 D(lacIZYA-argF)U169 deoR (F80dlacD(lacZ)M15)*.
- XL10-gold (Stratagene): *TetrD(mcrA)183 D(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte* [F' *proAB lacIqZDM15 Tn10 (Tetr) Amy Camr*]. Esta linhagem de *E. coli* foi desenvolvida para a transformação de grandes moléculas de DNA, e com alta eficiência.

2. Linhagem de Células de Mamíferos

- CHO-K1- Linhagem celular derivada da subclonagem de uma célula de ovário de hamster Chinês (CHO) parental, iniciada pela biópsia de um ovário da fêmea adulta do hamster Chinês *Cricetulus griseus*.

São células epiteliais, aderentes e necessitam de suplementação de soro fetal bovino e prolina ao meio de cultura. Número ATCC: CCL-61. As células foram cultivadas em meio HAM-F12 (Hyclone) contendo soro fetal bovino (SFB) a uma concentração de 10 % (v/v).

3. Plasmídios utilizados nas clonagens e transfecções

- pGFP/NEO – 11,2 kb, Possui promotor de timidina quinase (pTK), NEO^R, sítio múltiplo 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.

- pMACIA scFvZ22NLS

O vetor pMACIA scFvZ22NLS foi contruído por Quilici (2008), para atingir o objetivo de clonar o gene que codifica o fragmento de anticorpo na forma de scFv anti-Z-DNA Z22. Além desta informação genética, contêm seqüências codificadoras de um sinal de localização nuclear (NLS); proteína A de *Staphylococcus aureus* e His-TAG, para detecção e isolamento da proteína posteriormente expressa.

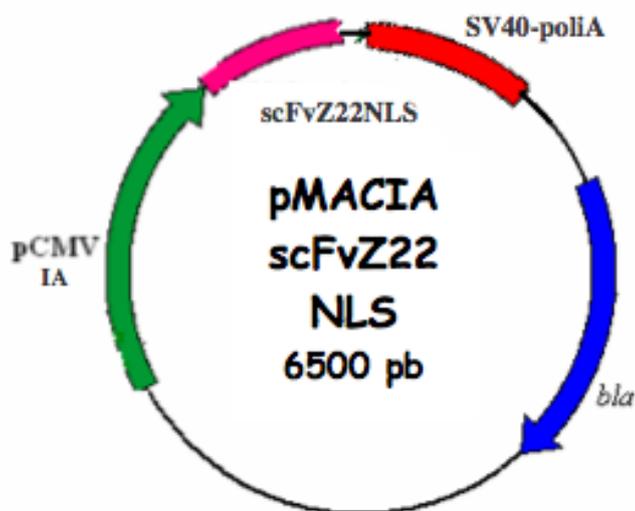


Figura 5- **Esquema do vetor pMACIA scFvZ22NLS**. A parte em rosa representa o fragmento scFvZ22NLS; A seta azul identificada por "bla" é o gene da β -Lactamase, que confere resistência à ampicilina para seleção das bactérias que contêm o plasmídeo (Quilici, 2008).

- PUC 57 FcGFP – este vetor de 4,15 kb foi utilizado nos procedimentos de clonagem da porção Fc do anticorpo anti CD3 fusionado a proteína GFP (proteína verde fluorescente) nos vetores pCO antiCD3 humanizado e pCO Δ 600 antiCD3 humanizado. O fragmento Fc-GFP pode ser isolado através da digestão com as enzimas EcoR I e Xho I.

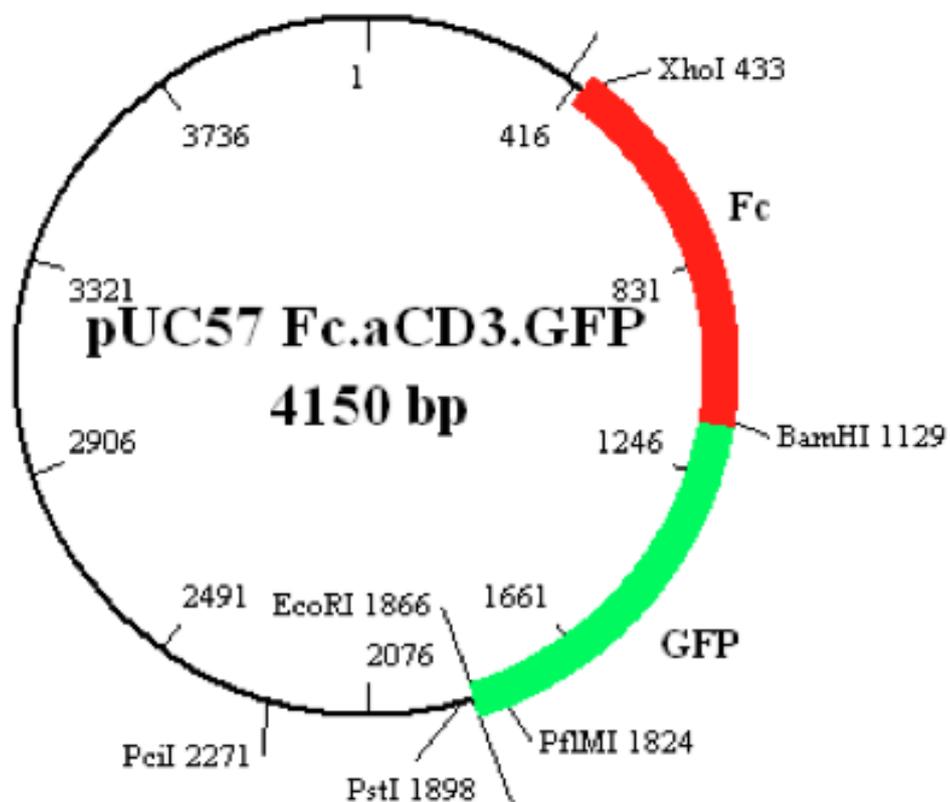


Figura 6. **Mapas do vetor pUC 57 FcGFP.** Utilizados para a construção dos vetores pCO aCD3_GFP e pCO Δ 600 aCD3_GFP. No painel está representado o esquema do mapa do vetor, de onde foi retirado o gene do Fc de aCD 3 fusionado com GFP. Os sítios para clonagem do fragmento Fc_GFP nos vetores de expressão foram BamH I e EcoR I, nas posições 1129 e 1866 respectivamente.

- pCO antiCD3 FvFc humanizado– 8,595 kb, foi construído por Alcântara (2010) durante sua dissertação de mestrado. Foi utilizado nesse trabalho para clonar os elementos Z-DNA e o gene reporte GFP.

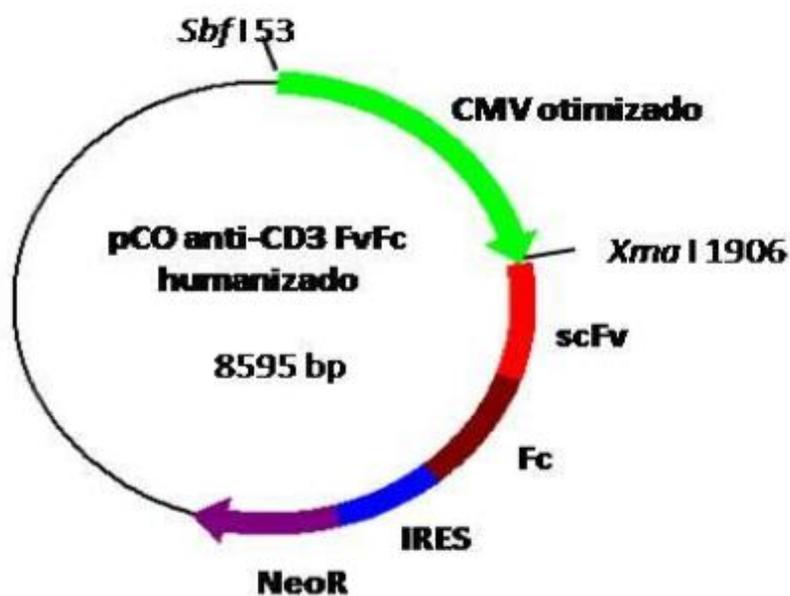


Figura 7. **Esquema do vetor pCO anti-CD3 FvFc humanizado.** Em verde o promotor CMV otimizado, o qual havia sido previamente sintetizado quimicamente. Siglas – CMV: promotor de citomegalovírus. scFv: fragmento variável cadeia simples. Fc: fragmento cristalizável. IRES: sítio interno de entrada do ribossomo. NeoR: gene de resistência ao antibiótico G418 (Alcântara, 2010).

- pCO Δ 600 antiCD3 humanizado – 7,99 kb, construído por Quilici (2012). Foi obtido através da digestão dupla, do vetor pCO antiCD3 FvFc humanizado, com as enzimas BspE I e Nru I (deleção de 600 pb no intron A do promotor de CMV).

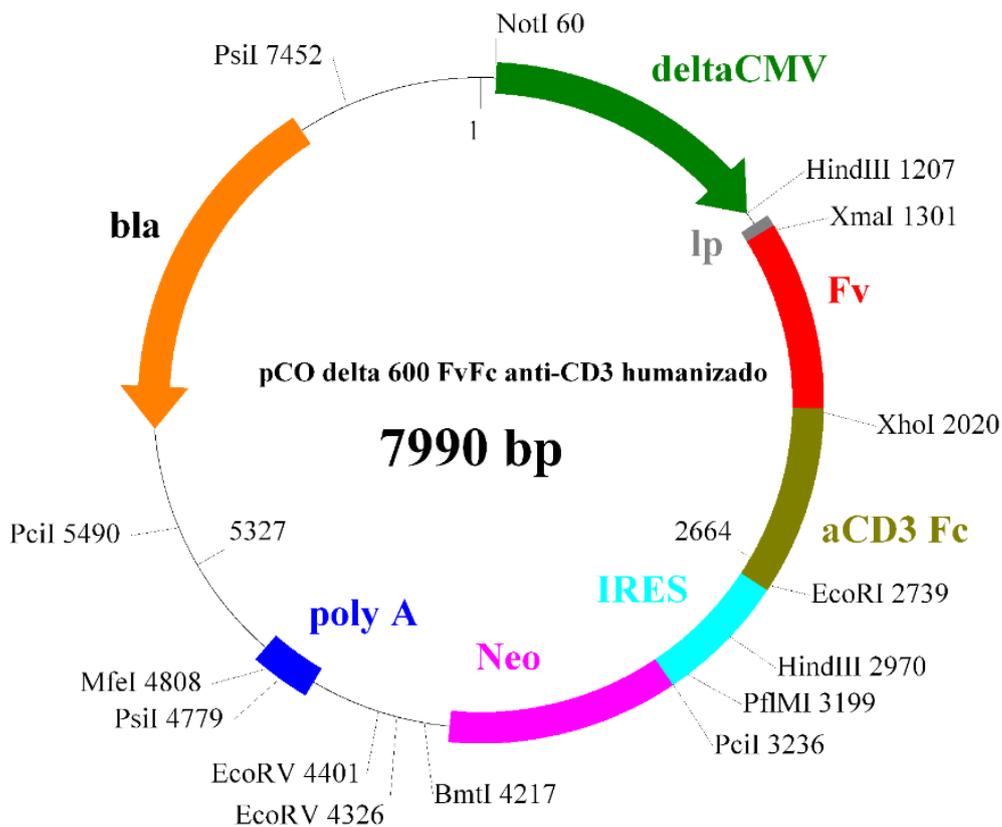


Figura 8. **Mapa do vetor pCO Δ 600 antiCD3 humanizado**. Foi utilizado nesse trabalho para clonar os elementos Z-DNA e o gene reporte GFP. Siglas – deltaCMV: promotor de cytomegalovirus com deleção de 600 pb. lp: peptídeo sinal. Fv: fragmento variável cadeia simples de aCD3. aCD3Fc: fragmento cristalizável. IRES: sítio de entrada do ribossomo interno. NeoR: gene de resistência ao antibiótico G418, poly A: sinal de poliadenilação. Bla: gene de resistência a ampicilina para sistema de seleção bacteriano.

4. Oligonucleotídeos utilizados para seqüenciamento e obtenção de Z-DNA

Os oligonucleotídeos foram fornecidos pela IDT® e solubilizados em água Milli-Q para concentração de uso de 10 pmoles/ μ L. A tabela 2 mostra as seqüências de cada um dos oligonucleotídeos.

Tabela 2. Seqüências dos oligonucleotídeos utilizados

| Identificação | Seqüência do Oligonucleotídeo | Utilização |
|---------------|---------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Z1 not | 5' GGCCGCACACACACGCACACGCACGCACACACATGT 3' | Anela com Z1 not_REV, formando o elemento Z1 clonado no sítio NotI dos vetores para formação de Z-DNA. |
| Z1 not_REV | 5' GGCCACATG TGTGTGCGTGGGTGTGCGTGTGC3' | Ibid Z1 not |
| Z1 suf | 5' GGCCGCACAGAGACACCACCAACCCGACATGT 3' | Anela com Z1 suf_REV, formando o elemento Z2 clonado no sítio NotI dos vetores para não formar Z-DNA. |
| Z1 suf_REV | 5' GGCCACATGTGCGGTTGGTGGGTGTCTCTGTGC 3' | Ibid Z1 suf |
| Z3not | 5' GGCCGCACGCACGCACGCACGCACATCT 3' | Anela com Z3 not_REV, formando o elemento Z3 clonado no sítio NotI dos vetores para formação de Z-DNA. |
| Z3not_REV | 5' GGCCACATGTGCGTGCCTGCCGTGC 3' | Ibid Z3not |
| Z1.isa | 5'GGCCGGCAAACACACACACACACACACACACACTCCTTACATGT 3' | Anela com Z1.isa_REV, formando o elemento Z4 clonado no sítio NotI dos vetores para formação de Z-DNA. |
| Z1.isa_REV | 5'GGCCACATGTAAGGAGTGTGTGTGCGCGTGTGTGTGTTTGC 3' | Ibid Z1.isa |

| | | |
|--------------|--------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| GAPDH | 5' GGCCGCATCACCTCCCATCGGGCCACATGT 3' | Anela com GAPDH_REV, formando o elemento Z5 clonado no sítio NotI dos vetores para não formar Z-DNA. |
| GAPDH_REV | 5' GGCCACATGTGCCCGATGGAGGTGATGC 3' | Ibid GAPDH |
| 6240 forward | 5' GGA TGA GCT GAC CAA GAA CC 3' | Anela no CH3 de aCD3. Utilizado para sequenciar fragmento da GFP clonado nos vetores |
| 8202_REV | 5' CTA GGA ATG CTC GTC AAG AAG AC 3' | Anela no Ires Neo. Utilizado para sequenciar fragmento da GFP clonado nos vetores |

5. Meios de Cultura e soluções para bactérias

Meio LB (Luria-Bertani)

Peptona de caseína 1,0 % (p/v)

Extrato de levedura 0,5 % (p/v)

NaCl 1,0 % (p/v)

pH 7,0.

Meio LB ágar

Meio LB adicionado de ágar bacteriológico a 1,4 % (p/v).

Meio SB (Super Broth)

Peptona de caseína 3,0 % (p/v)

Extrato de levedura 2,0 % (p/v)

MOPS 1,0 % (p/v)

pH 7,0.

Meio SOB

Bacto-triptona 2,0 % (p/v)

Extrato de levedura 0,5 % (p/v)

NaCl 0,06 % (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

Solução estoque de glicose 2 M

Esterilizada por filtração e estocada a 4°C.

Solução estoque de Mg 2 M

MgCl₂ 1 M

MgSO₄ 1 M

Esterilizada por filtração e estocada a 4°C.

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

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

Para a cultura das linhagens de células de mamífero utilizadas neste estudo, foram utilizados os meios de cultura HAM -F12, DMEM e RPMI -1640. Todos esses meios de cultura apresentam uma composição química bastante complexa, contendo sais inorgânicos diversos, vitaminas, aminoácidos e outros compostos, como piruvato de sódio.

Meio Ham-F12 com L-Glutamina a 2 mM (Invitrogen®, no cat 21700-075)

Meio Base 1 pacote

NaHCO₃ 1,176 g

dH₂O q.s.p 1 L

pH 7,4

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) (Invitrogen®, n.º catálogo: 12800-017)

Meio Base 1 pacote

NaHCO₃ 3,7 g

dH₂O q.s.p 1 L

pH 7,4

Meio de Congelamento de Células

DMEM

Soro Fetal Bovino 20 % (v/v)

DMSO 5 % (v/v)

Solução salina balanceada sem Cálcio e Magnésio (BSS.CMF)

NaCl 8 g

KCl 0,4 g

Na₂HPO₄ 0,048 g

KH₂PO₄ 0,06 g

Glicose 1 g

Vermelho de fenol 0,01 g

dH₂O q.s.p. 1 L

pH 7,4 43

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

Tripsina 2,5 g

EDTA 0,38 g

BSS.CMF qsp 1 L

pH 8,0

Soro Fetal Bovino (Invitrogen[®], n^o catálogo: 10438-026)

Estocar de -5 a -20 °C.

Adicionado ao meio de cultura Ham-F12 com L-glutamina à concentração de 5% ou 10% (v/v).

Azul de Tripán

Corante Azul de Tripán 400 mg

PBS pH 7,2 q.s.p. 100 mL

Reagente de transfecção JetPEI™ (Polyplus Transfection, n^o de catálogo 101-01N)

Esse reagente de transfecção é um derivativo linear de uma polietilenimina. É um composto catiônico cuja formulação específica permite a transfecção de diversas linhagens de células de mamíferos.

Reagente de transfecção Lipofectamine 2000 (Invitrogen, no de catálogo 11668019)

É um lipídeo catiônico cuja formulação específica permite a transfecção de diversas linhagens de células de mamífero, como se pode observar neste trabalho.

Reagente de transfecção JetPRIME™ (Polyplus Transfection, nº de catálogo 201-01F)

Esse reagente de transfecção é um derivativo linear de uma polietilenimina. É um composto catiônico cuja formulação específica permite a transfecção de diversas linhagens de células de mamíferos

Reagente de transfecção Lipofectamine LTX (kit Lipofectamine™ LTX (Invitrogen Cat.N. 15338-100)

Esse reagente de transfecção é um lipídeo que permite a transfecção de diversas linhagens de células de mamíferos.

7. Soluções e tampões de uso geral

Azida Sódica – Solução estoque 100X

Azida sódica 5 % (p/v)

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

Tampão TE

Tris-HCl pH 8,0 10 mM

EDTA pH 8,0 1 mM

Glicerol – Solução estoque

Glicerol 50 % (v/v)

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

NaCl 1,5 M

Na₂HPO₄ 0,1 M

NaN_3 0,02 % (p/v)

Solução de brometo de etídeo 20.000X

Brometo de etídeo 10 mg/mL

8. Soluções e material para preparo de células competentes e transformação
– bactéria

Solução de CaCl_2

CaCl_2 50 mM

Esterilizada por filtração e estocada a 4°C

Solução de CaCl_2 + 10 % de Glicerol (v/v)

CaCl_2 50 mM

Glicerol 10 %

Esterilizada por filtração e estocada a 4°C

Glicerol 50 % (v/v)

Esterilizado por filtração e estocada a 4°C

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

9. Soluções para extração 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 0,1 v 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 Sódio 3 M, pH 4,8

Utilizada para precipitação de DNA em preparação de pequena escala.

Acetato de amônio 7,5 M

Utilizada para precipitação de DNA em preparação de larga escala.

10. Tampões de Endonucleases de Restrição

Os Tampões de enzimas de restrição empregados foram aqueles comercializados pela New England Biolabs[®] :

NEB 1

Bis-Tris-propano-HCl pH 7,0 10 mM

MgCl₂ 10 mM

DTT 1 mM

NEB 2

Tris-HCl pH 7,9 10 mM

MgCl₂ 10 mM

DTT 1 mM

NEB 3

Tris-HCl pH 7,9 150 mM

MgCl₂ 10 mM

NaCl 100 mM

DTT 1 mM

NEB 4

Tris-Acetato pH 7,9 20 mM

Acetato de Magnésio 10 mM

Acetato de Potássio 50 mM

DTT 1 mM

Tampões de outras enzimas

Tampão de Reação 5X da T4 DNA ligase (Invitrogen[®])

Tris-HCl 250 mM

MgCl₂ 50 mM

ATP 5 mM

DTT 5 mM

PEG-8000 25 % (p/v)

pH 7,6

Tampão de Reação 10X da T4 DNA ligase (Promega[®])

Tris-HCl pH 7,8 300 mM

MgCl₂ 100 mM

DTT 100 mM

ATP 10 mM

11. Enzimas

Enzimas de Restrição

Biolabs

Not I (10U/μL)

Hind III (10U/μL)

EcoRI (20U/μL)

XhoI (10U/μL)

Pfml (5U/μL)

BamHI (5U/μL)

PciI (10U/μL)

Outras enzimas

Invitrogen

T4 DNA Ligase (1U/μL)

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

dH₂O q.s.p. 1 L

pH 8,0

Tampão de corrida TAE 50X

Tampão Tris-Acetato 2 M

Trizma-base 242 g

Ácido Acético Glacial 57,10 mL

EDTA pH 8,0 0,05 M

dH₂O q.s.p. 1 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)

Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8

Tris 36,34 g

dH₂O q.s.p. 200 mL

Tris-HCl 0,5M, pH 6,8

Tris 12,11 g

dH₂O q.s.p. 200 mL

SDS 10 %

SDS 10 g

dH₂O q.s.p. 100 mL

13. Antibióticos

Ampicilina

A ampicilina liofilizada foi ressuspensa 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, ela foi estocada a -20°C e protegida da luz. Este antibiótico foi utilizado como marca de seleção para plasmídios transformados em células de *E. coli*.

Tetraciclina

A tetraciclina liofilizada foi ressuspensa em água destilada na concentração de 50 mg/mL e esterilizada por filtração em membrana Millipore de 0,22 µm. Após a filtração, ela foi estocada a -20°C e protegida da luz. Este antibiótico foi utilizado para a semeadura e manutenção de células *E. coli* das linhagens XL1-blue e XL10-gold, que possuem o gene de resistência a esse antibiótico.

Antibiótico/Antimicótico 100X (GIBCO)

Penicilina 10.000U

Estreptomicina 10.000µg

Anfotericina B 25µg/mL

Preparada em 0,85 % de salina

Solução utilizada como antibacteriano e antimicótico que foi adicionada aos meios de cultura das células de mamífero, na concentração final 1X.

Geneticina (G418)

Liofilizada foi ressuspensa em água destilada na concentração de 50 mg/mL e esterilizada por filtração em membrana Millipore de 0,22 µm. Após a filtração, ela foi estocada a -20°C e protegida da luz. A geneticina foi utilizada para a obtenção de clones estáveis de construções com seqüências indutoras de Z⁻-DNA na linhagem CHO-K1.

14. Marcadores moleculares para DNA

1 kb plus DNA Ladder – (Invitrogen[®] n°. 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 Ladder – (Invitrogen[®] n°. catálogo. 15615-016)

Fragmentos de DNA em pb: 201; 220; 298; 344; 396; 500; 517; 1.018; 1.636; 2.036; 3.054; 4.072; 5.090; 6.106; 7.126; 8.144; 9.162; 10.180; 11.198; 12.216.

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 4 µL do marcador, corresponde a massa de 200; 120; 80; 60; 40 e 20 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 4 µL do marcador, corresponde a massa de 200; 120; 80; 60; 40 e 20 ng, respectivamente.

15. Kits comerciais

QIAGEN Plasmid Midi Kit 100 – Para preparação plasmidial em escala intermediária (Qiagen[®], n.º. catálogo 12145).

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).

Qiaquick Gel Extraction kit 50 – Para extração de DNA de gel de agarose (Qiagen[®], n.º. catálogo 28704).

Qiaquick PCR purification kit 50 – Para purificação de DNA para seqüenciamento (Qiagen[®], n.º. catálogo 28104).

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

Qubit Fluorometer - para quantificação de DNA/RNA. Invitrogen (n.º catálogo: Q32860)

16. Soluções e materiais para os experimentos com citometria de fluxo

Todas as soluções preparadas no laboratório eram posteriormente filtradas em membranas de 0,2 μm .

Solução Salina 0,9 %

NaCl 9 g

dH₂O q.s.p. 1 L

Tampão de lavagem para reação de FACS

Soro fetal bovino 2 % (v/v)

Ázida Sódica 0,02 % (p/v)

Dissolvidos em PBS 1X

Tampão do citômetro de fluxo (FACSflow)

NaCl 162,4 g

KCl 5,6 g

KH₂PO₄ 5,2 g

Na₂HPO₄ 47,0 g (Anidro)

LiCl 8,6 g (dessecador)

EDTA-Na 7,2 g

Azida 4,0 g (0,02 %)

dH₂O q.s.p. 20 L 55

Métodos

1. Preparação de DNA plasmidial

1.1. Em pequena escala (adaptado de Sambrook e Russel, 2001).

1- Foram inoculados 3,0 mL de cultura de células de *E. coli*, transformadas com o plasmídeo de interesse, crescidas em meio LB/Amp (150 µg/mL) durante 16 horas a 37°C, por meio de duas centrifugações de 5 min a 5.000 rpm em microtubos de 1,5 mL, sendo o sobrenadante desprezado a cada centrifugação.

2- Foi ressuscitado o sedimento em 200 µL de Solução I. Foram incubadas as amostras no gelo por 5 min.

3- Foram adicionados 400 µL de Solução II e homogeneizadas as amostras, invertendo-se gentilmente o tubo várias vezes. Incubava-se à temperatura ambiente por 5 min.

4- Foram adicionados 300 µL de Solução III, repetindo-se o mesmo procedimento de homogeneização e incubou-se no gelo por 10 min.

5- Centrifugou-se a 12.000 rpm por 15 min a 4°C.

6- Ao sobrenadante foram adicionados 5 µL de RNase A e incubava-se por 1 hora a 37°C.

7- Foram adicionados 300 µL de clorofane e, após forte homogeneização, centrifugava-se por 5 min a 5.000 g à temperatura ambiente, a fase aquosa era coletada para outro tubo.

8- Foram adicionados 300 µL de clorofil e repetiu-se o mesmo procedimento anterior de homogeneização, centrifugação e coleta.

9- Foram adicionados 2,0 v de etanol absoluto gelado e incubou-se a -20°C por no mínimo 2 horas.

10- Centrifugou-se a 12.000 rpm por 45 min a 4°C. Desprezava-se o sobrenadante.

11- Foram adicionados 1 mL de etanol 70 % gelado e centrifugou-se novamente a 12.000 rpm por 15 min a 4°C.

12- Secou-se o sedimento a vácuo ou por simples exposição ao ar.

13- O sedimento foi ressuscitado em 50 µL de TE, e as amostras conservadas a -20°C.

1.2. Em larga escala (adaptado de Sambrook e Russel, 2001).

- 1- Foram coletados 200 mL de cultura de células de *E. coli*, transformadas com o plasmídeo de interesse, crescidas em meio LB/Amp (150 µg/mL) durante 16 horas a 37°C, por meio de centrifugação de 15 min a 3.000 x g, desprezando-se o sobrenadante.
- 2- Foi ressuspendido o sedimento em 5 mL de Solução I sob forte agitação. Incubavam-se as amostras no gelo por 10 min.
- 3- Foram adicionados 10 mL de Solução II e homogeneizavam-se as amostras, invertendo gentilmente o tubo várias vezes. Incubou-se à temperatura ambiente por 5 min.
- 4- Foram adicionados 7,5 mL de Solução III, repetindo o mesmo procedimento de homogeneização e incubou-se no gelo por 20 min.
- 5- Foram centrifugadas a 10.000 x g por 30 min a 4°C.
- 6- O sobrenadante foi filtrado em papel de filtro e ao sobrenadante eram adicionados 0,6v de isopropanol. Após uma incubação de 5 min à temperatura ambiente centrifugava-se a 12.000 x g por 20 min a temperatura ambiente.
- 7- Desprezou-se o sobrenadante e, após a secagem por exposição ao ar, o sedimento foi ressuspendido em 500 µL de TE ao qual eram adicionados 10 µL de RNase A. Incubou-se por 1 hora a 37°C.
- 8- Foram adicionados 1 v de clorofane e, após forte homogeneização e centrifugação de 5 min a 5.000 x g à temperatura ambiente, a fase aquosa foi coletada para outro tubo.
- 9- O passo anterior foi repetido mais uma vez.
- 10- Foram adicionados 1 v de clorofil e repetia-se o mesmo procedimento anterior de homogeneização, centrifugação e coleta.
- 11- Adicionaram-se 0,5 v de acetato de amônio 7,5 M e 2,0 v de etanol 100% gelado seguido de incubação por, no mínimo 2 horas a -20°C.
- 12- Foram centrifugadas a 12.000 rpm por 45 min a 4°C. Desprezou-se o sobrenadante.
- 13- Foram adicionados 1 mL de etanol 70% gelado e centrifugava-se novamente a 12.000 rpm por 15 min a 4°C.

14- Após secagem o sedimento foi ressuspenso em 200 µL de TE, e as amostras foram conservadas a -20°C.

1.3. Extração de DNA plasmidial em pequena escala utilizando o kit comercial QIAprep Spin Miniprep kit (Qiagen – número de catálogo 27106)

1 – Foi inoculada uma colônia bacteriana em 10 mL de meio LB com ampicilina a 150µg/mL. A cultura foi incubada a 37 °C por 12 a 16 horas sob agitação de 250 rpm.

2 – As amostras foram centrifugadas a 5.000 rpm por 5 minutos a temperatura ambiente em tubos de 1,5 mL. O sobrenadante foi descartado e esse procedimento repetido, sendo que no final o volume de células coletadas foi de 3 mL.

3 – O sedimento foi ressuspenso em 250µL de tampão P1. A este tampão já foi adicionada RNase A.

4 – A essa mistura, adicionaram-se 250µL de tampão P2 (promove a lise celular), e misturou-se vagarosamente por inversão de tubo 4 a 6 vezes.

5 – Em seguida, foram adicionados 350µL de tampão P3 previamente resfriado às amostras. Elas foram homogeneizadas por inversão de tubo 4 a 6 vezes.

6 – Os tubos foram centrifugados a 13.000 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente.

7 – O sobrenadante foi coletado e aplicado na coluna de troca iônica do kit (QIAprep spin column).

8 – As colunas contendo o sobrenadante do passo 6 foram centrifugadas a 13.000 rpm por 30 a 60 segundos. O líquido que saiu da coluna foi descartado.

9 – Em seguida, a coluna foi lavada com 750µL de tampão PE e centrifugada a 13.000 rpm por 30 a 60 segundos. O líquido que saiu da coluna foi descartado.

10 – As colunas foram centrifugadas novamente nas mesmas condições para que o tampão PE residual fosse removido.

11 – As colunas foram colocadas em tubos novos de 1,5 mL. Para a eluição do DNA, foram adicionados 50 µL de tampão EB (Tris-HCl 10 mM pH 8,5) previamente aquecido por 10 minutos a 75°C no centro da coluna. Após 1 minuto, as amostras foram centrifugadas por 1 minuto, sendo o DNA recuperado nos microtubos.

1.4. Extração de DNA plasmidial em larga escala utilizando o kit comercial QIAGEN Maxi Kit (QIAGEN-tip 500) (Qiagen – número de catálogo 12163).

1 – Uma colônia bacteriana foi inoculada em 3mL de meio LB com ampicilina a 150µg/mL e incubada por até 8 horas a 37 °C sob agitação de 250 rpm.

2 – Quinhentos microlitros desse pré-inóculo foram adicionados a 250mL de meio LB com ampicilina a 150 µg/mL. A cultura foi então incubada a 37 °C sob agitação de 250 rpm por 12 a 16 horas.

3 – As células foram centrifugadas a 6.000 x g por 15 minutos a 4 °C. Descartou-se o sobrenadante.

4 – O sedimento foi ressuscitado em 10 mL de tampão P1.

5 – Adicionaram-se 10 mL de tampão P2 e misturou-se cuidadosamente por inversão de tubo (cerca de 5 vezes).

6 – À mistura, adicionaram-se 10 mL de tampão P3 previamente resfriado. Homogeneizou-se o líquido por inversão de tubo (também cerca de 5 vezes).

7 – Os tubos foram centrifugados a 20000 x g por 30 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi removido, colocado em outro tubo, e centrifugado novamente a 20000 x g por 15 minutos a 4 °C.

8 – Enquanto a centrifugação do passo 7 ocorria, a coluna QIAGEN-tip 500 foi equilibrada com 10mL de tampão QBT, que passou por meio da ação da gravidade.

9 – O sobrenadante do passo 7 foi aplicado na coluna já equilibrada, e também passou por meio da ação da gravidade.

10 – A coluna foi lavada 2 vezes com 30mL de tampão QC.

11 – O DNA foi eluído com 15mL de tampão QF. O líquido contendo o DNA plasmidial foi coletado em um tubo de 50 mL.

12 – O DNA foi precipitado com 10,5mL de isopropanol a temperatura ambiente (0,7 volumes). Misturou-se o líquido por inversão de tubo e centrifugou-se a 15.000 x g por 30 minutos a 4°C. Descarte cuidadosamente o sobrenadante.

13 – O sedimento foi lavado com 5mL de etanol 70 % gelado e centrifugado a 20000 x g por 15 minutos a 4°C.

14 – O sobrenadante foi descartado e o sedimento secado a temperatura ambiente. Após a secagem, foi ressuscitado em 200µL de tampão EB.

2. Digestão do DNA plasmidial com enzimas de restrição.

As digestões dos plasmídios utilizados foram 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. Análise de DNA plasmidial em gel de agarose (Sambrook e Russel, 2001).

A agarose era preparada de 0,7 a 1,0 % em tampão TEB 1X ou TAE 1X com 0,5 µg/mL de brometo de etídeo. As amostras de DNA com tampão de amostra para gel de agarose eram aplicadas no gel e submetidas à eletroforese em tampão TEB ou TAE 0,5X, como descrito por (Sambrook e Russel, 2001). 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.

4. Purificação de DNA a partir de pedaços de gel de agarose com o kit comercial QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen – número de catálogo 28104).

1 – A banda correspondente ao fragmento de DNA a ser purificado foi cortada do gel de agarose feito com tampão TAE.

2 – A banda foi pesada. Adicionou-se 3 volumes de tampão QG para 1 volume de gel (100mg correspondem a 100µL).

3 – A mistura foi incubada a 50 °C por 10 minutos, ou até que o gel se dissolvesse completamente no tampão. Para que esse processo ocorresse mais rapidamente, a mistura foi agitada vigorosamente em aparelho do tipo Vortex a cada 2 minutos.

4 – Após a dissolução do gel no tampão, a mistura adquiriu a cor amarela. Caso contrário, se a cor da mistura fosse laranja ou violeta, deveriam ser acrescentados 10µL de acetato de sódio 3M, pH 5,0.

5 – Foi adicionado 1 volume de isopropanol (esse passo foi realizado quando os fragmentos de DNA possuíam tamanho menor que 500 pb e maior que 4 kb).

6 – A coluna de troca iônica do kit foi posicionada no tubo coletor de 2 mL, também fornecido pelo fabricante.

7 – A amostra foi aplicada na coluna e centrifugada a 13.000 x g por 1 minuto.

8 – O líquido remanescente foi descartado.

9 – A coluna foi lavada com 750 µL de tampão PE. Centrifugou-se a 13.000 x g por 1 minuto e descartou-se o líquido remanescente.

10 – A coluna foi centrifugada novamente nas mesmas condições para que o tampão PE residual fosse removido.

11 – A coluna foi colocada em um microtubo novo de 1,5mL, e o DNA foi eluído com 50 µL de tampão EB previamente aquecido a 75 °C por 10 minutos. Após a adição do tampão, a coluna ficou em repouso por 1 minuto, e depois foi centrifugada a 13.000 x g por 1 minuto.

5. Eluição de fragmentos de DNA de gel de agarose

Os fragmentos de DNA a serem eluídos foram cortados do gel de agarose após eletroforese. A eluição do DNA do gel era feita de acordo com as instruções do fabricante do kit utilizado (Qiaquick Gel Extraction kit, Qiagen[®]) ou submetido ao Freeze-Squizee:

1 - A banda do DNA cortada do gel foi transferida para uma bolsa feita utilizando um pedaço de Parafilm[®]. Duas extremidades da bolsa eram juntas e seladas com o auxílio da parte cônica de um microtubo de 1,5 mL. A banda era inserida dentro da bolsa pela parte não selada.

2 - A bolsa contendo o fragmento foi então congelada a – 40 °C.

3 - Após o total congelamento, a porção plana da tampa de um microtubo de 1,5 mL foi utilizada para macerar o fragmento até se liquefazer.

4 - O líquido e o gel foram transferidos para colunas Ultrafree DA Centrifugal Unit (Millipore[®]).

5 - O material foi centrifugado por 5 minutos a 12.000 x g a temperatura ambiente.

6 - Após a centrifugação o material foi precipitado com a adição de 0,1 v de acetato de sódio 3M, 60 µg de glicogênio e 2,5v etanol 100% gelado. Procedeu-se a uma incubação a -20°C durante a noite para um melhor rendimento da precipitação.

6. Ligação de fragmentos de DNA

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

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

As reações de ligação foram realizadas de acordo com instrução do fabricante da T4 DNA Ligase utilizada. Após incubação, em geral de 16 horas a 4°C, foram usados para transformar células de *E. coli*.

7. Preparação de células competentes e transformação bacteriana

7.1. Por choque térmico-CaCl₂ (adaptado de Maranhão, 2003).

- 1- Inoculavam-se 500 µL de um pré-inóculo, feito a partir de uma colônia isolada da célula de interesse, em 50 mL de meio LB. Incubava-se a 37°C a 220 rpm até a cultura atingir uma densidade óptica a 600nm (OD_{600nm}) de 0,1 a 0,3.
- 2- Centrifugava-se a 3.000 x g por 15 min a 4°C, desprezando-se o sobrenadante (Após essa etapa é importante que em todas as etapas subseqüentes as células sejam mantidas resfriadas para evitar uma perda de eficiência).
- 3- O sedimento era ressuspendido em 10 mL de solução de CaCl₂ 50mM estéril gelada, com movimentos suaves.
- 4- Centrifugava-se a 3.000 x g por 15 min a 4°C, desprezando-se o sobrenadante.
- 5- O sedimento era ressuspendido em 1 mL de solução de CaCl₂ 50mM estéril gelada, com movimentos suaves.
- 6- Após incubação de 1 hora em banho de água/gelo as células eram aliquotadas e podiam ser usadas por um período máximo de 24 horas.

- 7- Incubavam-se de 100 a 200 μL de célula competente com o plasmídio de interesse a ser transformado em banho de água/gelo por 30 min.
- 8- Procediam-se o choque térmico incubando-se o sistema de transformação em banho a 42°C por 3 min.
- 9- Adicionava-se imediatamente 1 mL de meio LB e incubava-se por 1 h a 37°C .
- 10- Semeavam-se quantidades variáveis do sistema de transformação em placas contendo meio LB-ágar contendo ampicilina a $150 \mu\text{g/mL}$. As placas eram mantidas na estufa a 37°C por 16 horas.

7.2. Por eletroporação (adaptado de Maranhão, 2003).

- 1- Uma colônia isolada da célula de interesse foi inoculada em 10 mL de meio SB contendo o antibiótico de interesse. Esse pré-inóculo era mantido a 37° sob agitação de 220 rpm por 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 $\text{OD}_{600\text{nm}}$ de 0,7 a 0,9.
- 2- Centrifugava-se a $3.000 \times g$ por 20 min a 4°C , desprezando-se o sobrenadante e mantendo sempre a célula gelada a partir desse momento.
- 3- O sedimento era ressuspenso em 25 mL de glicerol 10 % estéril gelado e a seguir adicionava-se mais 75 mL de glicerol 10 % gelado.
- 4- Centrifugava-se a $3.000 \times g$ por 20 min a 4°C , repetindo-se a etapa anterior.
- 5- O sedimento era ressuspenso em 25 mL de Glicerol 10 % estéril gelado e submetido a última centrifugação a $3.000 \times g$ por 20 min a 4°C .
- 6- O sedimento final era ressuspenso em 1 a 2 mL de glicerol 10 % e as células eram aliqüotadas, congeladas em banho de gelo seco com etanol e armazenadas imediatamente a -80°C .
- 7- Para a transformação, o plasmídio, já em um tubo resfriado previamente, era adicionado à célula competente e imediatamente colocado na cubeta de eletroporação (BioRad[®]) também já resfriadas.
- 8- A eletroporação era feita seguindo os seguintes parâmetros elétricos: 2,5 kV, 25 μF e 200Ω , no aparelho Gene Pulser com Pulser Controller da BioRad. O τ esperado nessas condições era de 4,0 a 5,0 milissegundos.

9- 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.

10- Após uma incubação de 1 h a 37°C e 220 rpm, diluições da transformação eram semeadas em placas contendo ampicilina a 200 µg/mL. As placas eram mantidas na estufa a 37°C por 16 horas.

8. Anelamento e clonagem dos oligonucleotídeos

Os oligonucleotídeos com as seqüências controles e indutoras de Z-DNA estão listados na tabela 2.

O anelamento dos oligonucleotídeos chamados For e Rev foi feito utilizando 50 ng de cada, tampão de anelamento (100 mM tris pH 8.0, 50 mM MgCl₂) para um volume final de 50µl, e as seguintes condições: 88°C por dois minutos, 65°C por 10 minutos, 37°C por 10 minutos, temperatura ambiente por 1 hora.

Os oligonucleotídeos anelados foram ligados a cada vetor de expressão para células de mamíferos, pCOaCD3_GFP e pCOΔ600aCD3_GFP, previamente digerido com 30 unidades das enzimas NotI (New England Biolabs), gerando extremidades coesivas para ligação com os oligonucleotídeos. Cinquenta nanogramas do vetor foram ligados a 1 ng de cada par dos oligonucleotídeos anelados, e à mistura foi adicionada a enzima T4 ligase (New England Biolabs), juntamente com o tampão próprio. Os tubos foram mantidos a 16 °C por aproximadamente 16 horas.

Os plasmídeos foram digeridos com as enzimas de restrição Pci I (New England Biolabs) O produto da digestão foi visualizado em gel de agarose 0,8 %, e os clones positivos selecionados.

9. Precipitação de DNA utilizando glicogênio como carreador.

O volume do material a ser precipitado foi aferido. Em seguida, acrescentou-se, na ordem, 3 µL de glicogênio 20 mg/mL, 1/10 do volume de acetato de sódio 3M pH 5,0 e 2 volumes de etanol 100 % gelado. O sistema de precipitação foi incubado a – 20 °C durante a noite. No dia seguinte, as amostras foram centrifugadas a 12.000 x g por 45 minutos a 4 °C. Descartou-se o sobrenadante e o sedimento foi

lavado com 200µL de etanol 70 % (v/v) gelado, centrifugando-se a 12.000 x g por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi deixado à temperatura ambiente por cerca de 15 minutos para secar.

10. Seqüenciamento automático de DNA e análise de seqüências.

Após ter sido realizada uma análise de restrição, os plasmídios foram seqüenciados utilizando-se o seqüenciador 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 seqüências obtidas por meio do seqüenciamento automático eram analisadas, utilizando-se ferramentas de bioinformática: Phred e CAP3 disponíveis na página: www.biomol.unb.br. Depois da análise de qualidade, as seqüências 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 seqüências já depositadas no GenBank. As seqüências também eram manipuladas e analisadas com seqüências, depositas em um banco de dados pessoal, utilizando o programa BioEdit Sequence Aligment Editor.

11. Cultura de células de mamíferos

Durante toda a manutenção da cultura, as células eram observadas em microscópio invertido de contraste de fase NIKON DIAPOH e incubadas em estufa a 37 °C, 5 % de CO₂ e 70 % de umidade.

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

1 – As células em cultura aderente eram lavadas 3 vezes com BSS.CMF. Após esse procedimento, eram adicionados 5 mL de tripsina 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 5 mL 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 ressuspenso no meio de cultura remanescente do tubo.

5 – As células eram distribuídas em alíquotas de 500 µL em criotubos, onde eram adicionados 500 µL de meio de congelamento.

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.

11.2. Descongelamento de células CHO (Ruggiero, 2002).

1 – Os criotubos eram transferidos para um banho de 37 °C até o total descongelamento das células.

2 – As células eram plaqueadas em densidade de 2×10^2 células por garrafa de 25cm² em meio Ham-F12 acrescido de 10% SFB.

11.3. Tripsinização, passagem das células e formação de monocama celular.

Quando as células atingiam a confluência total e cobrem 100 % de toda superfície da placa de cultura, elas deveriam ser repicadas.

1 – O meio de cultura da garrafa era descartado.

2 – Eram adicionados 5 mL de tripsina a garrafa.

4 – Após 3 minutos, as células começaram a se descolar da superfície da garrafa. O descolamento das células era acompanhado por visualização a olho nu.

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

6 – A suspensão celular era transferida para tubos falcon de 50 mL, e centrifugados a 130 x g por 8 minutos.

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

8 – Era transferida toda a população células por garrafas de 75 cm² ou 150 cm² contendo 10 mL ou 30 mL de meio acrescido de SFB.

11.4. Estimativa do número de células por meio de contagem em câmara de Neubauer.

1 – As células eram tripsinizadas e ressuspensas em 1 mL de meio de cultura.

2 – A câmara de Neubauer era coberta com a lamínula e eram aplicados 10 µL de suspensão de células em cada compartimento da Câmara. Caso alguma diluição tivesse sido necessária, o número de células contado era multiplicado por esse fator de diluição.

3 – As células eram observadas em microscópio óptico (na objetiva com aumento de 40 vezes) e contadas nos 4 quadrantes externos. Em seguida, era utilizada a fórmula:

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

11.5. Determinação Viabilidade celular.

1 – As células foram tripsinizadas e transferidas para um tubo falcon de 15 mL, ao qual se adicionou 5 mL de meio com SFB.

2 – As células eram centrifugadas a 130 x g por 8 minutos.

3 – O sobrenadante era descartado e as células ressuspensas em 3 mL de meio de cultura remanescente.

4 – Vinte microlitros da suspensão celular eram incubados com 80 µL da solução de Azul de Tripán (diluição de 5 vezes da cultura).

5 – A câmara de Neubauer era montada, e nela aplicou-se um volume de 10 µL da mistura.

6 – Eram contadas 200 células, entre viáveis (transparentes) e não-viáveis (azuis). A célula não-viável tem a membrana celular mais permeável, e por isso, o corante

entra na célula, tornando-a azul. Após a contagem, era estabelecida a porcentagem de células viáveis.

11.6. Transfecção de Células CHO utilizando o reagente JetPEI™ (Polyplus Transfection, nº de catálogo 101-01N)

O reagente JetPEI é um polímero catiônico derivado de polietilenimina linear. Suas características inibem a formação de complexos de DNA.

1 – Em placa de cultura de 6 poços eram semeadas cerca de 2×10^4 células por poço, adicionando-se em seguida 2 mL de meio acrescido de 10 % SFB e solução de antibiótico/antimicótico.

2 – As células eram incubadas em estufa a 37°C, 5 % de CO₂ e 70 % de umidade durante a noite, até que se atingisse a confluência ideal de 50 a 60 %.

3 – No dia seguinte, em microtubos de 1,5 mL estéreis, as soluções eram preparadas da seguinte maneira: na solução A, para cada transfecção eram diluídos 3 µg do vetor em 100 µL de NaCl 150mM. Na solução B, para cada transfecção eram diluídos 6 µL de JetPEI em 100 µL de NaCl 150 mM. As duas soluções eram agitadas rapidamente e centrifugadas só para baixar os resíduos das paredes do tubo.

4 – A partir daí, era adicionada a solução B sobre a solução A (não misturar na ordem inversa), imediatamente a mistura é agitada rapidamente e centrifugadas só para baixar os resíduos das paredes do tubo.

5 – Incubava-se a mistura à temperatura ambiente por 15 minutos.

6 – Adicionava-se 200 µL da mistura por transfecção delicadamente gota a gota, fazendo movimentos em forma de cruz no poço.

7 – Homogeneizar a placa mexendo-a gentilmente.

8 – Após 48 horas a cultura era visualizada ao microscópio de fluorescência e verificado quanto a presença da proteína recombinantes.

11.7. Transfecção de Células CHO utilizando o reagente JetPRIME™

As células tinham 60-80 % de confluência no momento da transfecção.

Protocolo detalhado na placa de 12 poços

1. Foi diluído 1 µg de DNA em 75 µl de tampão jetPRIME™. Misturado por vórtex.
2. Em seguida adicionava-se 2 µl de reagente jetPRIME™. Vórtex, por 10 s, e spin rapidamente.
3. Incubava-se durante 10 min à TA.
4. Eram adicionados 75 µl da mistura de transfecção, gota a gota, por poço com as células em meio de crescimento celular normal.
5. Agitavam-se suavemente as placas para trás e para os lados.
6. Após 4 h de transfecção substituíam o meio de crescimento para 2 ml e retornavam as placas a incubadora.
7. O resultado era analisado 48 h depois.

11.8. Transfecção utilizando o reagente Lipofectamine 2000 (Invitrogen - no de catálogo 11668019)

- 1 – Em uma placa de cultura de 24 poços foram semeadas cerca de 5×10^4 células por poço, adicionando-se em seguida 500 µL de meio contendo SFB. Para transfecção em placa de 6 poços, semeou-se cerca de 6×10^5 células por poço.
- 2 – As células foram incubadas em estufa a 37 °C, 5 % de CO₂ e 70 % de umidade durante a noite, até que se atingisse a confluência de 90 %.
- 3 – No dia seguinte, a monocamada celular foi lavada com 200 µL de Ham F12 sem soro, e depois se adicionou 500 µL de meio de cultura sem soro. Para placa de 6 poços, utilizou-se 500 µl de Ham F12 e 2 mL de meio.
- 4 – O DNA a ser transfectado foi diluído em meio de cultura sem soro. Para placas de 24 poços, a quantidade a ser utilizada: variou de 250 ng a 1 µg de DNA para um volume final de 50 µL, completado com meio sem soro. Para placa de 6 poços, utiliza-se 2500 ng de DNA para o volume final de 250 µL de meio sem soro.
- 5 – O reagente lipídico também foi diluído em meio de cultura sem soro. Para placas de 24 poços, a quantidade de lipídeo a ser utilizada é 2 µL, para um volume final de 50 µL. Para placa de 6 poços, o volume do reagent lipídico foi de 10 µL para um volume final de 250 µL de meio sem soro.
- 6 – As duas diluições, do DNA e do lipídeo, foram misturadas e incubadas a temperatura ambiente por 15 minutos.

7 – Após este período, a mistura foi adicionada lentamente sobre o poço em movimentos cruciformes (no total, foram adicionados 100 µL da mistura por poço na placa de 24 poços) e 500 µL na placa de 6 poços.

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

9 – Transcorridas 5 horas após a transfecção, o meio de cultura sem soro foi trocado para um meio de cultura com soro. Em seguida, a placa foi incubada durante a noite nas mesmas condições descritas no passo 8.

10 – No tempo 48 horas pós-transfecção as células foram analisadas.

11.9. Transfecção de células utilizando o reagente Lipofectamine LTX™ (Invitrogen, no de catálogo 15338-100)

1 – Em uma placa de cultura de 6 poços eram semeadas cerca de $4,2 \times 10^5$ células por poço, e em seguida eram adicionados 2 mL de meio contendo 10 % de SFB.

2 – As células eram incubadas em estufa a 37 °C, 5 % de CO₂ e 70 % de umidade durante a noite, até que se atingisse a confluência de 90 %.

3 – No dia seguinte, o DNA a ser transfectado era diluído em meio de cultura sem soro. Para placas de 6 poços, a quantidade otimizada a ser utilizada era: 1250 ng de DNA por poço, para um volume final de 250 µL, completado com meio sem soro.

4 – Era utilizado 1,25 µL do reagente Lipofectamine LTX™ para volume final de 250 µL, completado com meio sem soro.

5 – Após 10 min. as soluções contendo o DNA e a solução com o reagente eram misturadas e incubadas por 30 minutos à temperatura ambiente.

6 – Enquanto o complexo era formado, o meio dos poços do dia anterior era trocado por 2 mL de meio sem soro.

7 – Após este período, a mistura era adicionada lentamente sobre o poço em movimentos cruciformes (no total, foram adicionados 500 µL da mistura por poço).

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

9 – Transcorridas de 4 a 6 horas após a transfecção, o meio de cultura sem soro era trocado para um meio de cultura com soro. Em seguida, a placa era incubada durante a noite nas mesmas condições descritas no passo 7.

10 – No tempo de 48 horas pós-transfecção, as células eram analisadas.

11.10. Teste da transfecção por quatro diferentes metodologias

Foram testadas quatro estratégias: Jet Pei, Jet Primer, Lipofectamina 2000 e Lipofectamina LTX (o vetor utilizado foi pZ1, construído nesse trabalho). O resultado da transfecção foi identificado pela contagem do número de células que apresentaram fluorescência de GFP, após 48 h do ensaio de transfecção, num campo de cem células (escolhido aleatoriamente), para cada metodologia de transfecção.

11.11. Seleção de células transfectadas utilizando Geneticina[®] (G418-Sulfato)

1 - Após 72 h da transfecção o meio era trocado para o meio com geneticina a uma concentração final de 600 µg/mL em todos os poços transfectados com o plasmídeo e também no poço com as células não transfectadas, utilizadas como controle.

2 - O meio de cultura a partir de então era trocado a cada 4 dias 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 que houve a 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.

12. Preparação das amostras para FACS (Fluorescent Activated Cell Sorter)

Nesse experimento evitava-se ao máximo a exposição à luz direta, as amostras foram transportadas protegidas em papel alumínio.

1 - As células eram tripsinizadas e ressuspendidas em 400 µL de tampão de FACS e as transferia-se para tubos apropriados para o aparelho de FACS.

11 - A leitura da reação no citômetro de fluxo foi realizada no dia da reação para evitar a morte celular. A leitura foi feita com um total de 10.000 eventos de cada amostra.

12.1. Leitura das amostras no citômetro de fluxo

1 – O citômetro de fluxo utilizado foi o cyFlow® Space (PARTEC). O programa utilizado para análise dos dados foi o FlowJo.

2 – As células foram adquiridas e selecionadas de acordo com seu tamanho e granulosidade de maneira a analisar a população de CHO-K1

3 – Os dados eram obtidos a partir da análise dos histogramas ou gráficos de pontos fornecidos pelo programa. Os resultados eram expressos em percentagem de células positivas para o estudo. O parâmetro considerado era a mediana de intensidade de fluorescência.

Resultados e Discussão

Resultados e Discussão

1. O desenho do Promotor

Nesse trabalho utilizamos os promotores sintéticos descrito por Quilici (2013), contendo todos os sítios críticos de transcrição tanto na sua versão completa, como na versão $\Delta 600$ do promotor. Além disso, utilizamos o sítio de clonagem (Not I) na extremidade 5' do enhancer/promotor, para a clonagem dos elementos Z-DNA sem perder nenhuma parte do promotor (Figura 9 e 10).

Foi demonstrado em trabalho anterior que dentre vetores contendo sequências indutoras de Z-DNA transfectados de forma transiente em CHO-K1, um dos elementos Z-DNA aumento em 50 % a atividade da luciferase em relação a sequencia controle (Quilici, 2008). A fim de analisar o potencial formador de Z-DNA desta seqüência na região próxima ao promotor, clones estáveis de CHO-K1 foram desenvolvidos com a construção. Nestes clones estáveis, transfectou-se de forma transiente o plasmídeo pMACIA scFvZ22NLS, um fragmento de anticorpo anti-Z-DNA (intracorpo anti-Z22NLS). A atividade da enzima aumentou em 3 vezes quando este elemento em trans foi adicionado ao sistema de expressão, indicando que esta seqüência deveria se encontrar na forma de Z-DNA e que a modulação da expressão gênica ocorre em níveis transcricionais (Quilici, 2008).

No trabalho de Quilici (2008), as sequências formadoras de Z-DNA foram adicionadas entre dois sítios de Ssp I, um do enhancer do CMV e um do vetor pMACIA, o que resultou na remoção de uma região de cerca de 700 pb na região 5' do enhancer. A remoção dessa região que inclui dois sítios de NF1, poderia em tese estar mascarando o efeito da região formadora de Z-DNA. Dessa forma o promotor sintético pCO foi desenhado preservando a região dos sítios de NFI e introduzindo um sítio único de Not I cerca de 700 pb a montante. Esse sítio de Not I foi aqui utilizado para a introdução dos elementos formadores de Z-DNA.

A presença do enhancer juntamente com o promotor de CMV, é mais eficiente para a expressão heteróloga de proteínas (McLean et al., 2000; Xu et al., 2001; Gruh et al., 2008; Ogawa et al., 2007). No entanto Quilici (2008, 2013) mostrou que deleções de até 70 % do promotor de CMV-IA melhoravam a produção de um transgene. O promotor com uma deleção de 600 pb (CMV-IA $\Delta 600$) que perdeu

grande parte da porção 3' do promotor, mas que resguarda o sítio 3' de splicing foi recriado no promotor sintético pCO Δ 600 (Quilici, 2013) e se mostrou eficiente na expressão heteróloga.

2. Validação através de digestão enzimática, dos vetores pCO aCD3 humanizado e pCO Δ 600 aCD3 humanizado.

Para verificar se os plasmídeos iniciais desse trabalho de fato correspondiam aos vetores pCO aCD3 humanizado (Alcântara, 2010) e pCO Δ 600 aCD3 humanizado (Quilici, 2013) foram realizadas análises do perfil de restrição enzimática de cada um dos vetores. Através dessas análises o mapa estratégico de restrição enzimática de cada vetor foi construído (Figuras 9 e 10).

A partir disso foi possível estabelecer quatro enzimas, EcoR I, Xho I, Hind III e PflM I, que puderam traçar uma validação abrangente de cada vetor. Cada uma dessas enzimas escolhidas abrange uma região importante do vetor (Figuras 9 e 10). O vetor pCO aCD3 humanizado possui dois sítios de PflM I, dois de Hind III e um de EcoRI e Xho I. Um dos sítios de PflM I está inserido dentro da região do promotor onde foi realizada a deleção de Δ 600, por isso é determinante para a distinção entre os dois vetores. Portanto o vetor pCO aCD3 humanizado possui dois sítios para PflM I e ao ser digerido por essa enzima libera um fragmento de 2636 pb (Figura 9d), já o outro vetor, como possui apenas um sítio, quando foi digerido apresentou apenas a linearização do vetor de 7990 pb (Figura 10d). Hind III possui dois sítios flanqueando a mesma região de 1763 pb em ambos os vetores, um desses sítios se localiza na extremidade 3' do promotor e o outro fica dentro do elemento IRES, por isso os vetores digeridos por essa enzima liberam o fragmento visualizado na imagem abaixo (Figuras 9c e 10c). Nos dois vetores as enzimas EcoRI e Xho I localizam-se de modo a flanquear a região Fc do anti CD3 humanizado, assim quando foi feita a digestão com essas enzimas um fragmento de 719 pb foi liberado (Figuras 9a e 10a).

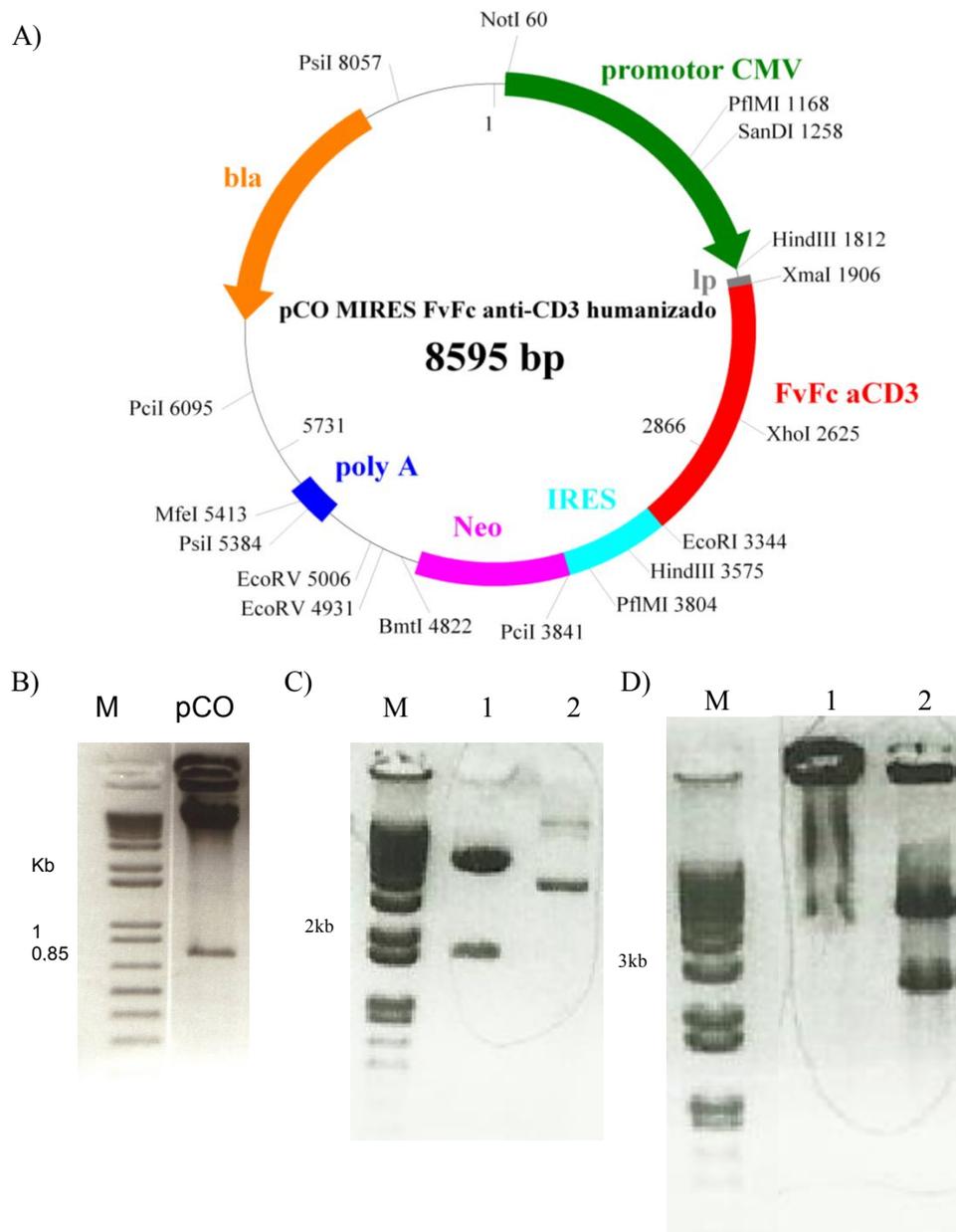


Figura 9. **Análise do perfil de restrição do vetor pCO anti-CD3 FvFc humanizado.** A) mapa esquemático do vetor. B) Digestão do vetor com as enzimas EcoR I e Xho I mostra a liberação de um fragmento de 719 pb na amostra pCO; M, Marcador de Massa Molecular 1 kb Plus (Invitrogen). C) Digestão do vetor com enzima Hind III libera fragmento de 1763 pb – Amostra M, Marcador de Massa Molecular 1 kb Plus (Invitrogen); 1, vetor digerido com Hind III; 2, vetor intacto. D) Digestão com enzima PflM I libera fragmento de 2636 pb – Amostra M, Marcador de Massa Molecular 1 kb Plus (Invitrogen); 1, vetor não digerido; 2 vetor digerido com PflM I. Os números ao lado da foto se referem ao tamanho das bandas do marcador. Siglas – CMV: promotor de citomegalovirus com deleção de 600 pb. Ip: peptídeo sinal. Fv: fragmento variável cadeia simples de aCD3. aCD3 Fc: fragmento cristalizável. IRES: sítio de entrada do ribossomo. NeoR: gene de resistência ao antibiótico G418, poly A: sinal de poliadenilação. Bla: gene de resistência a ampicilina para clonagem em sistema bacteriano.

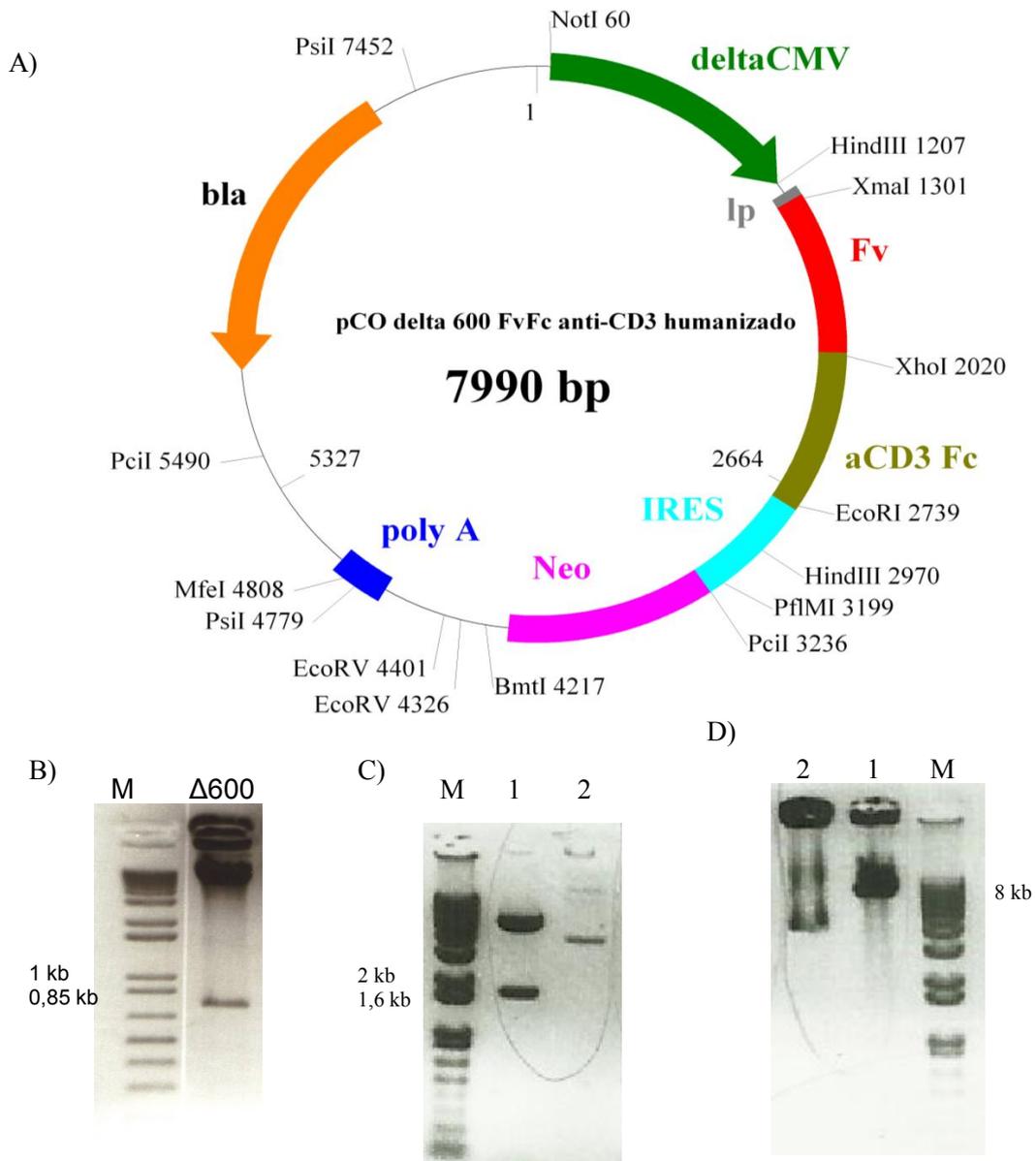


Figura 10. **Análise do perfil de restrição do vetor pCO Δ 600 anti-CD3 FvFc humanizado (Δ 600).** A) mapa esquemático do vetor. B) Digestão do vetor com as enzimas EcoR I e Xho I mostra liberação de um fragmento de 719 pb na amostra Δ 600; M, Marcador de Massa Molecular 1 kb Plus (Invitrogen). C) Digestão do vetor com enzima Hind III libera fragmento de 1763 pb – Amostra M, Marcador de Massa Molecular 1 kb Plus (Invitrogen); 1, vetor digerido com Hind III; 2, vetor intacto. D) Digestão com enzima PfiM I apenas lineariza o vetor – Amostra M, Marcador de Massa Molecular 1 kb Plus (Invitrogen); 2, vetor não digerido; 1 vetor digerido com PfiM I. Os números ao lado da foto se referem ao tamanho das bandas do marcador. Siglas – deltaCMV: promotor de citomegalovirus com deleção de 600 pb. lp: peptídeo sinal. Fv: fragmento variável cadeia simples de aCD3. aCD3 Fc: fragmento cristalizável. IRES: sítio de entrada do ribossomo. NeoR: gene de resistência ao antibiótico G418, poly A: sinal de poliadenilação. Bla: gene de resistência a ampicilina para clonagem em sistema bacteriano.

3. Fusão da porção Fc de aCD3 humanizado à proteína GFP e montagem do gene de expressão no vetor pCO aCD3 humanizado

Para proceder a avaliação dos elementos Z-DNA e do intracóporo anti-Z22NLS na influência da expressão gênica utilizando microscopia e citometria de fluxo foi realizada uma fusão da proteína GFP à porção Fc do anticóporo anti CD3 humanizado (Figura 11). Nessa fusão foram adicionados os sítios para as enzimas Xho I e EcoR I para serem clonados nos vetores pCO e pCO Δ 600, nos quais Xho I se localiza na extremidade 3' da porção Fc e a EcoR I na extremidade 5' de GFP. Dentro dessa fusão Fc-GFP foi adicionado um único sítio de BamH I, este sítio não esta presente nos vetores que albergarão a fusão. Dessa forma, BamH I servia para validar os resultados das clonagens desse gene repórter (Figuras 11 e 12). A sequencia que codifica para GFP se encontra a partir do sítio de BamH I na direção 5'.

BioEdit version 7.0.9.0 (6/27/07) Restriction Mapping Utility
(c)1998, Tom Hall

nova fusao FvFc Restriction Map
15/6/2013 15:13:47
1440 base pairs
Translations: 1

Restriction Enzyme Map:

```

      L E I K D K T H T C P P C P A P E L L G G P S V F L F
1    CTCGAGATTAAGGATAAACTCACACATGCCACCCTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTT 80
1    GAGCTCTAATTCCTATTTTGTAGTGTGTACGGGTGGCAGGGTCTGGACTTGAGGACCCCCCTGGCAGTCAGAAGGAGAA 80
      XhoI                               BseYI

      P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S H E
81   CCCCCAAAACCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGACCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAAG 160
81   GGGGGGTTTTGGGTTCCTGTGGGAGTACTAGAGGGGCTGGGACTCCAGTGTACGCACCACCACCTGCACCTCGGTGCTTC 160
      BspHI                               BmgBI

      D P E V K F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q Y
161  ACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGCAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTAC 240
161  TGGACTCCAGTTCAAGTTGACCATGCACCTGCCACCTCCACGTATTACGGTTCGTGTTTCGGCGCCCTCCTCGTCATG 240
      SacII

      N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K C K V
241  AACAGCACGTACCGTGTGGTCCAGCGTCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGT 320
241  TTGTCGTGATGGCACACCAGTCGCAGGAGTGGCAGGACTGGTCTGACCCGACTTACCGTTCCTCATGTTTACAGTTC 320

      S N K A L P A P I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y
321  CTCCAACAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTATA 400
321  GAGGTTGTTTCGGGAGGGTCTGGGGTAGCTCTTTTGGTAGAGGTTTCGGTTTCCCGTCCGGGGCTCTTGGTGTCCACATAT 400
      BseYI                               BstZ17I

      T L P P S R D E L T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D
401  CCCTGCCCCATCTCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGACCGCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGAC 480
401  GGGACGGGGTAGAGCCCTACTCGACTGGTTCCTGGTCCAGTCCGACTGGACGGACAGTTTCCGAAGATAGGGTCCGCTG 480
      BseYI

      I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G S
481  ATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGACGGCGGAGAACTACAAGACCACGCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTC 560
481  TAGCGGCACCTCACCTCTCGTTACCCGTCGCCTCTTGTGATGTTCTGGTGGGAGGGCACGACCTGAGGCTGCCGAG 560

      F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H
561  CTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCGGGAAACGCTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATG 640
561  GAAGAAGGAGATGTCGTTTCAGTGGCACCTGTTCTCGTCCACCGTCGTCCTTGCAGAAGAGTACGAGGCACTACGTAC 640
      BfrBI
      NsiI

      E A L H N H Y T Q K S L S L S P G K G G S K G E E L F
641  AGGCTCTGCACAACCACTACCGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAGGGCGGATCCAAAGGAGAGGAGCTGTT 720
641  TCCGAGACGTGTTGGTGTGTCGCTCTTCTCGGAGAGGGACAGAGGCCATTTCCGCCTAGGTTTCTCTCCTCGACAAG 720
      BamHI

```

```

T G V V P I L V E L D G D V N G H K F S V S G E G E G
721 ACCGGAGTGGTGCCTATCCTGGTGGAGCTGGACGGAGACGTGAACGGACACAAATTCCTGTGTCTGGAGAGGGAGAGGG 800
721 TGGCCTCACACGGATAGGACCACCTCGACCTGCCTCTGCACCTGCCTGTGTTTAAAGACACAGACCTCTCCCTCTCCC 800
      BmgBI

D A T Y G K L T L K F I C T T G K L P V P W P T L V
801 AGACGCTACCTACGGAAAAGTACCCTGAAATTCATCTGCACCACCGAAAAGTGCCTGTGCCTTGGCCTACCTCGGTGA 880
801 TCTGCATGGATGCCTTTTACTGGGACTTTAAGTAGACGTGGTGGCCTTTTACGGACACGGAAACGGATGGGACCACT 880

T T L G Y G V Q C F S R Y P D H M K R H D F F K S A M
881 CCCCTGGGATACGGAGTGCAGTGCCTTCTCCAGATACCCTGACCACATGAAAAGACACGACTTCTTCAAATCTGCTATG 960
881 GGTGGGACCCATGCCTCACGTCACGAAGAGGTCTATGGGACTGGTGTACTTTTCTGTGCTGAAGAAGTTTAGACGATAC 960

P E G Y V Q E R T I S F K D D G N Y K T R A E V K F E
961 CCTGAGGGATACGTGCAGGAGAGAACCATCTCTTTCAAAGACGACGGAAAAGTACAAAACAGAGCTGAGGTGAAATTCGA 1040
961 GGACTCCCTATGCACGCTCTCTCTGGTAGAGAAAGTTTCTGCTGCCTTTGATGTTTTGGTCTCGACTCCACTTTAAGCT 1040
      BbvCI

G D T L V N R I E L K G I D F K E D G N I L G H K L
1041 GGGAGACCCCTGGTGAACAGAAATCGAGCTGAAAGGAATCGACTTCAAAGAGGACGGAAACATCCTGGGACACAAACTGG 1120
1041 CCCTCTGTGGGACCACTTGTCTTAGCTCGACTTTCCTTAGCTGAAAGTTTCTCCTGCCTTTGTAGGACCTGTGTTTGACC 1120

E Y N Y N S H N V Y I T A D K Q K N G I K A N F K I R
1121 AGTACAACATAACTCTCACAACGTCTACATCACCGCTGACAAACAGAAAACGGAAATCAAAGCTAACTTCAAATCAGA 1200
1121 TCATGTTGATGTTGAGAGTGTGACAGATGAGTGGCGACTGTTTGTCTTTTGCCTTAGTTTCGATTGAAGTTTGTAGTCT 1200

H N I E D G S V Q L A D H Y Q Q N T P I G D G P V L L
1201 CACAACATCGAGGACGGATCTGTGCAGCTGGCTGACCACTACCAGCAGAACCCCTATCGGAGACGGACCTGTGCTGCT 1280
1201 GTGTTGATGCTCCTGCCTAGACACGTGCACCGACTGGTGTGTCGTCTTGTGGGATAGCCTCTGCCTGGACACGACGA 1280
      PvuII

P D N H Y L S T Q S A L S K D P N E K R D H M V L L
1281 GCCTGACAACCACTACCTGTCTACCCAGTCTGCTCTGTCTAAAGACCCTAACGAGAAAAGACACATGGTGTGCTGG 1360
1281 CGGACTGTTGGTGTGACAGATGGGTCAGACGAGACAGATTTCTGGGATTGCTCTTTTCTCTGGTGTACCACGACGACC 1360

E F V T A A G I T H G M D E L Y K * V R R Q S L V N S
1361 AGTTCGTGACCCGCTGCTGGAATCACCCACGGAAATGGACGAGCTGTATAAATGAGTGCACGGCAATCACTAGTGAATTCG 1440
1361 TCAAGCACTGGCGACGACCTTAGTGGGTGCCTTACCTGCTCGACATATTTACTCACGCTGCCCTTAGTGATCACCTAAGC 1440
      SpeI
      EcoRI

```

Figura 11. **Seqüência da fusão Fc-GFP.** É mostrada a seqüência completa da fusão Fc-GFP. Acima da seqüência de nucleotídeos está representada a seqüência deduzida de aminoácidos da respectiva proteína de fusão. Em amarelo está indicada a seqüência utilizada na validação das clonagens através do sequenciamento.

Após os procedimentos de clonagem foram realizadas digestão de vários clones obtidos com a enzima BamH I. A linearização do DNA plasmidial dos clones escolhidos para análise indica a clonagem da fusão gênica FvFc-aCD3-GFP, que foi empregada como gene repórter no presente estudo. A fim de confirmar o provável clone positivo (Figura 12 e 13) nova digestão foi realizada onde foi possível visualizar a confirmação do clone positivo pela digestão com a enzima Hind III que liberou um fragmento de aproximadamente 2477 pb, como pode ser visualizado abaixo.

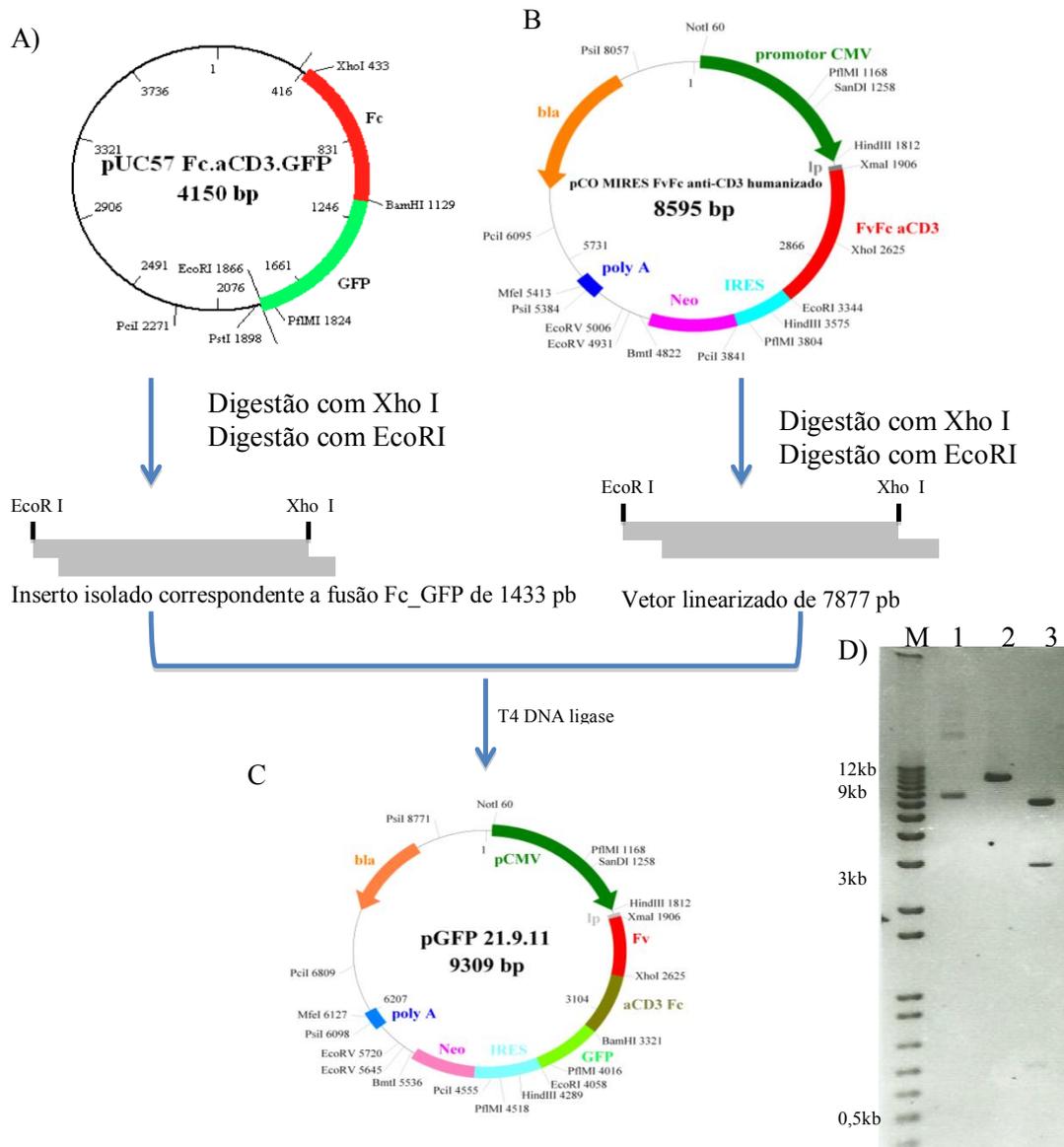


Figura 12. **Esquema de clonagem da fusão Fc_GFP no vetor pCO e perfil de restrição do vetor resultante pGFP.** A) mapa esquemático do vetor pUC 57 Fc.aCD3.GFP. B) mapa esquemático do vetor pCO. Abaixo o resultado da digestão dos vetores com as enzimas EcoR I e Xho I liberando o vetor pCO sem o fragmento Fc e o inserto contendo o fragment Fc_GFP. C) Mapa do novo vetor construído, contém o gene repórter aCD3_GFP. D) Validação da nova construção analisado por eletroforese em gel de agarose 0,8 % (p/v), amostra M, Marcador de Massa Molecular 1 kb Plus (Invitrogen); 1, vetor intacto; 2, digestão com enzima BamH I apenas lineariza o vetor; 3, vetor digerido com Hind III libera fragment de 2477 pb. Os números ao lado da foto se referem ao tamanho das bandas do marcador. Siglas – pCMV: promotor de citomegalovirus completo com Intron A. Ip: peptídeo sinal. Fv: fragmento variável cadeia simples de aCD3. aCD3 Fc: fragmento cristalizável. GFP: do inglês, Green Fluorescent Protein. IRES: sítio de entrada ribossomal interno. Neo: gene de resistência ao antibiótico G418, poly A: sinal de poliadenilação. Bla: gene de resistência a ampicilina para clonagem em sistema bacteriano.

4. Fusão da porção Fc de aCD3 humanizado à proteína GFP e montagem do gene de expressão no vetor pCO Δ 600 aCD3 humanizado

A estratégia de clonagem foi idêntica a utilizada para o vetor pCO. Portanto para proceder a avaliação do efeito dos elementos Z-DNA e do intracampo anti-Z22NLS na expressão gênica utilizando a microscopia e a citometria de fluxo a proteína de fusão Fc-GFP foi clonada no vetor pCO Δ 600 (Figura 13a).

Após os procedimentos de clonagem foram realizadas digestão de vários clones obtidos com a enzima BamH I, clones que apresentavam perfil linear na análise eletroforética eram tidos como positivos. A fim de confirmar o clone positivo, nova digestão foi realizada onde foi possível visualizar a confirmação do clone positivo pela digestão com a enzima Hind III que liberou um fragmento de aproximadamente 2477 pb, como pode ser visualizado abaixo (Figura 13d).

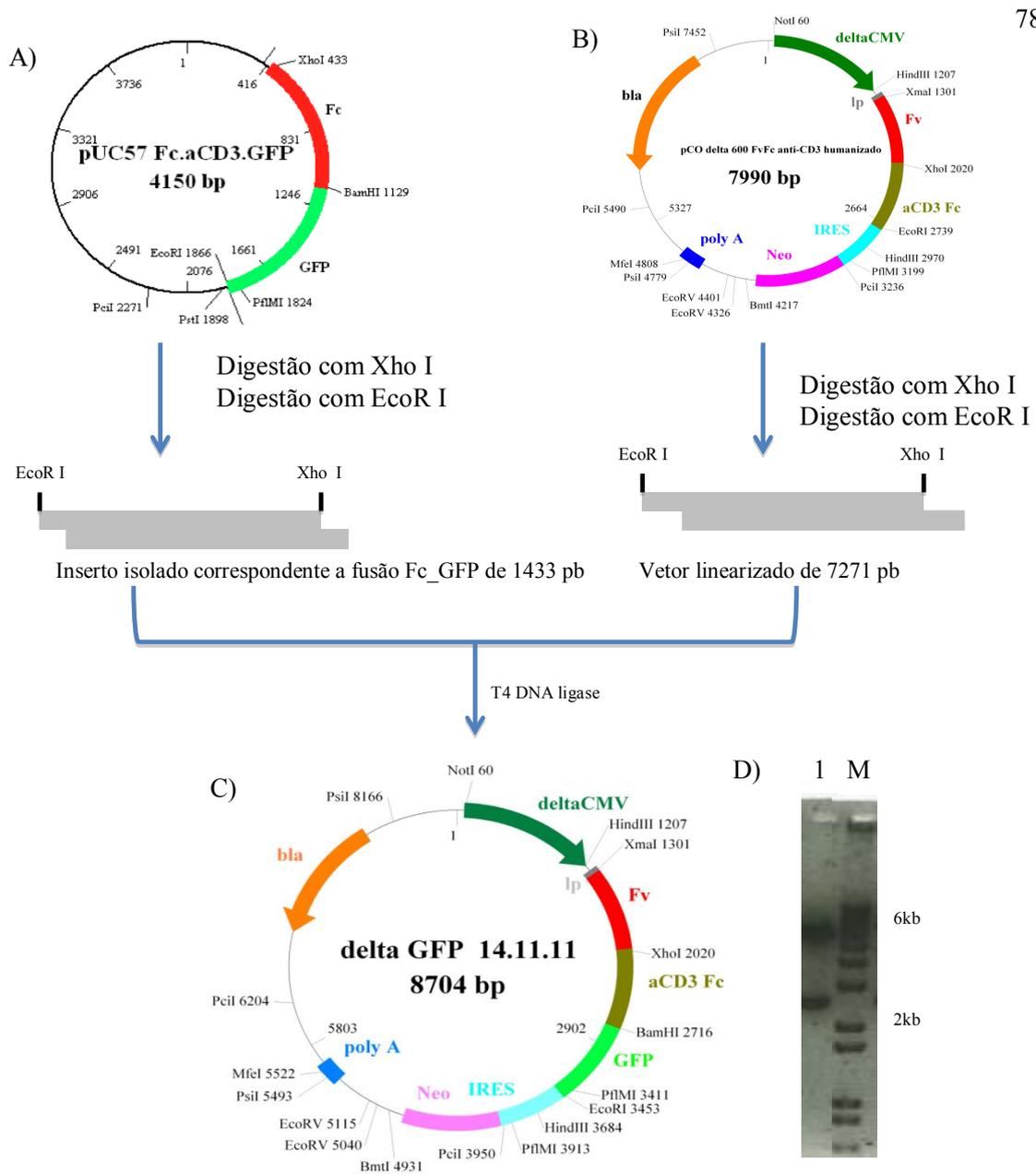


Figura 13. **Esquema de clonagem da fusão Fc_GFP no vetor pCO Δ 600 e perfil de restrição do vetor resultante Δ GFP.** A) mapa esquemático do vetor pUC 57 Fc.aCD3.GFP. B) mapa esquemático do vetor pCO Δ 600. Abaixo o resultado da digestão dos vetores com as enzimas EcoR I e Xho I liberando o vetor pCO Δ 600 linearizado sem o fragmento Fc e o inserto contendo o fragmento Fc_GFP. C) Mapa do novo vetor construído, contém o gene repórter aCD3_GFP. D) Validação da nova construção analisado por eletroforese em gel de agarose 0,8% (p/v), amostra M, Marcador de Massa Molecular 1 kb Plus (Invitrogen); 1, vetor digerido com Hind III libera fragmento de 2477 pb. Os números ao lado da foto se referem ao tamanho das bandas do marcador. Siglas – deltaCMV: promotor de citomegalovirus com Intron A deletado em 600 pb. I_p: peptídeo sinal. Fv: fragmento variável cadeia simples de aCD3. aCD3 Fc: fragmento cristalizável. GFP: do inglês, Green Fluorescent Protein. IRES: sítio de entrada ribossomal interno. Neo: gene de resistência ao antibiótico G418, poly A: sinal de poliadenilação. Bla: gene de resistência a ampicilina para clonagem em sistema bacteriano.

5. Obtenção e anelamento dos elementos formadores de Z-DNA

Os oligonucleotídeos com as seqüências controles e indutoras de Z-DNA estão listados na tabela 2. O anelamento dos oligonucleotídeos chamados For e Rev foi feito utilizando 50 ng de cada um, tampão de anelamento (100 mM tris pH8.0, 50mM MgCl₂), e um volume final de 50µl. As condições estabelecidas para o anelamento foram as seguintes: 88°C por dois minutos, 65°C por 10 minutos, 37°C por 10 minutos e por fim temperatura ambiente por 1 hora. A configuração esperada para cada anelamento pode ser visualizada na figura 14. Esses elementos de seqüência foram elaborados de modo que ambas as extremidades possuíssem seqüências coesivas compatíveis com o sítio de clonagem Not I, presentes na forma de sítio único nos vetores pCO (Figura 9a, 12b).

Os óligos Z-DNA foram desenhados de forma que, após a clonagem nos vetores desenvolvidos, a extremidade 3' coesiva com o sítio de Not I* será convertido para o sítio Pci I (Figura 14). Essa esquematização foi muito importante para preservar apenas um sítio de Not I nos vetores resultantes e permitir a realização de um "screener" nos clones positivos para cada clonagem dos elementos Z-DNA nos novos vetores, pois nos vetores sem os óligos Z existe apenas dois sítios de Pci I, e após clonagem dos elementos Z os vetores resultantes possuem 3 sítios de Pci I.

Os óligos Z1 e Z3 foram criados a partir dos parâmetros característicos de alternância G.C indutores de Z-DNA e correspondem a trechos de DNA murino. O Z2 é o Z1 embaralhado. O Z4 foi imunoprecipitado com anti-Z-DNA. O Z5 é um controle negativo com trecho do gene GAPDH. A escolha desse elementos se basearam em evidências biológicas (Quilici, 2008; Silva, 2010).

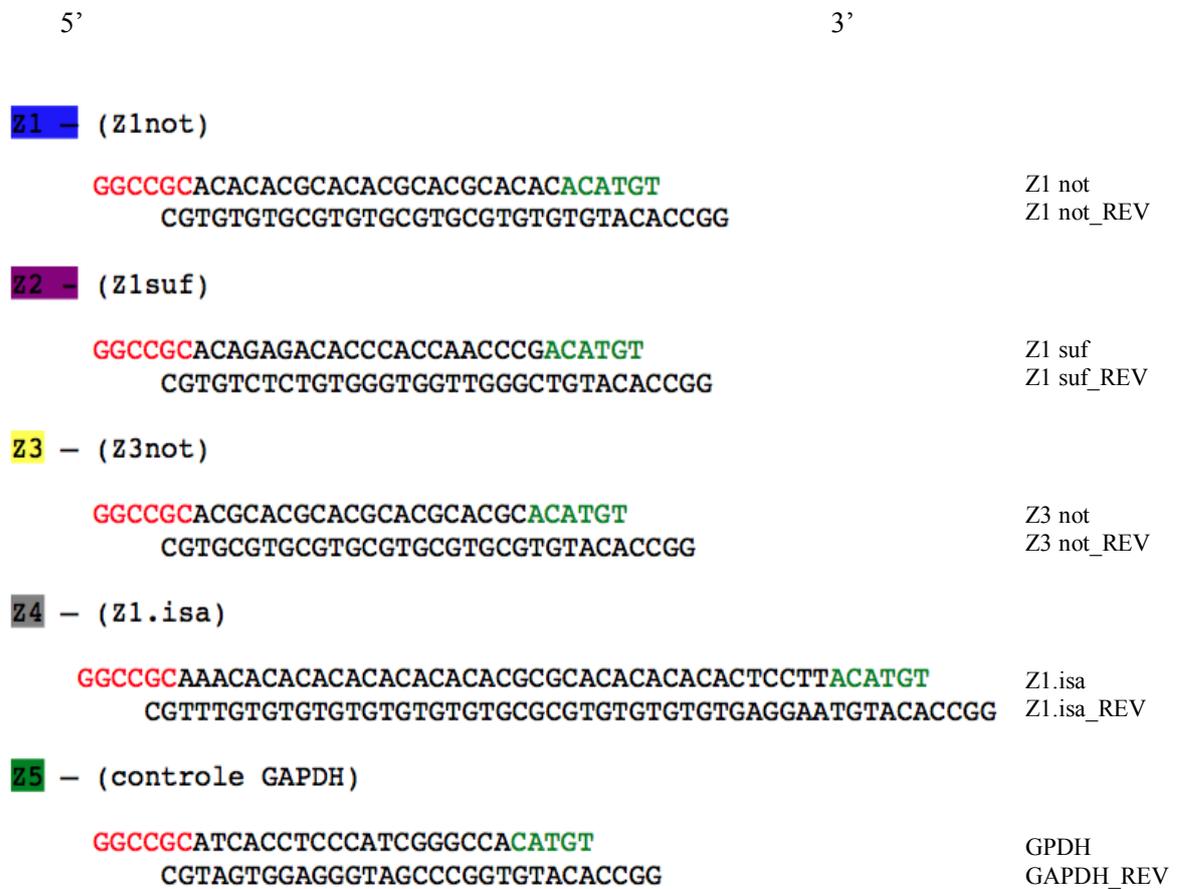


Figura 14. **Representação esquemática dos elementos Z-DNA anelados.** Em vermelho sítio de Not I e em verde sítio de Pci I. Ambas as extremidades possuem extremidades coesivos para Not I, porém apenas na região 3' após clonagem o sítio Not I se perde e mantém o de Pci I.

6. Clonagem dos elementos Z1, Z2, Z3, Z4 e Z5 nos vetores pCO Δ 600 aCD3_GFP e pCO aCD3_GFP

Apos obtenção dos vetores delta_GFP e pGFP (figura 15a, 15b) as sequencias potencialmente indutoras de Z-DNA (Z1, Z3 e Z4) e as não indutoras (Z2 e Z5) foram inseridas na extremidade 5' de cada vetor. Isso foi realizado a fim de verificar a influência desses elementos na expressão gênica, pois diversos estudos têm mostrado que estruturas de Z-DNA próximo ao sítio de iniciação da transcrição pode aumentar o nível de expressão do gene a jusante (Yang et al., 2012; Schroth, 1992; Li et al., 2009; Kwon e Rich, 2005). As figuras 15, 16, 17, 18 e 19 mostram o esquema de clonagem de cada um dos cinco elementos nos vetores pCO Δ 600 aCD3_GFP e pCO aCD3_GFP, originando dessa forma dez novos vetores de expressão.

Diferentemente das seqüências Z1, Z3 e Z4 que possuem alternâncias de purinas e pirimidinas, as seqüências Z2 e Z5 não possui esse padrão de repetições. Com isso, estas seqüências não devem induzir a formação de Z-DNA, mas funcionam apenas como um controle para a manipulação do vetor, sendo seqüências introduzidas no mesmo sítio de clonagem das demais seqüências de interesses desse estudo.

Com a análise das figuras 15, 16, 17, 18 e 19 observa-se que a digestão dos vetores delta_GFP e pGFP com a enzima de restrição Not I apenas lineariza o vetor, preservando todos os sítios de clonagens e o promotor com seus sítios de ligação, como foi representado na figura 3 da Introdução. Após a digestão dos vetores com a enzima Not I, o vetor linearizado e os oligonucleotídeos (anelados) foram ligados com a enzima T4 DNA ligase. Depois o sistema de ligação foi transformado em células XL10 gold por choque térmico. Os clones transformantes foram analisados por digestão com a enzima de restrição Pci I para validar a clonagem do óligo e garantir a obtenção dos vetores finais desse trabalho, pZ1, pZ2, pZ3, pZ4, pZ5, Δ Z1, Δ Z2, Δ Z3, Δ Z4 e Δ Z5.

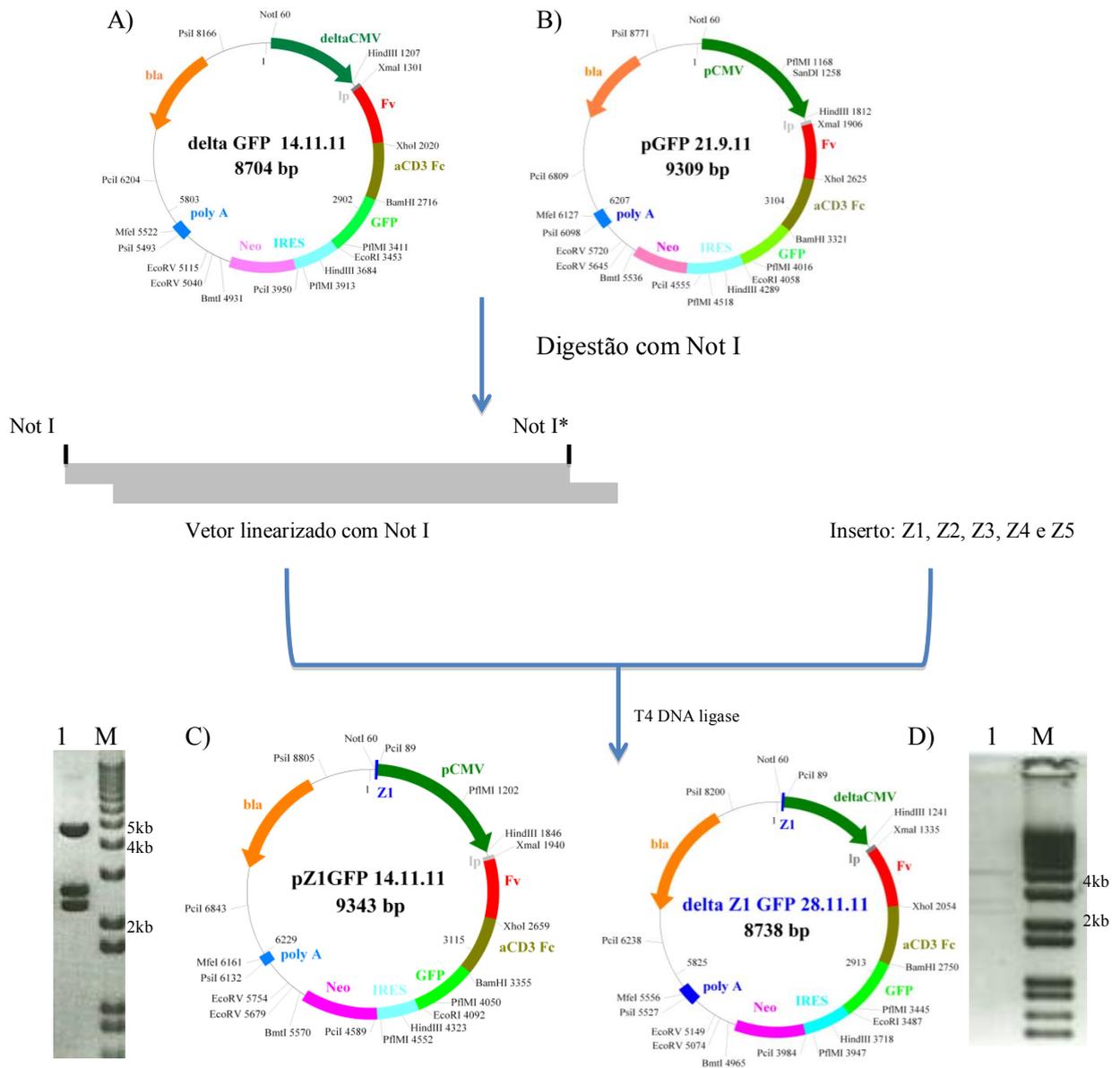


Figura 15. **Esquema da clonagem dos elementos Z1, Z2, Z3, Z4 e Z5 nos vetores pCO Δ 600 aCD3_GFP e pCO aCD3_GFP.** A) mapa esquemático do vetor delta GFP. B) mapa esquemático do vetor pGFP. No meio, digestão dos vetores com a enzima Not I lineariza os vetores, cada um dos dois vetores é ligado com o inserto (elemento Z1) através da T4 DNA ligase. O resultado obtido foi analisado por eletroforese em gel de agarose 0,8% (p/v). C) Mapa do vetor resultante pZ1 e ao lado digestão do vetor com enzima Pci I libera 3 bandas de 4500 pb, 2589 pb e 2254 pb – Amostra M, Marcador de Massa Molecular 1 kb Plus (Invitrogen); 1, vetor digerido com Pci I. D) Mapa do vetor resultante Δ Z1 e ao lado digestão do vetor com enzima Pci I libera 3 bandas de 3895 pb, 2589 pb e 2254 pb – Amostra M, Marcador de Massa Molecular 1 kb Plus (Invitrogen); 1, vetor digerido com PciI. Os números ao lado da foto se referem ao tamanho das bandas do marcador. Siglas – deltaCMV: promotor de cytomegalovirus com deleção de 600 pb. Ip: peptídeo sinal. Fv: fragmento variável cadeia simples de aCD3. aCD3 Fc: fragmento cristalizável. IRES: sítio de entrada ribossomal interno. Neo: gene de resistência ao antibiótico G418, poly A: sinal de poliadenilação. Bla: gene de resistência a ampicilina para clonagem em sistema bacteriano.

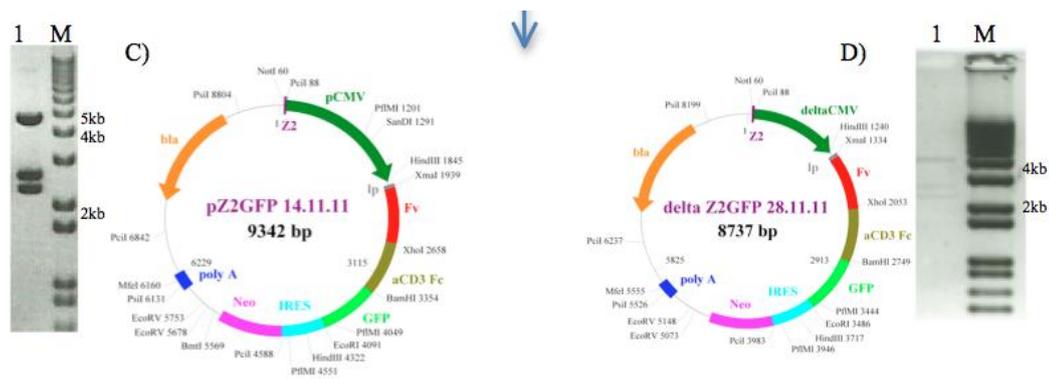


Figura 16. **Análise da clonagem do elemento Z2 nos vetores pCO Δ 600 aCD3_GFP e pCO aCD3_GFP.** C) Mapa do vetor resultante pZ2 e ao lado digestão do vetor com enzima Pci I libera 3 bandas de 4500 pb, 2589 pb e 2254 pb – Amostra M, Marcador de Massa Molecular 1 kb Plus (Invitrogen); 1, vetor digerido com Pci I. D) Mapa do vetor resultante Δ Z2 e ao lado digestão do vetor com enzima Pci I libera 3 bandas de 3895 pb, 2589 pb e 2254 pb – Amostra M, Marcador de Massa Molecular 1 kb Plus (Invitrogen); 1, vetor digerido com Pci I. Siglas – deltaCMV: promotor de citomegalovirus com deleção de 600 pb. Ip: peptídeo sinal. Fv: fragmento variável cadeia simples de aCD3. aCD3 Fc: fragmento cristalizável. IRES: sítio de entrada ribossomal interno. Neo: gene de resistência ao antibiótico G418, poly A: sinal de poliadenilação. Bla: gene de resistência a ampicilina para clonagem em sistema bacteriano.

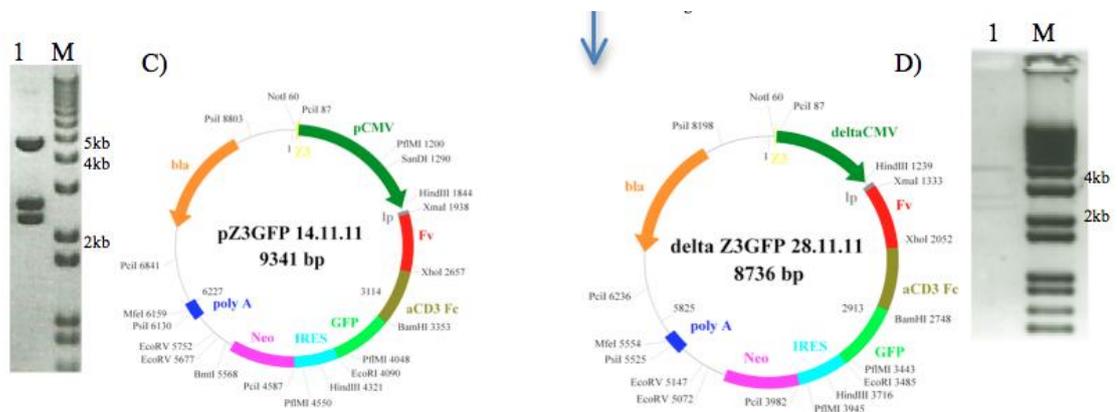


Figura 17. **Análise da clonagem do elemento Z3 nos vetores pCO Δ 600 aCD3_GFP e pCO aCD3_GFP.** C) Mapa do vetor resultante pZ3 e ao lado digestão do vetor com enzima Pci I libera 3 bandas de 4500 pb, 2589 pb e 2254 pb – Amostra M, Marcador de Massa Molecular 1 kb Plus (Invitrogen); 1, vetor digerido com Pci I. D) Mapa do vetor resultante Δ Z3 e ao lado digestão do vetor com enzima Pci I libera 3 bandas de 3895 pb, 2589 pb e 2254 pb – Amostra M, Marcador de Massa Molecular 1 kb Plus (Invitrogen); 1, vetor digerido com Pci I. Siglas – deltaCMV: promotor de citomegalovirus com deleção de 600 pb. Ip: peptídeo sinal. Fv: fragmento variável cadeia simples de aCD3. aCD3 Fc: fragmento cristalizável. IRES: sítio de entrada ribossomal interno. Neo: gene de resistência ao antibiótico G418, poly A: sinal de poliadenilação. Bla: gene de resistência a ampicilina para clonagem em sistema bacteriano.

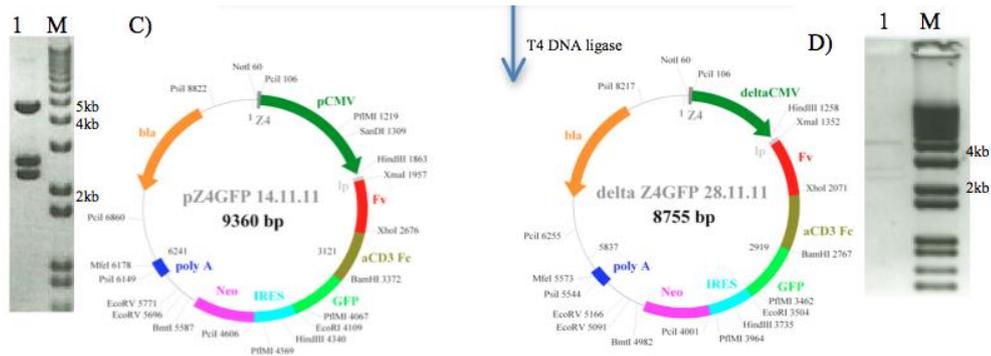


Figura 18. **Análise da clonagem do elemento Z4 nos vetores pCO Δ 600 aCD3_GFP e pCO aCD3_GFP.** C) Mapa do vetor resultante pZ4 e ao lado digestão do vetor com enzima Pci I libera 3 bandas de 4500 pb, 2589 pb e 2254 pb – Amostra M, Marcador de Massa Molecular 1 kb Plus (Invitrogen); 1, vetor digerido com Pci I. D) Mapa do vetor resultante Δ Z4 e ao lado digestão do vetor com enzima Pci I libera 3 bandas de 3895 pb, 2589 pb e 2254 pb– Amostra M, Marcador de Massa Molecular 1 kb Plus (Invitrogen); 1, vetor digerido com Pci I. Siglas – deltaCMV: promotor de citomegalovirus com deleção de 600 pb. Ip: peptídeo sinal. Fv: fragmento variável cadeia simples de aCD3. aCD3 Fc: fragmento cristalizável. IRES: sítio de entrada ribossomal interno. Neo: gene de resistência ao antibiótico G418, poly A: sinal de poliadenilação. Bla: gene de resistência a ampicilina para clonagem em sistema bacteriano.

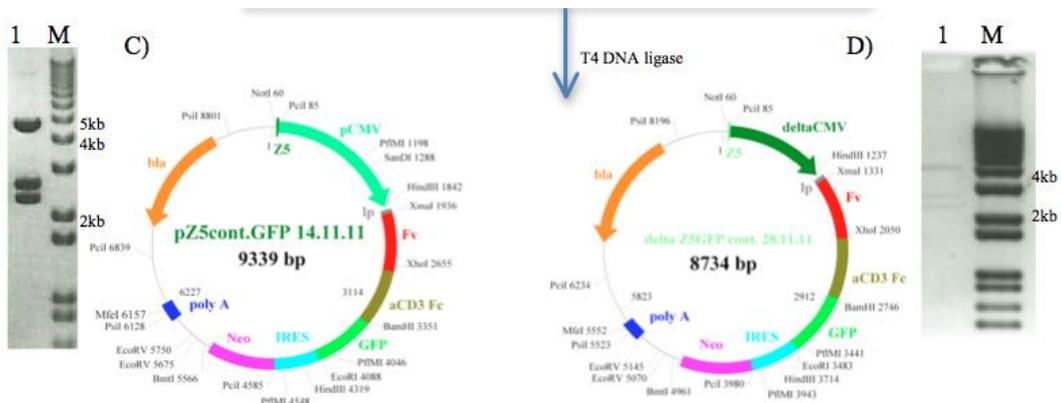


Figura 19. **Análise da clonagem do elemento Z5 nos vetores pCO Δ 600 aCD3_GFP e pCO aCD3_GFP.** C) Mapa do vetor resultante pZ5 e ao lado digestão do vetor com enzima Pci I libera 3 bandas de 4500 pb, 2589 pb e 2254 pb – Amostra M, Marcador de Massa Molecular 1 kb Plus (Invitrogen); 1, vetor digerido com Pci I. D) Mapa do vetor resultante Δ Z5 e ao lado digestão do vetor com enzima Pci I libera 3 bandas de 3895 pb, 2589 pb e 2254 pb– Amostra M, Marcador de Massa Molecular 1 kb Plus (Invitrogen); 1, vetor digerido com Pci I. Siglas – deltaCMV: promotor de citomegalovirus com deleção de 600 pb. Ip: peptídeo sinal. Fv: fragmento variável cadeia simples de aCD3. aCD3 Fc: fragmento cristalizável. IRES: sítio de entrada ribossomal interno. Neo: gene de resistência ao antibiótico G418, poly A: sinal de poliadenilação. Bla: gene de resistência a ampicilina para clonagem em sistema bacteriano.

7. Sequenciamento do inserto aCD3_GFP de todos os 10 vetores de expressão construídos: 5 construções pCO (pZ1, pZ2, pZ3, pZ4 e pZ5) e 5 construções pCO Δ 600 (Δ Z1, Δ Z2, Δ Z3, Δ Z4 e Δ Z5)

Essas dez preparações plasmidiais foram obtidas através do kit QIAGEN Plasmid Midi. Esse cuidado é importante para garantir uma boa qualidade do DNA plasmidial, crucial para o sequenciamento e para as transfecções. Todos os clones foram sequenciados utilizando-se os primers 6240 forward e 8202_REV (Tabela 2, Materiais e Métodos). Em todos os vetores o primer 6240 forward se anela no CH3 de aCD3 e o primer 8202_REV se anela no elemento Ires Neo. Isso permitiu sequenciar a região onde foi inserido a fusão Fc_GFP nos novos vetores. Passo importante para confirmar a clonagem do gene repórter.

Após o sequenciamento, um fragmento da sequência original da fusão Fc_GFP foi utilizado como referência para alinhar com as seqüências advindas do sequenciador. Na figura 20 são mostrados os alinhamentos de um fragmento da fusão Fc_GFP dos clones obtidos para os vetores pZ1, pZ2, pZ3, pZ4, pZ5, Δ Z1, Δ Z2, Δ Z3, Δ Z4 e Δ Z5. Com isso ficou confirmado a presença do gene repórter nas novas construções.

```

CLUSTAL format alignment by MAFFT (v7.023b)
frag_pUC57_Fc_G actacaagaccacgcctcccgtgctggactccgacggctccttcttccctctacagcaagc
seq_pZ1_Fc_GFP  actacaagaccacgcctcccgtgctggactccgacggctccttcttccctctacagcaagc
seq_pZ2_Fc_GFP  actacaagaccacgcctcccgtgctggactccgacggctccttcttccctctacagcaagc
seq_pZ3_Fc_GFP  actacaagaccacgcctcccgtgctggactccgacggctccttcttccctctacagcaagc
seq_pZ4_Fc_GFP  actacaagaccacgcctcccgtgctggactccgacggctccttcttccctctacagcaagc
seq_pZ5_Fc_GFP  actacaagaccacgcctcccgtgctggactccgacggctccttcttccctctacagcaagc
seq_ΔZ1_Fc_GFP  actacaagaccacgcctcccgtgctggactccgacggctccttcttccctctacagcaagc
seq_ΔZ2_Fc_GFP  actacaagaccacgcctcccgtgctggactccgacggctccttcttccctctacagcaagc
seq_ΔZ3_Fc_GFP  actacaagaccacgcctcccgtgctggactccgacggctccttcttccctctacagcaagc
seq_ΔZ4_Fc_GFP  actacaagaccacgcctcccgtgctggactccgacggctccttcttccctctacagcaagc
seq_ΔZ5_Fc_GFP  actacaagaccacgcctcccgtgctggactccgacggctccttcttccctctacagcaagc
*****

```

Figura 20. **Alinhamento de um fragmento da fusão Fc_GFP.** Foi escolhido um segmento da sequência conhecida do repórter para realizar o alinhamento com o resultado do sequenciamento dos clones positivos de todas as construções.

8. Eficiência de transfecção com diferentes reagentes: Jet Pei, Jet Primer, Lipofectamina 2000 e Lipofectamina LTX

Células de mamíferos são amplamente usadas para produzir proteínas heterólogas recombinantes para produção farmacêutica (Wurm, 2004). A linhagem celular que tem se mostrado mais favorável para a produção de biofarmacêuticos é a CHO (Li, Menzel et al., 2007). Por esse motivo decidimos testar a atividade dos elementos Z-DNA e do intracóporo Z22NLS sobre a expressão heteróloga de fragmentos de anticorpos nessa linhagem.

Para verificar o melhor método de transfecção utilizamos uma das construções, pZ1, para transfectar de forma transiente as células. Para isso foi utilizado quatro reagentes diferentes, JetPRIME, Jet PEI, Lipofectamina 2000 e Lipofectamina LTX. A transfecção foi realizada em placa de 6 poços e o protocolo empregado foi aquele descrito pelo fabricante (Material e Métodos 11.6 a 11.9).

Para verificar a eficiência de transfecção foi feita contagem do número de células que apresentaram fluorescência de GFP, após 48 h do ensaio de transfecção, num campo de aproximadamente cem células (escolhido aleatoriamente). Na figura 21 é possível verificar que a eficiência de transfecção era baixa, sendo que o melhor resultado foi para a lipofectamina LTX com aproximadamente 10 % de eficiência. Curiosamente é possível notar que a lipofectamina 2000 teve resultado de 0 % de eficiência, acredita-se que esse fato ocorreu devido ao kit apresentar data de validade vencida há mais de um ano. Para cada tipo de plasmídeo e linhagem celular tem sido relatada a necessidade de otimização da transfecção. Como os estudos do efeito de Z-DNA utilizaram um vetor com a informação gênica para codificar um fragmento de anticorpo contra o DNA, o desafio de estabelecer uma estratégia que eficientemente produziu a transfecção desta linhagem celular foi a primeira etapa deste trabalho.

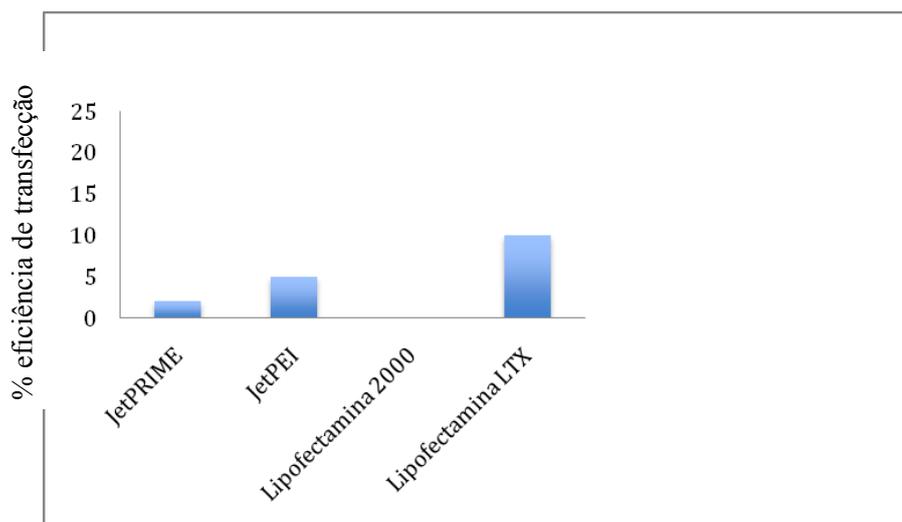


Figura 21. **Porcentagem de células CHO-K1 transfectadas com uma construção, pZ1, utilizando diferentes reagentes.** O eixo X mostra os diferentes veículos utilizados para transfectar as células, o eixo Y contém os valores de porcentagem de células GFP+.

9. Teste com BFA (inibidor de secreção protéica) sobre a eficiência e aumento da fluorescência de células transfectadas com as novas construções.

A detecção, por citometria de fluxo, de células emitindo fluorescência de cor verde, é indicativo da expressão do gene repórter GFP. A quantidade relativa de células que expressaram a proteína GFP permitiu a avaliação do sucesso da transfecção em cada um dos casos, uma vez que a fluorescência indica que o plasmídeo conseguiu entrar na célula, ultrapassar as barreiras lisossomais e citoplasmáticas e penetrar no núcleo. Porém a quantidade de células que apresentavam fluorescência era muito baixa, e como o gene repórter deste estudo possui um sinal de endereçamento para secreção, pensou-se que esse baixo número de células GFP+ poderia ocorrer devido à secreção da proteína GFP com consequente perda de fluorescência.

Foi descrito que a exposição de células de mamíferos a uma concentração de 0,3 μM de brefeldina A (inibidor de secreção) por cerca de 3 horas aumentava a quantidade intracelular de proteínas (Nylander e Kaliesr, 1999). Por isso foi testado a atividade de BFA na concentração de 0,3 μM em dois tempos de exposição, 3h e 24h antes da aquisição no citômetro. As células transfectadas e expostas ao BFA foram analisadas pela citometria de fluxo 48h após a transfecção. Na figura 22

percebe-se que a eficiência de transfecção não sofreu influência entre a amostra não tratada e a que recebeu a exposição de BFA por 3h. No entanto é visível uma redução de 25 % na quantidade de células GFP+ quando a exposição a BFA foi de 24h.

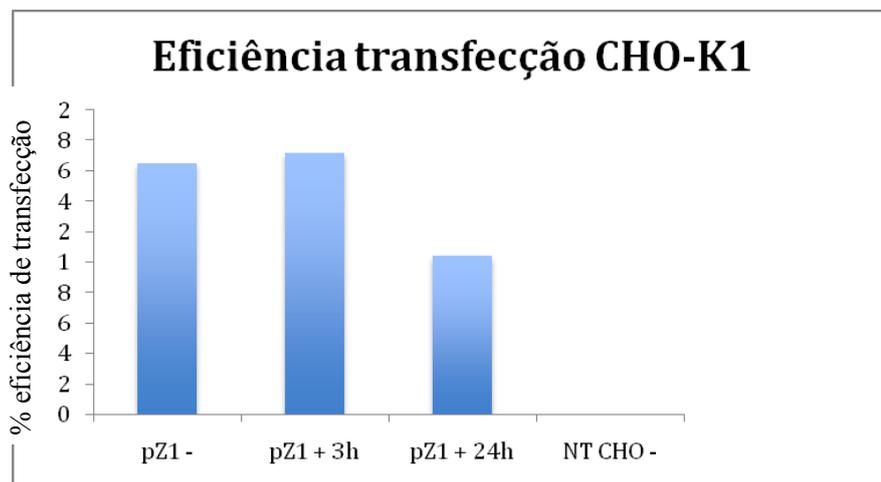


Figura 22. **Eficiência da transfecção utilizando 0,3 μ M de BFA em diferentes tempos de exposição utilizando a citometria de fluxo.** O eixo X mostra os diferentes tempos de exposição a 0,3 μ M de BFA, o eixo Y contém os valores de porcentagem de células GFP+. NT (não transfectado).

Também foi verificado a influência do mesmo tratamento com BFA na obtenção da mediana de intensidade de fluorescência (MFI). Esse parâmetro permite quantificar de forma absoluta, por meio da fluorescência analisada no citômetro de fluxo, a expressão do gene repórter. Como visto na figura 23 o tratamento com BFA por 3 h se mostrou indiferente quando em comparação com o não tratado.

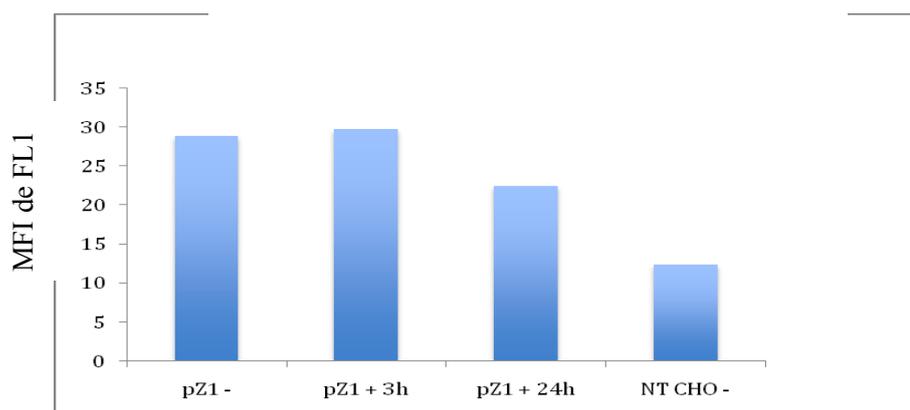


Figura 23. **Medida de MFI utilizando 0,3 μ M de BFA.** O eixo X mostra os diferentes tempos de exposição antes da aquisição no citômetro, o eixo Y contém os valores de MFI. NT (não transfectado).

10. Teste com diferentes proporções de lipofectamina LTX e DNA.

Como anteriormente verificamos que o reagente Lipofectamina LTX apresentava melhor resultado para transfectar as novas construções (figura 21). Ainda no intuito de, melhorar a eficiência de transfecção, pois a baixa eficiência prejudicaria as análises pela citometria de fluxo, foi elaborado teste com diferentes concentrações de lipofectamina LTX.

Foi realizado teste em placa de 24 poços com 4 quantidades diferentes de DNA, 250 ng, 500 ng (protocolo tradicional), 750 ng e 1000 ng, sendo que o melhor resultado foi para a amostra com 250 ng (Figura 24 e 25).

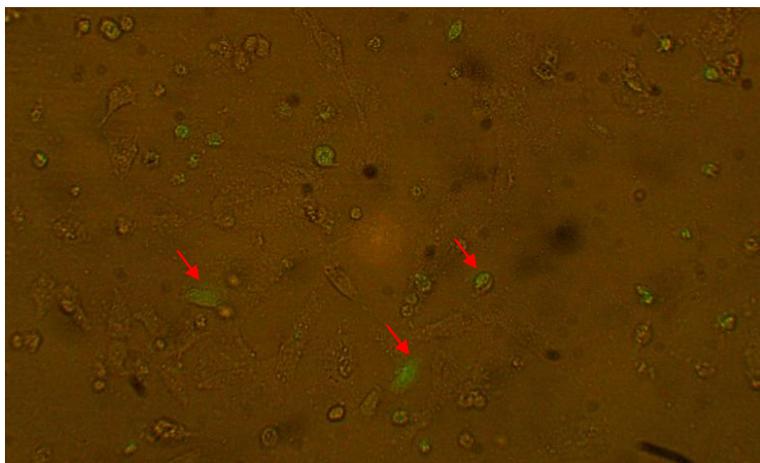


Figura 24. **Imagem de células transfectadas com a construção pZ1.** Imagem capturada com objetiva de 20X em uma placa de 24 poços.

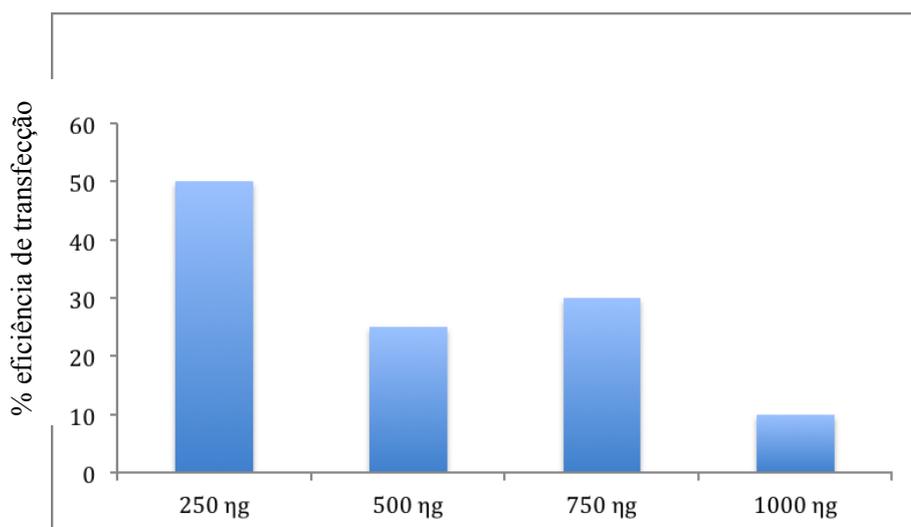


Figura 25. **Teste com diferentes concentrações de DNA.** Influência da quantidade de DNA sobre a eficiência de transfecção. O eixo X mostra as diferentes concentrações de DNA, o eixo Y contém os valores da eficiência de transfecção. Valores em porcentagem obtido da contagem de células fluorescentes em campo microscópico.

Com base no resultado anterior onde foi otimizada a quantidade de DNA a ser utilizada na transfecção, também para tentar melhorar a transfecção foi elaborado um ensaio em placa de 24 poços, utilizando 250 ng de DNA do plasmídeo pZ1 por

poço e seis quantidades diferentes de reagente lipofectamina LTX, partindo de 0,25 μ L (1:1) até 1,5 μ L (1:6). Na figura 26 é possível notar que o melhor resultado foi para a concentração de 1:1, ou seja, 250 ng de DNA e 0,25 μ L de reagente Lipofectamina LTX.

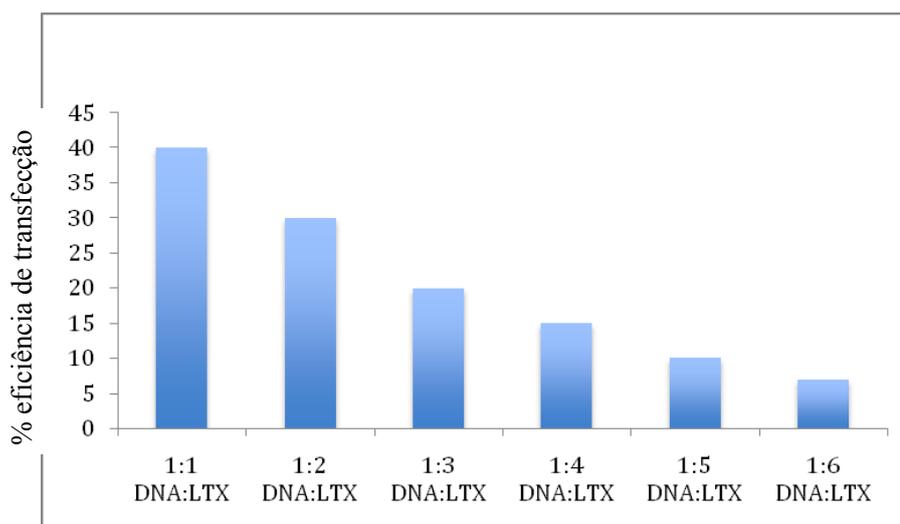


Figura 26. **Teste com diferentes proporções de DNA: Regente Lipofectamina LTX.** Influência na eficiência de transfecção. O eixo X mostra as diferentes proporções de DNA: reagente lipofectamina LTX, o eixo Y contém os valores da eficiência de transfecção

11. Padronização das análises das amostras pela citometria de fluxo.

A citometria de fluxo é uma técnica que permite a análise de propriedades físicas e biológicas de populações e sub-populações celulares (Bacal e Faulhaber, 2003). Um dos fundamentos desta metodologia é a capacidade de mensurar propriedades de células individuais, através do emprego de radiação laser, fluxo hidrodinâmico, óptica, substâncias fluorescentes e recursos de informática (Bertho, 2007). Quando uma amostra em solução é injetada no citômetro de fluxo, as células são ordenadas de tal forma que uma única célula por vez seja interceptada por um laser, sendo que a dispersão de luz (scatter) e a emissão de fluorescência por células que foram marcadas com fluorocromos ou que expressam proteínas naturalmente fluorescentes fornecem informações sobre as propriedades destas células (Rahman, 2006).

Após todo o processo de otimização da transfecção foi realizado o experimento com as dez construções e a co-transfecção com vetor pMACIA Z22 NLS. Para isso foi utilizado placa de 6 poços e a proporção de DNA foi 1:4 do vetor com gene repórter para o vetor com Z22. Como controle da atividade de Z22 foi utilizado o vetor pMACIA vazio, dessa forma pode-se comparar o padrão de expressão das células transfectada de modo transiente com e sem o Z22NLS. Para medir o nível de expressão foi utilizado a citometria de fluxo. O nível médio de fluorescência (MFI) permitiu determinar a eficiência de cada promotor na presença e na ausência de Z22NLS, isto é, o efeito estabilizador de Z-DNA e o nível da expressão do gene repórter.

Na figura 27 mostra o padrão das células CHO adquirida pelo citômetro. A população escolhida através do “gate” foi analisada de acordo com a quantidade de fluorescência emitida pelas células GFP+ e adquirida pelo canal FL1 (FITC). Esse canal quantifica a emissão de fluorescência característica do repórter GFP.

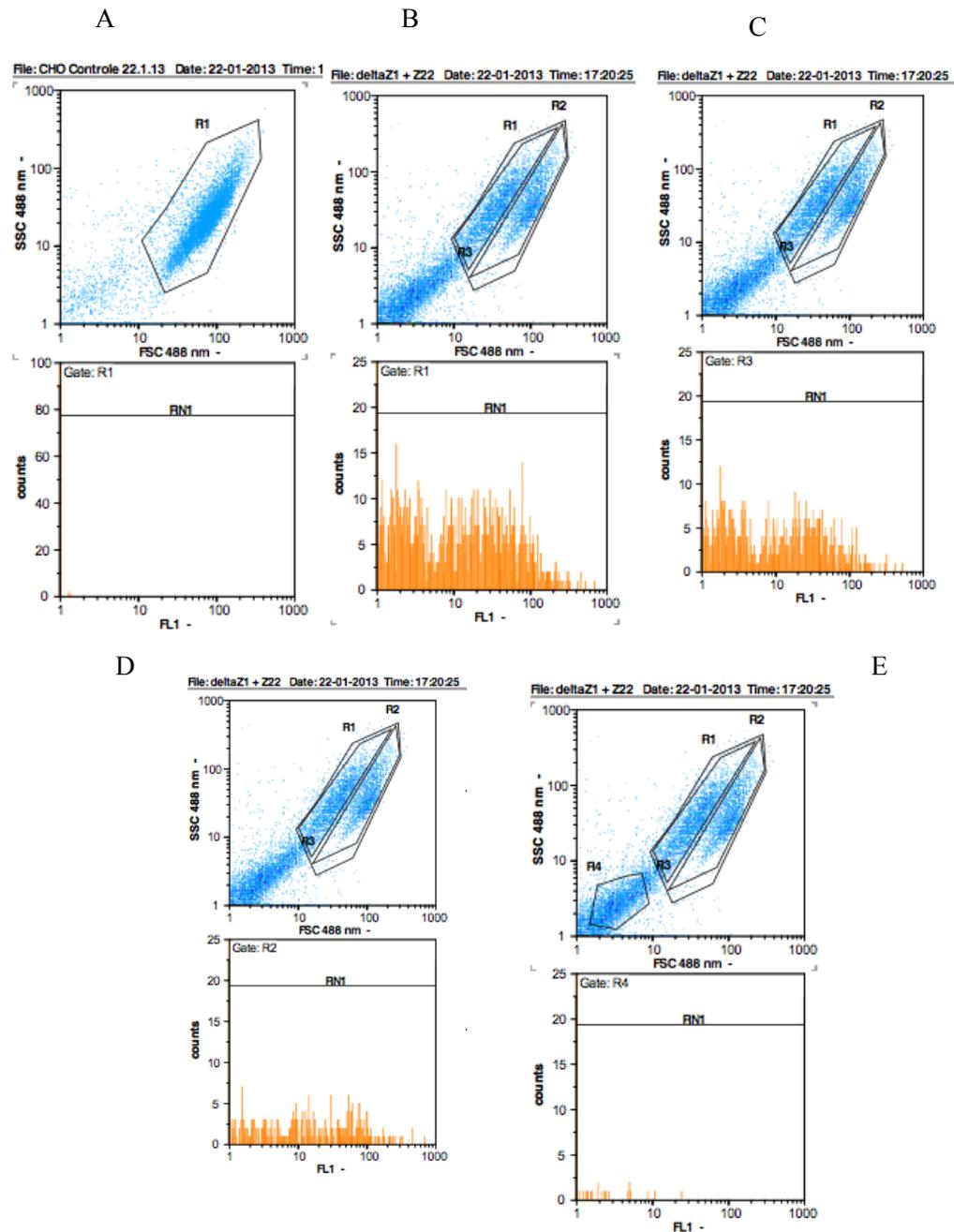


Figura 27. Imagem das regiões dos “Gates” de análise na citometria de fluxo. A) gate do controle CHO (não transfectado), mostra que não existe emissão de fluorescência no canal FL 1. B) Padrão de uma amostra transfectada. Em laranja gráfico das células GFP+, correspondendo ao gate R1, com o número de células (counts) no eixo Y e a de intensidade de fluorescência no eixo X. C), D) e E) mostra a emissão de fluorescência no canal FL 1 dos gates R3, R2 e R4 respectivamente.

12. Z22NLS estabiliza a conformação Z-DNA e aumenta a expressão do gene repórter.

Todas as construções de aCD3-GFP reporter foram transfectadas de forma transiente em células CHO-K1 e depois de 48 horas de transfecção, a fluorescência de GFP foi medida por citometria de fluxo (Partec). Para a transfecção foi utilizada uma placa de 6 poços e a proporção de DNA do vetor com gene repórter para o vetor com gene do intracoporo Z22NLS foi de 1:4. O vetor vazio pMACIA foi utilizado para controle da não expressão de Z22NLS. A mediana de fluorescência (MFI) permitiu determinar a eficácia de cada promotor na presença e ausência do intracoporo Z22NLS, ou seja, o efeito estabilizador de Z-DNA e elevação da expressão do gene repórter. O efeito da presença de Z22NLS sobre a expressão de GFP nos vetores repórter pCO contendo os elementos Z-DNA é mostrado na Figura 29.

Esses resultados corroboram Quilici (2008), quando demonstrou que a sequência indutora de Z-DNA Z3 era capaz de aumentar em aproximadamente 2,5 vezes a atividade da luciferase em comparação com a construção Z5. Ainda naquele estudo foi mostrado que a utilização do intracoporo scFvZ22NLS em clones estáveis de Z3 e Z5 em CHO-K1, apoiou a hipótese de que a sequência Z3 exerce a sua atividade moduladora por meio da formação de Z-DNA, visto que a transfecção transiente desta construção nos clones estáveis aumentou significativamente a atividade da luciferase em Z3, e não em Z5, o controle.

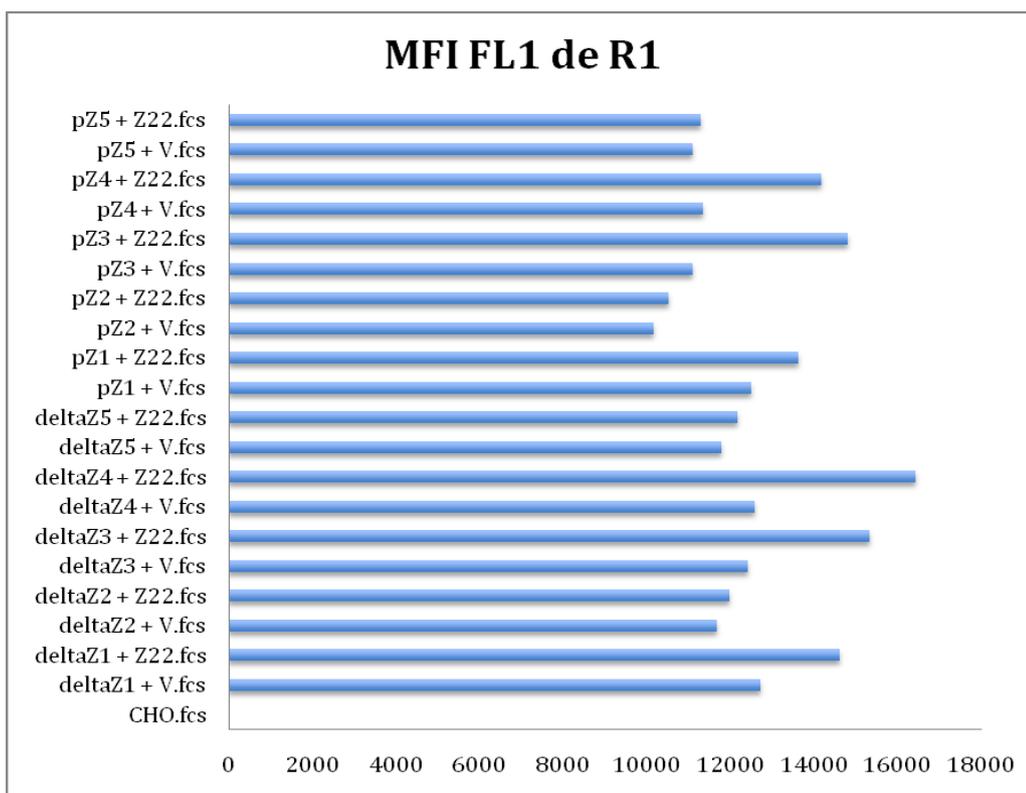


Figura 28. **Medida da expressão gênica através da MFI.** O eixo X mostra os números referentes a intensidade mediana de fluorescência de FL1 do gate R1, o eixo Y contém a identificação de cada amostra. O controle negativo (que não emite fluorescência) CHO.fcs. Sigla: pZ5 + Z22.fcs – co-transfecção do vetor pZ5 com o vetor pMACIA Z22 NLS. pZ5 + V.fcs – co-transfecção do vetor pZ5 com vetor pMACIA vazio.

Os dados de MFI mostram (Figura 28) que, em todas as construções, com elementos indutores de Z-DNA, a presença do anti-Z22 parece estabilizar a expressão do gene repórter. Também é notável que nas construções com os elementos controles Z2 e Z5 não há diferença entre a MFI da co-transfecção com o vetor pMACIA Z22NLS e a MFI da co-transfecção com o vetor pMACIA vazio. Isso indica o papel estabilizador do intracóporo Z22NLS atuando diretamente sobre a transcrição do gene repórter, através dos elementos Z1, Z3 e Z4.

Para visualizar de forma mais clara a diferença entre a expressão do gene repórter na presença e na ausência do intracóporo fizemos os gráficos seguintes. Nesses gráficos realizamos o tratamento matemático dividindo o valor da MFI de cada amostra quando presente o intracóporo Z22NLS pelo valor da MFI da mesma amostra sem a presença do intracóporo Z22 NLS. Na figura 29 é possível deduzir que

o efeito de Z22NLS nas construções pCO, que contém os elementos Z-DNA, sofreram a influência positiva na expressão do gene repórter. Também é possível inferir que o elemento Z3 parece ser o mais responsável pela presença do Z22NLS nessas construções pCO.

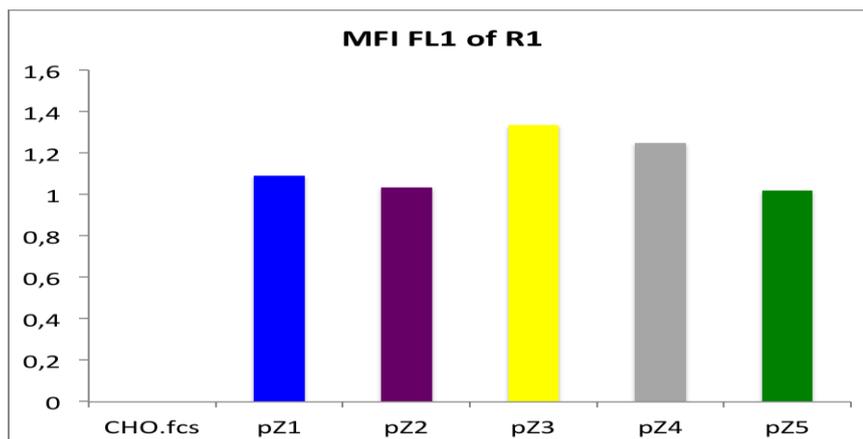


Figura 29. **Medição da expressão do gene através da MFI nas construções pCO.** O Y refere-se a razão da mediana de intensidade de fluorescência FL1 do “gate” R1 (razão da MFI na presença de Z22 sobre a da ausência de Z22), o eixo X contém a identificação de cada amostra. O controle negativo (que não emite fluorescência) é CHO.fcs.

Na figura 30 é possível deduzir que o efeito de Z22NLS nas construções pCOΔ600, que contém os elementos Z-DNA, apresentam acentuada influência positiva na expressão do gene repórter. Nessas construções o elemento Z4 parece ser o mais responsável pela presença do Z22NLS. Nesse caso o incremento na produção do repórter foi maior em cerca de 25 % em relação a mesma amostra controle sem a presença de Z22NLS.

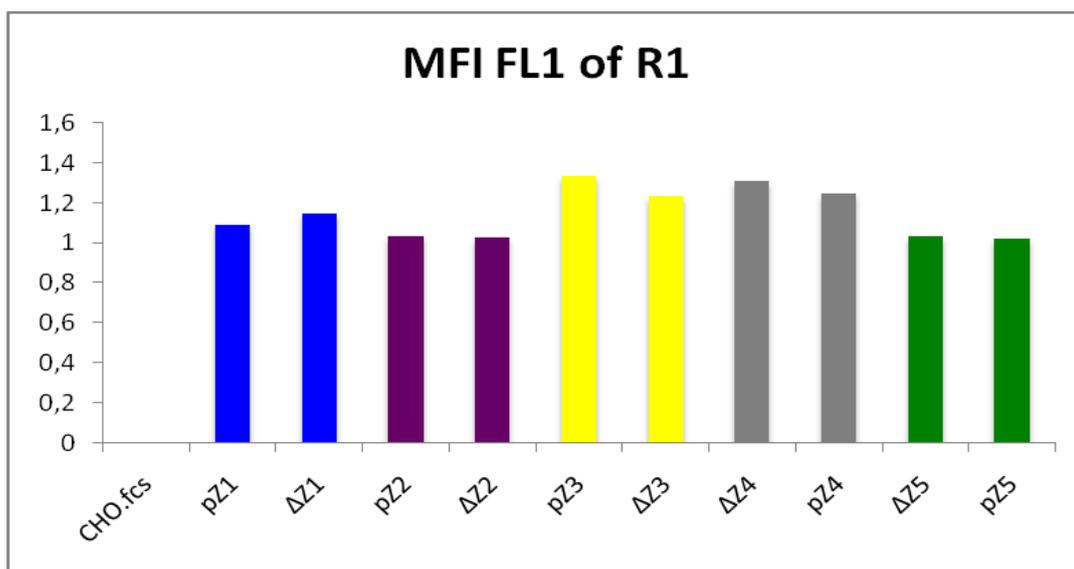


Figura 30. O efeito de anti-Z22 sobre as construções Δ Zs e pZs em relação aos controles Z2 e Z5. O eixo Y mostra os números referentes a mediana da intensidade de fluorescência FL1 “gate” R1 (razão da MFI na presença de Z22 sobre a da ausência de Z22), o eixo X contém a identificação de cada amostra. O controle negativo (que não emite fluorescência) CHO.fcs.

Com isso pode-se observar que dentre diversas questões como o efeito de cada um dos oligos *per si*, o efeito do Intron A nas versões inteira (pCO) e na versão com deleção (pCO Δ 600) e o efeito do Z22NLS sobre cada um dos oligos o que parece ser mais importante nesse estudo é entender o papel do Z22NLS interferindo na expressão do gene repórter através de Z-DNA. Portanto com isso foi possível demonstrar a eficácia de elementos, atuando em cis (oligos Z-DNA) e em trans (Z22NLS), como possíveis alvos potencializadores da expressão de transgenes nos vetores da séria pMACIA desenvolvidos pelo grupo de Imunologia Molecular.

Conclusão e Perspectivas

Conclusão e perspectivas

No presente trabalho foi avaliado o potencial de interferência de Z-DNA na expressão gênica. Para isso foram testadas seqüências formadoras de Z-DNA (atuação em cis), inseridas a montante do promotor de CMV, assim como a presença de um elemento em trans, Z22NLS, na produção heteróloga de uma proteína de fusão α CD3_GFP. As seqüências formadoras foram desenhadas respeitando as regras para formação de Z-DNA (alternância de purinas e pirimidinas) ou foram copiadas de seqüências naturais (Silva, 2010). O elemento em trans é um fragmento de anticorpo anti-Z-DNA modificado para agir como um intracorpo pela adição de um NLS.

Para testar os elementos formadores de Z-DNA, dez vetores de expressão em células de mamíferos foram construídos. Cinco desses vetores possuíam CMV-intron A inteiro (pCO) e os outros cinco possuíam o promotor com uma deleção de 600 pb no intron A (pCO Δ 600). Foram preparados 5 oligonucleotídeos para elucidar esse mecanismo, 3 desses indutores de Z-DNA (Z1, Z3 e Z4) e dois não indutores de Z-DNA (Z2 e Z5). Cada uma dessas seqüências Z, em média com 30 pb cada uma delas, foi inserida a montante do promotor de CMV, resultando em dez novos vetores pZ1, pZ2, pZ3, pZ4, pZ5, Δ Z1, Δ Z2, Δ Z3, Δ Z4 e Δ Z5. Todos os vetores mostraram funcionalidade em células CHO, sendo o gene repórter GFP expresso em células transfectadas com estes vetores, situação verificada por Microscopia de Fluorescência e citometria de fluxo.

Verificou-se que os elementos indutores de Z-DNA na presença de Z22 aumentaram em até 25 % a expressão do gene repórter em células CHO. Sendo que o aumento foi maior nas construções com versões do intron A deletado. Sendo que a versão com deleção de 600 pb pode ser considerada um intron A mínimo funcional, tendo em vista que a expressão do gene repórter, na ausência de Z22NLS, foi praticamente a mesma nessas construções em comparação com a versão completa de CMV-IA. A construção Δ Z4 foi a que apresentou maior resposta na presença de Z22, sugerindo que pode existir um maior potencial para formação de Z-DNA na seqüência Z4 o que promoveria o maior acesso da maquinaria de transcrição ou até mesmo a estabilização desse processo transcricional.

Dentre as perspectivas futuras para este trabalho estão:

Repetir os ensaios de co-transfecção transiente das construções com os vetores $\Delta Z1$, $\Delta Z2$, $\Delta Z3$, $\Delta Z4$ e $\Delta Z5$ e o vetor pMACIA scFv Z22 NLS para confirmar os resultados demonstrados nesse trabalho, ou seja, que as seqüência Z-DNA exercem atividade moduladora por meio da formação de Z-DNA e aumentam a expressão gênica na presença do estabilizador anti Z22. Fazer experimento de qPCR com todas as construções a fim de relacionar o aumento da proteína repórter com o aumento da transcrição do seu mRNA.

Realizar transfecção transiente de pMACIA Z22 NLS em clones estáveis das construções $\Delta Z1$, $\Delta Z2$, $\Delta Z3$, $\Delta Z4$ e $\Delta Z5$, que apresentaram melhores resultados nesse trabalho. Testar diretamente a expressão de GFP por citometria de fluxo e realizar experimento de qPCR para correlacionar os níveis do transcrito do gene repórter com a produção final de GFP, dessa forma poder elucidar possíveis gargalos na expressão da proteína repórter.

Referências Bibliográficas

Referências Bibliográficas

Alcântara, P.H.F. Efeitos da clonagem de elementos de DNA anti-repressores em vetor de expressão na produção de Anti-CD3 em CHO-K1. Dissertação de mestrado apresentada à Universidade de Brasília, 2010.

Bacal, N.S.; Faulhaber, M.H.W. Introdução à Citometria de Fluxo, cap.1 In: Aplicação prática em Citometria de Fluxo. São Paulo: Editora Atheneu, 2003.

Beattie, E. et al. Host-range restriction of vaccinia virus E3L-specific deletion mutants. *Virus Genes*, v. 12, n. 1, p. 89-94, 1996.

Behe, M.; Felsenfeld, G. Effects of methylation on a synthetic polynucleotide: the B→Z transition in poly(dG-m5dC).poly(dG-m5dC). *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 78, n. 3, p. 1619-23, 1981.

Belmar, N.A.; Lombardo, J.R.; Chao, D.T.; Li, O.; Ma, X.; Pong-Afar, M.; Law, D.A.; Starling, G.C. Dissociation of efficacy and cytokine release mediated by an Fc-modified anti-CD3 mAb in a chronic experimental autoimmune encephalomyelitis model. *Journal of Neuroimmunology*. v. 212, Issues 12. p. 6573, 2009.

Bertho, A.L. (2007). Citometria de fluxo. Apostila Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ. Disponível em <<http://picf.ioc.fiocruz.br/>> Acesso em set/2012.

Borém, A. Biotecnologia no melhoramento de plantas In: Melhoramento de Plantas, 2ª ed, Editora UFV, Viçosa, 1998.

Brandt, T. et al. The N-terminal domain of the vaccinia virus E3L-protein is required for neurovirulence, but not induction of a protective immune response. *Virology*, v. 333, n. 2, p. 263-70, 2005.

Brandt, T. A.; Jacobs, B. L. Both carboxy- and amino-terminal domains of the vaccinia virus interferon resistance gene, E3L, are required for pathogenesis in a mouse model. *J Virol*, v. 75, n. 2, p. 850-6, 2001.

Brigido, M. M.; Stollar, B. D. Two induced anti-Z-DNA monoclonal antibodies use VH gene segments related to those of anti-DNA autoantibodies. *J Immunol*, v. 146, n. 6, p. 2005-9, 1991.

Brígido, M.M.; Polymenis, M. e Stollar, B.D. Roles of mouse VH10 and VL gene segments in the binding of antibody to Z-DNA, analysed with recombinant single chain Fv molecules. *J. Immunology*. v. 150, p. 469-479.

Caldas, C.; Coelho, V.; Kalil, J.; Moro, A. M.; Maranhão, A. Q. e Brígido, M. M. Humanization of the anti-CD18 antibody 6.7: an unexpected effect of a framework residue in binding to antigen. *Mol Immunol*, v.39, n.15, p.941-952, 2003.

Campos-da-Paz, M.; Costa, C. S.; Quilici, L. S.; Simões, I. D.; Kyaw, C. M.; Maranhão, A. Q. e Brígido, M. M. Production of Recombinant Human Factor VIII in

Different Cell Lines and the Effect of Human XBP1 Co-Expression. *Mol Biotechnol.*, 2008.

Carrel, A. On the permanent life of tissues outside the organism. *J. Exp. Med.*, v.15, p.516-528, 1912.

Champ, P. C. Distributions of Z-DNA and nuclear factor I in human chromosome 22: a model for coupled transcriptional regulation. *Nucleic Acids Research*, v. 32, n. 22 6501–6510, 2004.

Chapman, B.S., Thayer, R.M., Vincent, K.A. and Haigwood, N.L. Effect of intron A from human cytomegalovirus (Towne) immediate-early gene of heterologous expression in mammalian cells. *Nucleic Acid Res.* 19, 3979-3986, 1991.

Costa, P. Caracterização da Atividade Ligante de Domínios Variáveis Humanizados de um Anticorpo Anti-CD3 Humano. Universidade de Brasília, 2004.

De Paula, Janaína do Nascimento Lima Matias. Otimização Estrutural de um Anticorpo Recombinante Humanizado Ligante ao Antígeno Humano CD3. Tese de doutorado. Universidade de Brasília, 2012.

Diciommo, D. P.;

JBremner, R. Rapid High Level Protein Production Using Dna-Based Semliki Forest Virus vectors. *J. Biol. Chem.* 273, 18060–18066, 1998.

Ellison, M. J. et al. Sequence-dependent energetics of the B-Z transition in supercoiled DNA containing nonalternating purine-pyrimidine sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 82, n. 24, p. 8320-4, 1985.

Fernandez, M.J. et al. Apoptosis induced by different doses of caffeine on Chinese hamster ovary cells. *J. Appl. Toxicol.*, 23(4), pp. 221-224, 2003.

Fonseca, A. Construção e expressão de duas versões humanizadas scFv de um anticorpo anti-CD3. Tese de mestrado. Universidade de Brasília, 2000.

Furger, A.; O'Sullivan, J. M.; Binnie, A.; Lee, B. A. e Proudfoot, N. J. Promoter proximal splice sites enhance transcription. *Genes and Development*, v.16, p.2792-99, 2002.

Gagna, C. E.; Lambert, W. C. The halting arrival of left-handed Z-DNA. *Med Hypotheses*, v. 60, n.3, p. 418-23, 2003.

Giddings, G.; Allison, G.; Brooks, D.; Carter, A. Transgenic plants as factories for biopharmaceuticals. *Nature Biotechnology*, v. 18, p. 1151-1155, 2000.

Gruh, I.; Wunderlich, S.; Winkler, M.; Schwanke, K.; Heinke, J.; Blömer, U.; Ruhparwar, A.; Rohde, B.; Li, R. K.; Haverich, A.; e Martin, U. Human CMV immediate-early enhancer: a useful tool to enhance cell-type-specific expression from lentiviral vectors. *Journal of Gene Medicine.* 10(1): 21-32, 2008.

Haniford, D. B.; Pulleyblank, D. E. Facile transition of poly [d(TG) x d(CA)] into a left-handed helix in physiological conditions. *Nature*, v. 302, n. 5909, p. 632-4, 1983.

Harrison, R. Observations on the living developing nerve fiber. *Anat. Rec.* 1:116-128; *Proc. Soc. Exp. Med*, NY 140-143, 1907.

Herbert, A.; Rich, A. Left-handed Z-DNA: structure and function. *Genetica*, 106:37-47, 1999.

Herold, K.; Hagopian, W.; Auger, J.; Poumian-Ruiz, E.; Taylor, L.; Donaldson, D.; Gitelman, S.; Harlan, D.; Xu, D.; Zivin, R.; Bluestone, J. Anti-CD3 monoclonal antibody in new-onset type 1 diabetes mellitus. *New England Journal of Medicine* 346(22): 1692-1698, 2002.

Houdebine, L.M.; Attal, J. Internal ribosome entry sites (IRESs): reality and use. *Transgenic Res*, v.8, n.157. 1999.

Jackson, D. A.; Yuan, J.; Cook, P. R. A gentle method for preparing cyto- and nucleoskeletons and associated chromatin. *J Cell Sci*, v. 90 (Pt 3), p. 365-78, 1988.

Jayapal, K.P.; Wlaschin, K.F.; Hu, W.S.; Yap, M.G. Recombinant protein therapeutics from CHO cells – 20 years and counting. *Chem En Progr.* 103: 40-47, 2007.

Jens Nielsen. Production of biopharmaceutical proteins by yeast: Advances through metabolic engineering. *Bioengineered*, v. 4 (4), pp. 1 – 5, 2013.

Kevan, C. H.; Stephen, E. G.; Umesh, M.; William, H.; Brygida, B.; David, D.; Kristina, R.; Beverly, D.; David, M. H.; Jeffrey, A. B. A Single Course of Anti-CD3 Monoclonal Antibody hOKT3 1 (Ala-Ala) Results in Improvement in C-Peptide Responses and Clinical Parameters for at Least 2 Years After Onset of Type 1 Diabetes. *Diabetes*, v. 54, 2005.

Kim, Y. G. et al. Evidence that vaccinia virulence factor E3L binds to Z-DNA in vivo: Implications for development of a therapy for poxvirus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 101, n. 6, p. 1514-8, 2004.

Koeris, M. et al. Modulation of ADAR1 editing activity by Z-RNA in vitro. *Nucleic Acids Res*, v. 33, n. 16, p. 5362-70, 2005.

Kohm, A. P. et al. Treatment with nonmitogenic anti-CD3 monoclonal antibody induces CD4+ T cell unresponsiveness and functional reversal of established experimental autoimmune encephalomyelitis. *Nat. Biotechnol.* v.21, n 5, p.553-8, 2003.

Kwek, K. Y.; Murphy, S.; Fungler, A.; Thomas, B.; O’Gorman, W.; Kimura, H.; Proudfoot, N.J. e Akoulitchev, A. U1 snRNA associates with TFIIF and regulates transcriptional initiation. *Nature Structural Biology*, v.9, n.11, p.800-5, 2002

Kwon, J. A.; Rich, A. Biological function of the vaccinia virus Z-DNA-binding protein E3L: gene transactivation and antiapoptotic activity in HeLa cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 102, n. 36, p. 12759-64, 2005.

Lafer, E. M. et al. Antibodies specific for left-handed Z-DNA. *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 78, n. 6, p. 3546-50, 1981.

Lafer, E. M. et al. Z-DNA-specific antibodies in human systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest*, v. 71, n. 2, p. 314-21, 1983.

Le Hir, H.; Nott, A. e Moore M.J. How introns influence and enhance eukaryotic gene expression. *Trends in Biochem. Sci*, p. 215-220. 2003.

Li, H. et al. Human genomic Z-DNA segments probed by the Z alpha domain of ADAR1. *Nucleic acids research*, v. 37, n. 8, p. 2737-46, 2009.

Li, J.; Menzel, C.; Meier, D.; Zhang, C.; Dübel, S. e Jostock, T. A comparative study of different vector designs for the mammalian expression of recombinant IgG antibodies. *JIM*, v. 318, p.113-124. 2007.

Liu, K.; Sandgren, E. P.; Pamiter, R. D. e Stein, A. Rat growth hormone gene introns stimulate nucleosome alignment in vitro and in transgenic mice. *PNAS*, v.92, p.7724:28. 1995.

Liu, R. et al. Regulation of CSF1 promoter by the SWI/SNF-like BAF complex. *Cell*, v. 106, n. 3, p. 309-18, 2001.

Maranhão, A.; brígido, M. Anticorpos humanizados - Humanização de anticorpos de interesse clínico. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento* 23:38-43, 2001.

Mariati, N.Y.K.; Chao, S.H.; Yap, M.G.S.; Yang, Y. Evaluating regulatory elements of human cytomegalovirus major immediate early gene for enhancing transgene expression levels in CHO-K1 and HEK293 cells. *Journal of Biotechnol.* 147:160-3, 2010.

Mattanovich, Diethard; Branduardi, Paola; Dato, Laura; Gasser, Brigitte; Sauer, Michael and Porro, Danilo. Recombinant Protein Production in Yeasts. *Recombinant Gene Expression: Methods in Molecular Biology*, Volume 824, pp 329-358, 2012.

McLean, G. R.; Nakouzi, A.; Casadeval, A.; Green, N.S. Human and Murine immunoglobulin expression vector cassettes. *Molecular Immunology*. 37(14): 837-45, 2000.

Mellado, M.C.; Castilho, L.R. Proteínas recombinantes terapêuticas. In: Moraes AM, Augusto EFP, Castilho LR. *Tecnologia do cultivo de células animais: de biofármacos a terapia gênica*. São Paulo: Roca, P. 384 -402, 2007.

Mielke, C.; Tümmler, M.; Schübeler, D.; von Hoegen, I.; Hauser, H. Stabilized long-term expression of heterodimeric proteins from tricistronic mRNA. *Gene*, v.254, p.1-8, 2000.

Moller, A. et al. Monoclonal antibodies recognize different parts of Z-DNA. *J Biol Chem*, v. 257, n. 20, p. 12081-5, 1982.

Nordheim, A.; Pardue, M.L.; Weiner, L.M.; Lowenhaupt, K.; Scholten, P.; Möller, A.; Rich, A.; Stollar, B.D. Analysis of Z-DNA in fixed polytene chromosomes with monoclonal antibodies that show base sequence-dependent selectivity in reactions with supercoiled plasmids and polynucleotides. *J Biol Chem.*, 261(1):468–476, 1988.

Nylander, Sven; Kalies, Inge. Brefeldin A, but not monensin, completely blocks CD69 expression on mouse lymphocytes:: efficacy of inhibitors of protein secretion in protocols for intracellular cytokine staining by flow cytometry. *Journal of Immunological Methods*. v. 224, p. 69-76, 1999.

Ogawa, R.; Kagiya, G.; Kodaki, T.; Fuduka, S.; Yamamoto, K. Construction of strong mammalian promoters by random cis-acting element elongation. *Biotechniques*. 42: 628-33, 2007.

Oh, D. B.; Kim, Y. G.; Rich, A. Z-DNA-binding proteins can act as potent effectors of gene expression in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 99, n. 26, p. 16666-71, 2002.

Ohyama, T. Intrinsic DNA bends: an organizer of local chromatin structure for transcription. *Bioessays*, 23:708-715, 2001.

Plain, K. M.; Chen, J.; Merten, S.; He, X.Y.; Hall, B.M. Induction of specific tolerance to allografts in rats by therapy with non-mitogenic, non-depleting anti-CD3 monoclonal antibody: association with TH2 cytokines not anergy. *Transplantation*, v.67, n.4, p.605-613, 1999.

Quilici, L.S. Caracterização de elementos moduladores da expressão gênica em células de mamífero: estudo do Intron A do gene Precoce Imediato de Citomegalovírus. Tese de Doutorado. Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília, Brasília, 2013.

Quilici, L.S. Estudo de elementos moduladores da expressão gênica em diferentes linhagens de células de mamífero. Dissertação de Mestrado. Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília, Brasília, 2008.

Rahman, M. (2006). Introduction to Flow Cytometry. Oxford, UK: Serotec Ltd;16-23. Disponível em <<http://www.abdserotec.com/uploads/flow-cytometry.pdf>> Acesso em set/2012.

Rich, A.; Zhang, S. Timeline: Z-DNA: the long road to biological function. *Nat Rev Genet*. 4(7):566-72, 2003.

Ruggiero, L.A. Clonagem de anticorpos recombinantes e expressão em cultura de células de Ovírio de Hamster Chinês (CHO). Dissertação de Mestrado. Universidade de Brasília, 2002.

- Sambrook, J. Russel, D. W. *Molecular Cloning*. 3rd edition. 3 v. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2001.
- Sanford, D.G.; Stollar, B.D. Characterization of anti-Z-DNA antibody binding sites on Z-DNA by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J Biol Chem*, v. 265, n. 30, p. 18608-14, 1990.
- Schroth, G.P.; Chou, P.J.; Ho, P.S. Mapping Z-DNA in the human genome. Computer-aided mapping reveals a nonrandom distribution of potential Z-DNA-forming sequences in human genes. *J Biol Chem*, 267:11846-11855, 1992.
- Schulte, G.; Fredholm, B.B. the G(s)-coupled adenosine A (2B) receptor recruits divergente pathways to regulate ERK1/2 and p38. *Exp. Cell Res.*, 290 (1), p. 168 - 176, 2003.
- Silva, H.M.; Vieira, P.M.; Costa, P.L.; Pimentel, B.M.; Moro, A.M.; Kalil, J.E.; Maranhão, A.Q.; Coelho, V.; Brigido, M.M. Novel humanized anti-CD3 antibodies induce a predominantly immunoregulatory profile in human peripheral blood mononuclear cells. *Immunol. Lett.* 125 : 129–136, 2009.
- Silva, I.C.R. Isolamento e análise de regiões de cromatina nativa contendo segmentos de DNA na conformação Z em diferentes tipos celulares. [tese]. Brasília: Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, 2010.
- Sinden, R.R. *DNA Structure and Function*. San Diego: Academic Press, 1994.
- Stinski, M. F. Cytomegalovirus promoter for expression in mammalian cells, em "Gene Expression Systems: Using Nature of the Art of Expression". Academic Press, 1999.
- Tjio, J.H.; Puck, T.T. Genetics of somatic mammalian cells. Chromosomal constitution of cells in tissue culture. *J. Exp. Med.*, 108 (2), pp. 259 – 268, 1958.
- Utset, T.; Auger, J.; Peace, D.; Zivin, R.; Xu, D.; Jolliffe, L.; Alegre, M.; Bluestone, J.; Clark, M. Modified anti-CD3 therapy in psoriatic arthritis: a phase I/II clinical trial. *Journal of Rheumatology* 29(9):1907-1913, 2002.
- WHEELER, R. A-DNA, B-DNA and Z-DNA. Feb 2007. Disponível em: <<http://en.wikipedia.org/wiki/File:A-DNA, B-DNA and Z-DNA.png>>.
- Wittig, B. et al. Transcription of human c-myc in permeabilized nuclei is associated with formation of Z-DNA in three discrete regions of the gene. *EMBO J*, v. 11, n. 12, p. 4653-63, 1992.
- Wittig, B.; Dorbic, T.; Rich, A. The level of Z-DNA in metabolically active, permeabilized mammalian cell nuclei is regulated by torsional strain. *J Cell Biol*, v. 108, n. 3, p. 755-64, 1989.

Wittig, B.; Dorbic, T.; Rich, A. Transcription is associated with Z-DNA formation in metabolically active permeabilized mammalian cell nuclei. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 88, n. 6, p. 2259-63, 1991.

Wolfl, S.; Wittig, B.; Rich, A. Identification of transcriptionally induced Z-DNA segments in the human c-myc gene. *Biochim Biophys Acta*, v. 1264, n. 3, p. 294-302, 1995.

Wu, H.Y.; Maron, R.; Tukpah, A.M.; Weiner, H.L. Mucosal Anti-CD3 Monoclonal Antibody Attenuates Collagen-Induced Arthritis That Is Associated with Induction of LAP+ Regulatory T Cells and Is Enhanced by Administration of an Emulsome-Based Th2-Skewing Adjuvant. *J Immunol*. v. 185(6): p. 34013407, 2010.

Wurm, F. M. Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. *Nat Biotechnol*, v.22, n.11, p.1393-1398. 2004.

Xia, W.; Bringmann, P.; McClary, J.; Jones, P.P.; Manzana, W.; Zhu, Y.; Wang, S.; Liu, Y.; Harvey, S.; Madlansacay, M.R.; McLean, K.; Rosser, M.P.; MacRobbie, J.; Olsen, C.L.; Cobb, R.R. High levels of protein expression using different mammalian CMV promoters in several cell lines. *Protein Expression and Purification*, v.45, n.1, p.115-24, 2006.

Xu, Z.L.; Mizuguchi, H.; Watabe, A.I.; Uchida, E.; Mayumi, T. e Hayakawa, T. Optimization of transcriptional regulatory elements for constructing plasmid vectors. *Gene*, v. 272, p.149- 56, 2001.

Yang, L.; Wang, S.; Tian, T.; Zhou, X. Advancements in Z-DNA: Development of Inducers and Stabilizers for B to Z Transition. *Current Medicinal Chemistry*, v. 19 (4), p. 557-568, 2012.

Yerganian, G. The biology and genetics of Chinese hamster. *Molecular Cell Genetics*. New York, 1985.