



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
CURSO DE FARMÁCIA

DOMINIQUE STERNADT ALEXANDRE RAMOS

**ESTUDO PARA CONFIGURAÇÃO DE UM SISTEMA DE EXPRESSÃO SELETIVA DE
TRANSGENES SOB CONTROLE DE MICRORNA**

Brasília, 2018

DOMINIQUE STERNADT ALEXANDRE RAMOS

**ESTUDO PARA CONFIGURAÇÃO DE UM SISTEMA DE EXPRESSÃO SELETIVA DE
TRANSGENES SOB CONTROLE DE MICRORNA**

Monografia de Conclusão de Curso
apresentada como requisito parcial para
obtenção do grau de Farmacêutico, na
Faculdade de Ciências da Saúde,
Universidade de Brasília.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Marie Togashi (UnB)

Brasília, 2018

DOMINIQUE STERNADT ALEXANDRE RAMOS

**ESTUDO PARA CONFIGURAÇÃO DE UM SISTEMA DE EXPRESSÃO SELETIVA DE
TRANSGENES SOB CONTROLE DE MICRORNA**

Brasília, 14 de Junho de 2018

COMISSÃO AVALIADORA

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Marie Togashi

Faculdade de Ciências da Saúde

Universidade de Brasília

Avaliadora: Prof^a. Dr^a. Andrea Barretto Motoyama

Faculdade de Ciências da Saúde

Universidade de Brasília

Brasília, 2018

Esta monografia se baseia no projeto desenvolvido no 26º Programa de Bolsas de Verão do Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM), Campinas, SP, realizado no período de janeiro a fevereiro de 2017, conforme idealização e supervisão do Prof. Dr. Marcio Chaim Bajgelman, detentor da propriedade intelectual. Agradecemos ao Prof. Marcio que gentilmente autorizou a utilização dos resultados obtidos para a redação desta monografia.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer aos meus pais, por me incentivarem sempre a ser uma pessoa melhor a cada dia e a seguir meus sonhos e objetivos de vida. Ao meu irmão, por demonstrar carinho e orgulho pelas minhas conquistas. À minha avó, que mesmo de longe, me acompanha e dá forças para superar cada obstáculo. Pelo apoio incondicional da minha família, em todas as escolhas que eu fiz até hoje.

Aos amigos que fiz durante a graduação, que me ajudaram e apoiaram em todas as etapas percorridas ao longo desses anos. Principalmente Camila, Heidi, Matheus e Renata – a caminhada foi mais fácil com vocês do meu lado.

Ao Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM), ao Dr. Marcio Chaim Bagjelman, à Soledad Palameta e aos membros da equipe do Laboratório de Vetores Virais por terem me orientado e auxiliado em todas as etapas desse projeto.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa que permitiu a estadia em Campinas pelo período de realização desse projeto.

Por último, agradeço à minha orientadora, Dra. Marie Togashi por ter se disposto a me orientar nesse projeto e ter dado todo o suporte necessário para atingirmos o êxito.

A todos vocês, muito obrigada por fazerem parte dessa conquista.

RESUMO

Os sistemas baseados na utilização de vetores virais possibilitam a correção de genes defeituosos ou mesmo inserção completa de um gene deletado levando a uma alteração fenotípica que pode se propagar a progênie celular. Contudo, um dos maiores desafios encontrados nesse contexto é de se obter uma expressão seletiva de transgenes veiculados por esses vetores retrovirais recombinantes capazes de transduzir somente células específicas. Dentre os possíveis níveis de controle de expressão, encontra-se o uso de sítios alvo de microRNA. Esses sítios alvos são úteis para o reconhecimento por microRNAs endógenos que vão estimular a degradação do transcrito viral. Sendo assim, vetores podem ser construídos para conter sítios alvo de microRNA que induzem a degradação do vetor recombinante em células que apresentam expressão do microRNA, restringindo-se a expressão do gene terapêutico apenas a células que não apresentem o microRNA. Portanto, o objetivo deste projeto consistiu em estudar diferentes arranjos de sítios alvo do microRNA 31 (mir-31), no intuito de verificar a melhor configuração que ocasiona o menor efeito residual. Para estudar a eficiência destas configurações utilizamos do sistema repórter de luciferase, que permitiu confirmar a eficiência do sistema criado neste projeto.

Palavras-chave: microRNA, vetores virais, clonagem em *tandem*, biologia molecular, engenharia genética

ABSTRACT

Biological systems based on the use of viral vectors allow the correction of defective genes or even complete insertion of a gene leading to phenotypic alteration which can propagate the cell progeny. However, one of the biggest challenges in this context is to obtain a selective expression of transgenes provided by retroviral vectors, being able to transduce only specific cells. Among the possible levels of expression control, we can use microRNA target sites. These targets are useful sites for endogenous microRNAs recognition that will stimulate the viral transcript degradation. Thus, vectors can be engineered to contain microRNA target sites that induce degradation of recombinant vector in cells that present expression of specific microRNA, allowing gene expression only in cells that do not express the microRNA. In this way, we can drive selectivity to the viral vector depending on differential expression of microRNA. Therefore, the aim of this project was to study different arrangements of target sites microRNAs miR-31, in order to verify the best configuration that causes the lower residual effect, by using luciferase reporter system, which allowed to confirm the efficiency of the vector created in this project.

Keywords: microRNA, viral vectors, tandem cloning, molecular biology, genetic engineering

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Modelos de vetores virais: plasmídeos e partículas virais correspondentes.....	15
Figura 2. Possíveis modificações para a obtenção de vetores virais.....	16
Figura 3. Princípio de silenciamento da expressão de transgenes mediada por microRNAs.	18
Figura 4. Funcionamento do ensaio do gene repórter luciferase.....	20
Figura 5. Configuração desejada do vetor PC-TS-miR31.....	21
Figura 6. Estratégia do <i>killing site</i>	23
Figura 7. Clonagem em <i>tandem</i> utilizando a estratégia de <i>killing site</i>	24
Figura 8. Obtenção de DNA de bactérias para PCR de colônias.	30
Figura 9. Protocolo para extração de DNA plasmidial de bactérias.....	33
Figura 10. Configuração das co-transfecções realizadas para o ensaio em células.....	35
Figura 11. Configuração do vetor psiCHECK-2.....	38
Figura 12. Eletroforese em gel de agarose a 2% da reação de PCR de colônias (clones 1 a 30).	40
Figura 13. Sítios de reconhecimento dos <i>primers</i> utilizados para determinação da orientação do inserto.....	42
Figura 14. Reação de PCR para verificação da orientação do inserto TS-miR31 clonado no vetor psiCHECK-2.....	43
Figura 15. Eletroforese em gel de agarose a 2% da reação de PCR de colônias (clones 31 a 60).	45
Figura 16. Eletroforese em gel de agarose a 2% da reação de PCR de colônias (clones 60 a 80).	46
Figura 17. Eletroforese em gel de agarose 2% da reação de PCR de colônias (clones 111 a 130).	47

Figura 18. Sítios de reconhecimento dos <i>primers</i> utilizados para determinação da orientação dos insertos.....	49
Figura 19. Simulação da eletroforese em gel de agarose dos clones 113, 115 e 117 em comparação às bandas referentes à clonagem de um sítio alvo.	50
Figura 20. Orientação do segundo sítio TS-miR31 no vetor PC-TS-miR31-I dos clones 113, 115 e 117.....	51
Figura 21. Gráfico da atividade relativa da luciferase em diferentes condições de transfecção de células.	56

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Protocolo para reação de digestão do vetor psiCHECK-2.	25
Tabela 2. Sequência dos <i>primers</i> para TS-miR31.	26
Tabela 3. Protocolo para reação de ligação do vetor psiCHECK-2 e o inserto TS-miR31.	27
Tabela 4. Relação dos reagentes para a produção de meio Luria-Bertani (LB).	28
Tabela 5. Protocolo para realização de PCR.....	29
Tabela 6. <i>Primers</i> utilizados para a amplificação por PCR	31
Tabela 7. Sinais obtidos no ensaio de atividade de luciferase pelas enzimas <i>Renilla</i> e <i>firefly</i>	54

LISTA DE ABREVIÇÕES E SIGLAS

AAV: vírus adeno-associado

CMV: citomegalovírus

CNPEM: Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais

E2F: fator E2

EtBr: brometo de etídio

GFP: proteína G fluorescente

LB: Luria-Bertani

LNBio: Laboratório Nacional de Biociências

LTR: *long terminal repeats*

Luc: luciferase

miRNA: microRNA

mir31: microRNA-31

pb: pares de base

PBS: *phosphate-buffered saline* ou tampão fosfato-salino

PCR: reação em cadeia da polimerase

PC-TS-miR31: vetor psiCHECK-2 o qual será submetido à clonagem do inserto

PC-TS-miR31-I: vetor psiCHECK-2 com um inserto clonado

q.s.p.: quantidade suficiente para

RNAi: RNA de interferência

RSV: Rous Sarcoma Virus

Target-31-*Xho*I-Sall-F: *primer forward* de sequência complementar ao microRNA-31

Target-31-Sall-R: *primer reverse* de sequência complementar ao microRNA-31

TS-miR31: sítio alvo do microRNA (inserto)

β -gal: β -galactosidase

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 ENGENHARIA GENÉTICA, TRANSFERÊNCIA GÊNICA E ESTUDOS FUNCIONAIS.....	13
1.2 VETORES VIRAIS COMO VEÍCULOS DE TRANSFERÊNCIA GÊNICA.....	14
1.3 UTILIZAÇÃO DE SÍTIOS ALVO DE MICRORNA PARA DIRIGIR EXPRESSÃO DE VETORES RECOMBINANTES.....	17
1.4 UTILIZAÇÃO DE SISTEMAS REPÓRTERES PARA MONITORAMENTO DA EXPRESSÃO DE VETORES GÊNICOS.....	19
2 OBJETIVOS	21
2.1 OBJETIVO GERAL.....	21
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	21
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	22
3.1 ESTRATÉGIA DE CLONAGEM.....	22
3.2 CONSTRUÇÃO DO VETOR PC-TS-MIR31.....	24
3.2.1 Digestão do vetor psiCHECK-2	24
3.2.2 Preparação do inserto	25
3.2.3 Reação de ligação	26
3.3 TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA.....	27
3.4 CULTURA DE BACTÉRIAS.....	27
3.4.1 Plaqueamento.....	28
3.4.2 Inóculo de clones do vetor PC-TS-miR31.....	28
3.5 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)	29
3.5.1 PCR de colônias.....	29

3.5.2 Determinação da orientação de TS-miR31 clonados no vetor psiCHECK-2	31
.....	
3.6 MINIPREPS.....	31
3.7 ENSAIO EM CÉLULAS.....	34
3.7.1 Cotransfecção de células HEK 293	34
3.7.2 Ensaio de atividade de luciferase	35
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
4.1 CLONAGEM DO PRIMEIRO SÍTIO TS-MIR31 NO VETOR PSICHECK-2.....	37
4.2 DETERMINAÇÃO DA ORIENTAÇÃO DO INSERTO TS-MIR31 NO VETOR PSICHECK-2.....	41
4.3 CLONAGEM DO SEGUNDO SÍTIO ALVO NO VETOR PC-TS-MIR31-I.....	44
4.4 DETERMINAÇÃO DA ORIENTAÇÃO DO INSERTO TS-MIR31 NO VETOR PC-TS-MIR31-I DOS CLONES 113, 115 E 117.....	48
4.5 COTRANSFECÇÃO DAS CÉLULAS HEK293.....	52
6 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS	58
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59
APÊNDICE A – Teste de competência bacteriana	62
ANEXO A – Configuração do vetor pBABE-GFP-miR31	64

1 INTRODUÇÃO

1.1 ENGENHARIA GENÉTICA, TRANSFERÊNCIA GÊNICA E ESTUDOS FUNCIONAIS

As células podem ser modificadas geneticamente para ocasionar a superexpressão de um determinado gene, ou mesmo sua inibição. Esta estratégia é muito utilizada para o estudo da função e regulação de genes, bem como de seus produtos (KIM & EBERWINE, 2010, WURM, 2004). Além de aplicações voltadas para ciência básica, técnicas de transferência gênica são utilizadas no desenvolvimento de estratégias terapêuticas, em que vetores gênicos são construídos e administrados para corrigir a expressão de genes defeituosos, tanto em doenças monogênicas, quanto para introduzir uma informação adicional para tratamento de cânceres, por exemplo, ou ainda, como uma estratégia preventiva, no caso das vacinas (BOUARD et al., 2009).

Diferentes métodos podem ser empregados para transferência gênica que dependem do tipo de célula escolhida e o objetivo a ser alcançado. São geralmente categorizados em dois principais grupos: métodos virais e não virais.

Os métodos não-virais consistem em uma transfecção de células com o auxílio de ferramentas químicas e/ou físicas; ou seja, fazem uso de procedimentos como eletroporação, irradiação laser, injeção direta, polímeros e lipídios catiônicos, dentre outros compostos. São no geral de simples realização e não apresentam limitação no tamanho do DNA transferido; porém apresentam baixa eficiência e especificidade para ensaios *in vivo* (KIM & EBERWINE, 2010).

Os métodos virais baseiam-se na introdução de um cassete de expressão em um vetor viral, utilizado posteriormente para transduzir uma célula-alvo. São abordagens de alta eficiência e facilmente atingem níveis sustentáveis de expressão de transgenes, graças à capacidade de integração no genoma da célula hospedeira.

1.2 VETORES VIRAIS COMO VEÍCULOS DE TRANSFERÊNCIA GÊNICA

Um dos maiores desafios para estratégias de transferência gênica consiste em veicular um gene utilizando um vetor que seja capaz de transduzir células de forma específica, com alta eficiência e com baixa toxicidade (BOUARD et al., 2009).

Atualmente, uma vasta gama de vírus é modificada geneticamente para possibilitar sua utilização como vetores para a expressão de transgenes em células. Dentre as famílias que podem ser usadas para esses fins, podemos citar vetores virais derivados de adenovírus, vírus adeno-associados, vírus de herpes e retrovírus. Os últimos têm sido bastante estudados devido à capacidade de se integrar ao genoma da célula hospedeira e aos avanços no seu *design*, o que garante maior segurança e eficácia na infecção de diversos tipos celulares (MATSUI et al., 2010). A escolha do vetor é um ponto essencial do processo, visto que cada um deles possuem suas particularidades e diferentes capacidades de transfecção e expressão - por exemplo, vetores lentivirais são capazes de transfectar células de baixa divisão, como células do sistema nervoso central.

Os retrovírus possuem naturalmente uma capacidade de infecção de alta eficiência e têm sido mais empregados na pesquisa clínica devido à sua capacidade de realizar uma integração estável ao genoma da célula hospedeira (MERTEN, HEBBEN & BOVOLENTA, 2016), permitindo a passagem do transgene para a progênie celular, além de possibilitar sua própria replicação. Devido ao amplo espectro de funcionamento dos promotores virais em diversas linhagens celulares, pode tornar-se complexo restringir a expressão de transgene em sistemas *in vivo*. Entretanto, num contexto de terapia gênica, é interessante poder utilizar estratégias que permitam uma expressão seletiva, com objetivo de que um transgene possa ser expresso num determinado tecido em que é necessário e que sua expressão possa ser silenciada em tipos celulares que não precisem do transgene.

Nesse contexto, as técnicas de engenharia genética, tornam possíveis as modificações no genoma viral visando retirar sequências de genes não-essenciais e substituindo-as por cassetes de expressão contendo genes de interesse terapêutico

(BOURAD et al., 2009) (Figuras 1 e 2). A produção de vetores virais recombinantes pode ser facilmente realizada em laboratório, sendo que as partículas geradas podem ser defectivas, sem capacidade de replicação e não patogênicas, atribuindo-se alto nível de segurança para o sistema (NAVIAUX et al., 1996; BAGJELMAN et al., 2003).

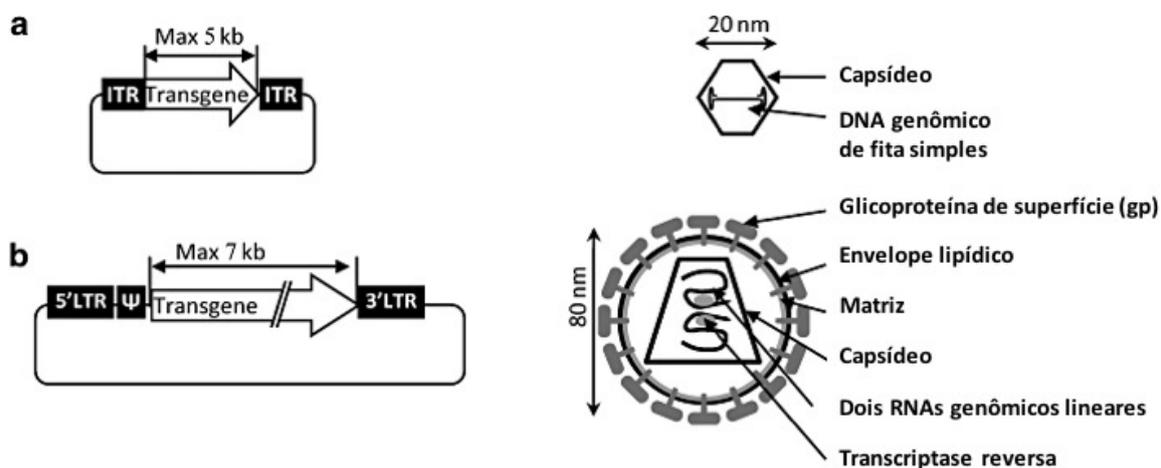


Figura 1. Modelos de vetores virais: plasmídeos e partículas virais correspondentes. Em (a), vetor recombinante do tipo vírus adeno-associado (AAV) e em (b), vetor retroviral, um dos mais empregados na pesquisa e prática clínica (adaptado de BOUARD et al., 2009)

Estratégias para aprimorar a seletividade de vetores virais recombinantes se baseiam normalmente em modificações no envelope viral, alterações em sequências promotoras, ou utilização de sítios alvo de microRNA para restringir a expressão viral em tecidos específicos. Nesse contexto, considerando-se a modificação do envelope viral, as proteínas de membrana podem ser alteradas para favorecer o reconhecimento de receptores específicos existentes na superfície de células-alvo. Desta forma, a internalização do vetor pela linhagem celular escolhida ocorrerá de acordo com o revestimento do envelope viral, atribuindo um certo nível de especificidade.

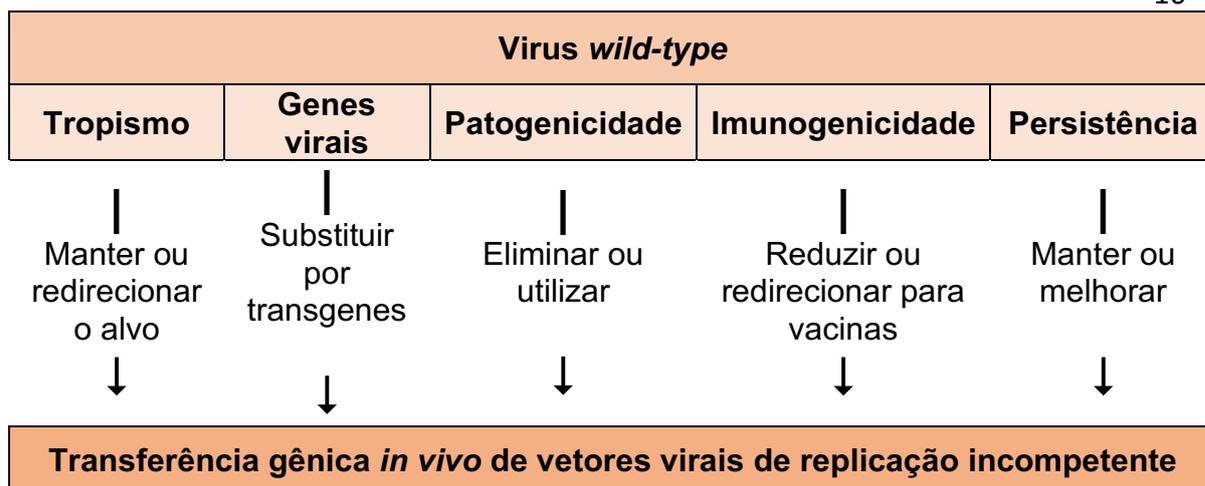


Figura 2. Possíveis modificações para a obtenção de vetores virais. Alterações nas propriedades virais que são necessárias para a transformação de um vírus *wild-type* em um sistema de entrega de genes (vetor). (Adaptado de BOUARD et al., 2009)

Um outro tipo de abordagem para o controle de expressão de vetores virais recombinantes é a escolha dos promotores. Diversos tipos de promotores podem ser escolhidos, podendo ser promotores derivados do *long term repeats* (LTR) retroviral (DANOS & MULLIGAN, 1988), promotores citomegalovírus (CMV), vírus Rous Sarcoma (RSV) ou mesmo promotores quiméricos para expressão induzível por antibióticos como a tetraciclina, ou promotores responsivos a fator E2 (E2F) ou p53 que são tecido específicos (GOSSEN & BUJARD, 1992; NALDINI et al., 1996; VIGNA et al., 2002; STRAUSS et al., 2005; STRAUSS et al., 2006). Os promotores RNAPolimerase II possibilitam a expressão de transgenes e também de microRNA. Além desses promotores, são muito utilizados vetores contendo promotores de RNAPolimerase III, como U6 ou H1, para expressão de sequências de RNA de interferência que apresentam alta eficiência de expressão e também podem ser utilizados para construção de promotores quiméricos induzíveis ou tecido específicos (AAGAARD et al., 2007).

Com intuito de aprimorar mais ainda o nível de controle de expressão, uma sequência alvo de microRNA pode ser inserida num vetor recombinante para que o vetor possa ser silenciado num determinado tipo celular que apresente alta expressão do microRNA para esse alvo. Dessa forma, havendo expressão do microRNA, o RNA

mensageiro codificante do gene de interesse que é fundido com o sítio alvo é degradado, mediando-se o silenciamento da expressão gênica. Com esta estratégia, o direcionamento da expressão de um cassete transgênico, por exemplo, pode ser mais específico na célula de interesse do que em outra, somente sendo diferenciado o tipo e o nível de expressão de microRNA endógeno nas células.

1.3 UTILIZAÇÃO DE SÍTIOS ALVO DE MICRORNA PARA DIRIGIR EXPRESSÃO DE VETORES RECOMBINANTES

Os microRNAs são pequenas sequências endógenas de RNA não-codificante de aproximadamente 21 pares de base que fazem parte da regulação pós-transcricional de genes, ao reconhecerem sequências complementares ao RNA mensageiro (LAN, 2014, PEREIRA et al., 2015). Eles são bastante conservados evolutivamente e possuem um perfil de expressão específico para o tecido no qual as células se encontram (GEISLER & FECHNER, 2016). Contudo, observou-se que em casos patológicos como câncer e doenças infecciosas, a expressão de microRNA se encontra desregulada, tornando-os alvos em potencial para novas terapias.

Estudos recentes relataram o uso de microRNA como supressor pós-transcricional com o objetivo de dirigir especificamente a expressão de transgenes em determinados tecidos utilizando vetores virais. Assim, são inseridas no genoma viral, que carrega o transgene de interesse, sequências complementares ao microRNA candidato (neste trabalho, denominamos esta sequência alvo como TS-miR31). Devido à formação de um complexo de degradação de microRNA e outras ribonucleoproteínas capazes de levar à clivagem de RNAs mensageiros, é possível o silenciamento do transcrito (Figura 3) (PEREIRA et al., 2015).

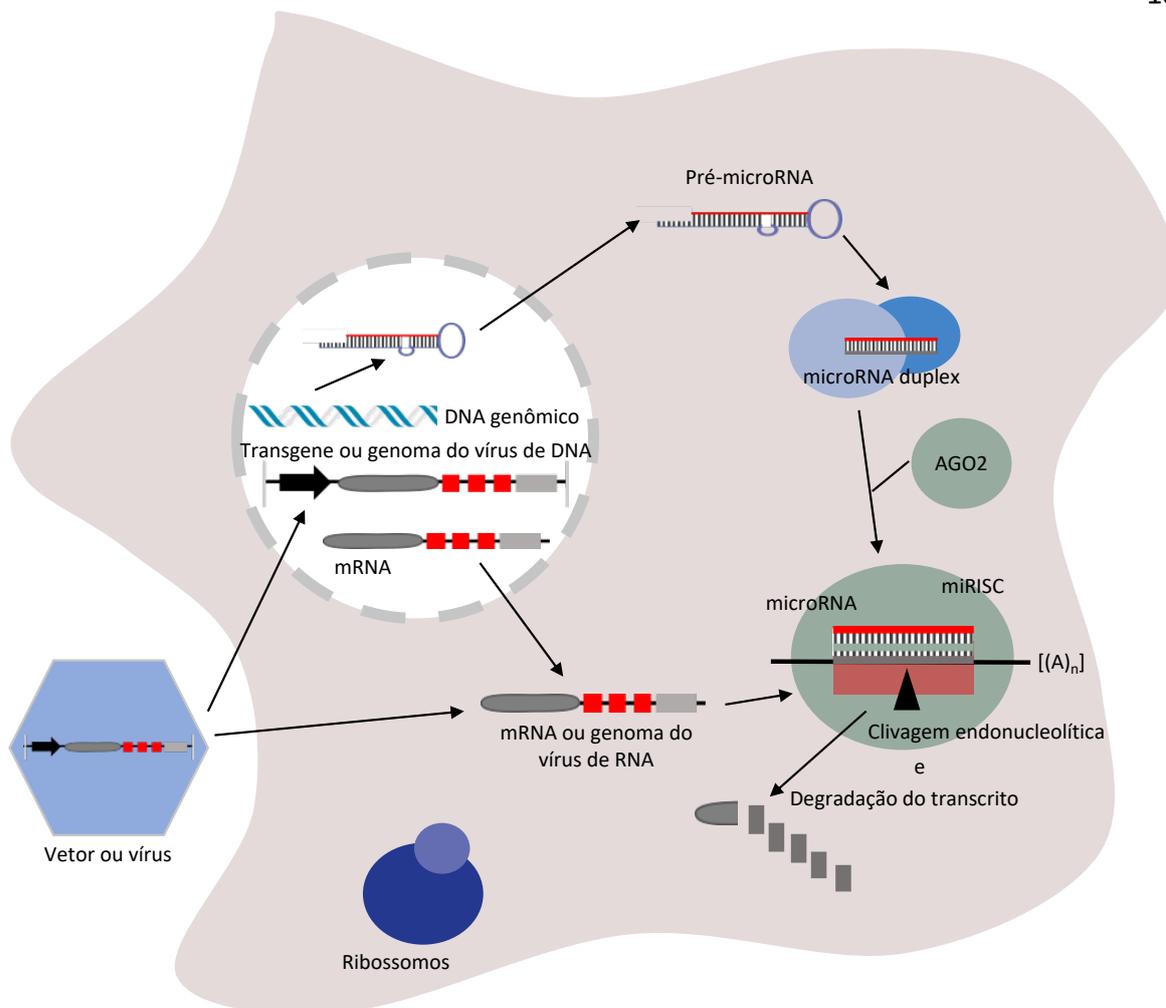


Figura 3. Princípio de silenciamento da expressão de transgenes mediada por microRNAs. Após a infecção pelo vetor viral, o DNA viral é diretamente transcrito ou integrado no núcleo da célula hospedeira. O transcrito – que contém o sítio alvo de microRNA artificial (caixas vermelhas) – é transportado para o citoplasma. Se o microRNA endógeno é expresso, ele reconhece e se complementa ao sítio alvo – o RNA alvo é clivado e degradado pelo complexo de silenciamento induzido por microRNA (miRISC), suprimindo sua expressão (adaptado de GEISLER & FECHNER, 2016).

Dados na literatura têm mostrado que um número maior de sítios alvos de microRNA, melhoram a repressão do transgene, mediada por microRNA – embora não haja uma relação direta entre esses dois pontos (GEISLER & FECHNER, 2016). Contudo, foi demonstrado experimentalmente que quando esses sítios são clonados em *tandem* (entre três e quatro repetições), a eficiência de repressão do transgene é melhorada significativamente (GEISLER et al., 2011).

1.4 UTILIZAÇÃO DE SISTEMAS REPÓRTERES PARA MONITORAMENTO DA EXPRESSÃO DE VETORES GÊNICOS

Sistemas repórteres são caracterizados pela facilidade de execução de protocolos e pela rápida obtenção de resultados. Podem ser desenvolvidos com o objetivo de validar eficácia de transfecção, funcionamento de um determinado promotor, localização de uma proteína recombinante acoplada a um marcador fusionado, ou mesmo para ensaios de avaliação da atividade de um microRNA endógeno, como o que descreveremos neste projeto mais adiante.

Existem diversos tipos de sistemas repórteres, podendo ser citados luciferase (LUC), proteína verde fluorescente (GFP), beta-galactosidase (β -Gal), entre outros. Cada um possui sua particularidade e são escolhidos de acordo com as especificações do experimento a ser realizado.

Neste projeto, o sistema repórter de escolha foi o de luciferase, um ensaio de bioluminescência caracterizado pela emissão de luz como resultado de uma reação química sem que ocorram mudanças térmicas. Neste caso, a enzima luciferase (LUC) quando em um meio com seu substrato luciferina, ATP, magnésio e oxigênio, catalisa uma reação que libera um *flash* de luz, capaz de ser detectado por um luminômetro (KAIN ANGULY, 2001).

É notável que essa reação ocorre muito rapidamente e a LUC é passível de sofrer ação das proteases, levando à sua degradação, quando em células transfectadas. O fato da LUC apresentar essa baixa estabilidade pode se constituir uma vantagem, ao analisar-se por exemplo a degradação de um RNA mensageiro que contém um sítio alvo para microRNA. Neste caso, se a mesma possuísse alta estabilidade, ela poderia se acumular no citoplasma celular mascarando a degradação do RNA mensageiro. Com a baixa estabilidade da LUC, ao inibir um RNA mensageiro fundido ao gene repórter, imediatamente inibe-se o sinal do repórter.

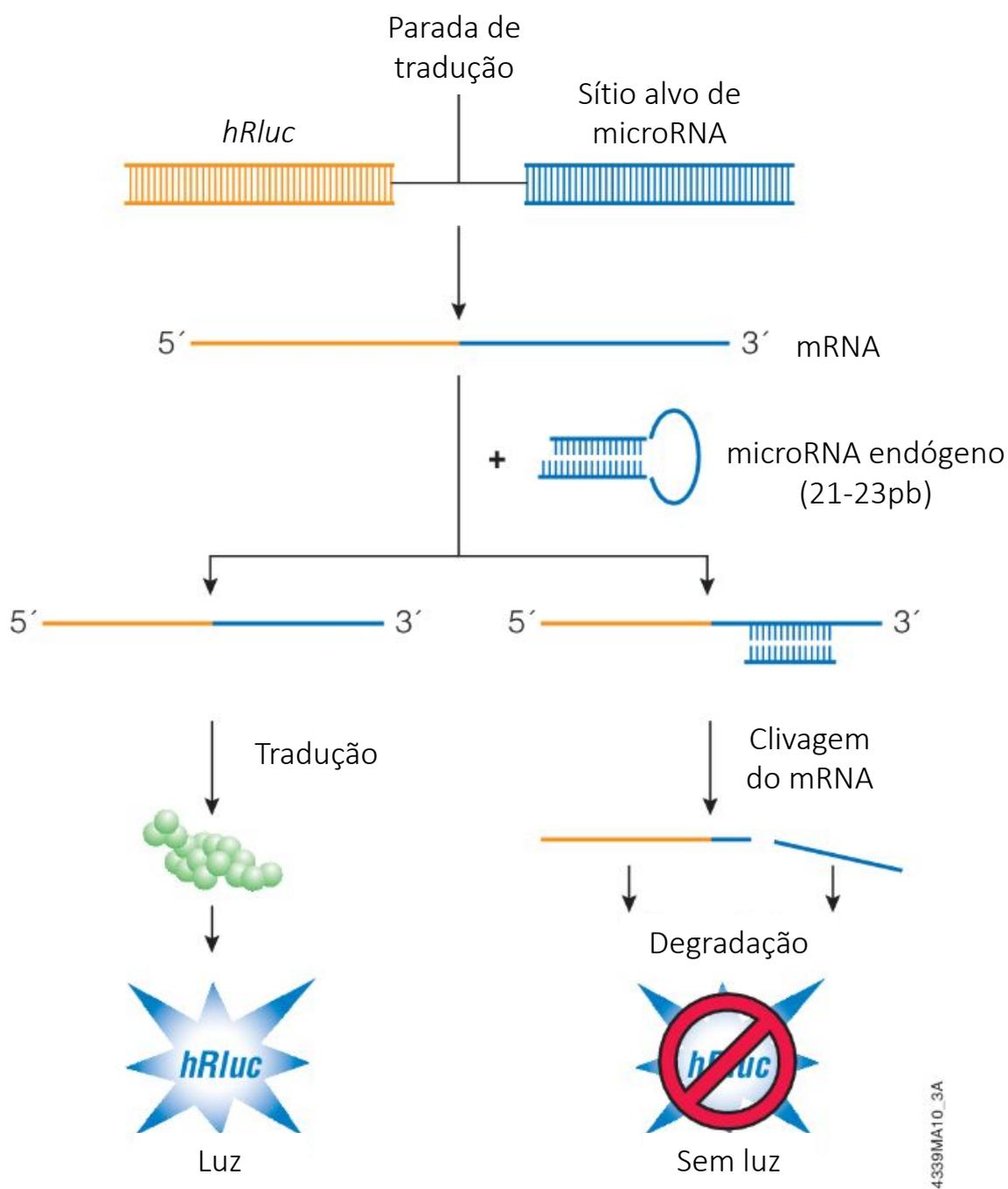


Figura 4. Funcionamento do ensaio do gene repórter luciferase.

O gene *hRluc* (luciferase) é transcrito em um único RNA mensageiro (mRNA) juntamente com uma sequência de interesse – que no nosso caso, é o sítio alvo de microRNA. É possível fazer uma correlação entre o sinal de LUC e a expressão do plasmídeo.

(Adaptado de Promega® Fonte: <<https://www.promega.com.br/-/media/files/resources/protocols/technical-bulletins/101/sicheck-vectors-protocol.pdf?la=pt-br>>.)

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Neste estudo, planejamos avaliar diferentes configurações de sítio alvo do miR31 (TS-miR31) para obter máxima atividade inibitória do microRNA. Esta configuração de sítio alvo poderá ser utilizada em outros projetos do grupo de Engenharia de Vetores e Desenvolvimento de Estratégias de Terapia Gênica para a construção de vetores virais recombinantes alvo-específicos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Clonar fragmentos codificando sítio alvo TS-miR31 no vetor repórter de luciferase psiCHECK-2;
- Realizar ensaios *in vitro* para verificar o funcionamento dos vetores gerados por meio da expressão do gene repórter luciferase em células HEK293 que expressem o microRNA miR31.

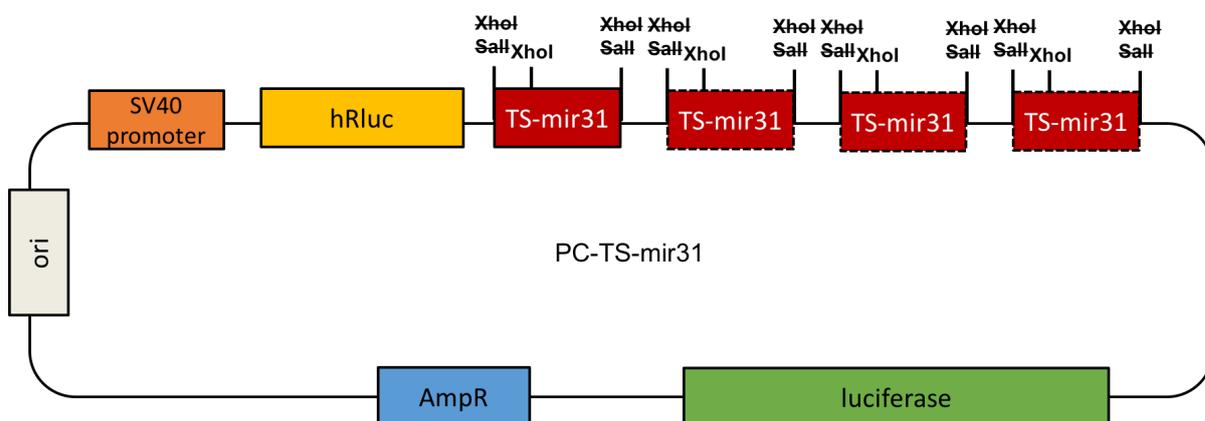


Figura 5. Configuração desejada do vetor PC-TS-miR31.

O vetor PC-TS-miR31 apresentará os sítios alvo TS-miR31 (caixas vermelhas) clonados em *tandem* a fim de avaliar a eficiência do silenciamento do transcrito do gene da luciferase (hRluc/luciferase) em células com expressão induzida do miR31.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ESTRATÉGIA DE CLONAGEM

Para que fosse possível a realização da clonagem dos sítios alvos de microRNA em sequência – também conhecida como clonagem em *tandem* – foi utilizada a estratégia de *killing site*.

Essa estratégia permite a clonagem de múltiplos insertos em sequência utilizando uma mesma enzima de restrição. A clonagem em *tandem* é permitida quando é feita a escolha das sequências nas extremidades do inserto e do vetor, devendo ser complementares, mas que não permitem o reconhecimento por certas enzimas de restrição. Para o desenvolvimento deste trabalho, as sequências das enzimas de restrição escolhidas foram a de *XhoI*, para a clivagem do vetor, e *SalI* para a extremidade do inserto. Essas duas enzimas foram selecionadas visto que possuem sequências palindrômicas com quatro pares de bases homólogas (Figura 6a)

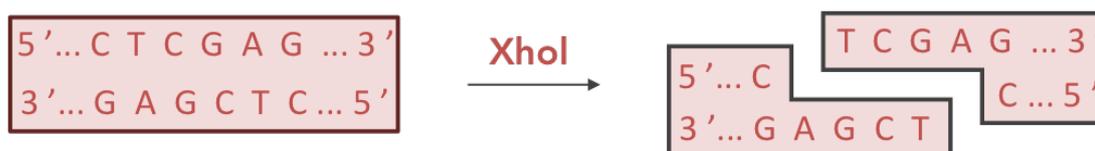
Quando o vetor é digerido pela enzima de restrição *XhoI*, as extremidades ficam com as sequências de clivagem por *XhoI*, conforme a Figura 6a. Ao realizar uma reação de ligação entre o vetor e o inserto, este deve possuir uma extremidade complementar ao do vetor, mas que no entanto não reconstitua a sequência reconhecida por *XhoI*. Assim, no caso de se realizar uma posterior digestão com essa enzima, não haverá a retirada do inserto previamente clonado. Para que isso seja possível, então, a extremidade do nosso inserto – neste trabalho, o sítio alvo para microRNA TS-mir31 – possui uma sequência referente à uma clivagem por *SalI*. Desta forma, temos a formação de um sítio híbrido, não sendo reconhecido nem pela enzima de restrição *SalI* e nem por *XhoI* (Figura 6b).

Para realizar uma outra clivagem no vetor, é necessário que haja, neste caso, um sítio de restrição novo para a enzima *XhoI*, para que possamos abrir o vetor e inserir o próximo inserto. Foi introduzida então, na sequência do inserto a ser clonado, um sítio de

restrição complementar reconhecido por *Xho*I, permitindo que a cada ciclo de clonagem, um sítio de clivagem novo esteja disponível para a próxima reação. Assim, além de permitir a utilização de somente uma enzima de restrição, há a garantia de que esses insertos serão clonados em sequência (Figura 7).

(a)

Sítio de restrição de *Xho*I



Sítio de restrição de *Sal*I



(b)

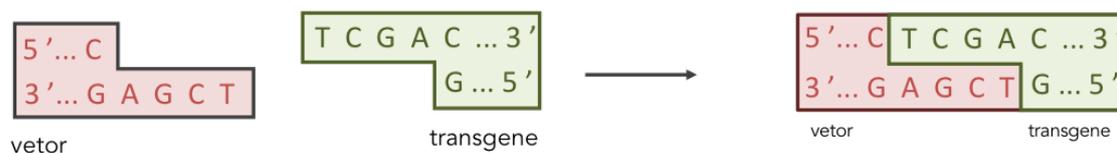


Figura 6. Estratégia do *killing site*.

(a) Representação dos sítios de restrição – sequências de DNA reconhecidas pelas enzimas de restrição *Xho*I (em rosa) e *Sal*I (em verde) – e o resultado da clivagem das ligações fosfodiéster pelas respectivas enzimas. (b) Simulação da reação de ligação entre as extremidades do vetor e do inserto a ser clonado (transgene) e formação do sítio híbrido.

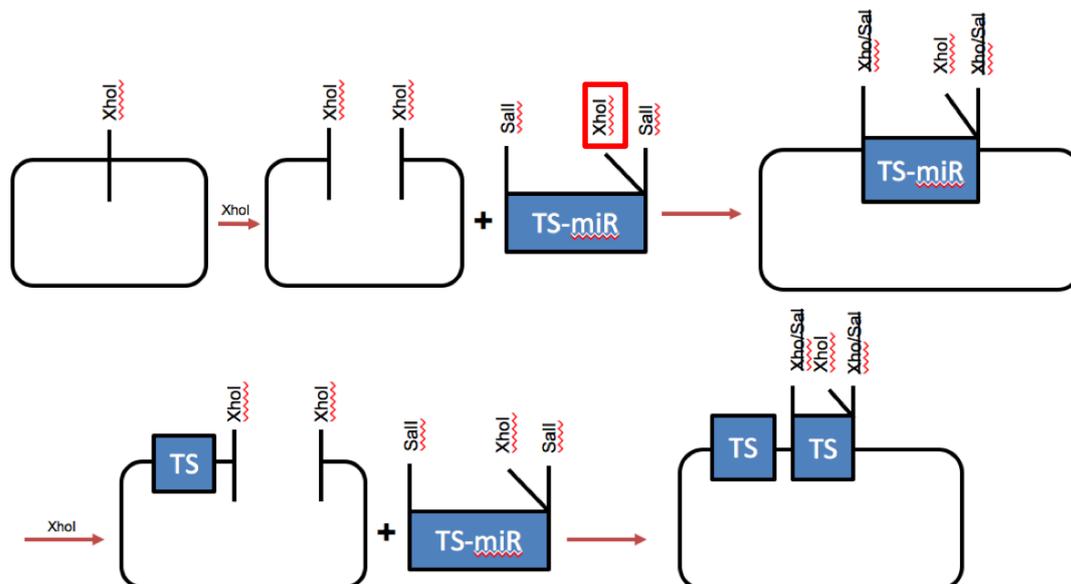


Figura 7. Clonagem em *tandem* utilizando a estratégia de *killing site*.

Representação do processo de clonagem usando a enzima de restrição *XhoI* para a clivagem do vetor. Em destaque em vermelho, a presença de um sítio de restrição suplementar de *XhoI* na sequência do inserto, que permite clivagens posteriores e a inserção do sítio alvo para microRNA (representado como TS e TS-miR na figura) em sequência.

3.2 CONSTRUÇÃO DO VETOR PC-TS-MIR31

3.2.1 Digestão do vetor psiCHECK-2

O plasmídeo psiCHECK-2 (3,1µg/µL) foi digerido com 4µL da enzima de restrição *XhoI* (20.000 unidades/mL), por 2 horas a 37°C (Tabela 1). Após incubação, o vetor foi desfosforilado com enzima fosfatase alcalina (CIP) para evitar religação das extremidades do vetor mantendo a reação por mais 1 hora a 37°C.

A amostra foi então submetida a um campo elétrico de 100 volts por 45 minutos em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio (EtBr), para que a banda correspondente ao vetor pudesse ser visualizada e comparada com o marcador ThermoFischer Scientific® O'GeneRuler 1kb. A fim de visualizar o andamento dessa etapa, foram adicionados aos 60µL da amostra, 12µL do *Loading Dye* (6x) da ThermoFischer Scientific®.

Tabela 1. Protocolo para reação de digestão do vetor psiCHECK-2.

Reagentes	Concentração
psiCHECK-2	15µg
<i>Xho</i> I (20.000U/mL)	80U
Buffer CutSmart Neb® (1x)	6µL
BSA (1x)	6µL
H ₂ O MilliQ®	q.s.p
Volume final	60µL

Após o processo de separação por eletroforese, o gel foi submetido à luz UV para visualização da banda que continha os vetores clivados. Com o auxílio de uma lâmina, a banda de interesse foi cortada do gel, alocada em um tubo *ependorfe* pesada em balança de precisão.

A purificação do vetor foi feita a partir da banda isolada do gel de agarose com o QIAquick Gel Extraction Kit da Qiagen®, seguindo o protocolo recomendado pela empresa. A concentração do vetor digerido foi estimada com auxílio do dispositivo NanoDrop da ThermoFisher Scientific®.

3.2.2 Preparação do inserto

Para a construção do inserto TS-miR31, foram sintetizados oligos que apresentam sítios de enzimas de restrição *Xho*I e *Sal*I pela empresa Exxtended® (Tabela 2). Foram misturados 10µL do *primer forward* Target-31-*Sal*I/*Xho*I-F e 10µL do *primer reverse* Target-31-*Sal*I-R, ambos de concentração de 100µM e incubados por 10 minutos à 95°C. Após esse tempo, a reação foi reservada à temperatura ambiente para realizar posteriormente a reação de ligação com o vetor psiCHECK-2, previamente clivado.

Tabela 2. Sequência dos *primers* para TS-miR31.

Primers	Sequências
Target-31-Sall/XhoI-F	5' TCGACTATAATCTCGAGCAGCTATGCCAGCATCTTGCCCTG 3'
Target-31-Sall-R	3' TCGACAGGCAAGATGCTGGCATAGCTGCTCGAGATTATAG 5'

3.2.3 Reação de ligação

Nas reações de ligações (Tabela 3), foram utilizados 100ng do vetor psiCHECK-2, digerido previamente, e duas concentrações do inserto junto com enzimas T4 ligase (NEB) e polinucleotideo T4 kinase (NEB), conforme o protocolo do fabricante.

Para que houvesse a ligação entre o vetor e o inserto, foram feitas quatro diferentes reações, conforme Tabela 3. A primeira reação era composta somente do vetor psiCHECK-2 e água MilliQ®, como controle negativo; a segunda, possuía todos os componentes da reação de ligação com exceção do inserto (TS-miR31), como controle positivo. As terceira e quarta reações se diferenciaram pela concentração do inserto na reação – na terceira, o inserto foi submetido à uma diluição de 1:10, ficando com uma concentração final de 10pmol/μL(*); e a quarta, permaneceu concentrada em 100pmol/μL(**). A concentração do vetor foi reajustada para 100ng/μL por meio de uma diluição da solução inicial.

Depois de adicionados todos os reagentes, as reações foram incubadas à 16°C *overnight* ou a temperatura ambiente, durante 2 a 3 horas.

Tabela 3. Protocolo para reação de ligação do vetor psiCHECK-2 e o inserto TS-miR31.

	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Amostra 4
Vetor psiCHECK-2	100ng	100ng	100ng	100ng
Inserto TS-miR31	-	-	1pmol	200pmol
Buffer da ligase (10x)	-	2µL	2µL	2µL
ATP (10x)	-	2µL	2µL	2µL
T4 Ligase (NEB®)	-	1µL	1µL	1µL
PNK	-	1µL	1µL	1µL
H₂O MilliQ®	q.s.p	q.s.p	q.s.p	q.s.p
Volume final	20µL	20µL	20µL	20µL

3.3 TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA

Para que pudéssemos obter o vetor PC-TS-miR31 (vetor psiCHECK-2 com o inserto TS-miR31), bactérias competentes DH5α, previamente submetidas ao teste de competência (Anexo A), foram transformadas pelo método de choque térmico. 5µL de produto das reações de ligação e 80µL de bactérias foram incubadas no gelo por 30 minutos e nos dois minutos seguintes, submetidas ao aquecimento à 42°C, para depois serem novamente resfriadas no gelo por 1 minuto. Em seguida, as reações de transformação receberam 900µL de meio SOC e foram incubadas durante 1 hora no *shaker* à 37°C para serem, em seguida, plaqueadas em meio Luria-Bertani (LB) contendo 1,5% de ágar e ampicilina (50mg/mL).

3.4 CULTURA DE BACTÉRIAS

A cultura de bactérias foi crescida utilizando-se meios de cultura LB, produzidos conforme a Tabela 4.

Os reagentes foram solubilizados em água e em seguida autoclavados a 121°C. Após esterilização, o antibiótico ampicilina foi adicionado ao meio de cultura na concentração de 50mg/ml.

Tabela 4. Relação dos reagentes para a produção de meio Luria-Bertani (LB).

Reagentes	Relação (g de reagente/1L de meio)
Triptona	10g
Extrato de Levedura	5g
Cloreto de Sódio	10g
Ágar (meio sólido apenas)	15g

3.4.1 Plaqueamento

Foram incubadas oito placas: quatro com 200µL das soluções de bactérias transformadas e outras quatro com 100µL das soluções concentradas por centrifugação (5000 rpm por 4 minutos). As placas foram incubadas em estufa à 37°C *overnight* a fim de obter as colônias transformadas com o vetor PC-TS-miR31.

3.4.2 Inóculo de clones do vetor PC-TS-miR31

As colônias para inóculo são escolhidas por sua localização mais centralizada da placa e pela existência de bordas circulares e regulares. Elas são coletadas com uma ponteira ou palito de madeira estéril e colocados em tubos de ensaio, com 5mL de meio LB líquido contendo ampicilina. As mesmas colônias são também replicadas em outra placa de Petri contendo meio LB (1,5% ágar e ampicilina), para ter um controle da cultura e uma amostra para estoque, no caso de ser comprovado posteriormente que se trata de um clone com o plasmídeo de interesse. Os inóculos foram crescidos no *shaker* a 37°C *overnight*.

3.5 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

O protocolo utilizado para as PCRs realizadas nesse projeto pode ser observado na Tabela 5. As reações foram incubadas no termociclador MultiGene OptiMax Thermal Cycler – Labnet International, programado para que a temperatura de anelamento fosse de 57°C e um total de 35 ciclos, fazendo uso da enzima Phusion polymerase, purificada no Laboratório Nacional de Biociências (LNBio). Em seguida, a reação foi submetida à eletroforese em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio (EtBr) nas quais as amostras foram carregadas com *Loading Dye* (6x) da ThermoFischer Scientific®. A migração das bandas foi comparada com o marcador de peso molecular ThermoFischer Scientific® O'GeneRuler 100pb DNA Ladder. Foi imposta uma voltagem de 100V, corrente de 400mA por 40 a 50 minutos.

Tabela 5. Protocolo para realização de PCR

Reagentes	Quantidades
DNA (10ng)	1ul
dNTPs (10mM)	0,25µl
<i>Primer forward</i> (10µM)	0,625µl
<i>Primer reverse</i> (10µM)	0,625µl
DMSO	0,375µL
Buffer phusion (5x)	2,5µL
Phusion (0,125U)	0,125ul
H ₂ O MilliQ®	7µl
Volume final	12,5µL

3.5.1 PCR de colônias

A PCR de colônias é útil para um rápido *screening* de clones positivos (que possuem o plasmídeo e o inserto) utilizando-se diretamente as colônias de bactérias

obtidas nos procedimentos anteriores. A Figura 8 ilustra o procedimento inicial para obtenção do DNA de bactérias.

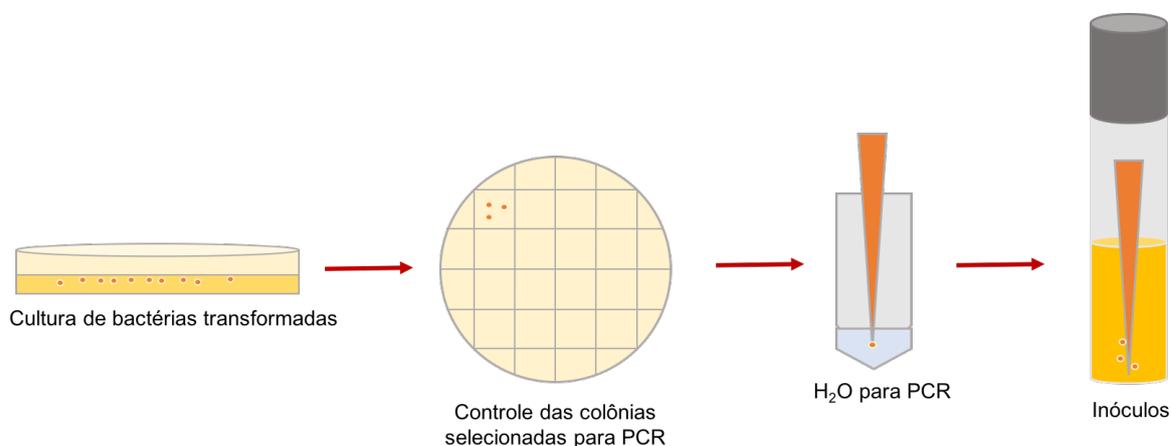


Figura 8. Obtenção de DNA de bactérias para PCR de colônias.

Inicialmente, é selecionada uma colônia que esteja localizada mais no centro da placa. A ponteira utilizada para retirar a colônia, é tocada em uma segunda placa para ser feito o controle. Com a mesma ponteira, ressuspende-se as bactérias na reação para PCR, e em seguida é deixada em um tubo de ensaio contendo 5mL de meio LB líquido com ampicilina – com intuito de fazer culturas de bactérias para serem realizados minipreps posteriormente.

O DNA das bactérias transformadas foi amplificado por PCR convencional, usando os *primers* PC *forward* e PC *reverse* descritos na tabela 6.

A fim de verificar a existência de clones positivos, foi realizada uma eletroforese em gel de agarose a 2%, corado com EtBr. Para observação dos fragmentos no gel, os 2,5µL do *Loading Dye* (6x) foram adicionados aos 12,5µL de produto de PCR – o volume final de 15µL é adicionado em sua totalidade nos poços do gel. Utilizou-se 4µL do marcador de peso molecular ThermoFischer Scientific® O'GeneRuler 100pb DNA Ladder.

Os geis de agarose contendo EtBr foram revelados por exposição à luz UV por 0,2 segundos.

3.5.2 Determinação da orientação de TS-miR31 clonados no vetor psiCHECK-2

Para determinar a orientação do inserto, foram montadas seis reações de PCR diferentes: controle negativo, para verificar a integridade dos reagentes usados na reação; controle positivo, onde foram adicionado 10ng do vetor parental; e quatro outras combinações de *primers*: PC *forward* + PC *reverse*, PC *forward* + TS-miR31-*Sall*-R, TS-miR31-*Sall/Xho*I-F + PC *reverse* e TS-miR31-*Sall/Xho*I-F + TS-miR31-*Sall*-R. Essas configurações permitem observar uma diferença no padrão de bandas formadas com a migração da banda do vetor parental.

Dos 12,5µL de reação produzida pela PCR, 5µL são usados para carregar o gel de agarose 2% juntamente com 2µL de *Loading Dye* (6x), totalizando 7µL por poço. É feita eletroforese em gel de agarose a 2% contendo EtBr de acordo com as condições previamente descritas nesse capítulo e reveladas por exposição à luz UV por 0,2 segundos.

Tabela 6. *Primers* utilizados para a amplificação por PCR

<i>Primers</i>	Sequências
PC <i>forward</i>	5' GCCTCCACTTCAGCCAGGAGG 3'
PC <i>reverse</i>	3'ACCAACACACAGATGTAATG 5'
TS-miR31-<i>Sall/Xho</i>I-F	5' TCGACTATAATCTCGAGCAGCTATGCCAGCATCTTGCCTG 3'
TS-miR31-<i>Sall</i>-R	3' TCGACAGGCAAGATGCTGGCATAGCTGCTCGAGATTATAG 5'

3.6 MINIPREPS

Minipreps foram realizadas para a extração de DNA plasmidial de bactérias transformadas em quantidades de até 20µL. Para esse projeto, foi utilizado o QIAprep® Spin Miniprep Kit da Qiagen, seguindo as instruções da própria empresa. A síntese desse procedimento pode ser visualizada na Figura 9.

Após centrifugação da cultura de bactérias, o *pellet* é ressuspendido utilizando-se o *buffer* B1 sob ação do *vortex* (Fig. 9.1). Na solução de células, é adicionado o *buffer* B2 para lise celular (Fig. 9.2) e o *buffer* B3 para precipitar os *debris* (Fig. 9.3). A amostra é submetida a uma centrifugação de 13.000 rpm por 10 minutos, para que forme um segundo *pellet*, contendo os *debris* do lisado celular (Fig. 9.4). O sobrenadante, que contém DNA, é transferido para uma coluna com uma matriz de separação e submetido a uma outra centrifugação de 13.000 rpm por 1 minuto (Fig. 9.5). O DNA ligado à coluna é lavado com dois outros *buffers*, para purificação. O DNA é eluído ao adicionar água MilliQ® ou um *buffer* de eluição e submetido a centrifugação, de 13.000rpm por 1 minuto (Fig. 9.6). A solução contendo o DNA plasmidial purificado é mantida no freezer a -20°C.

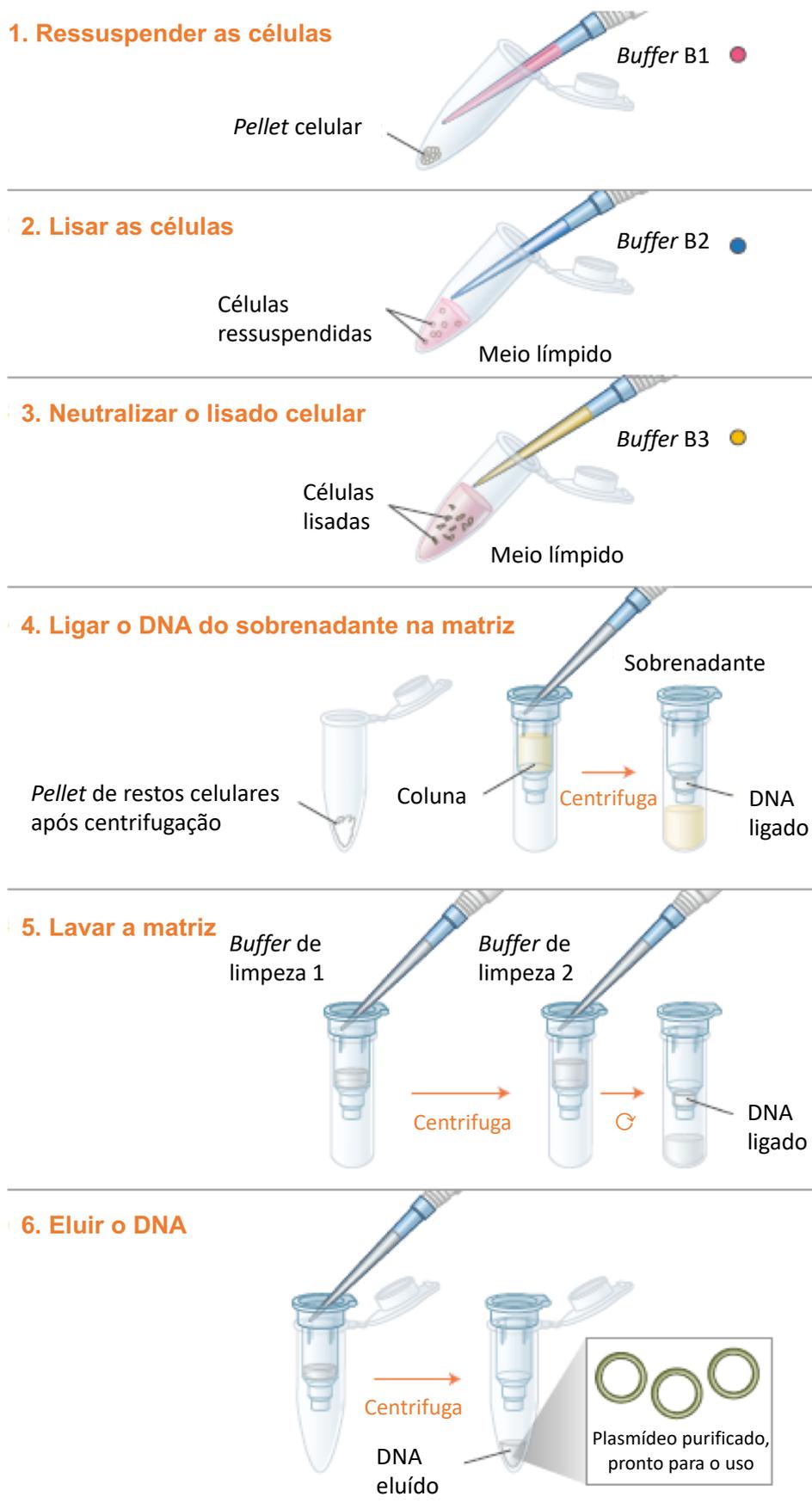


Figura 9. Protocolo para extração de DNA plasmidial de bactérias.

Fonte: New England Labs <<https://www.neb.com/products/t1010-monarch-plasmid-miniprep-kit>>.

3.7 ENSAIO EM CÉLULAS

Com o intuito de avaliar a eficiência dos vetores configurados, o ensaio em células foi realizado em células HEK 293 – uma linhagem celular humana derivada de células embrionárias de rim. São caracterizadas pelo seu rápido crescimento em meios de cultura, facilidade de manutenção e boa capacidade de transfecção – sendo uma candidata ideal para o nosso projeto.

Essas células não expressam mir31 de forma endógena, sendo necessária uma adaptação do experimento para permitir avaliar a eficiência de inibição dos vetores criados. Foi então criado um outro vetor, a partir do plasmídeo pBABE, no qual foi adicionado um gene GFP (proteína verde fluorescente) e uma sequência codificante para o microRNA-31, com um promotor constitutivo para permitir a expressão desse vetor na linhagem celular escolhida (Anexo B).

3.7.1 Cotransfecção de células HEK 293

Para a cotransfecção, 10^5 células foram cultivadas em cada poço das placas de cultura de 24 poços, com um volume final de 500 μ L e cultivadas na estufa a 37°C, 5% CO₂. Para a transfecção foi utilizado o reagente Lipofectamine e o meio de cultura Opti-MEM (ambos da ThermoFisher Scientific®). Esse reagente aumenta a eficiência de transfecção de plasmídeos em cultura de células *in vitro* por produzir lipossomas com os vetores, sendo capazes de se fundir com a membrana celular liberando todo seu conteúdo no interior das células. O meio de cultura Opti-MEM fornece os nutrientes necessários para favorecer o crescimento das células otimizando o ambiente celular para esse processo.

A cotransfecção fez uso de duas soluções iniciais – uma de 50 μ L de meio Opti-MEM contendo 100ng de cada DNA plasmidial de interesse e outra de 50 μ L de meio contendo 1 μ L de Lipofectamine. As soluções foram misturadas e incubadas à temperatura

ambiente por 20 minutos para posteriormente serem adicionadas aos poços contendo as células HEK 293, conforme a figura 10.

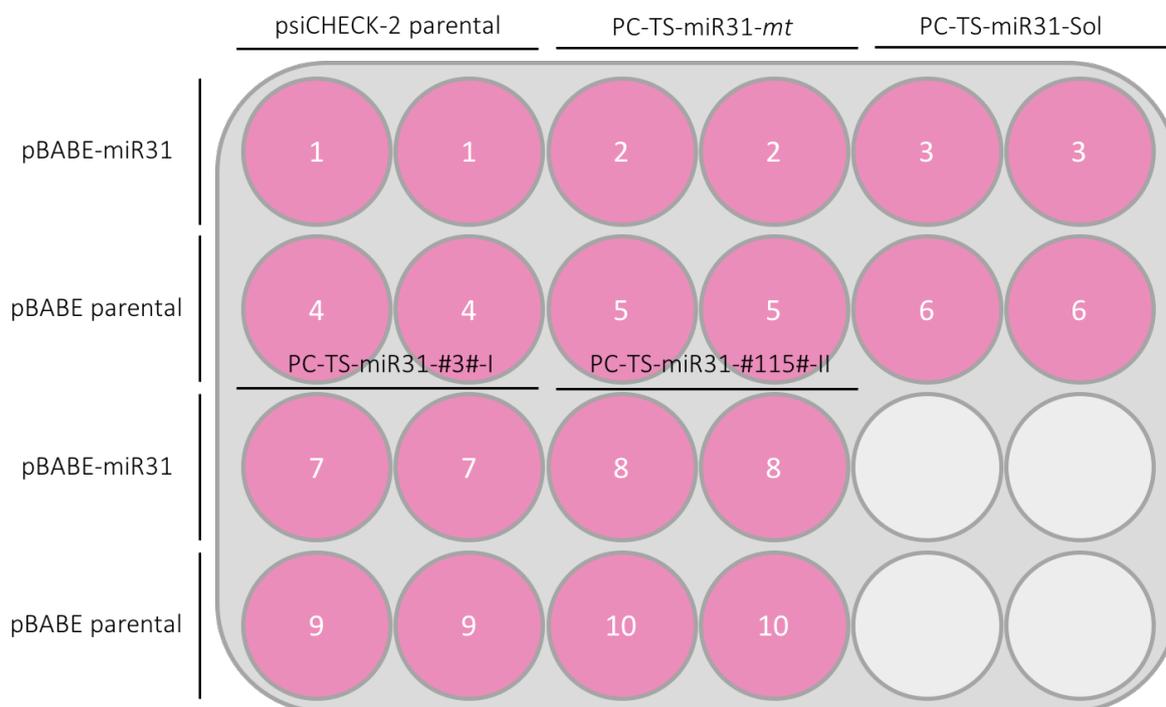


Figura 10. Configuração das cotransfecções realizadas para o ensaio em células. Foram utilizados vinte poços para realizar, em duplicata, as cotransfecções das células HEK 293. Os poços foram organizados de forma a obter dez situações distintas para possibilitar a comparação de resultados posteriores no ensaio de atividade de luciferase.

As células transfectadas foram cultivadas *overnight* na estufa a 37°C a 5% CO₂. O meio de cultura foi trocado após 24 horas da cotransfecção e após 48 horas o meio foi descartado e as células congeladas a -80°C para lise e posterior ensaio de atividade de luciferase.

3.7.2 Ensaio de atividade de luciferase

Para o ensaio de atividade de luciferase, foi usado o kit Dual-Glo[®] Luciferase Assay System da Promega[®] e seguido o protocolo segundo as orientações da empresa.

As células plaqueadas foram ressuspensas em 150µL de PBS 1x por poço, com auxílio da pipeta. Em uma placa de 96 poços, foram adicionados 75µL de células e 75µL do Dual-Glo[®] Luciferase Assay Reagent. Foi feita uma primeira medição da atividade da enzima luciferase *firefly*, o normalizador do nosso sistema. Em seguida, foi adicionado 60µL da solução contendo os Dual-Glo[®] Stop & Glo[®] Reagent (100x) para poder medir a atividade de luciferase *Renilla*.

Foi usado o luminômetro GloMax[®] 96 Microplate Luminometer da Promega[®] para avaliar os sinais emitidos pelas enzimas estudadas.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nesta parte do estudo, apresentaremos uma breve descrição dos resultados obtidos no projeto desenvolvido no Laboratório Nacional de Biociências (LNBio), no Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM) em Campinas, SP. O objetivo foi a criação de um vetor viral com sítios alvo de microRNA clonados em *tandem* para controlar a expressão do transcrito do plasmídeo – o PC-TS-miR31 – avaliando sua eficiência de inibição por meio de ensaios de atividade de luciferase.

4.1 CLONAGEM DO PRIMEIRO SÍTIO TS-MIR31 NO VETOR PSICHECK-2

O psiCHECK-2 (Figura 11) foi o vetor escolhido para desenvolver esse projeto por possuir integrado à sua sequência, genes como o de resistência à ampicilina – útil para a seleção de bactérias que foram capazes de internalizar os plasmídeos gerados – e genes que codifiquem a enzima luciferase, utilizada posteriormente para a avaliação da eficácia das diferentes configurações dos vetores. É um vetor usado para ser expresso em células de mamíferos e com um sistema otimizado para a expressão de RNA de interferência (RNAi).

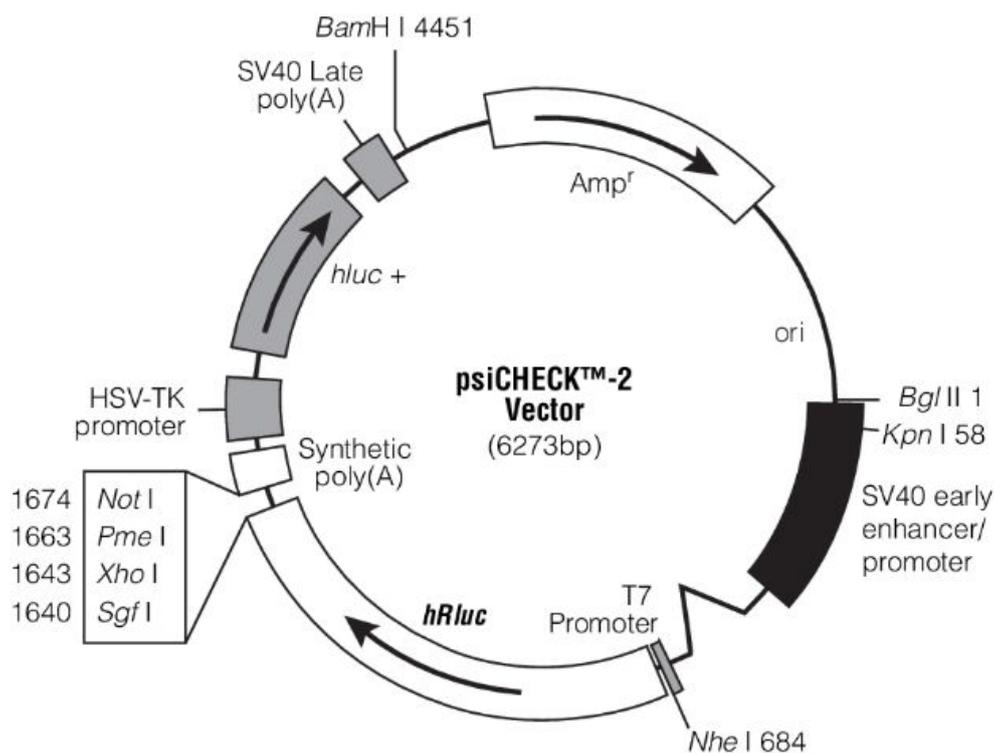


Figura 11. Configuração do vetor psiCHECK-2.

O vetor psiCHECK-2 possui 6.273 pares de base e possui em sua sequência, genes que codificam para a enzima luciferase (hRluc/hLuc+) e para resistência à ampicilina (Amp^r). Possui sítios de restrição que podem ser clivados pelas enzimas *NotI*, *PmeI*, *SgfI* e *XhoI* – essa última a de maior importância para o nosso estudo. Fonte: Promega® <https://www.promega.com.br/products/rna-analysis/rna-interference/psicheck_1-and-psicheck_2-vectors/?activeTab=2>

A fim de iniciar o processo de clonagem do sítio alvo, foram digeridos 15µg do vetor psiCHECK-2 com a enzima de restrição *XhoI*, submetidos à desfosforilação com a enzima fosfatase alcalina (CIP) e posteriormente à purificação. Foi obtida assim uma preparação do vetor digerido na concentração de 148,7ng/µL, calculada com o auxílio do NanoDrop da ThermoFisher Scientific®. O inserto foi preparado pelo anelamento dos *primers* Target-31-*Sall/XhoI*-F (*forward*) e Target-31-*Sall*-R (*reverse*), conforme protocolo descrito no capítulo anterior (Capítulo 3, página 26). Após reação de ligação vetor-inserto, bactérias DH5-α foram transformadas.

Com o intuito checar a existência de clones positivos, ou seja, colônias de bactérias que foram capazes de internalizar o plasmídeo de interesse PC-TS-miR31, foi realizada uma PCR de colônias (Capítulo 3, página 27).

Para esse experimento, foram utilizadas placas de cultura de bactérias que foram transformadas com as reações de ligação 3 e 4 (Vide Tabela 3, no Capítulo 3, item 3.2.3, página 26). Para a PCR, foram utilizados os *primers* PC *foward* e PC *reverse*, conforme item 3.5 do Capítulo 3 (página 26), permitindo constatar que das 30 (trinta) colônias selecionadas, somente uma – o clone 3 – aparentou possuir o plasmídeo contendo o inserto (Figura 12).

Os *primers* utilizados para o *screening* ligam-se *upstream* e *downstream* ao sítio de clonagem múltipla amplificando cerca de 200pb do vetor. Quando o inserto, de tamanho aproximado a 50pb está inserido no sítio de *XhoI* do vetor, espera-se obter um produto de PCR em torno de 250pb. É possível observar na figura 10, as bandas correspondentes à amplificação de sequência do vetor parental e clone positivo (clone 3) para o vetor PC-TS-miR31.

O controle negativo apresentou bandas, indicando uma possível contaminação de algum dos reagentes utilizados para a execução da PCR. Contudo, esse fator não interfere no resultado observado com o clone 3, pois as bandas apresentadas são distintas entre si. No entanto, foram realizados outros experimentos para comprovar a existência do sítio alvo clonado, bem como sua orientação no plasmídeo, o que é fundamental para o desempenho correto na inibição.

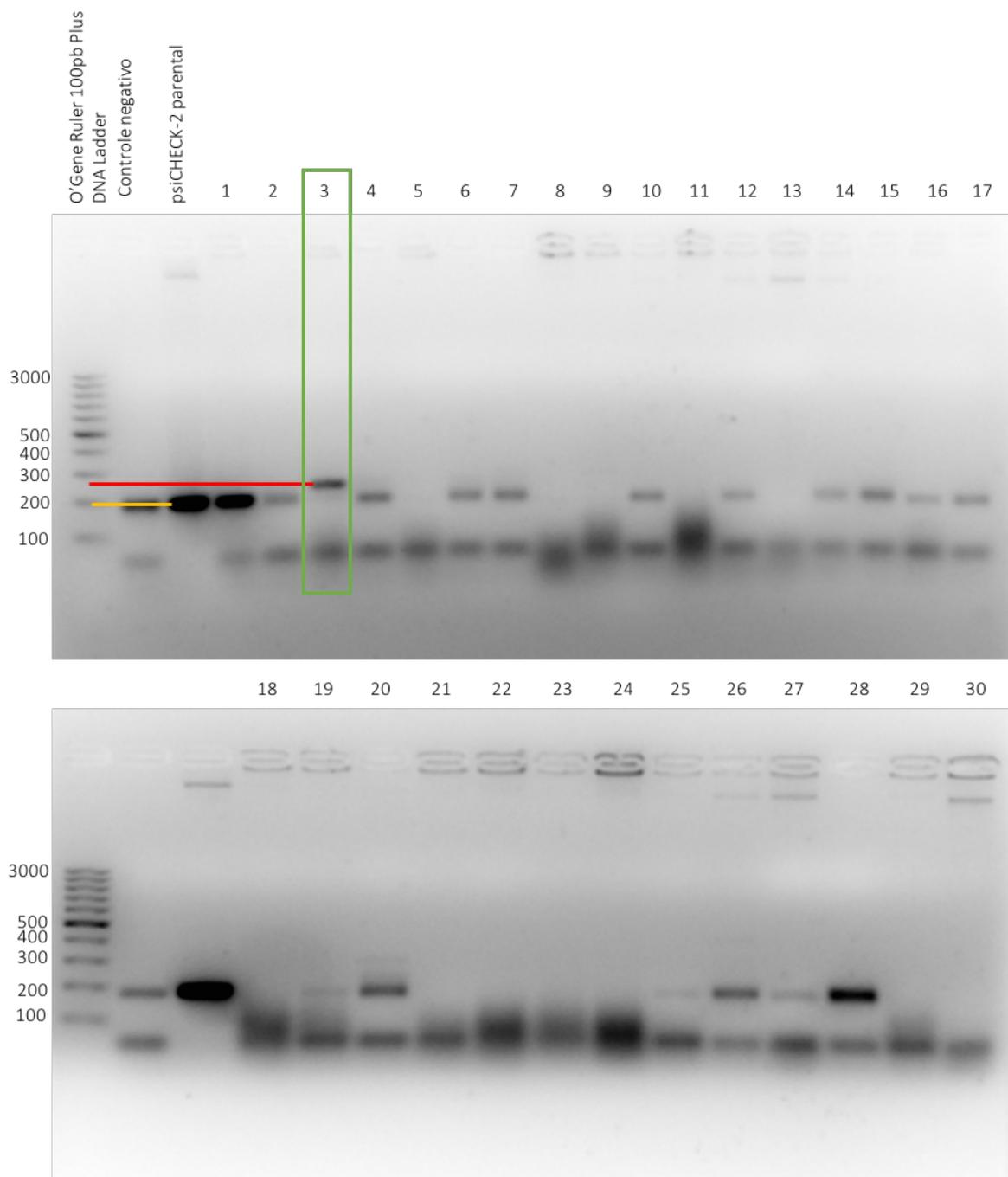


Figura 12. Eletroforese em gel de agarose a 2% da reação de PCR de colônias (clones 1 a 30). O gel foi carregado com 12,5 μ L de produto de PCR de colônia das bactérias transformadas juntamente com 2,5 μ L de *Loading Dye* (6x) por poço, para visualização das bandas. No primeiro poço, foram adicionados 4 μ L do marcador de peso molecular, ThermoFischer Scientific® O'GeneRuler 100pb Plus DNA Ladder, seguidos pelo controle negativo e positivo (com o psiCHECK-2 parental), a fim de comparar o tamanho entre as bandas obtidas na eletroforese. Foi imposta uma voltagem de 120V e corrente elétrica de 400mA durante 45 minutos. A foto foi tirada com exposição por 0,2 segundos à luz UV. A barra em verde, mostra o clone positivo, próximo dos 300pb (representado pela linha vermelha), cuja banda está acima dos 200pb da banda parental (representado pela linha amarela).

Do inóculo produzido anteriormente durante a etapa de PCR de colônia, foi obtido um *pellet* bacteriano por meio de centrifugação a 13.000 rpm por 1 minuto. Em seguida, foi realizada uma miniprep para possibilitar a extração do DNA plasmidial da colônia de bactéria positiva (clone 3), utilizando-se o kit Qiagen QIAprep® Spin Miniprep, que nos permitiu a obtenção de uma solução pura de DNA de concentração final de 606,7ng/μL. Prosseguiu-se então para a PCR.

4.2 DETERMINAÇÃO DA ORIENTAÇÃO DO INSERTO TS-MIR31 NO VETOR PSICHECK-2

Com o objetivo de confirmar a orientação correta do inserto no plasmídeo, foi realizada a PCR utilizando-se quatro diferentes *primers*: dois complementares às sequências do vetor psiCHECK-2 e outros dois, às sequências do sítio alvo. Quatro reações foram criadas de acordo com a combinação dos *primers* (vide Tabela 6, Capítulo 3, página 31). A utilização dessas diferentes reações permite predizer a orientação do inserto pela relação entre os *primers* usados na amplificação por PCR e o tamanho das bandas obtidas.

Na Figura 13, observa-se que independente da orientação do inserto, ao se realizar uma reação contendo os dois *primers* PC, uma banda de aproximadamente 226pb seria observada em uma eletroforese em gel de agarose. No caso de uma reação com os *primers* TS-miR31-*Sall/XhoI*-F (ou Target *forward*) e TS-miR31-*Sall*-R (ou Target *reverse*), uma banda de 40pb seria observada. No entanto, ao se fazer uma combinação entre o *primer* PC *forward* e Target *reverse* em condições nas quais o inserto está ligado da forma desejada (representado em verde claro), deve ser observada uma banda de 143pb. Se houvesse uma ligação inversa do inserto (representado em vermelho), a amplificação seria impedida. Combinando os *primers* Target *forward* e PC *reverse*, a banda correspondente ao inserto de orientação correta seria de 123pb, contrastando com a inexistência de banda na configuração antisenso.

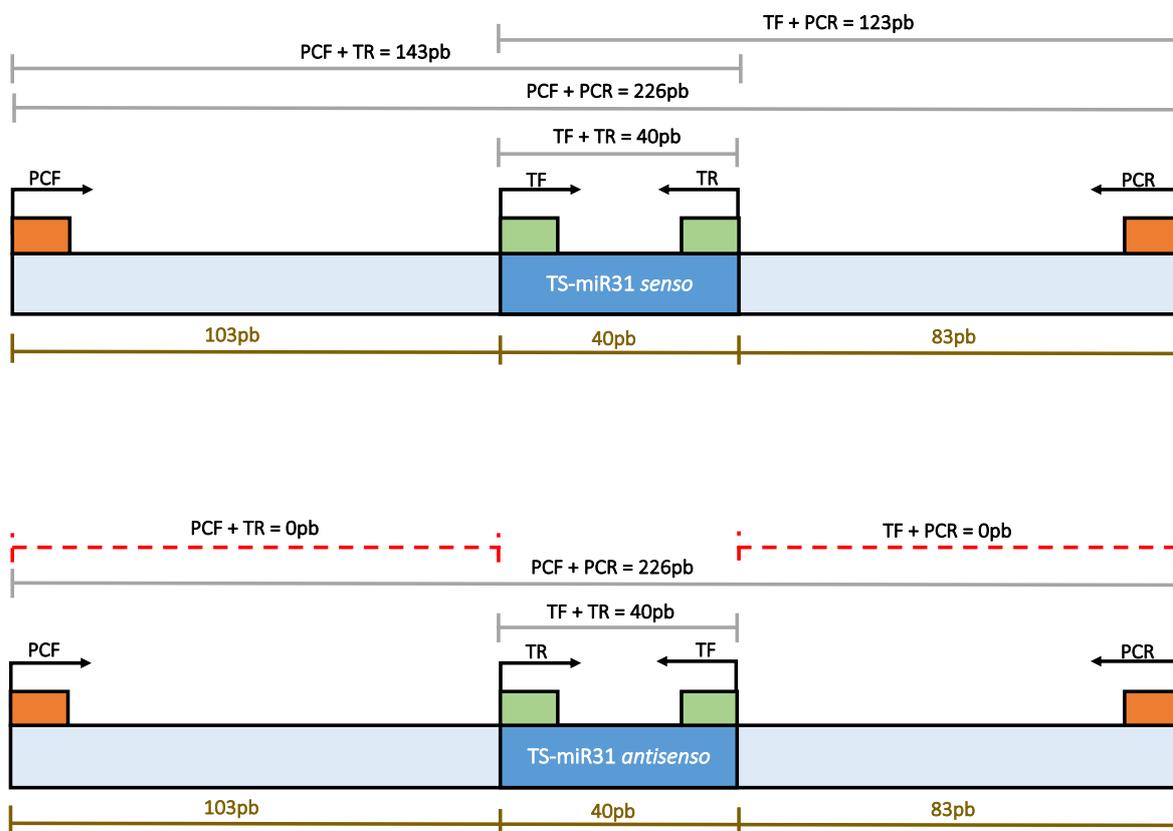


Figura 13. Sítios de reconhecimento dos *primers* utilizados para determinação da orientação do inserto.

Simulação das possíveis configurações do vetor com o primeiro sítio alvo clonado. Em laranja, a representação dos sítios de reconhecimento dos *primers* PC *forward* (PCF) e *reverse* (PCR); em verde, o sítio de amplificação dos primers TS-miR31-*Sall*/*Xho*-F (TF) e TS-miR31-*Sall*-R (TR). As linhas em cinza representam o tamanho das bandas correspondentes à uma amplificação com cada um dos *primers* descritos. As linhas em vermelho mostram a inexistência de amplificação em uma PCR.

Dessa forma, foi realizada uma eletroforese em gel de agarose a 2%, contendo EtBr e utilizou-se o marcador padrão de peso molecular ThermoFischer Scientific® O'GeneRuler 100pb DNA Ladder (Figura 14).

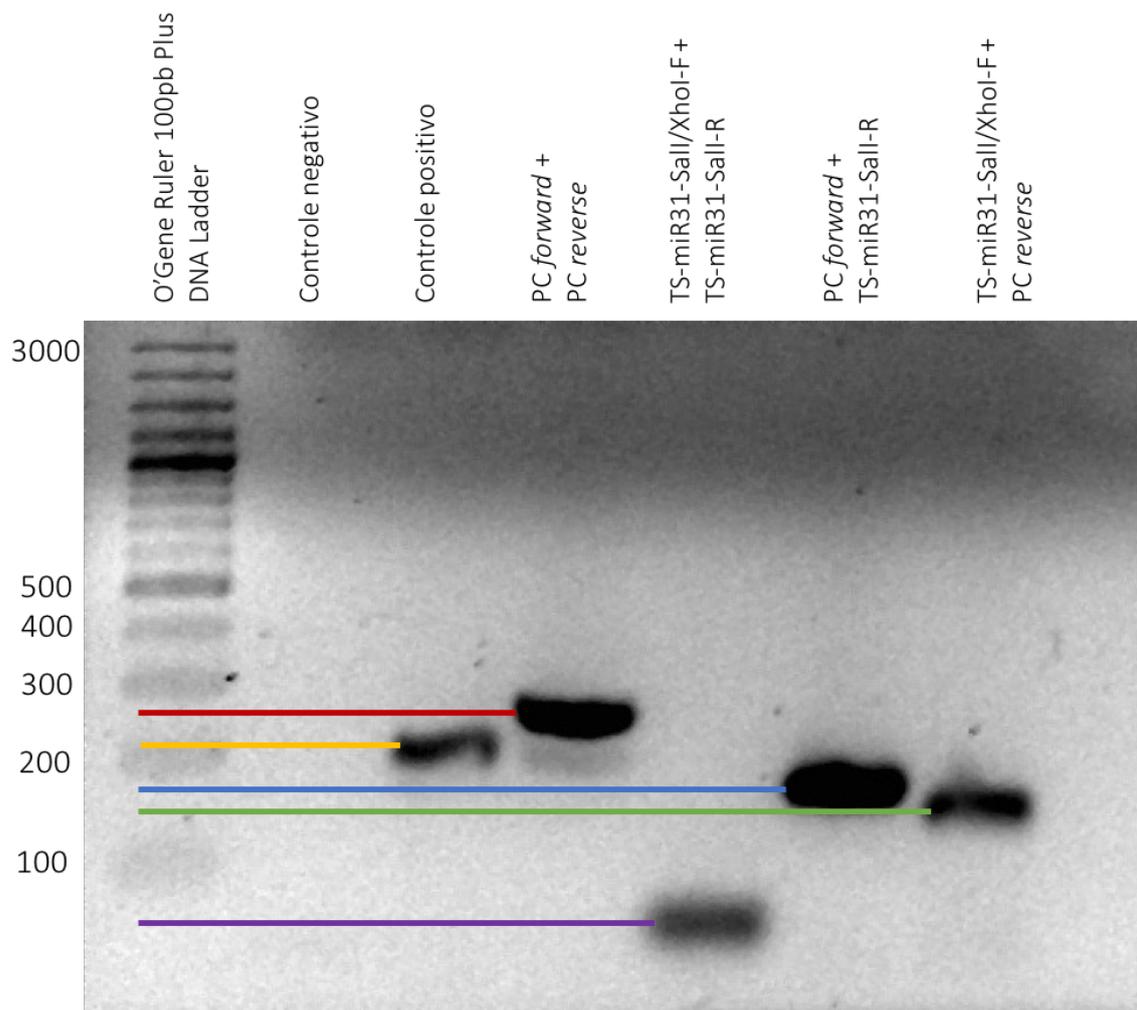


Figura 14. Reação de PCR para verificação da orientação do inserto TS-miR31 clonado no vetor psiCHECK-2.

O gel foi carregado com 5 μ L da miniprep do clone 3 (10ng/ μ L) e 1 μ L de *Loading Dye* (6x) por poço, para visualização das bandas, com exceção do controle positivo, onde foi colocado 10ng do vetor parental (psiCHECK-2). O controle negativo está sob as condições desejadas (sem contaminação). Para a eletroforese foi imposta uma voltagem de 100V, corrente elétrica de 400mA durante 40 minutos. A foto foi tirada sob exposição por 0,2 segundos à luz UV.

De acordo com o padrão de migração das bandas no gel, podemos concluir que estas migraram conforme o previsto, inferindo-se que o primeiro inserto se encontra na orientação desejada.

Para confirmação, a amostra foi sequenciada. Foi utilizado o *primer PC forward* numa concentração de 3pmol/ μ L e realizado no laboratório de sequenciamento de DNA do LNBio. O resultado do sequenciamento corroborou os nossos resultados e a partir desse clone – agora chamado de PC-TS-miR31-I – foi possível prosseguir com a clonagem do segundo sítio alvo.

4.3 CLONAGEM DO SEGUNDO SÍTIO ALVO NO VETOR PC-TS-MIR31-I

Foram digeridos 10µg do vetor PC-TS-miR31-I com a enzima de restrição *Xho*I. O vetor foi isolado em gel de agarose 1% e purificado com o QIAquick Gel Extraction Kit da Qiagen®. A concentração obtida foi de 85,7ng/µL, calculada com o auxílio do NanoDrop da ThermoFisher Scientific®. O inserto foi preparado pela mistura dos *primers* Target *forward* e Target *reverse* e aquecimento a uma temperatura de 95°C, seguido de resfriamento à temperatura ambiente, permitindo seu anelamento. Foram realizadas as reações de ligação, conforme descrito no item 3.2.3 do Capítulo 3 (página 26) e incubadas *overnight* a 16°C a fim de prosseguir para a transformação bacteriana.

Como anteriormente, das seis placas de cultura com bactérias transformadas, quatro foram utilizadas para a escolha de cinquenta colônias para verificar a existência de clones positivos. As colônias escolhidas foram submetidas a uma reação de PCR de colônias segundo o protocolo descrito no Capítulo 3 (página 29) seguida de eletroforese em gel de agarose a 2% para visualizar a existência de bandas correspondentes ao plasmídeo clonado nas bactérias transformadas.

O resultado da eletroforese pode ser observado nas Figura 15 e 16. Infelizmente, possivelmente por falhas na execução da técnica, não foram observadas bandas de DNA, somente de uma contaminação do controle negativo. Embora o resultado para alguns dos clones (37, 49, 60 e 74) aparentassem ter bandas, não foi possível afirmar que os plasmídeos possuíssem dois insertos TS-miR31 clonados. Não foram observadas bandas correspondentes a fragmentos maiores em relação ao controle positivo (amplificação do fragmento do vetor psiCHECK-2). A diferença encontrada seria de aproximadamente 80pb (valor dos dois insertos) entre o parental e os novos clones.

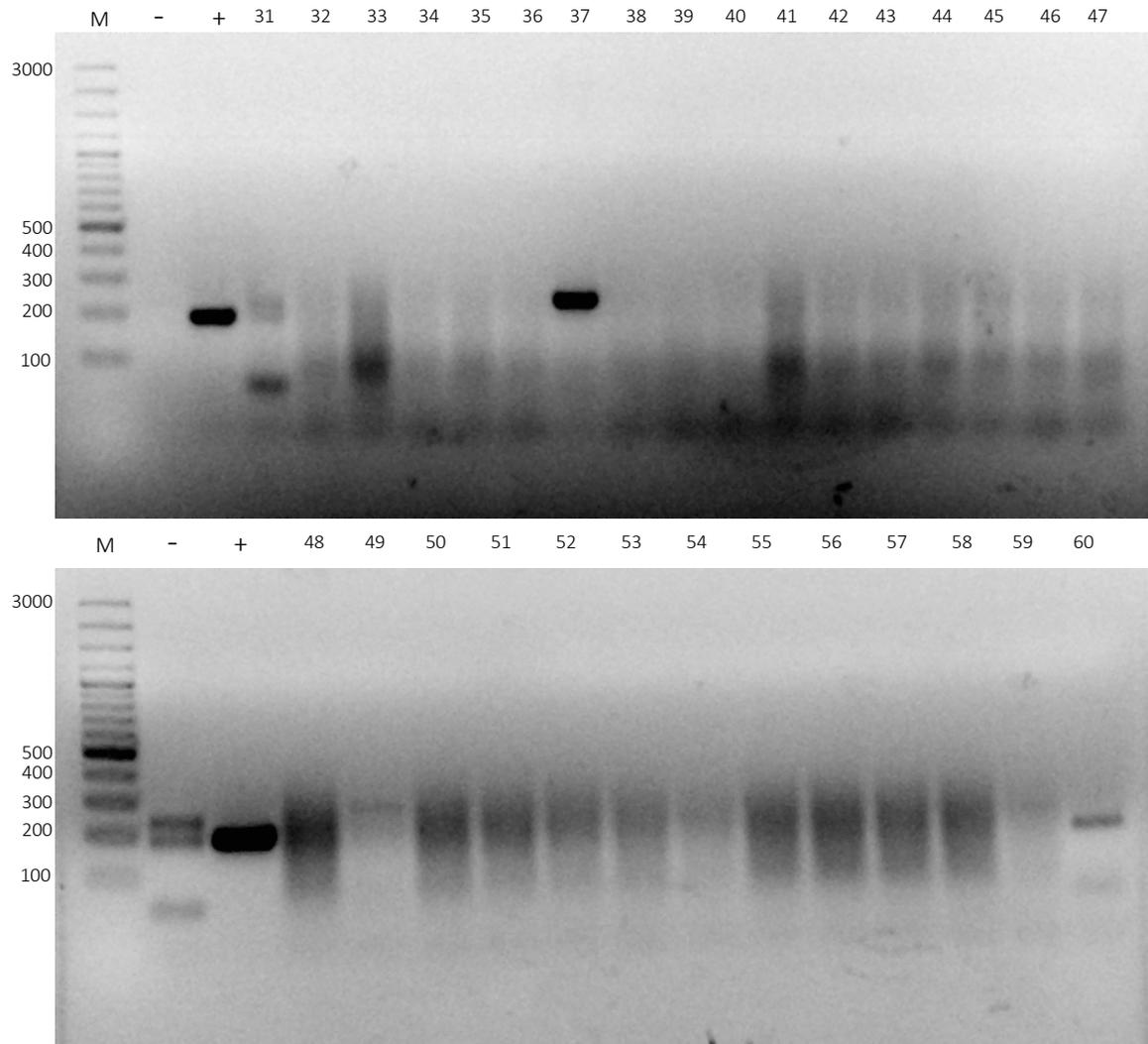


Figura 15. Eletroforese em gel de agarose a 2% da reação de PCR de colônias (clones 31 a 60). Foram adicionados aos 12,5 μ L de produto de PCR de colônia, 2,5 μ L de *Loading Dye* (6x) por poço, para visualização das bandas. No primeiro poço, foram adicionados 4 μ L do marcador de peso molecular, ThermoFischer Scientific® O'GeneRuler 100pb Plus DNA Ladder (M). Para a eletroforese, foi imposta uma voltagem de 120V, corrente elétrica de 400mA durante 45 minutos. A foto foi tirada com exposição por 0,2 segundos à luz UV.

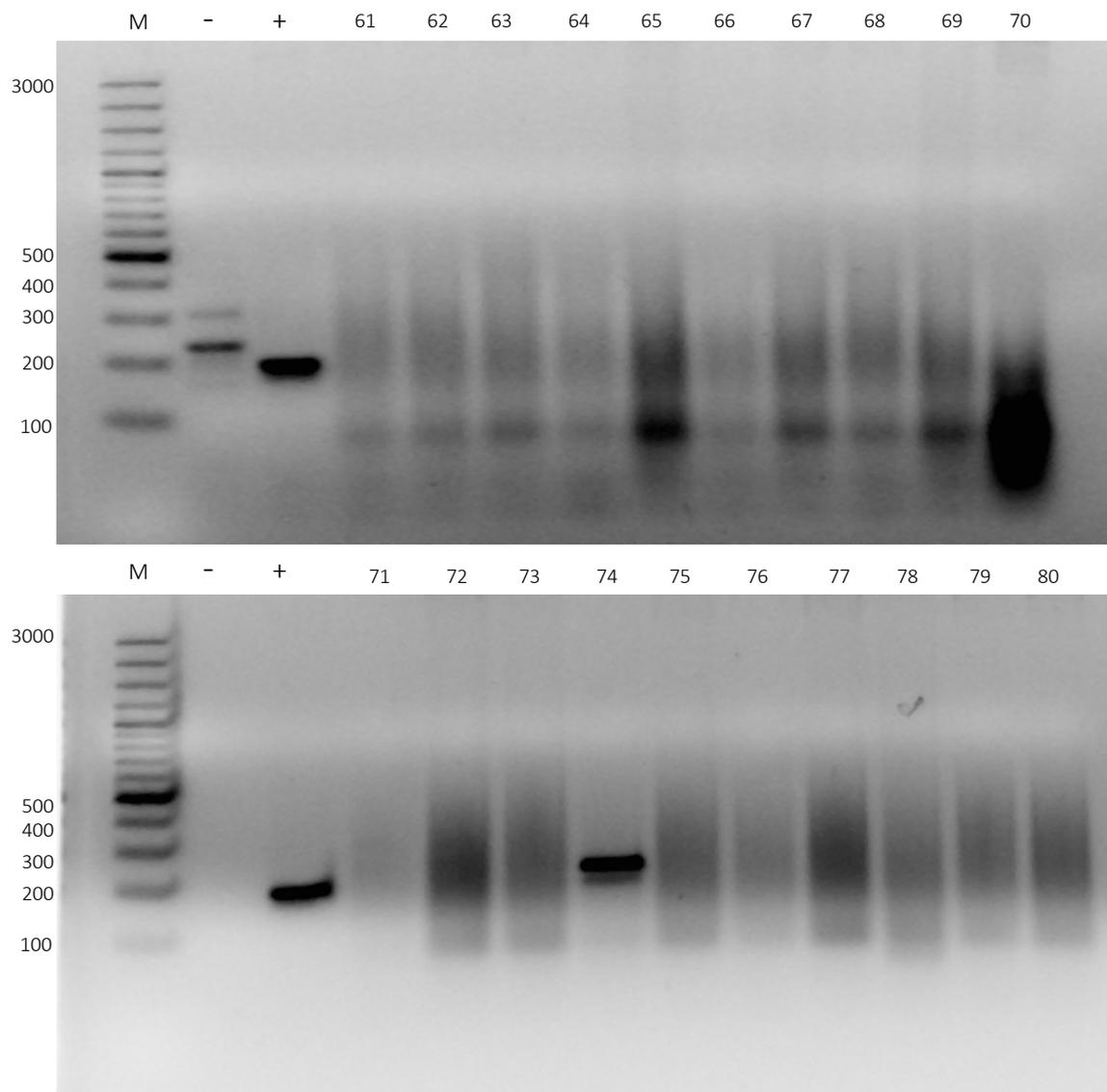


Figura 16. Eletroforese em gel de agarose a 2% da reação de PCR de colônias (clones 60 a 80). Foram adicionados aos 12,5 μ L de produto de PCR de colônia, 2,5 μ L de *Loading Dye* (6x) por poço, para visualização das bandas. No primeiro poço, foram adicionados 4 μ L do marcador de peso molecular, ThermoFischer Scientific® O'GeneRuler 100pb Plus DNA Ladder (M). Para a eletroforese, foi imposta uma voltagem de 120V, corrente elétrica de 400mA durante 45 minutos. A foto foi tirada com exposição por 0,2 segundos à luz UV.

Foi proposta então uma repetição do protocolo de digestão, ligação e transformação bacteriana, já descritos anteriormente. Mais trinta colônias foram selecionadas para fazer PCR e detectar a presença de novos clones. O resultado da eletroforese realizada pode ser visualizado na Figura 17.

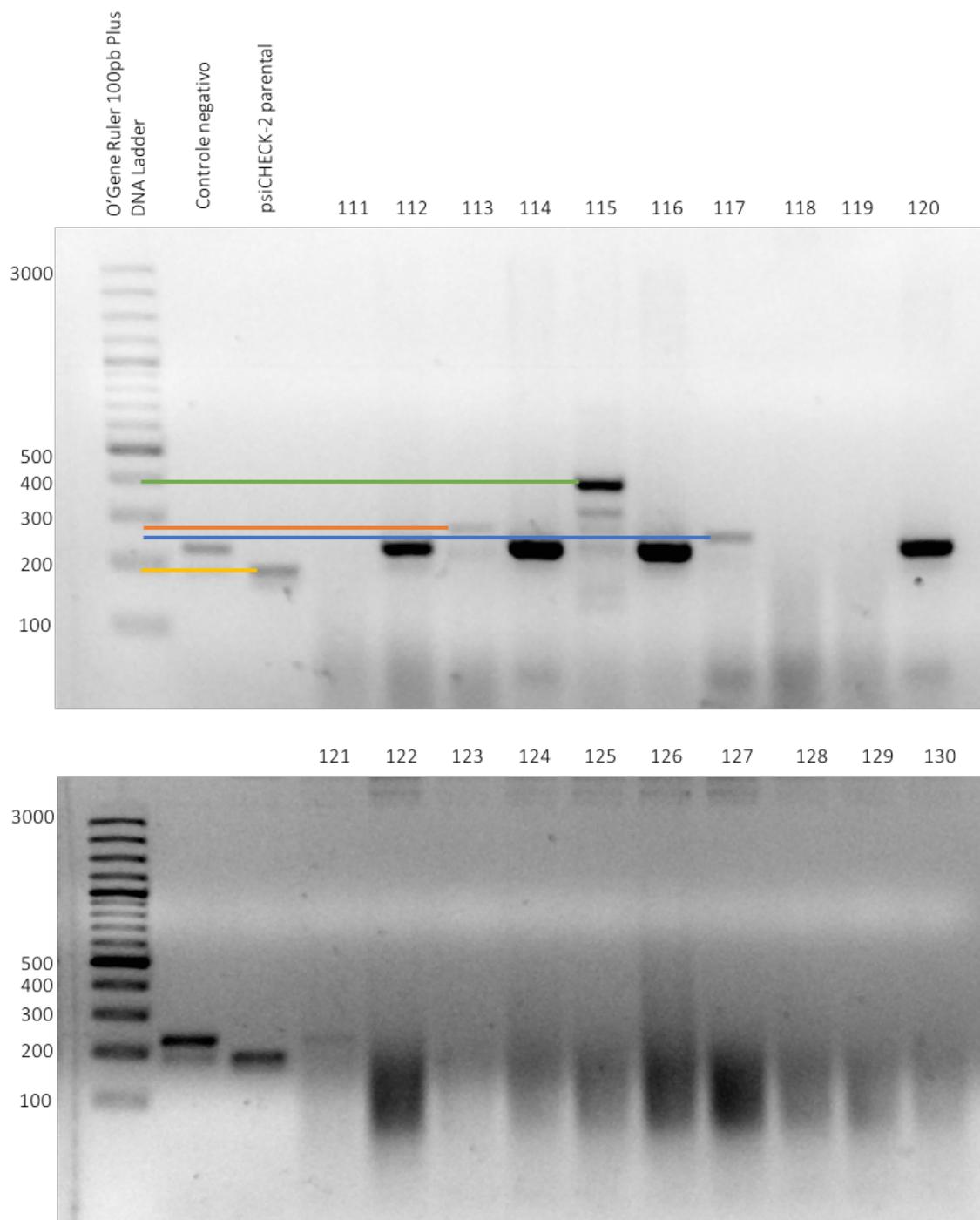


Figura 17. Eletroforese em gel de agarose 2% da reação de PCR de colônias (clones 111 a 130). Foram adicionados 12,5 μ L de produto de PCR de colônia das bactérias transformadas juntamente com 2,5 μ L de *Loading Dye* (6x) por poço, para visualização das bandas. No primeiro poço, foram adicionados 4 μ L do marcador de peso molecular, ThermoFischer Scientific® O'GeneRuler 100pb Plus DNA Ladder. Para a eletroforese, foi imposta uma voltagem de 120V, corrente elétrica de 400mA durante 45 minutos. A foto foi tirada com exposição por 0,2 segundos à luz UV.

Podemos observar que também houve contaminação do controle negativo, pois é possível visualizar a presença e migração de bandas de DNA. Os clones 118, 119 e 121 a 130 aparentaram não possuir DNA plasmidial de interesse pois não houve amplificação com os *primers* escolhidos. Já as amostras referentes aos clones 113, 115 e 117, apresentaram bandas bem acima da banda parental (marcada em amarelo), e foram selecionados para dar continuidade aos experimentos para avaliar a possibilidade de terem o PC-TS-miR31-I clonado com um segundo sítio alvo. Os outros clones que apresentaram bandas de material genético amplificado não foram considerados clones positivos devido ao padrão de migração de suas bandas (em torno de 230pb), indiciando a presença de somente um único sítio alvo clonado, conforme experimentos anteriores.

4.4 DETERMINAÇÃO DA ORIENTAÇÃO DO INSERTO TS-MIR31 NO VETOR PC-TS-MIR31-I DOS CLONES 113, 115 E 117

Com o intuito de confirmar a presença e orientação do segundo sítio clonado no vetor PC-TS-miR31-I, foi realizada uma PCR com a mesma combinação de *primers* do inserto e do vetor, conforme descrito no Capítulo 3, item 3.5.2 (página 31). Contudo, para esta etapa as bandas devem mostrar um padrão diferente da clonagem anterior, uma vez que haveriam dois sítios alvos. Para compreender melhor, foi feita uma simulação das possíveis configurações do vetor com os dois sítios TS-miR31 ligados (Figura 18) e o resultado do gel de agarose desejado, em comparação à presença de um único sítio alvo (Figura 19).

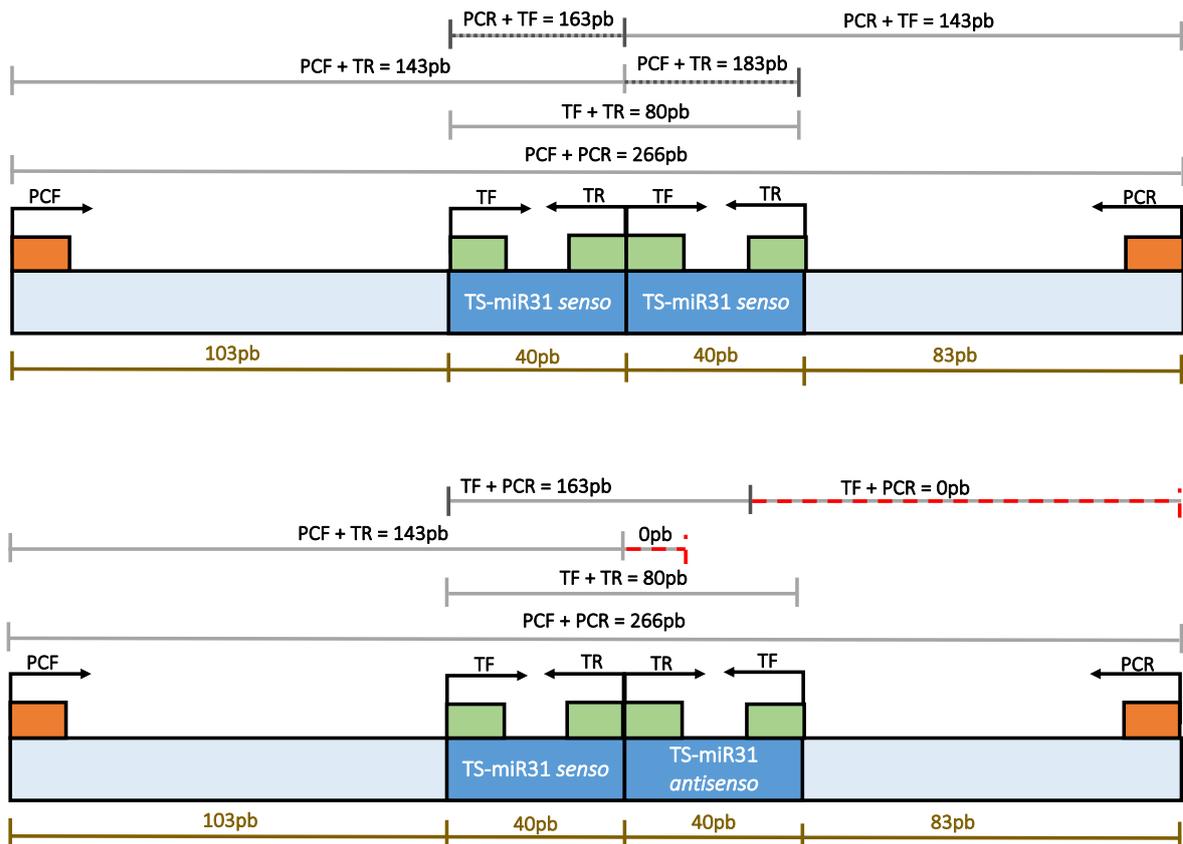


Figura 18. Sítios de reconhecimento dos *primers* utilizados para determinação da orientação dos insertos.

Simulação das possíveis configurações do vetor com o primeiro sítio alvo clonado. Em laranja, a representação dos sítios de reconhecimento dos *primers* PC *forward* (PCF) e *reverse* (PCR); em verde, o sítio de amplificação dos *primers* TS-miR31-*Sall*/*Xho*-F (TF) e TS-miR31-*Sall*-R (TR). As linhas em cinza representam o tamanho das bandas correspondentes à uma amplificação com cada um dos *primers* descritos. As linhas em vermelho mostram a inexistência de amplificação em uma PCR.

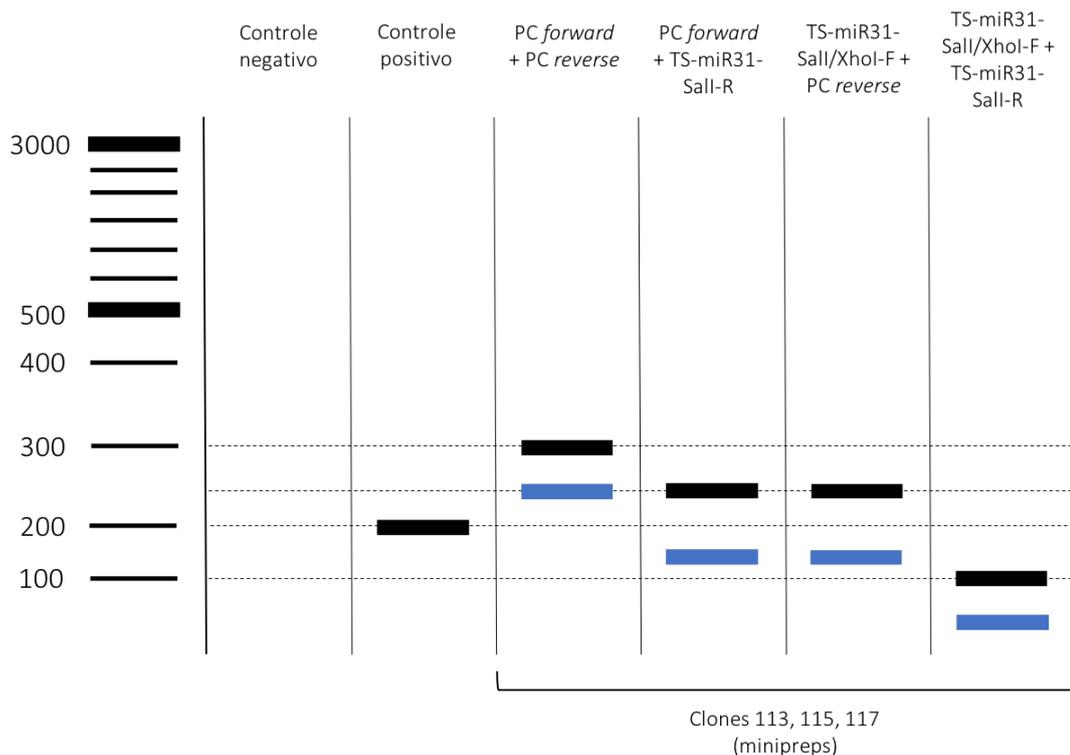


Figura 19. Simulação da eletroforese em gel de agarose dos clones 113, 115 e 117 em comparação às bandas referentes à clonagem de um sítio alvo.

Simulação da migração das bandas de DNA de acordo com a configuração dos *primers*. Em preto, a migração esperada das bandas. Em azul, o padrão de migração das bandas amplificadas do vetor com apenas um sítio alvo clonado.

Ao amplificar os vetores clonados (clones 113, 115 e 117) com os mesmos *primers* utilizados anteriormente, foi constatado que houve uma ligeira diferença no padrão de migração das bandas, mas não o suficiente para confirmar a presença de um segundo sítio alvo (Figura 20) no vetor PC-TS-miR31-I. Isso ocorre devido ao fato de haver uma diferença de apenas 40pb entre um vetor e outro, sendo difícil de visualizar claramente em uma eletroforese em gel de agarose. É notável que houveram problemas com o desenvolvimento da PCR, visto que foi observada a presença de bandas no controle negativo e falta de bandas em algumas amostras – como no caso do clone 113 amplificado com os *primers* TS-miR31-Sall/XhoI-F (na figura representado como *Target forward*) e PC *reverse*; bem como no clone 115, o qual foi amplificado com ambos os *primers* PC.

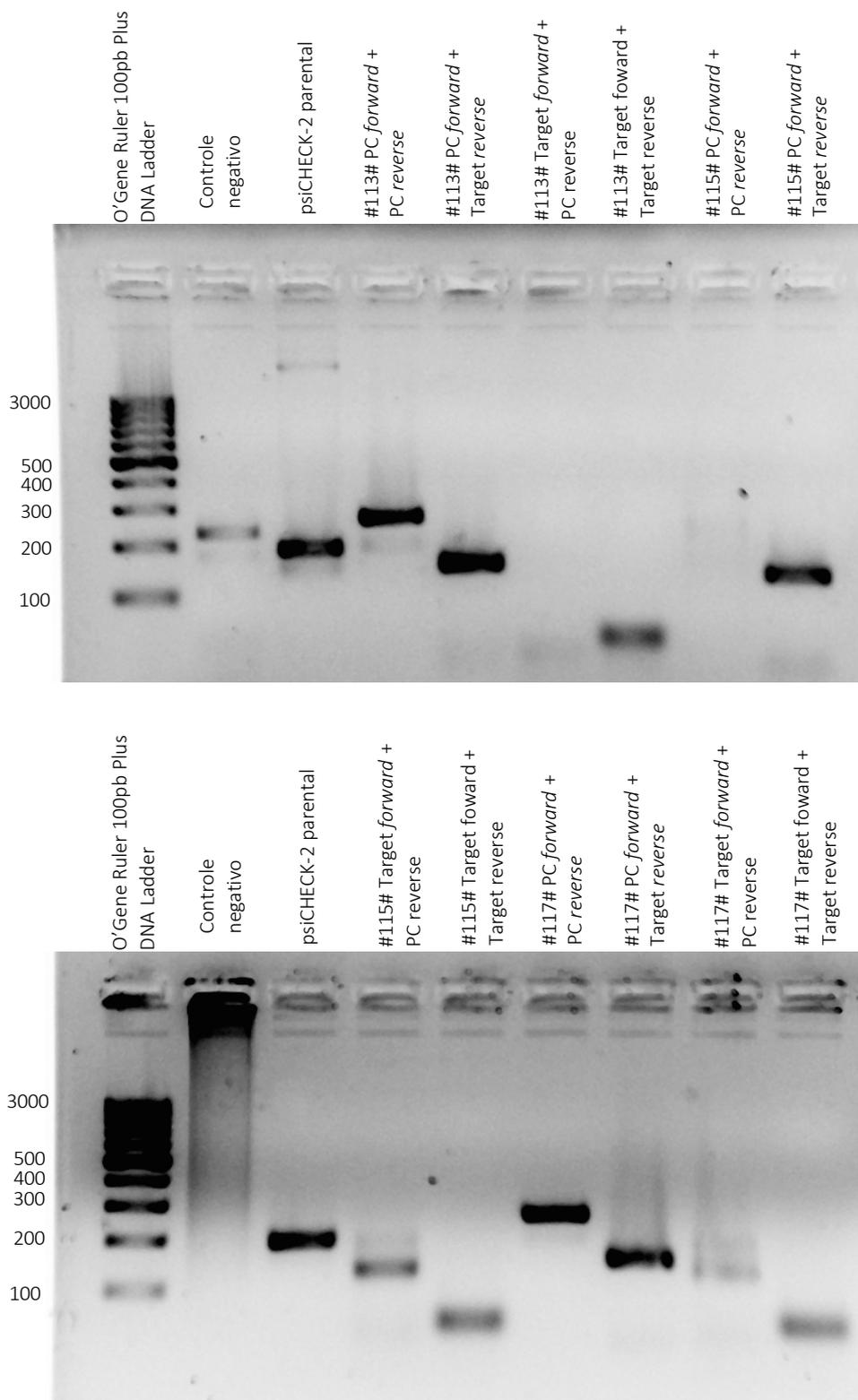


Figura 20. Orientação do segundo sítio TS-miR31 no vetor PC-TS-miR31-I dos clones 113, 115 e 117.

O gel foi carregado com 5 μ L da miniprep dos clones 113, 115 e 117 (10ng/ μ L) e 1 μ L de *Loading Dye* (6x) por poço, para visualização das bandas. O controle positivo foi composto de 10ng do vetor parental (psiCHECK-2). O controle negativo está com algum tipo de contaminante. Para a eletroforese foi imposta uma voltagem de 100V, corrente elétrica de 400mA durante 40 minutos. A foto foi tirada sob exposição por 0,2 segundos à luz UV.

Ao se comparar o tamanho das bandas obtidas (Figura 20) e as bandas esperadas (Figura 18), podemos inferir que o segundo sítio alvo foi efetivamente clonado, contudo, possivelmente se encontra na orientação antisenso. Isso é verificado quando são observadas as bandas formadas pela amplificação com PC *forward* e Target *reverse* que se encontram em torno de 140pb. Em contraste do esperado com as duas bandas, uma de tamanho de 143pb e outra de 183pb, a que foi formada pela combinação de *primers* Target *forward* e PC *reverse*, foi observado apenas uma banda de 163pb. Como não foi possível obter os clones com a orientação dos sítios desejadas, foram feitas novas clonagens, seguindo o mesmo protocolo descrito anteriormente no Capítulo 3 (página 22). No entanto, nenhuma das outras PCR realizadas foram conclusivas.

4.5 COTRANSFECCÃO DAS CÉLULAS HEK293

Com o intuito de verificar a eficiência de inibição do vetor criado, foi realizado o ensaio de atividade de luciferase, no qual as células HEK293 foram cotransfectadas com os vetores psiCHECK-2 com diferentes transgenes clonados (incluindo o PC-TS-miR31-I) e o vetor pBABE-GFP-mir31. Para aumentar a eficácia da transfecção, foi utilizado o meio Opti-MEM e Lipofectamine, um reagente capaz de englobar os plasmídeos formando um lipossoma, permitindo a fusão das membranas, e liberando seu conteúdo no interior das células.

A cotransfecção é necessária nesse caso, pois as células escolhidas para esse ensaio não expressam o microRNA mir31 endogenamente. Então, para medir a eficiência da inibição do vetor por meio da atividade luciferase, foi necessária a construção de um vetor que houvesse um sítio codificante para o microRNA de interesse. Esse vetor foi desenvolvido e cedido pela aluna Soledad Palameta, doutoranda em Biociências e Tecnologia em Produtos Bioativos pela Universidade Estadual de Campinas, para que fosse possível realizar essa etapa do trabalho.

Foram plaqueadas 10^5 células em vinte poços de placa para cultura de células de 24-poços e transfectadas com 200ng de DNA plasmidial (100ng de cada vetor), que estavam em uma solução de Lipofectamine e meio Opti-MEM. 48 horas pós-transfecção, as células foram recolhidas e congeladas no freezer a -80°C para prosseguir ao ensaio de atividade de luciferase.

As células foram ressuspendidas em PBS 1x e a elas foi adicionado o reagente Dual-Glo[®] Luciferase Assay Reagent, que corresponde ao substrato da enzima *firefly* codificada pelo vetor psiCHECK-2. O *firefly* nesse contexto tem o papel de normalizador do sinal do gene repórter, visto que esse tipo de ensaio ocorre em condições onde há chances de diferentes níveis de transfecções. O sinal *firefly* é medido pelo luminômetro GloMax[®] 96 Microplate Luminometer da Promega[®] para em seguida ser medido o sinal do gene repórter, a *Renilla*, ao adicionar a solução Dual-Glo[®] Stop & Glo[®] Reagent às células. Os sinais obtidos e a relação *Renilla/firefly* podem ser observados na tabela 7.

Tabela 7. Sinais obtidos no ensaio de atividade de luciferase pelas enzimas *Renilla* e

Amostra	<i>firefly</i>				
	Firefly	Renilla	Renilla/Fire	Media	Desvio padrão
Mock	1,40E+03	1,00E+02			
Controle: psiCHECK-2 parental	5,00E+06	4,80E+06			
pBABE-miR31 + psiCHECK-2 parental	4,10E+07	4,90E+07	1,20	1,30E+00	1,53E-01
	3,40E+07	4,80E+07	1,41		
pBABE-miR31 + PC-TSmt	1,60E+06	7,50E+05	0,47	4,84E-01	2,21E-02
	1,70E+06	8,50E+05	0,50		
pBABE-miR31 + PC-TSmiR-Sol	3,60E+07	3,90E+06	0,11	1,03E-01	7,86E-03
	3,60E+07	3,50E+06	0,10		
pBABE parental + psiCHECK-2 parental	2,20E+07	3,20E+07	1,45	1,50E+00	6,75E-02
	2,00E+07	3,10E+07	1,55		
pBABE parental + PC-TSmt	2,60E+06	1,40E+06	0,54	4,06E-01	1,87E-01
	3,00E+06	8,20E+05	0,27		
pBABEparental + PC-TSmiR-Sol	7,10E+06	2,30E+06	0,32	2,96E-01	4,00E-02
	8,60E+06	2,30E+06	0,27		
pBABE-miR31 + PC-TSmiR-#3#-I	1,20E+07	2,70E+06	0,23	2,05E-01	2,78E-02
	1,40E+07	2,60E+06	0,19		
pBABE-miR31 + PC-TSmiR-#115#-II	1,10E+07	2,60E+06	0,24	2,40E-01	4,59E-03
	1,40E+07	3,40E+06	0,24		
pBABEparental + PC-TSmiR-#3#-I	3,90E+06	4,90E+06	1,26	1,33E+00	1,02E-01
	3,00E+06	4,20E+06	1,40		
pBABE parental + PC-TSmiR-#115#-II	2,60E+06	1,10E+06	0,42	4,62E-01	5,44E-02
	2,40E+06	1,20E+06	0,50		

As células foram transfectadas por diferentes vetores como foi mostrado na Figura 8 (Capítulo 3, item 3.7.1, página 31) com o intuito de comparar e avaliar a qualidade dos clones gerados por meio de quantificação da atividade da enzima luciferase – e assim validar a hipótese desse estudo. Dez condições foram simuladas, utilizando-se os genes clonados em cada um dos vetores, tanto no psiCHECK-2, quanto pBABE. Dos vetores psiCHECK, foram utilizados os parentais (que não continham o inserto clonado), aqueles com um inserto mutado (PC-TSmt), aqueles com um inserto clonado anteriormente no laboratório (PC-TSmiR-Sol), aqueles com um inserto clonado proveniente do clone 3 desse estudo (PC-TSmiR-#3#-I) e aqueles com dois possíveis insertos clonados (PC-TSmiR-#115#-II) vindo do clone 115. Os vetores pBABE foram usados para simular condições onde há microRNA-31 sendo expresso na célula, a fim de observar a complementariedade e o poder de inibição seletiva dessa estratégia (pBABE-miR31), além do vetor pBABE parental, a título de comparação. Cada uma das condições foi feita em duplicatas, para aumentar a credibilidade dos sinais obtidos pelo luminômetro. Em relação aos valores, foi feita uma relação *Renilla/luciferase* e uma média dos valores obtidos, bem como o desvio padrão associado.

Com esses dados, foi plotado um gráfico (Figura 21) com as combinações realizadas que se mostraram mais relevantes e a atividade relativa da luciferase, o qual foi útil para verificar o poder de reconhecimento e inibição do vetor PC-TS-miR31.

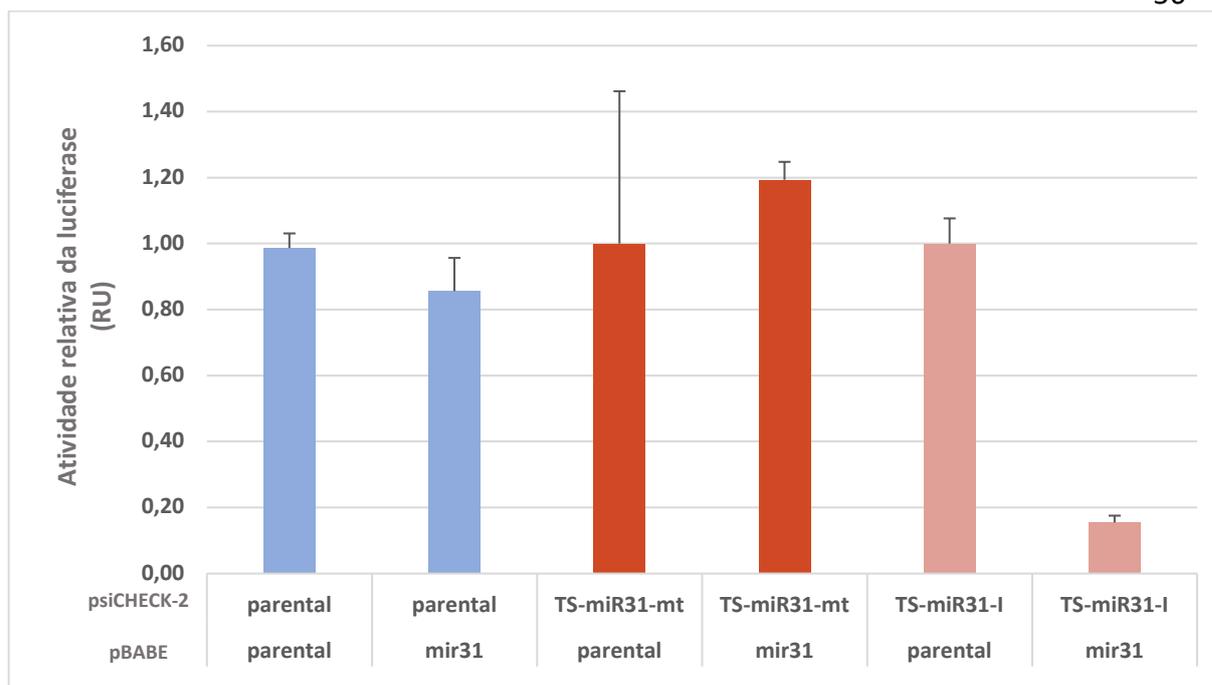


Figura 21. Gráfico da atividade relativa da luciferase em diferentes condições de transfecção de células.

O eixo x corresponde às diferentes condições de transfecção das células HEK293 – explicitando o tipo de vetor psiCHECK-2 utilizado: parental (sem inserto clonado), com um sítio alvo de microRNA mutado (TS-miR31-mt) e o vetor clonado neste trabalho (TS-miR31-l); e o tipo de vetor pBABE, sem (parental) ou com o gene codante para microRNA de interesse (mir31). O eixo y mostra a atividade relativa da luciferase.

No gráfico, é possível visualizar três principais condições, de acordo com o vetor psiCHECK-2 utilizado. Na primeira, em azul, o vetor parental, ou seja, sem sítio alvo, em um meio com e sem microRNA-31 expresso, no qual o sinal da luciferase se manteve constante. Em uma segunda condição, em vermelho, utilizou-se o vetor psiCHECK-2 que possui um sítio alvo de microRNA mutado. Neste esperávamos o mesmo resultado do controle parental, visto que o sítio alvo não seria capaz de desempenhar a função de se complementar corretamente ao microRNA, e portanto, não inibiria a expressão do vetor (medida pela atividade da enzima).

Nessas condições controles, o gráfico demonstrou uma alta atividade da luciferase. Isto ocorreu porque não haviam condições que propiciavam uma inibição do transcrito – já que foram utilizadas condições com e sem microRNA, com o vetor psiCHECK-2 sem sítio alvo e com o mesmo mutado.

Na situação de interesse, em rosa, foi demonstrada a eficiência do clone 3 que apresenta o sítio alvo de microRNA. É possível inferir que a atividade relativa da luciferase foi bastante diminuída onde o nosso vetor teste (PC-TS-miR31-#3#-I) foi colocado em um meio com alta concentração de microRNA (pBABE-miR31), obtendo um valor abaixo de 0,2.

Embora o clone 115 tenha sido utilizado para o ensaio em células, não foi considerado relevante explicitar seu resultado visto que não foi comprovado pelo sequenciamento a existência e orientação de dois sítios alvos até o término da execução deste estudo. Na Tabela 7 (página 54), podemos observar que a atividade relativa de luciferase (*Renilla/firefly*) foi diminuída em relação aos controles, porém a inibição não foi tão boa quanto à do clone 3, cuja existência do inserto foi comprovada pelo sequenciamento. Provavelmente, a inibição foi dada pelo primeiro sítio alvo clonado no vetor do clone 115, mas a existência de um segundo sítio alvo clonado no sentido antisenso prejudicou o sistema, não tendo apresentado a inibição desejada e comparável ao clone 3.

6 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

O presente estudo teve como objetivo a construção de vetores para avaliar a atividade de diferentes configurações de sítios-alvo para o miRNA-31, com intuito de obter uma sequência altamente eficiente para restringir a expressão de vetores em células que apresentem expressão de mir31.

O primeiro passo consistiu em gerar um primeiro vetor repórter, contendo um sítio alvo a jusante do gene repórter *Renilla luciferase*. Utilizamos uma estratégia de clonagem para possibilitar a ligação de sítios adicionais em tandem. Entretanto, não tivemos tempo suficiente para geração de outras configurações, que poderiam ser testadas no futuro.

O vetor construído foi transfectado em células eucariontes, na presença e na ausência de um segundo vetor codificando o microRNA-31. Observamos que houve redução do sinal de luciferase na presença do mir31, indicando o funcionamento do vetor. O próximo passo seria comparar a expressão obtida com vetores contendo outras configurações de sítios-alvo, como por exemplo, com três sítios alvos clonados em tandem, com objetivo de reduzir ao máximo a expressão do repórter, o que indicaria máximo silenciamento do vetor em células com expressão de mir31.

A continuidade deste projeto poderá resultar na obtenção de uma configuração de sítio-alvo otimizada, que possibilite uma eficiente restrição de expressão de vetores recombinantes retrovirais em células que apresentem alta expressão de mir31. A construção destes vetores é de grande interesse para o grupo de pesquisa do Laboratório de Vetores Virais do LNBio e pode ser empregada como uma alternativa na terapia de várias doenças de cunho genético.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AAGAARD, L., M. Amarzguioui, G. Sun, L. C. Santos, A. Ehsani, H. Prydz, et al. (2007). A facile lentiviral vector system for expression of doxycycline-inducible shRNAs: knockdown of the pre-miRNA processing enzyme Drosha. *Mol Ther* 15(5): 938-945.

BAJGELMAN, M. C., E. Costanzi-Strauss and B. E. Strauss (2003). Exploration of critical parameters for transient retrovirus production. *J Biotechnol* 103(2): 97-106.

BOUARD D, Alazard-dany D, Cosset FL. Viral vectors: from virology to transgene expression. *Br J Pharmacol*. 2009;157(2):153-65.

CARDARELLI F, Digiacomo L, Marchini C, et al. The intracellular trafficking mechanism of Lipofectamine-based transfection reagents and its implication for gene delivery. *Sci Rep*. 2016;6:25879.

DANOS, O. and R. C. Mulligan (1988). Safe and efficient generation of recombinant retroviruses with amphotropic and ecotropic host ranges. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85(17): 6460-6464.

GEISLER A, Fechner H. MicroRNA-regulated viral vectors for gene therapy. *World J Exp Med*. 2016;6(2):37-54.

GEISLER A, Jungmann A, Kurreck J, Poller W, Katus HA, Vetter R, Fechner H, Müller OJ. microRNA122-regulated transgene expression increases specificity of cardiac gene transfer upon intravenous delivery of AAV9 vectors. *Gene Ther* 2011; 18: 199-209 [PMID: 21048795 DOI: 10.1038/gt.2010.141]

GOSEN, M. and H. Bujard (1992). Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(12): 5547-5551.

HOWERTON, Michael. Killing Cancer Through the Immune System <<https://www.ucsf.edu/news/2014/01/111531/killing-cancer-through-immune-system>> Acesso em: 18/01/2017

KAIN SR, Ganguly S. Overview of genetic reporter systems. *Curr Protoc Mol Biol*. 2001;Chapter 9:Unit9.6.

KAMIO N, Hirai H, Ashihara E, Tenen DG, Maekawa T, Imanishi J. Use of bicistronic vectors in combination with flow cytometry to screen for effective small interfering RNA target sequences. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010;393(3):498-503.

KIM TK, Eberwine JH. Mammalian cell transfection: the present and the future. *Anal Bioanal Chem*. 2010;397(8):3173.

LAN H, Lu H, Wang X, Jin H. MicroRNAs as potential biomarkers in cancer: opportunities and challenges. *Biomed Res Int* 2015; 2015: 125094 [PMID: 25874201 DOI: 10.1155/2015/125094]

MATSUI H, Hegadorn C, Ozelo M, et al. A microRNA-regulated and GP64-pseudotyped lentiviral vector mediates stable expression of FVIII in a murine model of Hemophilia A. *Mol Ther*. 2011;19(4):723-30.

MERTEN OW, Hebben M, Bovolenta C. Production of lentiviral vectors. *Mol Ther Methods Clin Dev*. 2016;3:16017.

NALDINI, L., U. Blomer, F. H. Gage, D. Trono and I. M. Verma (1996). Efficient transfer, integration, and sustained long-term expression of the transgene in adult rat brains injected with a lentiviral vector. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(21): 11382-11388.

NAVIAUX, R. K., E. Costanzi, M. Haas and I. M. Verma (1996). The pCL vector system: rapid production of helper-free, high-titer, recombinant retroviruses. *J Virol* 70(8): 5701-5705.

PEREIRA, CT, Alves, C, Silva, G, Nogueira S. Mecanismo de ação de microRNAs. 2015. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/304537070_Mecanismos_de_acao_de_microRNAs> Acesso em: 18/01/2017

ROBBINS, S L., Kumar V. Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease. Philadelphia, PA, United States: Saunders/ Elsevier. 8th Edition. 2010.

STRAUSS, B. E., M. C. Bajgelman and E. Costanzi-Strauss (2005). A novel gene transfer strategy that combines promoter and transgene activities for improved tumor cell inhibition. *Cancer Gene Ther* 12(12): 935-946.

STRAUSS, B. E., J. R. Patricio, A. C. de Carvalho and M. C. Bajgelman (2006). A lentiviral vector with expression controlled by E2F-1: a potential tool for the study and treatment of proliferative diseases. *Biochem Biophys Res Commun* 348(4): 1411-1418.

THOMAS P, Smart TG. HEK293 cell line: a vehicle for the expression of recombinant proteins. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 2005;51(3):187-200.

VIGNA, E., S. Cavalieri, L. Ailles, M. Geuna, R. Loew, H. Bujard, et al. (2002). Robust and efficient regulation of transgene expression in vivo by improved tetracycline-dependent lentiviral vectors. *Mol Ther* 5(3): 252-261.

WURM FM (2004) Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. *Nat Biotechnol* 22(11):1393–1398

XIAO F, Zuo Z, Cai G, Kang S, Gao X, Li T. miRecords: an integrated resource for microRNA-target interactions. *Nucleic Acids Res*. 2009;37(Database issue):D105-10.

<<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CNPA-2009-09/22214/1/DOC191.pdf>>
Acesso em 16/01/2017

<http://www.nature.com/nri/focus/reglymph/viewpoints/nri1043_r.html>
Acesso em 17/01/2017

<https://www.promega.com.br/products/rna-analysis/rna-interference/psicheck_1-and-psicheck_2-vectors/?activeTab=2>
Acesso em 02/02/2017

<<https://www.promega.com.br/products/pm/applications-of-reporter-gene-assays/analyzing-mirna-targets/>>
Acesso em 02/02/2017

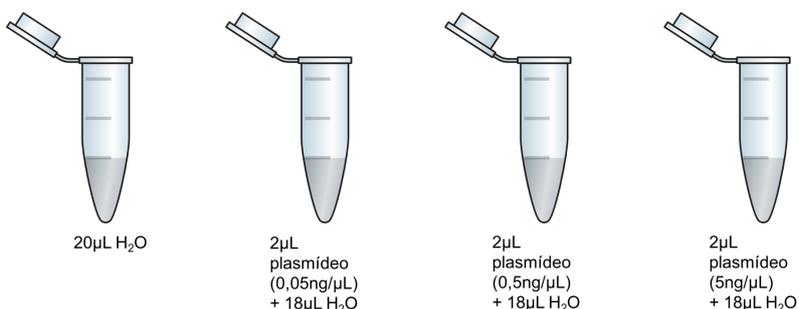
<<https://www.neb.com/products/t1010-monarch-plasmid-miniprep-kit>>
Acesso em: 08/02/2017

APÊNDICE A – Teste de competência bacteriana

Bactérias competentes são bactérias capazes de receber DNA exógeno, como plasmídeos. A competência pode ocorrer naturalmente ou ser produzida através de diferentes técnicas, como tratamento com íons metálicos e/ ou mudanças bruscas de temperatura – eventos que modificam da permeabilidade da parede celular.

Inicia-se o protocolo com a diluição de um plasmídeo de concentração já conhecida. Serão feitas quatro amostras, onde cada uma delas possuirá uma diferença de concentração em 10x, como mostrada na figura A1. São adicionados 80µL de bactérias aos 20µL de reação e segue o protocolo de transformação, já citado anteriormente nesse projeto. Para plaquear, são usados 25µL de bactérias com 100µL de meio LB líquido com ampicilina.

Figura A1. Protocolo de diluição de plasmídeo para teste de competência bacteriana



A competência é calculada segundo a fórmula abaixo:

$$* C = \frac{n^{\circ} \text{ de colônias} \times 10^6}{25 \times \text{ng DNA}} = 10^6 \text{ até } 10^7$$

ANEXO A – Configuração do vetor pBABE-GFP-miR31

O vetor pBABE-GFP-miR31 foi construído a partir da digestão do vetor pBABE-GFP com as enzimas EcoRI e Sall, inserindo o microRNA mmu-miR31 (300pb) amplificado previamente desde DNA genômico de células CD4+ de camundongo (plasmídeo cedido pela aluna Soledad Palameta).

Figura A1. Mapa do vetor pBABE-GFP-miR31.

