

Frederico Scott Varella Malta

**Caracterização inicial de  
dois anticorpos sintéticos  
de cadeia única  
selecionados por  
interação com p53(72-  
390) murina**

Belo Horizonte  
Departamento de Biologia Geral  
Instituto de Ciências Biológicas - UFMG  
2004

JCB

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Frederico Scott Varella Malta

**Caracterização inicial de  
dois anticorpos sintéticos  
de cadeia única  
selecionados por  
interação com p53 (72-  
390) murina**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação em Genética do Departamento de Biologia Geral do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Genética.

Orientadora: Dra. Mônica Bucciarelli Rodriguez

Belo Horizonte  
Departamento de Biologia Geral  
Instituto de Ciências Biológicas - UFMG  
2004

043

M261c

Malta, Frederico Scott Varella

Caracterização inicial de três anticorpos sintéticos de cadeia única selecionados por interação com p53 (72-390) murina [manuscrito] / Frederico Scott Varella  
Malta. - Belo Horizonte : Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Biologia Geral, 2004  
xiv, 75 f. : il.

Orientadora: Mônica Bucciarelli Rodriguez

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Biologia Geral.

1. Anticorpos sintéticos de cadeia única. 2. Proteína P53 – Teses. 3. Anticorpos – Purificação – Teses I. Título. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Departamento de Biologia Geral.

## Agradecimentos

Agradeço à Deus por ter caminhado comigo durante esta jornada, sem a sua ajuda não teria conseguido nem começar.

À minha orientadora **Mônica Bucciarelli Rodriguez**, pela ajuda, pela influência na minha formação científica e amizade durante todos esses anos.

Ao meu co-orientador **José Miguel Ortega**, pela colaboração infalível e amizade.

Aos meus pais, **Frederico e Edna**, pelo apoio e amor que sempre tiveram por mim.

Aos meus irmãos, **Guilherme e Ricardo**, por estarem sempre do meu lado.

À minha noiva, **Maria Clara**, pela presença e contribuição sem preço à minha vida.

Aos meus amigos, **Gustavo, Leandro e Mateus**, pela amizade durante todos esses anos.

À todos os companheiros de bancada, **Ana Raquel, Flávia Cristina(ex), Gilka, Gleydson, Lilian(ex), e Rosana** pela ajuda (que foi muita) e amizade (que também, foi muita) no dia a dia.

Aos professores **Adlane, Andréia Amaral e Chartone** pelo apoio e ensinamentos e aos alunos **Ana Alice, Amanda, Bárbara, Carla, Cláudia, Cristina, Cristina(ex), Daniela, Gabriel, Higgor, Karla, Kênia, Michelle e Letícia(ex)** pela ajuda, convívio e amizade.

Aos professores da Genética, **Álvaro, Ana Lúcia, Bernadete, Cleusa, Cristina, Dolores, Fabrício, Maria Raquel, Marisa e Willian** pelos ensinamentos muito valiosos para minha formação.

Aos Laboratório de Imunologia Celular e Molecular, Laboratório de Microbiologia Oral e de Anaeróbios, Laboratório de Vírus, Laboratório de Genética Celular e Molecular, Laboratório de Nutrição e Gnotobiologia, Laboratório de Enzimologia e Físico-Química de Proteínas, Laboratório de Biologia de Linfócitos, Laboratório de Biofísica-Peptídeos Biologicamente Ativos, Lab de Biotecnologia e Marcadores Moleculares, pelo suporte de materias e instrumentos.

Em especial, ao Prof. Carlos Salas do Laboratório de Biologia Molecular de Produtos Naturais pela ajuda com os experimentos de imunodeteccção e ao Prof. Ari do Laboratório Geral de Infecções Fúngicas pela ajuda com os microscópios e à técnica Tiza pelo auxílio com os experimentos utilizando o FACscan do Centro de Pesquisa René Rachou e pelo tempo dedicado ao meu aprendizado.

Às técnicas **Andréa Reis, Paixão e Rosa**, pelo auxílio no laboratório.

À **Marina**, secretária da Pós graduação em genética, pela amizade e disposição para resolver os problemas.

Aos amigos e colegas da biologia, que graças à Deus não caberiam nesta página, meus agradecimentos pelo convívio harmonioso, pelas farras, ajuda e compreensão.


À CAPES pelo suporte financeiro.

## Abreviaturas e Siglas:

µg	Micrograma.
µl	Microlitro.
aa	Aminoácidos.
CDR	Regiões Determinantes de Complementaridade.
CH	Região constante da cadeia pesada.
CL	Região constante da cadeia leve.
CMV	Promotor do vírus humano citomegalovírus.
DNA	Ácido desoxirribonucléico.
EB	Brometo de etídio.
EGFP	Proteína verde fluorescente.
g	Gramas.
GST	Glutathione S-transferase.
hDAT	Transportador humano de Dopamina.
HIS	Aminoácido histidina.
IgG	Imunoglobulina G.
IPTG	Isopropil β-D-1 tiogalactopiranosídeo.
kDa	Quilodaltons.
kV	Quilovolts.
mA	MiliAmpere.
mABs	Anticorpos monoclonais.
MBP	Proteína que liga-se à Maltose.
MCS	Sítios múltiplos de clonagem.

mg	Miligrama.
min	Minuto.
MiRNAs	microRNAs.
ml	Mililitro.
mM	Milimolar.
mseg	Milisegundos.
nm	Nanômetro.
°C	Graus centígrados.
OMS	Organização Mundial de Saúde.
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase.
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonil.
PTGS	Silenciamento gênico pós-transcricional.
PVDF	Polyvinylidene difluoride.
q.s.p.	Quantidade suficiente para.
RdRP	RNA polimerase dependente de RNA.
RNA <sub>m</sub>	RNA mensageiro.
ScFv	Anticorpos de cadeia única.
SFB	Soro fetal bovino.
SiRNAs	RNAs pequenos de interferência.
SScFv	Anticorpos sintéticos de cadeia única.
TNF $\alpha$	Fator de Necrose de Tumor.
UTR	Região não traduzida.
V	Volts.





VH Região variável da cadeia pesada.

VL Região variável da cadeia leve.

## Lista de Figuras

Figura 1: Diagrama esquemático de uma molécula de imunoglobulina. ....	2
Figura 2: Comparação dos domínios presentes em p53 e nas isoformas mais comuns de p63 e p73.....	9
Figura 3: Vetor da biblioteca, de onde as sequências dos SScFvs foram retirados e vetor onde foram clonados esses fragmentos em fusão com uma cauda de polihistidina.....	40
Figura 4: Amostras de proteínas totais de culturas bacterianas induzidas ou não com IPTG que foram aplicadas em gel de 10% de poliacrilamida-SDS.....	42
Figura 5: Amostras de proteínas totais de culturas bacterianas induzidas ou não com IPTG que foram aplicadas em gel de 10% de poliacrilamida-SDS.....	43
Figura 6: Amostras de proteínas totais de culturas bacterianas crescidas a 37°C induzidas ou não com 1 mM de IPTG que foram aplicadas em gel de 10% de poliacrilamida-SDS	44
Figura 7: Amostras de proteínas totais de culturas bacterianas crescidas a 30°C induzidas ou não com 1 mM de IPTG que foram aplicadas em gel de 10% de poliacrilamida-SDS	45
Figura 8: Amostras de proteínas totais de culturas bacterianas crescidas a 37°C induzidas ou não com Lactose 2% que foram aplicadas em gel de 10% de poliacrilamida-SDS	46
Figura 9: Amostras referentes aos passos de purificação de SScFv16-19 aplicadas em gel de 15% de poliacrilamida-SDS.....	47
Figura 10: Amostras referentes aos passos da re-purificação de SScFv16-19 aplicadas em gel 15% de poliacrilamida-SDS.....	48
Figura 11: Dot blot de clones transformados com pProEX9-15, pProEX16-19 e pProEX25, induzidos ou não com IPTG.....	49
Figura 12: Vetor pGAD424 de onde os minianticorpos foram extraídos e o vetor pEGFP-C2, onde foram clonados.....	53
Figura 13: Células de ovário de hamster (CHO) transfectadas.....	56
Figura 14: Célula de ovário de hamster (CHO) transfectadas, após 16 horas de incubação .....	57
Figura 15: Células da linhagem Wish transfectadas, após 7-9 horas de incubação.....	59
Figura 16: Células da linhagem Wish transfectadas, após 24 horas. de incubação.....	62
Figura 17: Células da linhagem HeLa transfectadas, após 8 horas de incubação.....	63

Figura 18: Células da linhagem HeLa transfectada, após 12 horas de incubação.....65

Figura 19: Célula da linhagem HeLa transfectada, após 48 horas de incubação.....65

## Lista de Tabelas

Tabela 1: Alterações no protocolo original de expressão de proteína heteróloga na linhagem BL21-SI de <i>E. Coli</i> .....	44
Tabela 2: Relação entre células da linhagem Wish transfectadas e aderidas (TA) e transfectadas e não aderidas (TñA) - TA/TñA .....	60
Tabela 3: Relação entre células da linhagem HeLa transfectadas e aderidas (TA) e transfectadas e não aderidas (TñA) - TA/TñA.....	64

# Índice

Agradecimentos.....	II
Abreviaturas e Siglas.....	IV
Lista de Figuras.....	VII
Lista de Tabelas.....	IX
Índice.....	X
Resumo.....	XIII
Abstract.....	XIV
1.Introdução.....	1
2.Objetivos.....	14
3.Material e Métodos.....	15
3.1 - Linhagem de células:.....	15
3.1.1 Células de mamíferos:.....	15
3.1.2 Linhagens bacterianas:.....	15
3.2 - Estocagem e cultivo:.....	16
3.2.1 Meios de cultura para bactérias:.....	16
3.2.1.1 Antibióticos:.....	17
3.2.2 Meios de cultivo para células de mamíferos:.....	17
3.2.2.1 Antibióticos:.....	18
3.2.2.2 Outras soluções:.....	18
3.3 - Vetores:.....	19
3.4 - Transformação e Transfecção:.....	19
3.4.1 Transformação de bactérias:.....	19
3.4.1.1 Preparação de células de bactérias eletrocompetentes:.....	19
3.4.1.2 Eletroporação de Bactérias:.....	20
3.4.2 Transfecção de células de mamíferos:.....	20
3.4.2.1 Eletroporação de células de mamíferos:.....	20
3.5 - Extração de DNA:.....	21
3.5.1 Extração de DNA plasmidiano de bactéria:.....	21

3.6 – Diálise:.....	22
3.7 – Eletroforese:.....	23
3.7.1 Eletroforese de DNA em gel de agarose:.....	23
3.7.2 Eletroforese de proteína em gel de poliacrilamida:.....	23
3.7.2.1 Preparação das amostras:.....	23
3.7.2.2 Preparação do gel:.....	24
3.7.2.3 Corrida do gel:.....	25
3.7.2.4 Coloração de gel poliacrilamida por <i>Coomassie blue</i> :.....	25
3.7.2.5 Coloração de gel de poliacrilamida por nitrato de prata:.....	26
3.8 - Purificação de DNA de gel de Agarose:.....	28
3.8.1 Purificação de DNA utilizando o kit <i>GeneClean</i> <sup>TM</sup> :.....	28
3.8.2 Purificação de DNA utilizando lã de vidro:.....	28
3.9 - Digestão de DNA com Enzima de Restrição:.....	29
3.10 - Ligação de fragmentos de DNA:.....	29
3.11 - Precipitação de DNA Utilizando-se Acetato de Amônio:.....	29
3.12 - Reação da Cadeia da Polimerase (PCR):.....	30
3.12.1 PCR com DNA purificado:.....	30
3.12.2 PCR de Colônia:.....	30
3.13 – Indução de clones recombinantes de pProEX HT:.....	31
3.13.1 Indução em pequena escala:.....	31
3.13.2 Indução em grande escala:.....	32
3.14 – Lise por sonicação:.....	33
3.15 – Purificação de SScFv (Protocolo Batchwise):.....	33
3.16 – Transferência semi-seca para “Western”:.....	34
3.17 Imunodeteção de cauda de polihistidina (6HIS):.....	35
3.17.1 Western Blot (Protocolo fornecido pela Qiagen):.....	35
3.17.2 Dot Blot (Protocolo fornecido pela Qiagen):.....	36
3.18 Reação de coloração da membrana com alcalina fosfatase e substratos:.....	36
3.19 Microscopia:.....	37
3.19.1 Microscopia de contraste de fase:.....	37
3.19.2 Microscopia de fluorescência:.....	37

3.20 – Fluróchromos:.....	37
3.21 Análise da relação TA/TñA:.....	38
<b>4. Resultados e Discussão.....</b>	<b>39</b>
4.1 Caracterização dos SScFvs <i>in vitro</i> .....	39
4.1.1 Obtenção dos SScFvs purificados:.....	39
4.2 Caracterização dos SScFvs <i>in vivo</i> .....	51
4.2.1 Transfecção de células de mamíferos.....	51
4.2.1.1 Transfecção de Células de ovário de hamster (CHO).....	54
4.2.1.2 Transfecção de Fibroblasto de Camundongo (3T3).....	57
4.2.1.3 Transfecção de células Wish.....	58
4.2.1.4 Transfecção de células HeLa.....	62
<b>5. Conclusões e Perspectivas.....</b>	<b>68</b>
<b>6. Referências Bibliográficas.....</b>	<b>69</b>

## Resumo

Anticorpos sintéticos de cadeia única (SScFv) são fragmentos de anticorpos que conservam a capacidade de se ligarem a alvos, mas não são capazes de desencadear a resposta imune, por não possuírem a porção efetora. Existem trabalhos na literatura mostrando diversos efeitos provocados pela expressão intracelular desses anticorpos, como nocaute fisiológico e restabelecimento de função.

Os SScFvs 9-15 e 16-19 foram previamente selecionados por interagir com p53 (72-390) murina utilizando o sistema do duplo-híbrido em levedura. A proteína p53 é um fator de transcrição que regula os genes responsáveis pela parada do ciclo celular e apoptose, sendo um protetor da integridade celular. Portanto, torna-se importante a caracterização de anticorpos sintéticos de cadeia única que se ligam à p53. O SScFv 25 foi escolhido como controle negativo por não interagir-se com p53. Foram feitas várias tentativas, sem sucesso, de expressar e purificar esses minianticorpos para serem utilizados em ensaios de caracterização *in vitro*, usando fusão gênica com etiqueta de seis histidinas.

Apesar da caracterização *in vitro* ter ficado comprometida, construções expressando esses SScFvs em fusão com a proteína verde fluorescente (EGFP) foram usadas para transfectar células murinas (CHO e 3T3), humanas normais (Wish) e tumorais (HeLa) para avaliar os efeitos provocados nestas células. Os resultados mostraram que os SScFvs foram tóxicos para as células testadas. Devido a semelhança dos efeitos provocados pela expressão em células com níveis normais de p53 (Wish) e em células com baixos níveis de p53 (HeLa) foi sugerido que os SScFvs não são muito específicos para p53. Eles podem estar ligando-se a outras isoformas da família de p53 ou a outras proteínas. O melhor entendimento da ação desses anticorpos sintéticos de cadeia única depende de sua caracterização bioquímica, com definição de especificidade. Isso só será possível com sua purificação.



## Abstract

Synthetic Single chain antibodies (SScFv) are antibody fragments that maintain the ability of binding to a target, but are not capable of triggering the immune response, since they do not have the effector domain. Several studies have been published that show different effects elicited by intracellular expression of such molecules, such as physiological knockout and function recovery.

SScFvs 9-15 and 16-19 have been selected by interreaction with murine p53(72-390) in the yeast two-hybrid system. The p53 protein is a transcription factor that regulates the genes of cell cycle arrest and apoptosis, is often referred to as the guardian of the genome. Therefore, it is relevant to characterize synthetic single chain antibodies that bind to p53. SScFv 25 has been chosen as a negative control that does not interact with p53. There were conducted several tentatives of to express and purify these miniantibodies aiming their use *in vitro* characterization assays.

Although *in vitro* characterization was not done, constructs that express these SScFv fused to green fluorescent protein (EGFP) have been used to transfect murine cells (CHO and 3T3), normal human cells (Wish) and tumoral ones (HeLa) to evaluate cellular effects induced by them. Results have shown that these SScFv are toxic for all tested cells. Since the effects induced by intracellular expression in p53 normal cells (Wish) and cells depleted of p53 (HeLa) were very similar, it has been suggested that the SScFvs do not specific to p53. Nevertheless, they might be binding to other isoforms in p53 family. To understand the SScFvs effects into mammalian cells it is necessary biochemically characterize them, specially their specificity. And that is only possible with their purification.

## 1. Introdução

A primeira indicação de que anticorpos monoclonais (mAb) teriam importante significado terapêutico foi obtida em 1982, quando um indivíduo portador de linfoma mostrou uma resposta completa a um breve tratamento com um anticorpo monoclonal de camundongo anti-idiotípico, gerado especificamente para o paciente. Naquela época, originou-se um grande interesse científico e comercial por estas moléculas. No entanto, no final da década de 80, o entusiasmo pelo uso terapêutico de mAbs diminuiu, como consequência de problemas apresentados: mAbs são de produção cara, de difícil administração e com considerável toxicidade devido à geração de resposta imune contra eles, por serem, freqüentemente, de origem murina (Glennie e Johnson, 2000).

Com o desenvolvimento das técnicas de biologia molecular, como a PCR ("Polimerase Chain Reaction", ou reação em cadeia da polimerase), tornou-se possível a amplificação dos genes de imunoglobulinas, dispensando-se a utilização de animais na geração de anticorpos (Malmberg e Borrebaeck, 1995). Inúmeras alternativas foram criadas, sendo possível amplificar apenas os domínios importantes para a ligação desses anticorpos aos antígenos, gerando moléculas menores, que passaram a ser chamadas de minianticorpos.

A molécula de imunoglobulina IgG (Figura 1) é formada por quatro cadeias polipeptídicas, sendo duas cadeias pesadas e duas leves, que são unidas por pontes de dissulfeto. As duas cadeias pesadas são subdivididas em domínios, chamados de região constante 3 (CH3), 2 (CH2), 1 (CH1) e região variável (VH).

As cadeias leves são subdivididas apenas em região constante (CL) e região variável (VL). Quando a molécula de IgG é digerida por papaína, são formados três fragmentos de anticorpo, dois Fabs e um Fc. Cada fragmento Fab é formado pelos domínios VH, VL, CH1 e CL, e retém a capacidade de ligação ao antígeno. O outro fragmento, Fc, que é formado pelos domínios CH2 e CH3 das duas cadeias pesadas que constituem a molécula de IgG, permanece com a propriedade de desencadear a resposta imune. O sítio de ligação ao antígeno propriamente dito é formado por três alças hipervariáveis, chamadas de regiões determinantes de complementaridade (CDR), que estão distribuídas: três na região variável da cadeia leve e três na pesada (Amit *et al.*, 1986).

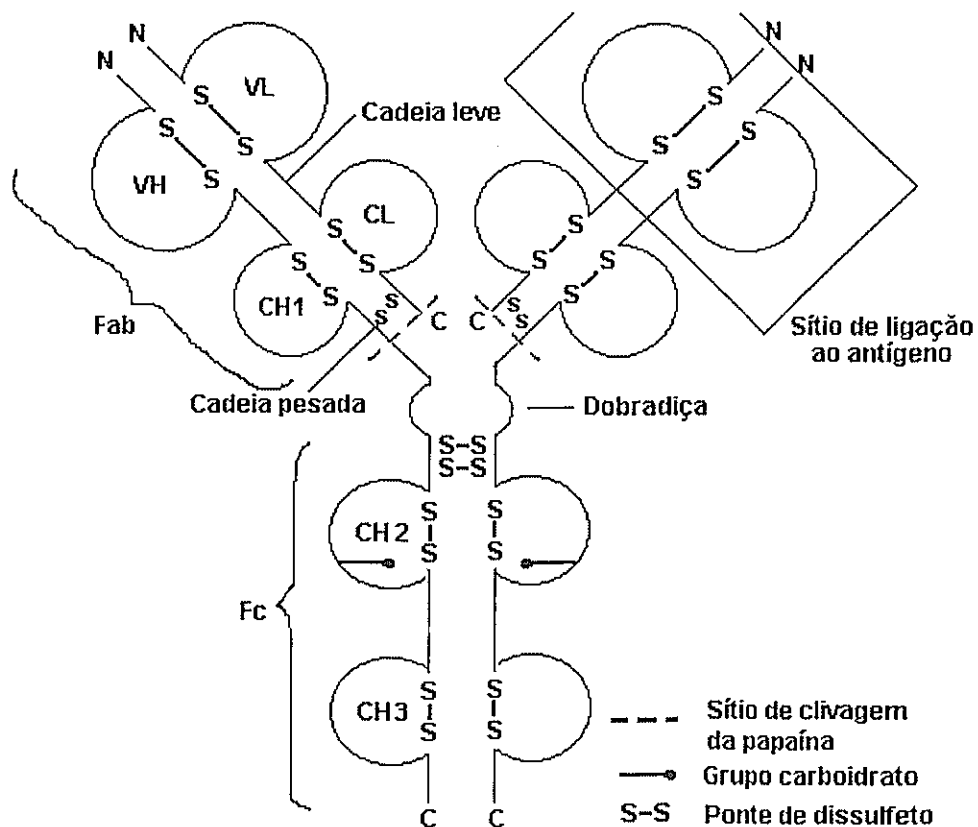


Figura 1: Diagrama esquemático de uma molécula de imunoglobulina. V refere-se a domínio variável e C refere-se a domínio constante. Extraído de Abbas *et al.*, 1998.

Os minianticorpos são moléculas menores que conservam a capacidade de ligação a antígenos, mas não são capazes de desencadear a resposta imune, por não possuírem a porção efetora (Fc). Além disso, quando são comparados aos anticorpos convencionais ou monoclonais, possuem rápida circulação sanguínea, boa penetração em tecidos, baixa imunogeneicidade, baixa retenção nos rins e outros órgãos não-alvos, melhor penetração em tumores alvo, fácil construção, menor custo de produção e possibilidade de reestruturá-los em função de melhorar sua atividade e produção (Colcher *et al.*, 1990; Plückthun, 1991; Holliger *et al.*, 1998 e Reiter *et al.*, 1998).

Já foram descritos inúmeros tipos de minianticorpos ou fragmentos de anticorpos, tais como Fab (Lagerkvist *et al.*, 1995), "diabodies" (Holliger *et al.*, 1997), anticorpos de cadeia única (ScFv) (Abraham *et al.*, 1995), e outros (Griep *et al.*, 1999). A estrutura de cada um desses varia.

Os Fabs são constituídos da região constante 1 (CH1) e da região variável da cadeia pesada (VH), mais a região constante (CL) e variável (VL) da cadeia leve.

Os "diabodies" são construídos pela ligação dos domínios VH e VL de dois diferentes anticorpos A e B, formando duas cadeias diferentes e cruzadas (Holliger *et al.*, 1997).

Os anticorpos de cadeia única (ScFv) têm seus domínios variáveis (VH e VL) unidos por um pequeno peptídeo hidrofílico geralmente rico em resíduos de serina (S, Ser) e glicina (G, Gly), que servem como um espaçador ou ponte, dando flexibilidade aos domínios (Abraham *et al.*, 1995).

A construção de bibliotecas de fragmentos de anticorpos torna-se importante para possibilitar a triagem de anticorpos que se ligam a um determinado antígeno. Existem três principais maneiras de se construir uma biblioteca de fragmentos de anticorpo. A primeira é por meio de amplificação das regiões variáveis da cadeia pesada e leve a partir do RNA extraído do baço de camundongos, humanos imunizados ou não, ou de células produtoras de mAbs. As regiões são combinadas aleatoriamente e unidas por um espaçador (Ward *et al.*, 1989; Huse *et al.*, 1989; Orlandi *et al.*, 1989; Sastry *et al.*, 1989). A segunda maneira, chamada de semi-sintética, consiste em substituir no cDNA codificador de um SvFv específico, o CDR3 da cadeia pesada, ou mesmo todos os CDRs, por seqüências degeneradas NNS, onde na posição N podem ser inseridos quaisquer dos quatro nucleotídeos e, na terceira posição do códon, S, podem ser inseridos apenas G ou C (Cramer *et al.*, 1996, Winter *et al.* 1994, Barbas *et al.* 1992; Nissim *et al.*, 1994). A terceira maneira é chamada de sintética, onde os genes dos anticorpos podem ser sintetizados *in vitro* sem a necessidade de qualquer molécula de DNA molde (Hayashi *et al.*, 1994, Knappik *et al.*, 2000). Para tanto, os oligonucleotídeos são sintetizados quimicamente e novamente os CDRs são sintetizados com regiões degeneradas, para aumentar o repertório de anticorpos.

Flávia Cristina Nery, em sua dissertação de mestrado (Nery, 2001), construiu duas bibliotecas de anticorpos sintéticos de cadeia única (SScFv). A seqüência consenso dos anticorpos foi baseada em seqüências de aminoácidos de anticorpos humanos, sendo a região variável da cadeia leve derivada do subgrupo I de Kabat e a região variável da cadeia pesada derivada do subgrupo III de Kabat (Kabat *et al.*, 1987). A intenção de usar consensos humanos é reduzir a

imunogeneicidade dos anticorpos. As regiões que correspondem aos CDRs foram codificadas pelo códon NNS, onde N representa qualquer dos 4 nucleotídeos A, T, G ou C, e S representa G ou C, como preclaro, de forma a evitar a formação dos códons UGA e UAA, reduzindo em dois terços a formação de códons de terminação na região dos CDRs (Nery, 2001).

As bibliotecas de anticorpos sintéticos de cadeia única foram triadas em busca de membros que interagissem com p53(72-390aa) murina, Tead1 ou transportador vesicular de acetil colina (VAcHT), utilizando o sistema de duplo híbrido (Nery, 2001).

O sistema do duplo híbrido é um ensaio que utiliza ativação de transcrição. Ele é baseado no princípio de que muitas proteínas, incluindo os ativadores de transcrição, possuem múltiplos domínios que funcionam independentemente. Os fatores de transcrição são proteínas que possuem pelo menos dois domínios independentes: um domínio de ligação ao DNA ("DNA Binding Domain" ou DBD) e um outro domínio, de ativação ("Activation Domain" ou AD). Essa natureza modular é explorada no sistema do duplo híbrido pela construção de uma proteína híbrida, no qual o DBD é fusionado à proteína ou domínio de interesse, geralmente chamada de "isca". Uma outra proteína híbrida é construída fusionando-se o AD a membros de uma biblioteca. A co-expressão dessas duas proteínas numa linhagem hospedeira apropriada restitui a atividade transcricional do fator de transcrição caso haja interação entre a proteína de interesse e o membro da biblioteca - ou seja, a formação do duplo-híbrido. A interação é prontamente observada pela expressão de um gene repórter que possui uma sequência específica na região promotora, na qual o DBD se liga (Fields e Song,

1989; Chien *et al.*, 1991; Fields; Sternglanz, 1994; Fashena *et al.*, 2000; Ito *et al.*, 2001 e Phizicky *et al.*, 2003).

O método de seleção de interação entre proteína de interesse e ligante mais largamente utilizado para seleção de fragmentos de anticorpos é o de "phage display", que consiste na fusão de membros de uma biblioteca com o gene III de fago filamentoso, num fagomídio (Huse *et al.*, 1989; Scott e Smith, 1990; Kang *et al.*, 1991; McCafferty *et al.*, 1990; Barbas *et al.*, 1991; Marks *et al.*, 1992; Chiswell e McCafferty, 1992; Presta, 1992; Allen *et al.*, 1995; McElhiney *et al.*, 2002; Mah *et al.*, 2003; Li e Aitken, 2004 e Blazek, *et al.*, 2004). Quando células são transformadas com o fagomídio e infectadas com fagos auxiliares que possuem todas as informações necessárias para a montagem da partícula viral, os fagos produzidos podem ser montados com a proteína recombinante codificada pelo plasmídeo e/ou incorporar seu DNA, ao invés do genoma viral, servindo como partículas transdutoras. A triagem consiste na fixação da proteína de interesse em uma placa e incubação com a biblioteca expressa em fagos. Apenas fagos que contiverem proteínas expressas em fusão com o gene III e que se ligarem fortemente ao antígeno fixado na placa, permanecerão ligados à placa após sucessivas lavagens. Os fagos selecionados são então eluídos e o processo pode ser repetido, para enriquecimento da biblioteca (Lorimer *et al.*, 1996, Turner *et al.*, 1997; Rodi e Makowski, 1999). Uma outra abordagem do sistema "phage display" consiste na clonagem de pequenas moléculas de DNA em fusão com o gene da proteína III no próprio genoma do fago filamentoso (Wells *et al.*, 1992). Neste caso, não é necessária a utilização de fagos auxiliares, pois os genes responsáveis pela manutenção do vírus estão presentes no seu genoma. Além

disso, o peptídeo é apresentado em mais cópias. A triagem ocorre da mesma forma.

Durante seu mestrado, Flávia Cristina Nery selecionou entre outros, dois anticorpos sintéticos de cadeia única contra uma porção de p53 murina (aa 72-390), utilizando o sistema de duplo híbrido, que foram denominados SScFv 9-15 e 16-19.

O gene p53 selvagem codifica um fator de transcrição que ativa diversos genes: gadd45, mdm2, p21(waf1/cip1), ciclina G, IGF-BP3, bax, PIG3 e outros (Cohen *et al.*, 1998). Foi identificado também atuando como repressor da transcrição de genes (Cohen *et al.*, 1998). A proteína p53 é responsável pela ativação do "checkpoint" da fase G1 do ciclo celular, induzido por dano no DNA e, portanto, monitora a integridade da célula e é necessária para a indução da expressão dos genes que são responsáveis pela inibição da síntese de DNA ou indução dos genes da apoptose (Roth *et al.*, 1996; Reisman e Loging, 1998 e Daujat *et al.*, 2001). Considera-se que mais da metade das causas de câncer em humanos estejam relacionados com a mutação de p53 (Marin *et al.*, 1998 e Woods e Vousden, 2001).

Alguns domínios de p53 que estão relacionados com essas funções já foram identificados (figura 2): um domínio transativador localizado entre os resíduos 1-40 e um segundo domínio transativador, que atua independentemente do anterior e que fica localizado entre os aminoácidos 40-83 (Cohen *et al.*, 1998); um domínio de ligação em DNA (aa 113-300); um outro domínio caracterizado por uma pequena região básica localizada no C-terminal (aa 363-393) responsável pela regulação negativa da atividade de ligação em DNA de p53 e que, quando



deletada ou fosforilada por CKII ou PKC, restitui a atividade de ligação em DNA de p53 (Jannot e Hynes, 1997 e Bénard *et al.*, 2003).

A atividade de p53 deve ser, portanto, regulada finamente para manter o controle do ciclo celular e favorecer reparo do DNA ou apoptose. Os meios de regulação de p53 podem ocorrer através da regulação de sua expressão pelos fatores de transcrição NF- $\kappa$ B (Webster e Perkins, 1999) e HOXA5 (Raman *et al.*, 2000), através da regulação de sua tradução por fatores de ligação ao RNA, agindo no 3'UTR de p53 (Fu *et al.*, 1996) e pelo controle dos mecanismos de importação e exportação nuclear, garantindo sua devida localização sub-celular (Shaulsky *et al.*, 1991). p53 também pode sofrer uma importante regulação através de Mdm2, que controla a manutenção da estabilidade de p53 (Kubbutat *et al.*, 1997), por modificações pós-traducionais como fosforilação que interfere na ligação de p53 com Mdm2 (Meek, 1998), ou como a acetilação, que promove acentuação da atividade de ligação de p53 em DNA (Gu e Roeder, 1997) e interações com diversas proteínas, tais como WT1, BRCA1, WRN e E2F1 que possivelmente causam mudanças conformacionais, interferindo em suas funções.

Os membros da família p53, as proteínas homólogas p63 e p73 (figura 2), foram descobertas em 1998 e 1997, respectivamente. Todas as três exibem domínios típicos de fatores de transcrição, domínio de ativação (AD), domínio de ligação ao DNA (DBD) e domínio de oligomerização (OD) (Bénard *et al.*, 2003). Em determinadas regiões, esses membros da família de p53 possuem 60-68% de identidade (Marin *et al.*, 1998; Zeng *et al.*, 2001 e Bénard *et al.*, 2003).

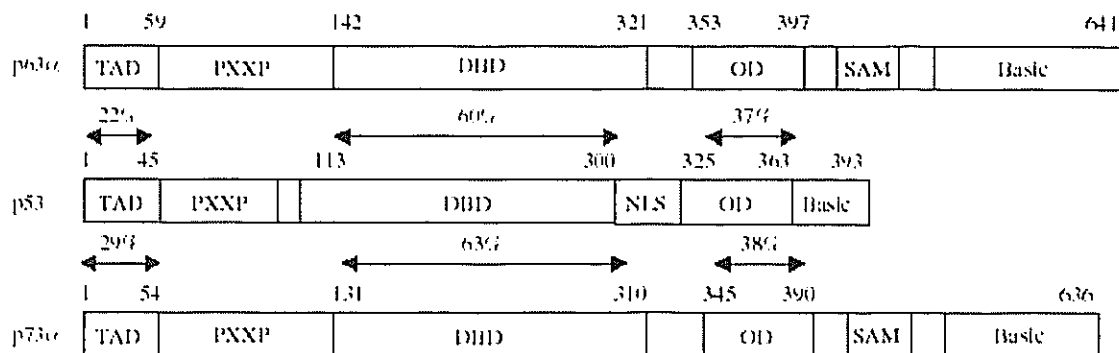


Figura 2: Comparação dos domínios presentes em p53 e nas isoformas mais comuns de p63 e p73. Domínio de ativação (TAD), domínio rico em prolina (PXXP), domínio de ligação (DBD), domínio de oligomerização (OD), domínio SAM e domínio básico. Figura retirada do artigo "TP53 Family Members and Human Cancers" de Bénard *et al.*, 2003.

Já foi evidenciado que os membros da família p53 podem se ligar nos sítios alvos de p53, transativar genes que respondem a p53, induzir a parada do ciclo celular ou apoptose (Kaghad *et al.*, 1997, Jost *et al.*, 1997).

Os anticorpos SScFv 9-15 e 16-19 apresentaram certa especificidade de ligação à p53 murina (aa 72-390). Isso foi testado transformando-se os clones SScFv 9-15 ou 16-19 com outra "isca" não relacionada, uma porção de Tead1 de camundongo T7(aa 153-246) e ambos anticorpos falharam em interagir com T7, mostrando sua especificidade por p53 murina. Além disso, os anticorpos também falharam em interagir com dois mutantes pontuais de p53 murina: 14.2 e 42.2 (Nery, 2001).

Existem na literatura trabalhos que demonstram o interesse em anticorpos que interagem com p53, por exemplo, o anticorpo DO-1 ScFv, selecionado contra a porção N-terminal de p53, que foi capaz de inibir a função transativadora de p53 e, portanto, representa uma possível ferramenta para o estudo da função de p53 efetuada por sua porção N-terminal, como a ativação de genes alvos (Cohen *et*

*al.*, 1998). Um outro anticorpo selecionado contra p53 (ScFv Pab421) demonstrou, em células tumorais humanas, ser capaz de restaurar a atividade de p53 mutante (His273), sendo considerado um possível candidato para a terapia do câncer (Fromentel *et al.*, 1999). São dois exemplos de efeitos causados pela expressão intracelular, produzindo nocaute ("knock-out") ou, restabelecendo função.

Tewari *et al.* (1998) mostrou que a expressão de ScFv contra p17, uma proteína envolvida em vários processos do ciclo de replicação do vírus HIV-1, em células T CD4+ humanas infectadas com baixa taxa de infecção de HIV-1, foi capaz de inibir a replicação do vírus. Mas os fragmentos de Ab podem ser usados para diferentes abordagens, como exemplificado no estudo de Cooke *et al.* (2002) que mostrou que ScFv MFE-23, um anticorpo de cadeia única específico contra antígeno carcinoembriônico, quando fusionado ao fator de necrose de tumor (TNF $\alpha$ ), foi capaz de direcionar a ação deste último sobre tais tumores. Em outro estudo, Ho e Segre (2003) mostraram a produção e caracterização de um ScFv anti-id (anti-idiotípico), designado K2-3f, esse ScFv K2-3f mimetiza a configuração da molécula de cocaína e se liga ao transportador humano de Dopamina (hDAT), no sítio de ligação a cocaína, com maior afinidade que ela própria. Outra importante característica foi a inibição completa da ligação da cocaína ao hDAT sem interferir na absorção de Dopamina. Devido a estas características, ScFv K2-3f possui potencial para ser usado no tratamento de indivíduos dependentes de cocaína.

Os minianticorpos, devido à sua especificidade de ligação, podem ser usados na produção de colunas de purificação por afinidade. Eles se ligam no

interior dos poros da matriz da coluna, permitindo maior superfície de área para a purificação e, conseqüentemente, aumentando a capacidade de ligação da coluna (Berry *et al.* 1991 e McElhiney *et al.*, 2002). No estudo conduzido por McElhiney *et al.*, (2002) a sensibilidade do ScFv selecionado por interação com a toxina Microcistina-LR foi suficientemente alta para detectar sua presença na água em quantidades menores que 1µg/L (que corresponde ao nível permitido dessa toxina presente na água potável exigida pela Organização Mundial de Saúde, OMS), sendo candidato potencial para servir como um biosensor para o monitoramento dos níveis da toxina na água para uso humano ou animal.

Devido a suas características biológicas de se ligarem especificamente às proteínas e provocarem um nocaute fisiológico, os ScFvs podem ter uso terapêutico ou investigativo. Strube e Chen (2002) caracterizaram um anticorpo de cadeia única (ScFv) contra ciclina E, capaz de se ligar a ela e bloquear o crescimento de células tumorais de mama da linhagem SKBR3. A ciclina E é uma proteína crítica do ciclo celular que participa na regulação da progressão do ciclo de células normais durante a fase que antecede a replicação de seu DNA. Várias evidências indicam que sua desregulação está relacionada a tumorigenicidade, particularmente em câncer de mama.

Outra tecnologia utilizada atualmente para provocar o nocaute fisiológico é chamada interferência de RNA. Esta técnica consiste no silenciamento gênico sequência-específico induzido por RNA de dupla-fita (Tuschl, 2001; Agami, 2002 e Kim, 2003).

A interferência de RNA é mediada por pequenas moléculas de RNA. Existem duas classes de pequenas moléculas de RNA que estão envolvidas no silenciamento: RNAs pequenos de interferência (siRNAs  $\cong$  22nt) e microRNAs (miRNAs  $\cong$  22nt). Os siRNAs são gerados a partir da clivagem de uma longa molécula de RNA. Os miRNAs por sua vez formam grandes grampos que são processados ainda no núcleo gerando grampos menores. Após essa digestão os grampos são transportados para o citoplasma, onde são novamente processados em moléculas ainda menores (miRNAs). Essas pequenas moléculas de RNA podem incorporar-se num complexo com atividade de nuclease chamado RISC que cliva o mRNA que é complementar às pequenas moléculas de RNA (Nykanem *et al*, 2001). Apesar de possuir algumas vantagens, tais como o alto poder inibitório da expressão gênica (em torno de 90%) e alta persistência da interferência em *C. elegans*, sendo transmitida para sua progênie, a interferência de RNA em células de mamíferos é transiente e normalmente dura menos que cinco divisões celulares, devido à diluição das moléculas de siRNA e a falta de uma RNA polimerase dependente de RNA (RdRP) para amplificar a interferência, como é visto em *C. elegans*, plantas e *Neurospora* (Cottrell e Doering, 2003). Como a interferência atua no mRNA, o silenciamento gênico pode levar mais tempo caso a proteína seja estável. Outra desvantagem observada está relacionada com a necessidade de silenciar múltiplos genes, já que observou-se que, nesses casos, existe uma competição entre os diferentes siRNAs pela maquinaria da interferência de RNA, que parece ser limitada em mamíferos (Kim, 2003).

Portanto a utilização de ScFvs que provocam o nocaute fisiológico em células de mamíferos pode ser uma alternativa mais interessante que o uso de interferência de RNA.

## 2. Objetivos

Caracterizar os anticorpos de cadeia única SScFv 9-15 e 16-19, selecionados contra a porção (72-390aa) de p53 murina quanto aos seus efeitos causados em células murinas e células humanas normais e tumorais.

Expressar e purificar os SScFvs para avaliar as propriedades de ligação desses anticorpos *in vitro*.

### 3. Material e Métodos

#### 3.1 - Linhagem de células:

##### 3.1.1 Células de mamíferos:

3T3: Número de referência ATCC: CCL-92

Organismo: *Mus musculus* (camundongo)

Tecido: Fibroblasto de embrião

CHO: (Puck et al, 1965).

Organismo: *Cricetulus griseus* (hamster, chinês)

Tecido: Epitélio do ovário

Hela: Número de referência ATCC: CCL-2

Organismo: *Homo sapiens*

Tecido: Adenocarcinoma de epitélio cervical

Wish: Número de referência ATCC: CCL-25

Organismo: *Homo sapiens*

Tecido: Epitélio cervical

##### 3.1.2 Linhagens bacterianas:

BL21: *E. coli* B F- *dcm ompT hsdS*( $r_B^- m_B^-$ ) *gal*

DH5 $\alpha$ : F $^-$   $\phi$ 80dlac Z $\Delta$ M15 $\Delta$  (lac ZYA – argF) U169 end A1 recA1 hsdR17( $r_k^- m_k^+$ ) deoR thi-1 phoA supE44  $\lambda^-$ gyrA96 relA1.

MC1061: F-ara $\Delta$ 139 D(ara-leu)7696 galE15 galK16  $\Delta$ (lac)X74 rpsI (Str $^r$ ), hsdR2 ( $r_k^- M_k^+$ ) mcrAmcrB1.



XL1 – Blue: F': Tn10 proA<sup>+</sup> B<sup>+</sup> lacI<sup>q</sup> Δ(lacZ)M15/recA1 endA1 gyrA96 (Nal<sup>r</sup>) thi hsdR17 (r<sub>k</sub>-m<sub>k</sub><sup>+</sup>) supE44 relA1.

### 3.2 - Estocagem e cultivo:

#### 3.2.1 Meios de cultura para bactérias:

Todos os meios descritos foram esterilizados em autoclave (120Kgf/cm<sup>2</sup> – 15min) antes de utilizados.

LB:                      Triptona 1% (DIFCO ou SYNTH)  
                             Extrato de levedura 0,5% (DIFCO)  
                             NaCl 1% (VETEC)

Obs: Para fazer meio LB sólido foi adicionado 1,5%.de ágar.

SOB:                    Bactotriptona 2% (DIFCO ou SYNTH)  
                             Extrato de levedura 0,5% (DIFCO)  
                             NaCl 10mM (VETEC)  
                             KCl 2,5mM (REAGEN)  
                             MgCl<sub>2</sub> 10mM (SYNTH®)  
                             MgSo<sub>4</sub> 10mM (BERZOG®)

SOC:                    100ml SOB  
                             1ml solução glicose 2M esterelizada (ISO FAR)

2XYT:                  Bactopeptona 1% (DIFCO)  
                             Extrato de levedura 0,5% (DIFCO)  
                             NaCl 1% (VETEC)  
                             PH 7,4

O cultivo foi realizado inoculando-se uma colônia ou 10µl de cultura crescida durante a noite em 10ml de meio esterelizado e suplementado com antibiótico, o inóculo foi colocado em estufa à 37°C com agitação por 16 horas. O cultivo em placas foi realizado inoculando-se uma colônia ou plaqueando uma alíquota de cultura crescida durante a noite em placas de 150mm contendo 20 ml de meio suplementado com antibiótico, as placas foram colocadas em estufa à 37 °C por 16 horas.

A estocagem de bactérias foi realizada em baixas temperaturas (-90°C) mantendo os estoques viáveis por longos períodos. Para se proceder à estocagem foram obedecidos certos procedimentos: a cada 1 ml da cultura líquida de bactéria foram adicionados 400 µl de glicerol esterilizado, e manteve-se a -20°C por 24 horas, após este período a cultura foi estocada definitivamente a -90°C.

#### 3.2.1.1 Antibióticos:

Para fazer placas de meio sólido e culturas em meio líquido, foram adicionados ampicilina ou kanamicina na concentração final de 100 e 50 microgramas por mililitro de meio, respectivamente.

#### 3.2.2 Meios de cultivo para células de mamíferos:

Todos os meios descritos foram esterilizados por filtração em filtros com poros de 0.22µm.

#### DME:

Foram dissolvidos 100g de DME da CUTILAB® em 900ml de H<sub>2</sub>O mili-Q, adicionados 1,2g de bicarbonato de sódio e 5ml de solução de antibiótico 200X concentrado. O pH foi acertado para 6,8 com HCl 2,5N e o volume completado para 1000ml e conservado a 4°C.

O cultivo de células foi realizado lavando-se as células 3 vezes com 3-5 ml de PBS<sub>A</sub> para remover o meio. A seguir foram adicionados 1-2ml de solução de tripsina, deixando-se agir por 5-8 minutos para remover as células da garrafa. As células foram coletadas, e foi realizada uma diluição de 1:4 ou 1:6 com meio DME. A garrafa foi então incubada em estufa contendo 5% de CO<sub>2</sub> à 37°C por 48 horas.

Obs: O meio de cultura foi suplementado com 10% de SFB da CUTILAB®.

### 3.2.2.1 Antibióticos:

Solução 200X concentrada:

Penicilina G potássica cristalina (1590U/mg)	6g (ALDRICH)
Sulfato de Estreptomicina	2,5g (ALDRICH)

Dissolvidos em 100ml de PBS<sub>A</sub> e esterilizados por filtração.

### 3.2.2.2 Outras soluções:

PBS <sub>A</sub> concentrado 5X:	NaCl	40g (VETEC)
	KCl	1g (REAGEN)
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> anidro	5,75g(MERCK)
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1g (MERCK)

Dissolvidos em 950ml de H<sub>2</sub>O mili-Q, o pH acertado para 7,4 e o volume ajustado para 1000ml e esterilizado em autoclave (120Kgf/cm<sup>2</sup>-15min) antes de ser utilizado.

Glutamina concentrada 200X: Glutamina      200mM (SIGMA)

Esterilizado por filtração e conservado à -20°C.

Solução de Tripsina: Tripsina-EDTA 10x concentrado (GIBCO BRL)  
Diluída 10X em PBS<sub>A</sub> esterelizado.

### 3.3 - Vetores:

pGAD424 - Figuras 3 e 12 (Bartel *et al.*, 1993).

pProEX Hta – Figura 3 (Polayes, 1996).

pEGFP C2 – Figura 12 Acesso GenBank #: U57606.

### 3.4 - Transformação e Transfecção:

#### 3.4.1 Transformação de bactérias:

As bactérias foram transformadas por eletroporação seguindo-se o protocolo desenvolvido pelo Dr. Marcelo Bento Soares, Univ. Iowa, comunicação pessoal)

##### 3.4.1.1 Preparação de células de bactérias eletrocompetentes:

Uma colônia da bactéria escolhida foi inoculada em 100 ml de meio 2xYT (pré-inóculo) e posteriormente a cultura foi transferida para um agitador a 37<sup>o</sup>C por 12-16 horas. Depois desse período foram utilizados 10 ml desse pré-inóculo para inocular 1 litro de 2xYT sem antibióticos. Este inóculo foi então colocado sob agitação à 37<sup>o</sup>C e acompanhado até a D.O.<sub>600nm</sub> de 0,2-0,25. Assim que foi alcançado este ponto, o frasco contendo a cultura foi resfriado em gelo. Quando fria, a cultura foi centrifugada (16000 G- 10 minutos - 4<sup>o</sup>C) para sedimentar as células, sendo que o sobrenadante descartado e o sedimento ressuspendido em 50 ml de glicerol a 10% esterilizado a 4<sup>o</sup>C. A suspensão foi centrifugada novamente (por 15 minutos) nas condições anteriores. As células foram então lavadas por mais duas etapas de ressuspensão do sedimento com 100 ml de

glicerol a 10% esterilizado, a 4<sup>o</sup>C, e centrifugação nas mesmas condições. Depois destas lavagens o sedimento foi ressuspendido em 1-2 ml de glicerol a 10% esterilizado, a 4<sup>o</sup>C, sendo esta suspensão diluída em glicerol até que uma alíquota de 25 µl diluída em 10ml de glicerol 10% obtivesse D.O.<sub>600nm</sub> igual a 0,15. Ao atingir esta medida a suspensão foi dividida em alíquotas de 40 µl que foram estocadas a -90<sup>o</sup>C.

#### 3.4.1.2 Eletroporação de Bactérias:

As células eletrocompetentes armazenadas a -90<sup>o</sup>C foram descongeladas em gelo por 15 minutos. Logo depois adicionou-se o DNA ou a mistura de ligação (1 a 5 ng para plasmídios pequenos ou 1 µl da mistura de ligação – aproximadamente 10 ng) e incubou-se em gelo por 5 minutos. As células foram transferidas para cubetas de eletroporação e submetidas a um choque elétrico de 2,5 KV (resistência de 200 OHMs, capacitância de 25 µFD) no aparelho Electroporator 2510 da EPPENDORF. Após o choque as bactérias foram incubadas em meio SOC à 37<sup>o</sup>C por 1 hora e semeadas em LB contendo antibiótico.

#### 3.4.2 Transfecção de células de mamíferos:

##### 3.4.2.1 Eletroporação de células de mamíferos:

As células foram lavadas 3 vezes com 3-5 ml de PBS<sub>A</sub> para remover o meio. Foram adicionados 1-2ml de solução de tripsina, deixando-se agir por 5-8 minutos para remover as células da garrafa. As células foram coletadas e contadas utilizando a câmara de Neubauer. Após a contagem, um milhão de células por eletroporação foram separadas e misturadas a uma solução de DNA previamente preparada. Esta solução continha 5µg de DNA de esperma de Salmão (Stratagene®), 5µg de DNA do plasmídio de interesse e quantidade suficiente de

água mili-Q para 50µl. Esta mistura foi colocada em cubetas de 4mm e dado o pulso elétrico como descrito abaixo no aparelho Eletro Square Porator Model T820 da BTX Electroporation System. Após o pulso as células foram plaqueadas em garrafas e incubadas como descrito no cultivo de células.

Pulso elétrico:	CHO	Voltagem:225volts	Duração:40mseg
	3T3	Voltagem:200volts	Duração:20mseg
	Wish	Voltagem:250volts	Duração:40mseg
	Hela	Voltagem:250volts	Duração:40mseg

### 3.5 - Extração de DNA:

#### 3.5.1 Extração de DNA plasmidiano de bactéria:

Mini-preparação de plasmídeo bacteriano: lise alcalina (Sambrook *et al*, 1989 e Chart, 1994, com modificações).

Cada colônia individual foi inoculada em meio LB contendo ampicilina 100 µg /ml, e incubada à 37<sup>0</sup>C por 12-16 horas. Depois deste período as soluções foram centrifugadas e ressuspensas em 100 µl de solução GTE, e em seguida adicionou-se 200 µl de solução de lise, no gelo. Esperou-se 5 minutos e adicionou-se 150 µl de solução KOAc, inverteu-se o tubo 4 vezes e procedeu-se à centrifugação por 5 minutos. O sobrenadante foi recuperado e a ele acrescentou-se 400 µl de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1)(MERCK ou LABSYNTH), centrifugou-se por 1 minuto. A fase aquosa foi retirada e misturada a 2 volumes de etanol absoluto gelado (-20<sup>0</sup>C), centrifugou-se por 10 minutos. O sedimento, contendo o DNA, foi ressuspensado em 20 µl de solução de TE/RNase e incubado a 37<sup>0</sup>C por 20 minutos, sendo depois disto o DNA estocado a 4<sup>0</sup>C.

Soluções utilizadas:

GTE: (100 ml)

0,9 g glicose (dextrose) (ISOFAR).  
2 ml EDTA 0,5 M.(SIGMA)  
2,5 ml Tris-HCL 1M (pH 8,0) (SIGMA).  
H<sub>2</sub>O miliQ esterilizada.

Solução de lise: (5 ml)

200 µl de NaOH 5 N (SIGMA).  
500 µl de SDS 10% (SIGMA).  
H<sub>2</sub>O miliQ esterilizada.

KOAc:(100 ml)

60 ml de acetato de potássio 5 M (MERCK).  
11,5 ml de ácido acético glacial (MERCK).  
28,5 ml de H<sub>2</sub>O miliQ esterilizada.

TE/RNase: Tris-Cl 10 mM (pH 7,4) (SIGMA).

EDTA 1 mM (pH 8) (SIGMA).  
RNase pancreática livre de DNase (20µg/ml).

### 3.6 - Diálise\_(Sambrook *et al.*, 1989)

Fragmentos de tubos de diálise (SPECTRAPOR membrane tubing, MW CO 5.000. Wet in 0,1% Na-azide anisotropic, 10mm wide, 64 mm diam., 32 ml/cm length, reorder 131192), convenientes ao volume da solução de proteína, foram tratados da seguinte maneira: fervidos por 10 minutos em solução de 2% NaHCO<sub>3</sub>/EDTA, após esfriar, lavados com água destilada, fervidos novamente em solução de EDTA 1mM (pH 8), e lavados novamente com água destilada. O material foi colocado com ajuda de uma pipeta de vidro (2 ml) e as extremidades

são vedadas com pinças. Os tubos de diálise foram colocados em um béquer de 2 L contendo TE frio, e deixados a 4<sup>o</sup>C sob agitação . O tampão foi trocado por 4 vezes, num período de intervalo de aproximadamente 6 horas entre cada troca. Depois deste período o DNA foi retirado do tubo, dosado em espectrofotômetro (Spectrophotometer Modelo U -2001 da HITACHI) e congelado a -20<sup>o</sup>C.

### 3.7 – Eletroforese:

#### 3.7.1 Eletroforese de DNA em gel de agarose (Sambrook et al., 1989)

A agarose (1% p/v) foi fundida em TAE 1x. Após a completa dissolução da agarose e a temperatura abaixado foi adicionada à solução de brometo de etídio alcançando uma concentração final de 0,5 µg/ml. O gel foi polimerizado em cuba de eletroforese à temperatura ambiente por cerca de 10 min. Para corrida de DNA aplicou-se uma voltagem de 1 a 5 V/cm.

#### Soluções utilizadas:

TAE 1x:                   20ml de TAE 50x para cada 1000ml  
Tris-acetato 0,04 M  
0,001 M de EDTA (SIGMA).

TAE 50x:                242g Tris (SIGMA).  
57,1ml ácido acético glacial (MERCK).  
100 ml 0,5M de EDTA (pH 8,0) (SIGMA).  
q.s.p                    1000ml

#### 3.7.2 Eletroforese de proteína em gel de poliacrilamida (Sambrook et al., 1989) .

##### 3.7.2.1 Preparação das amostras:



Foram misturados 1 volume de amostra de suspensão de células e o mesmo volume do tampão de amostra 2xSDS. Todas os tubos de amostras, além do padrão de baixo peso molecular foram homogenizados vigorosamente, fervidos por 5 minutos e aplicados imediatamente no gel.

Tampão de amostra 2xSDS: 125 mM de Tris-HCl (pH 6.8) (SIGMA)  
4% (p/v) de SDS (SIGMA)  
20% de glicerol (MERCK)  
0.01% (p/v) de azul de bromofenol (MERCK)

### 3.7.2.2 Preparação do gel

O gel de corrida foi colocado entre duas placas de vidro, em uma estrutura própria para a montagem do gel, e foi coberto com 1 ml de n-butanol para desfazer a interface ar:gel, que se polimeriza defeituosamente quando em contato com o ar. Uma vez que o gel de corrida foi polimerizado, o gel de empilhamento foi colocado entre as duas placas de vidro e o pente, que dá forma às canaletas, foi devidamente ajustado.

Gel de resolução à 10%	VOLUME DO GEL		
	5 ml	10ml	15ml
H <sub>2</sub> O	1,9	4,0	5,9
30% acrilamida : bis(29:1)	1,7	3,3	5,0
1.5 M Tris (pH 8.8)	1,3	2,5	3,8
10% SDS	0,05	0,1	0,15
10% persulfato de amônia	0,05	0,1	0,15
TEMED	0,002	0,004	0,006

Gel de empilhamento	VOLUME DO GEL		
	5 ml	10ml	15ml
H <sub>2</sub> O	0,68	1,4	2,1
30% acrilamida : bis(29:1)	0,17	0,33	0,5
1,0 M Tris (pH 6,8)	0,13	0,25	0,38
10% SDS	0,01	0,02	0,03
10% persulfato de amônia	0,01	0,02	0,03
TEMED	0,001	0,002	0,003

### 3.7.2.3 Corrida do gel:

As amostras foram aplicadas no gel, que se encontrava mergulhado em solução Tris-Glicina (1X), e submetidas à corrida em cuba vertical a 150 V por aproximadamente 2 horas até que o azul de bromofenol, presente no tampão de amostra, atingisse o final do gel. A seguir procedeu-se à coloração do gel.

#### Soluções utilizadas:

Tris- Glicina: 5X

24 mM de base Tris (SIGMA)

250 mM glicina (pH 8,3) (SIGMA)

0,1% SDS (SIGMA)

Dissolver 15,1 g de Tris e 94 g de glicina em 900 ml de água deionizada. Adicionar 50ml de SDS a 10% e completar o volume para 1000 ml.

### 3.7.2.4 Coloração de gel de poliacrilamida por *Coomassie brilliant blue*:

O gel de empilhamento foi separado do gel de corrida e este foi marcado em seu canto superior à esquerda (ponto em que a primeira amostra foi aplicada).

Solução de coloração (p/100 ml):

45 ml de H<sub>2</sub>O Mili-Q

45 ml de metanol (MERCK)

10 ml de ácido acético glacial (MERCK)

0,25 g de *coomassie brilliant blue* (ACROS)

Solução de descoloração (p/100 ml): 45 ml de H<sub>2</sub>O Mili-Q

45 ml de metanol (MERCK)

10 ml de ácido acético glacial (MERCK)

O gel foi colocado em uma placa de petri e a solução de coloração foi adicionada (~30 ml) até que o gel ficasse encoberto. O gel permaneceu durante 15 minutos ou durante a noite. Após este tempo o gel foi lavado com ácido acético 10% e colocado de volta a placa. A solução de descoloração foi então adicionada e o gel foi mantido em agitação constante por 30 minutos (duas trocas foram feitas, uma a cada 10 minutos). Também com agitação constante, o gel ficou mergulhado em solução de ácido acético 10% por uma hora e meia (duas trocas foram feitas, uma a cada 30 minutos).

#### 3.7.2.5 Coloração de gel de poliacrilamida por nitrato de prata

O gel foi colocado em uma placa de petri juntamente com solução pré-fixadora 1, deixando-se agir por 2 horas. A solução pré-fixadora 1 foi retirada e foi colocada a solução Pré-fixadora 2, deixando-se agir novamente por 2 horas. O gel foi lavado em seguida com água por 30 minutos. Após a lavagem a solução de glutaraldeído 10% foi adicionada, deixando-se agir por 30 minutos. Novamente o gel é lavado com água durante 1 hora. O gel foi colocado submerso na solução de prata amoniacal deixando-se agir por 20 minutos. O gel foi lavado com água por 30 minutos. Após a lavagem, acrescentou-se a solução reveladora pelo tempo

necessário para o aparecimento das bandas. O processo foi interrompido pela solução inativadora.

Soluções utilizadas:

Pré-fixadora 1:	Ácido acético (MERCK)	15ml
	Metanol (MERCK)	100ml
	Água q.s.p.	200ml

Pré-fixadora 2:	Ácido acético (MERCK)	15ml
	Metanol (MERCK)	10ml
	Água q.s.p.	200ml

Solução de glutaraldeído (fixadora) 10%:

Glutaraldeído 25% (Riedel-de Haën)	20ml
Água q.s.p.	200ml

Solução de prata amoniacal:

Solução A:

NaOH 0,36% (REAGEN)	36ml
NH <sub>4</sub> OH (Hoechst) 500μl	

Solução B:

AgNO <sub>3</sub> (SYNTH)	0,5g
Água	10ml

Foi adicionada gota a gota de solução B na solução A até terminar a solução B. A solução A foi mantida em agitação durante este processo, quando aparecia uma turbidez na solução A, o processo era interrompido e pingava-se uma a uma as gotas de NH<sub>4</sub>OH na solução A.

Obs: A solução de prata amoniacal deve ser preparada no momento de uso.

Solução Reveladora:

Ácido cítrico 2,3M	50 $\mu$ l
Formaldeído 38%	200 $\mu$ l
Água q.s.p	200ml

Solução Inativadora:

Ácido acético (MERCK)	2ml
Água q.s.p	2l

3.8 - Purificação de DNA de gel de Agarose:

3.8.1 Purificação de DNA a partir de gel de agarose utilizando o kit *GeneClean*<sup>TM</sup> (BIO 101, Inc.)

A partir do gel de agarose contendo brometo de etídio excisou-se bandas de DNA, visíveis com ondas longas de UV. Calculou-se o volume de NaI a ser adicionado pesou-se o fragmento extraído, considerou-se que cada grama equivale a 1ml, e multiplicou-se por 3. O fragmento após a adição de NaI foi incubado a 55<sup>0</sup>C por 10 minutos, até a completa dissociação do gel. Em seguida adicionou-se à solução 5 $\mu$ l de *Glassmilk* (matriz de sílica a qual o DNA se liga) e colocou-se a suspensão sob agitação, em gelo, por 15 minutos. O DNA ligado à matriz de sílica foi precipitado por centrifugação e lavado 3 vezes com solução de *New Wash* gelada. O DNA foi eluído da matriz de sílica com água a 55<sup>0</sup>C por 10 minutos e recolhido após centrifugação.

3.8.2 Purificação de DNA a partir de gel de agarose utilizando lã de vidro.

A partir do gel de agarose contendo brometo de etídio excisou-se bandas de DNA, visíveis com ondas longas de UV. Em um tubo furado e forrado com lã de vidro foi colocado o fragmento de agarose contendo o DNA. Um outro tubo foi

encaixado no primeiro para possibilitar a coleta. Os tubos foram submetidos à centrifugação (8.000 RPM) por 20 segundos. A partir dessa amostra recuperada o DNA foi precipitado.

### 3.9 - Digestão de DNA com Enzima de Restrição:

O DNA selecionado foi colocado em um tubo Eppendorff contendo a enzima de restrição 5x em excesso em relação ao padrão (1 unidade de enzima/ $\mu\text{g}$  DNA), o tampão próprio para a enzima e  $\text{H}_2\text{O}$  miliQ esterilizada. A concentração de DNA não excedeu a 200 ng/ $\mu\text{l}$  e a quantidade da enzima não foi maior que 10% do volume final. A solução foi incubada a 37°C por 3 horas.

### 3.10 - Ligação de fragmentos de DNA:

Para proceder-se à ligação dos fragmentos preparou-se uma solução composta de: 100ng do vetor (digerido pelas enzimas de restrição adequadas), o inserto a ser ligado (3x a concentração molar do vetor), 2  $\mu\text{l}$  do tampão específico da ligase (Gibco, 5X) e 1  $\mu\text{l}$  da enzima T4 DNA ligase (Gibco, 5U / $\mu\text{l}$ ). Esta solução foi mantida a 22°C por 4 a 16 horas, seguiu-se as sugestões do fabricante, para ocorrer a ligação, e em seguida o DNA foi mantido a 4°C.

### 3.11 - Precipitação de DNA Utilizando-se Acetato de Amônio:

Para precipitar o DNA preparou-se uma solução contendo: mistura contendo o DNA selecionado,  $\text{H}_2\text{O}$  miliQ esterilizada até completar o volume de 100  $\mu\text{l}$ , 25  $\mu\text{l}$  de acetato de amônio 10 M, 250  $\mu\text{l}$  de etanol absoluto e 1  $\mu\text{l}$  de glicogênio. Esta solução foi homogenizada vigorosamente em um agitador do tipo Vortex e mantida a -20°C por 10 minutos, e depois centrifugou-se a 14.000 rpm por 10 minutos para precipitar o DNA. Em seguida o sedimento foi ressuspenso em  $\text{H}_2\text{O}$  miliQ esterilizada.

### 3.12 - Reação da Cadeia da Polimerase (PCR):

A reação de PCR utiliza DNA molde para a sua amplificação. Quando dispúnhamos de DNA purificado, 1 ng deste foi acrescentado à reação. Quando o DNA não estava purificado (o plasmídeo não foi isolado) uma PCR de colônia foi realizada. A enzima Taq Polimerase, usada em todos os experimentos de PCR, foi gentilmente cedida pelo professor Evanguedes Kalapothakis, Dept. Farmacologia - ICB- UFMG. O termociclador utilizado nos experimentos de amplificações por PCR foi PTC100TM Programmable Thermal Controller, M J Research Inc.

#### 3.12.1 PCR com DNA purificado:

Para as reações de PCR utilizou-se alíquotas de 25  $\mu$ l (para amplificação de fragmentos) contendo tampão de PCR 1X, 200  $\mu$ M de cada nucleotídeo trifosfatado, 5 U da enzima polimerase Taq, de 0,25 a 1  $\mu$ M de cada iniciador e o molde do DNA a ser amplificado (geralmente 1 ng). O DNA foi amplificado em aparelhos termocicladores e o resultado das amplificações foi analisado em géis de agarose contendo brometo de etídio.

#### 3.12.2 PCR de Colônia:

Para cada 25  $\mu$ l de solução de PCR foram adicionados 5U de Taq Polimerase, 25 pmoles de primers, 10  $\mu$ l de tampão (10X) e 200  $\mu$ M de cada dNTP e água miliQ esterilizada. Alíquotas de 10  $\mu$ l são distribuídas em tubos de microcentrífuga com capacidade para 500  $\mu$ l. As colônias foram retiradas diretamente da placa selecionada com ponteiras de micropipeta estéreis. Estas ponteiras contendo bactérias foram limpas repetidas vezes sobre meio LB sólido contendo antibiótico, e em seguida utilizadas como molde para a PCR através de refluxos com micropipeta em 10  $\mu$ l da reação, para cada clone. A placa foi incubada a 37<sup>0</sup>C para estoque de bactérias. O produto de PCR foi separado em gel de agarose 1% contendo brometo de etídio. A presença de uma banda do tamanho esperado indicou que o DNA foi amplificado e que a colônia correspondente contém o plasmídeo ligado ao inserto desejado.

Programa para amplificar SScFv (FCN2):

1	94°C	5 minutos
2	94°C	1 minuto
3	52°C	1 minuto
4	72°C	2 minutos
5	30 ciclos voltando para o passo 2	
6	72°C	10 minutos
7	4°C	2 horas
8	Fim	

Iniciadores:

FScFv	GATCGAATTCGGCGGCGAAGTTCAACTGGTTGAATCCG
(38Mer)	
RScFv	ATCTCTGCAGGTACGTTTGATTTCAACTTTGG (32Mer)

3.13 – Indução de clones recombinantes de pProEX HT (Protocolo recomendado pela INVITROGEN)

3.13.1 Indução em pequena escala:

Uma colônia de um clone transformado com o vetor pProEX ou os plasmídios construídos com os SScFvs foi usada para inocular 5ml de meio LB com ampicilina (100µg/ml final). O tubo foi incubado na temperatura indicada na descrição do experimento, com agitação durante a noite. No dia seguinte, 100µl de cada pré-inóculo foi usado para novamente inocular outro tubo contendo 10ml de LB-Amp. Esse tubo foi submetido às mesmas condições que os anteriores, até a OD<sub>590</sub> ter atingido 0,5-1,0 . Uma alíquota de 1ml foi removida, centrifugada por 1 minuto na microcentrífuga, o sobrenadante descartado e o sedimento de células ressuspendido em 100µl de PBS. Esta amostra não induzida foi guardada à -20°C. Na cultura restante foi adicionado IPTG ou lactose de acordo com o



experimento, suficiente para a concentração final indicada no experimento e prosseguiu-se com a incubação. Foram removidas alíquotas de 1ml da cultura induzida 1, 2, 3 e 4 horas após a indução e medidas a sua OD<sub>590</sub>. As alíquotas foram tratadas da mesma maneira que a amostra não induzida.

### 3.13.2 Indução em grande escala:

Uma colônia de um clone transformado com o vetor pProEX ou os plasmídios construídos com os SScFvs foi usada para inocular 5ml de meio LB com ampicilina (100µg/ml final). O tubo foi incubado a 37°C com agitação durante a noite. No dia seguinte, 5ml de cada pré-inóculo foi usado para novamente inocular um *erlenmeyer* contendo 500ml de LB-Amp, sendo submetido às mesmas condições de crescimento. Após a OD<sub>590</sub> ter atingido 0,5-1,0, uma alíquota de 1ml foi removida, centrifugada por 1 minuto na microcentrífuga, o sobrenadante descartado e o sedimento de células ressuspendido em 100µl de PBS. Na cultura restante foi adicionado IPTG para a concentração final de 1mM e prosseguiu-se com a incubação por 4 horas. Após este período as células foram centrifugadas à 10.000 g por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o peso molhado das células medido. Seguindo-se diretamente para lise por sonicação.

#### Soluções utilizadas:

PBS:	NaCl (VETEC)	0,8g
	KCl (REAGEN)	0,02g
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (MERCK)	0,144g
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (MERCK)	0,024g

Foram dissolvidos em 80ml de água deionizada, o pH ajustado para 7,4 com HCl 0,1M e o volume completado para 100ml. Esterilizado em autoclave (120Kgf/cm<sup>2</sup> – 15 min) antes de ser utilizado.

Solução de IPTG: IPTG (American Bioanalytical ou SIGMA) 1,42g

Dissolvido em 10ml de água deionizada. Esterelizado por filtração em filtros com poros de 0.22 $\mu$ m.

### 3.14 – Lise por sonicação (Diaz *et al.*, 2000):

O sedimento de células foi ressuspendido em 4 volumes de tampão de lise. Esta amostra foi sonicada no aparelho SONIFIER 450 da BRANSON por 10 ciclos de 15 segundos com intervalo de 30 segundos, na potência 2 ( $\cong$  20W) até que 80% das células estivessem lisadas. Uma alíquota dessa amostra foi guardada para análise em gel de poliacrilamida para verificar a presença do anticorpo nessa fração. O restante foi centrifugado para remover os "debris". O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e também guardado para a análise em gel de poliacrilamida. O sedimento também foi guardado para análise em gel de poliacrilamida no caso de SScFv ser insolúvel.

Solução utilizada:

Tampão de lise:	Tris.HCl(pH 8,5 à 4°C) (SIGMA)	50mM
	2-mercaptoetanol (MERCK)	10mM
	PMSF (ROCHE)	1mM

Obs: PMSF só foi adicionado no momento do uso devido o fato de ser instável em solução aquosa.

### 3.15 – Purificação de SScFv (Protocolo Batchwise da Qiagen):

Uma alíquota de 500 $\mu$ l do extrato lisado foi transferida para um tubo novo. Foi adicionado 200 $\mu$ l de resina Ni<sup>2+</sup>-NTA da Qiagen, ressuspendida e previamente equilibrada com o tampão A ao tubo com o extrato lisado. A mistura foi agitada

continuamente por 20 minutos à 4°C. O tubo foi centrifugado por 1 minuto na minicentrífuga e o sobrenadante foi transferido para um outro tubo (essa é a fração que não se liga à resina). Foi adicionado 1ml de tampão A no tubo contendo a resina e essa mistura foi agitada por 5 minutos à 4°C. O tubo foi centrifugado por 1 minuto na minicentrífuga e o sobrenadante foi transferido para um outro tubo (essa é a fração da primeira lavagem). Novamente a amostra é lavada com o tampão A nas mesmas condições anteriores (essa é a fração da segunda lavagem). A proteína é eluída da resina adicionando-se 200µl de tampão C ao tubo com a resina, agitando-se a mistura por 5 minutos e centrifugando a amostra por 1 minuto na minicentrífuga. O sobrenadante é recolhido em um tubo novo (essa é a fração do primeiro eluído). A resina é novamente submetida a mais dois ciclos utilizando-se o tampão C de eluição.

Soluções utilizadas:

Tampão A:	Tris.HCl(pH 8,5 à 4°C) (SIGMA)	20mM
	2-mercaptoetanol (MERCK)	10mM
	KCl (REAGEN)	100mM
	Glicerol(SYNTH)	10%
	Imidazol (SIGMA)	20mM
Tampão C:	Tris.HCl(pH 8,5 à 4°C) (SIGMA)	20mM
	2-mercaptoetanol (MERCK)	10mM
	KCl (REAGEN)	100mM
	Glicerol(SYNTH)	10%
	Imidazol (SIGMA)	100mM

### 3.16 – Transferência semi-seca para "Western".

Foram cortados 8 pedaços de papel filtro e 1 pedaço de membrana PVDF da SIGMA do mesmo tamanho do gel. A membrana de PVDF foi ativada

mergulhando-a em Metanol (MERCK). Os oitos filtros e a membrana de PVDF foram incubadas no tampão de transferência por 10 minutos. Após este período, 4 pedaços de papel filtro foram empilhados sobre o catodo, seguido do gel de poliacrilamida-SDS, membrana de PVDF e mais 4 pedaços de papel filtro, tomando-se cuidado pra que não ficassem bolhas entre eles, o anodo foi colocado sobre o empilhamento. A transferência foi realizada por 1:20 horas no aparelho de transferência TRANS-BLOT SEMI-DRY TRANSFER CELL da BIO-RAD utilizando as seguintes condições: 24V, 300mA e 8W.

Solução usada:

Tampão de transferência:	Tris Base (SIGMA)	25mM
	Glicina (SYNTH)	150mM
	Metanol (MERCK)	10%

### 3.17 Imunodeteção de cauda de polihistidina (6HIS):

Tanto nos experimentos de Dot Blot quanto nos experimentos de Western Blot a membrana foi tratada da mesma maneira, portanto o tratamento da membrana será descrito uma única vez.

#### 3.17.1 Western Blot (Protocolo fornecido pela Qiagen):

A membrana foi retirada do aparelho de transferência, tomando-se cuidado para não invertê-la e foi incubada durante a noite em tampão de bloqueio. Após o bloqueio, a membrana foi lavada 2 vezes por 10 minutos com tampão TBS-Tween/Triton e 1 vez por 10 minutos com tampão TBS. Incubou-se a membrana por 1 hora em uma diluição 1/1000 preparada do anticorpo primário (Penta-His

Antibody da Qiagen) e tampão de bloqueio. A membrana foi lavada 2 vezes por 10 minutos com tampão TBS-Tween/Triton e 1 vez por 10 minutos com tampão TBS. Após as lavagens, a membrana foi incubada por 1 hora em uma diluição 1/1000 preparada do anticorpo secundário (Anti-IgG de camundongo conjugado com fosfatase alcalina da SIGMA®) e tampão de bloqueio. A membrana foi lavada 4 vezes por 10 minutos com tampão TBS-Tween/Triton

Soluções utilizadas:

Tampão de bloqueio:	BSA (SIGMA)	3%
	Tampão TBS	
Tampão TBS:	Tris-Cl (pH 7,5)(SIGMA®)	10mM
	NaCl (VETEC®)	150mM
Tampão TBS-Tween/Triton:	Tris-Cl (pH 7,5)(SIGMA®)	20mM
	NaCl (VETEC®)	500mM
	Tween 20(v/v)(SIGMA®)	0,05%
	Triton X-100(v/v)(Union Carbide)	0,2%

### 3.17.2 Dot Blot (Protocolo fornecido pela Qiagen):

O extrato foi lisado como descrito no item 3.13 do material e métodos. Foram pingados 5µl ou 10µl do extrato lisado dos clones na membrana, esperou-se que os pingos secassem. A membrana foi tratada como descrito anteriormente no item 3.16.1.

### 3.18 Reação de coloração da membrana com fosfatase alcalina e substratos

Colocou-se 50µl de NBT (GIBCO®-BRL) e 25µl de BCIP (GIBCO®-BRL) em 10ml de tampão de fosfatase alcalina, agitou-se bem. A membrana foi

incubada nesta solução por 15 minutos ao abrigo da luz. Após a reação a membrana foi lavada com água. Esperou-se a membrana secar com ajuda de papel de filtro e foi fotografada.

Solução utilizada:

Tampão de fosfatase alcalina:	Tris-Cl(pH 9,5) (SIGMA®)	100mM
	NaCl (VETEC®)	100mM
	MgCl <sub>2</sub> (SYNTH®)	5mM

### 3.19 Microscopia:

#### 3.19.1 Microscopia de contraste de fase:

Foi utilizado o microscópio invertido em fases BX-70 da Olympus® .

#### 3.19.2 Microscopia de fluorescência:

Foi utilizado o microscópio invertido IX70-S8F2 da Olympus®. Com os seguintes parâmetros:

Método de Excitação	B
Unidade de Espelho	U-MWB2
Espelho Dicroico	DM500
Filtro de excitação	BP460-490
Filtro de Barreira	Ba520IF

### 3.20 - Flurócromos

EGFP é um mutante de GFP (Proteína verde fluorescente) que contém uma substituição da fenilalanina 64 para uma leucina e da serina 65 para uma treonina (Excitação máxima= 488nm e emissão máxima=507)

### 3.21 Análise da relação TA/TñA:

A proporção foi avaliada contando-se o número encontrado de TA e TñA em cinco campos (aumento de 200x) escolhidos aleatoriamente.

## 4. Resultados e Discussão:

De acordo com nossos objetivos, duas abordagens foram escolhidas para a caracterização dos SScFvs selecionados contra p53. Uma seria a caracterização dos SScFvs em experimentos realizados *in vitro* e a outra por meio da expressão dos SScFvs *in vivo*.

### 4.1 Abordagens para a caracterização dos SScFvs *in vitro*

#### 4.1.1 Obtenção dos SScFvs purificados:

A caracterização *in vitro* depende da obtenção dos SScFvs purificados para utilização em experimentos de ligação e de interação *in vitro*.

Para esse fim escolheu-se o sistema de expressão procariota e purificação ProEX™ HT da INVITROGEN®. Este sistema incorpora uma seqüência de seis histidinas no amino-terminal na seqüência de aminoácidos do fragmento que se deseja purificar, facilitando sua purificação em colunas carregadas com níquel, devido à forte afinidade deste com a cauda de polihistidinas (Hoffman e Roeder, 1991). Além disso, a expressão do gene de interesse ocorre através da sua clonagem neste vetor que possui um promotor Trc. Este promotor é um híbrido dos promotores Triptofano-Lac e pode ser induzido adicionando-se IPTG no meio de cultura (Polayes, 1996).

Os fragmentos de DNA que codificam os minianticorpos foram extraídos dos plasmídios selecionados da biblioteca construída por Nery (2001) utilizando o sistema de duplo-híbrido. A excisão do fragmento foi realizada utilizando-se as



enzimas de restrição *EcoRI* e *PstI* e o fragmento resultante de cada minianticorpo foi clonado no vetor de expressão pProEX Hta, conservando a fase de leitura correta (figura 3) e dando origem aos plasmídios pProEX9-15, pProEX16-19 e pProEX25. O SScFv25 constitui-se de um clone que não foi triado contra nenhum ligante específico e é utilizado como controle; foi obtido e sequenciado por Breno Mello Silva e estão descritos em Nery (2001).

Após a ligação do fragmento no vetor, foram selecionados clones de cada minianticorpo para a confirmação da clonagem por amplificação do fragmento por PCR. Os iniciadores utilizados foram FScFv e RScFv (ver material e métodos 3.11.2).

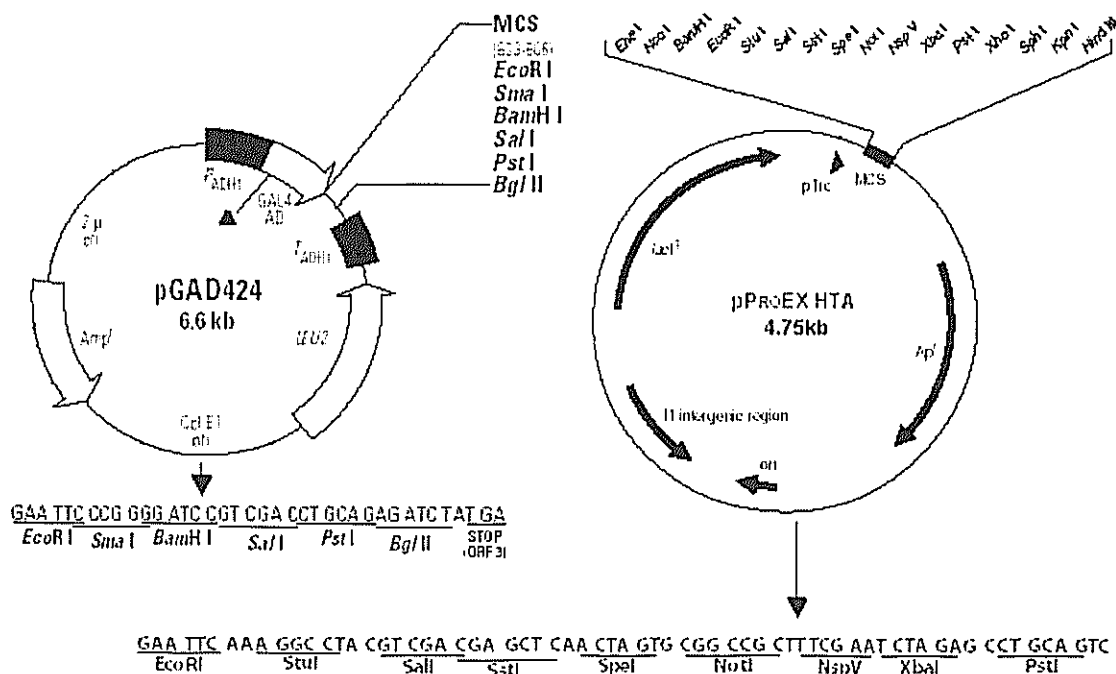


Figura 3: À esquerda, vetor da biblioteca, de onde as seqüências dos SScFvs foram retirados e, à direita, vetor onde foram clonados esses fragmentos em fusão com uma cauda de polihistidina.

Estes iniciadores anelam-se nas regiões flanqueadoras dos genes que codificam os SScFvs, que são idênticas para os três minianticorpos. O DNA de um fragmento de tamanho esperado ( $\cong 700$ pb) foi amplificado em pelo menos um dos clones transformados com os plasmídios construídos de cada minianticorpo testado (dados não mostrados).

Além da confirmação do sucesso da clonagem por PCR, os clones selecionados foram submetidos à digestão com as mesmas enzimas de restrição usadas na clonagem. Todos os clones testados apresentaram um padrão de restrição condizente com o padrão esperado, isto é, o fragmento liberado continha aproximadamente 700 pb (dados não mostrados), confirmando a clonagem sem lesão das extremidades onde os sítios de restrição estão posicionados, o que sugere que a clonagem manteve a fase de leitura correta.

Após a confirmação, os plasmídios pProEX9-15, pProEX16-19 e pProEX25 foram usados para transformar a linhagem MC1061 de *E. coli* para a expressão dos SScFvs, usando o protocolo recomendado pela INVITROGEN®. Este protocolo consiste em induzir a expressão da proteína de interesse, na hospedeira, durante a fase logarítmica, a 37°C, utilizando-se 0,6 mM (concentração final) de IPTG. Após a indução, alíquotas da cultura de cada clone são recuperadas com espaço de uma hora até quatro horas após a indução. Essas alíquotas foram tratadas como descrito no item 3.6.2.1 do material e métodos e aplicadas em gel de 10% de poliacrilamida-SDS. Em nenhum dos clones testados foi detectada uma banda correspondente à expressão dos SScFvs, isto é, uma banda de aproximadamente 27 kDa (figura 4).

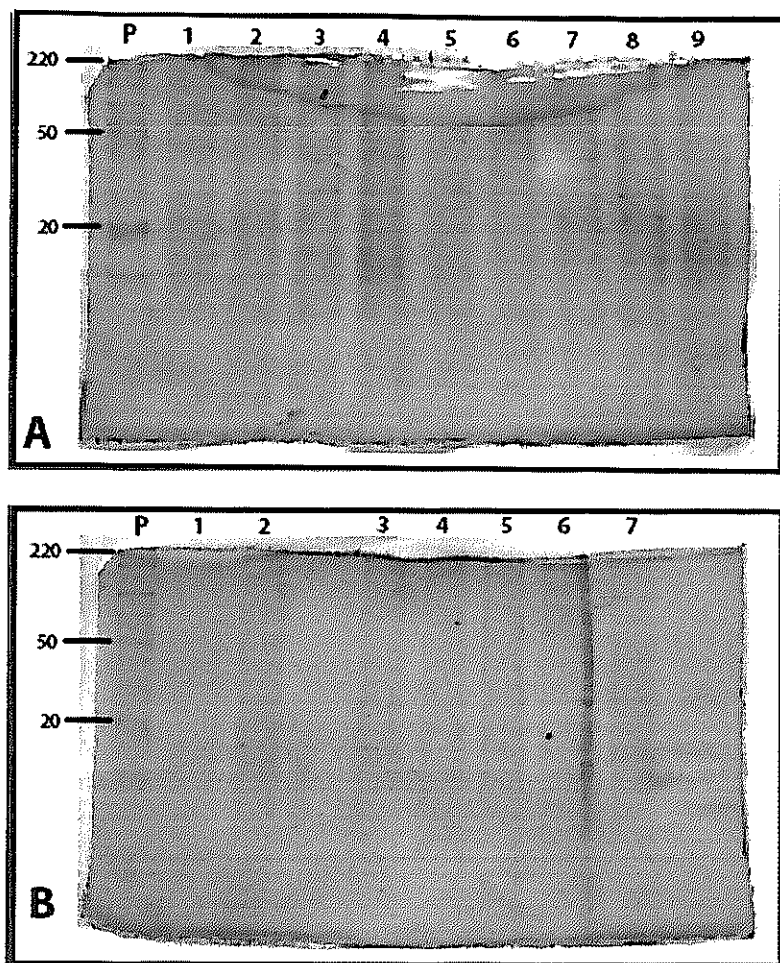


Figura 4: Amostras de proteínas totais extraídas de culturas bacterianas induzidas ou não com IPTG que foram aplicadas em gel de 10% de poliacrilamida-SDS e coradas com Coomassie Blue. Painei A: P-padrão BenchMark™ da GIBCO®, 1-pProEX9-15 sem indutor, 2-3-4 e 5-pProEX9-15 1h, 2h, 3h e 4h após adição de indutor, 6-pProEX16-19 sem indutor, 7-8 e 9-pProEX16-19 1h, 2h e 3h após adição de indutor, respectivamente. Painei B: P-padrão BenchMark™ GIBCO®, 1-pProEX16-19 sem indutor, 2-pProEX16-19 4h após adição de indutor, 3-pProEX25 sem indutor, 4-5-6 e 7-pProEX25 1h, 2h, 3h e 4h após adição de indutor, respectivamente.

Como foi visto por Polayes (1996), a quantidade de proteína total e a atividade recuperada variam de acordo com a linhagem de *E. coli* utilizada na expressão e, portanto, decidiu-se testar duas linhagens de *E. coli*, DH5 $\alpha$  e BL21-

SI. Essa última apresenta alto nível de expressão por ser deficiente em duas proteases (OmpT e Lon).

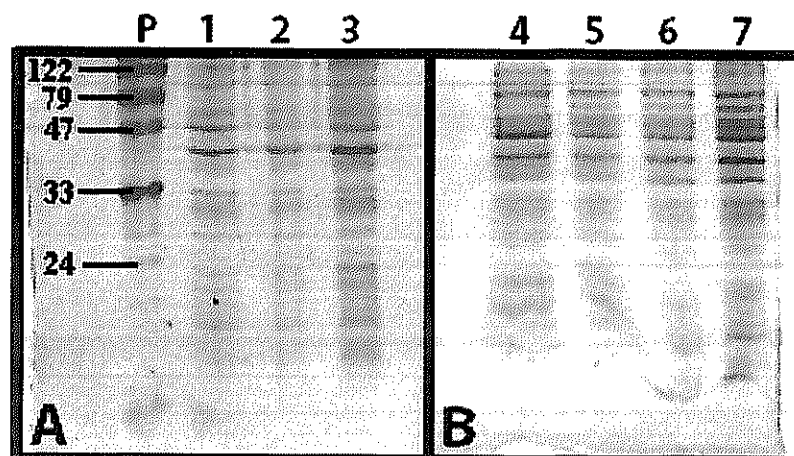


Figura 5: Amostras de proteínas totais extraídas de culturas bacterianas induzidas ou não com IPTG que foram aplicadas em gel de 10% de poliacrilamida-SDS coradas com Coomassie Blue. Painel A - BL21-SI transformada com pproex16-19: P-padrão Prestained Protein Molecular Weight Marker™ da Fermentas®, 1-pProEX16-19 não induzida, 2 e 3-pProEX16-19 2h e 4h após adição de indutor, respectivamente. Painel B - DH5 $\alpha$  transformada com: 4-pProEX16-19 não induzida, 5-6 e 7-pProEX16-19 2h, 3h e 4h após adição de indutor, respectivamente.

Novamente, não foi observada no gel uma banda ( $\cong 27$ kDa) que correspondesse à expressão significativa de SScFv (figura 5).

Várias alterações no protocolo original foram realizadas na tentativa de obtenção da expressão desejada. Na tabela 1 são mostradas as variações testadas.

Caracterização inicial de dois anticorpos sintéticos de cadeia única selecionados por interação com p53 (72-390) murina. **Resultados e Discussão**

Tabela 1: Alterações no protocolo original de expressão de proteína heteróloga na linhagem BL21-SI de *E. Coli*.

Tentativa	Temperatura de crescimento	Indutor utilizado	Concentração final do Indutor	Intervalo de coleta das amostras induzidas	Resultados obtidos
1	37°C	IPTG	1mM	0h/1h/2h/3h/4h	Sem expressão (figura 6)
2	30°C	IPTG	1mM	0h/1h/2h/3h/4h	Sem expressão (figura 7)
3	20°C	IPTG	0,3mM	0h/12h	Sem expressão (não mostrado)
4	37°C	Lactose	2%	0h/4h	Sem expressão (figura 8)

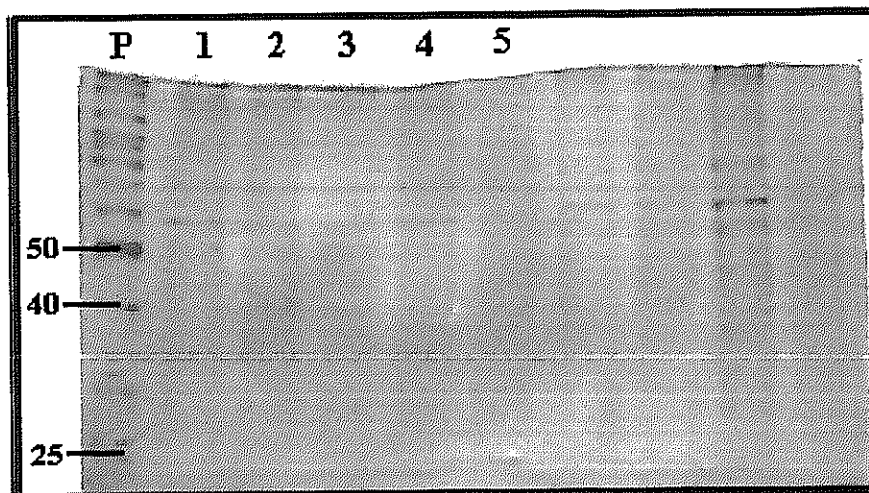


Figura 6: Amostras de proteínas totais extraídas de culturas bacterianas crescidas a 37°C induzidas ou não com 1 mM de IPTG que foram aplicadas em gel de 10% de poliacrilamida-SDS coradas com Coomassie Blue. BL21-SI transformada com pProEX9-15: P-padrão BenchMark™ da GIBCO®, 1-pProEX9-15 não induzida, 2-3-4 e 5-pProEX9-15 1h, 2h, 3h e 4h após adição de indutor, respectivamente.

Os resultados observados na figura 6 indicam que o aumento da concentração de IPTG não foi eficiente para observar-se a expressão de SScFv.

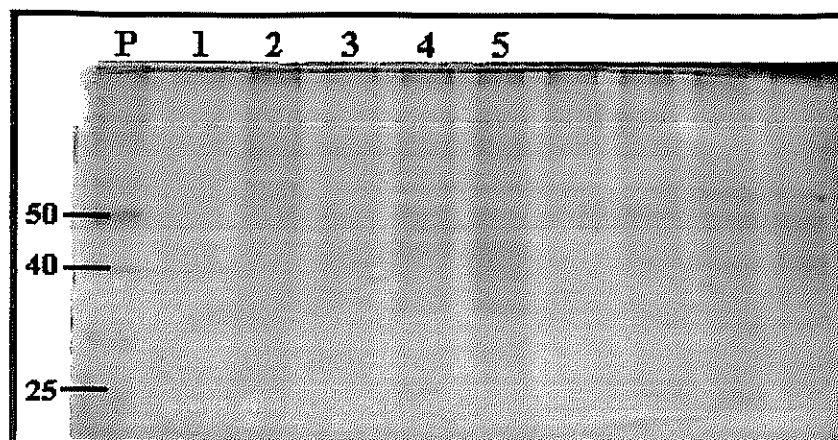


Figura 7: Amostras de proteínas totais extraídas de culturas bacterianas crescidas a 30°C induzidas ou não com 1 mM de IPTG que foram aplicadas em gel de 10% de poliacrilamida-SDS coradas com Coomassie Blue. BL21-SI transformada com pProEX9-15: P-padrão BenchMark™ da GIBCO®, 1-pProEX9-15 não induzida, 2-3-4 e 5-pProEX9-15 1h, 2h, 3h e 4h após adição de indutor, respectivamente.

A alteração na temperatura de crescimento e indução não foi capaz de estimular a expressão do SScFv em níveis visíveis (figura 7), como foi visto com sucesso em Shibui e Nagahari (1992).

Lactose também é capaz de se ligar ao repressor *Lacl*, que por sua vez fica impossibilitado de se ligar à região do operador, favorecendo a transcrição gênica. Na figura 8 foi testado o uso de lactose como indutor, mas novamente não observou-se a expressão de SScFv.

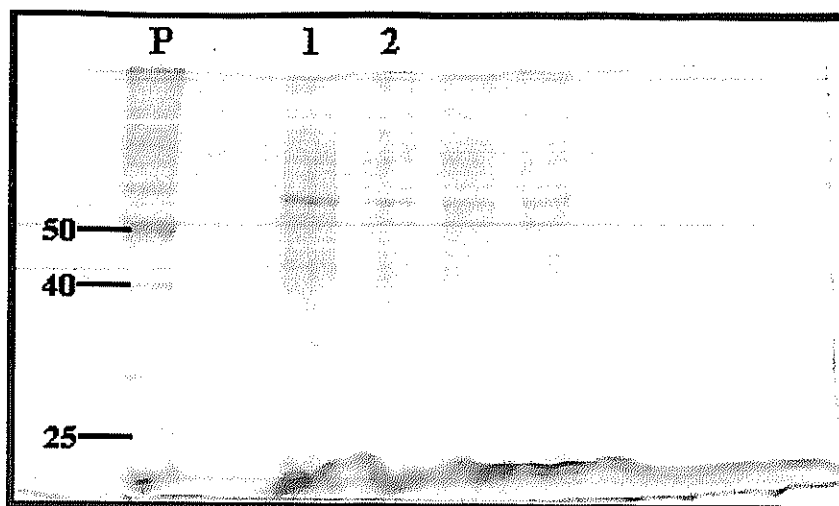


Figura 8: Amostras de proteínas totais extraídas de culturas bacterianas crescidas a 37°C, induzidas ou não com Lactose 2%, que foram aplicadas em gel de 10% de poliacrilamida-SDS coradas com Coomassie Blue. BL21-SI transformada com pProEX9-15: P-padrão BenchMark™ da GIBCO®, 1-pProEX9-15 não innduzida e 2-pProEX9-15 4h após adição de indutor.

Embora tenham sido feitas várias tentativas de otimização do protocolo de expressão (Tabela 1), não foi observada nenhuma banda de expressão significativa que correspondesse à esperada. As amostras das culturas expressando os outros minianticorpos SScFv16-19 e SScFv25 apresentaram resultados semelhantes (dados não mostrados). Apesar de não ser possível visualizar uma forte banda de expressão, poderia ser que a expressão estivesse acontecendo em baixo nível. Para verificar esta hipótese, decidiu-se tentar concentrar a amostra purificando os SScFvs por afinidade com a resina carregada com níquel. Para tanto, células provenientes de 250 ml de cultura induzida com IPTG tiveram suas células lisadas e o extrato resultante incubado com resina carregada com níquel, como descrito no material e métodos (protocolo de "batchwise"). As amostras correspondentes a cada passo da purificação foram

aplicadas em gel de 15% de poli-acrilamida-SDS corado com nitrato de prata (figura 9).

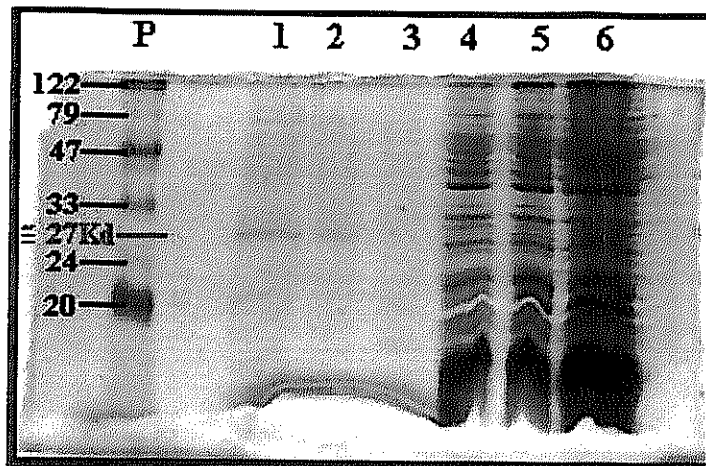


Figura 9: Amostras referentes aos passos de purificação de SScFv16-19 aplicadas em gel de 15% de poli-acrilamida-SDS corado com nitrato de prata: P-padrão Prestained Protein Molecular Weight Marker™ da Fermentas®, 1-primeiro eluído, 2-segundo eluído, 3-terceiro eluído, 4-sobrenadante que corresponde às proteínas que não se ligaram à resina, 5-extrato lisado e 6-extrato de cultura sem sonicação.

Como mostrado na figura 9, foi possível observar uma banda de aproximadamente 27 kDa que corresponderia ao tamanho do SScFv somado à cauda de histidina. No entanto, considera-se que a quantidade de proteína recuperada foi pequena e que havia contaminantes na fração do eluído, portanto decidiu-se incubar novamente as frações do purificado em contato com a resina carregada com níquel a fim de concentrar a amostra ainda mais e excluir os contaminantes, utilizando-se um tampão de lavagem com concentração maior de



imidazol (de 20 mM para 50mM). O imidazol, neste caso, competiria pelo níquel e somente ligações fortes permaneceriam ligadas à coluna (figura 10).

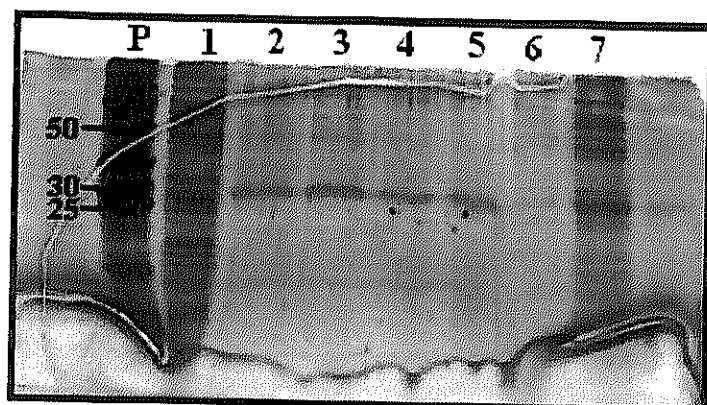


Figura 10: Amostras referentes aos passos da re-purificação de SScFv16-19 aplicadas em gel 15% de poliacrilamida-SDS corado com nitrato de prata: P-padrão BenchMark™ da GIBCO®, 1-extrato lisado obtido na primeira purificação, 2-segunda lavagem, 3-primeira lavagem, 4-segundo eluído, 5-primeiro eluído, 6-sobrenadante que corresponde às proteínas que não se ligaram na resina e 7-primeiro eluído da primeira purificação.

Na figura 10, comparando-se a canaleta 7, que corresponde ao eluído da primeira purificação, com as canaletas 4 e 5, que correspondem às frações do segundo e primeiro eluído da re-purificação, nota-se que houve redução dos contaminantes, isto é, de proteínas que interagiram com a resina carregada com o níquel mas não apresentavam a cauda de polihistidina. No entanto, houve perda de proteína recuperada nas frações do eluído, como pode ser observado por sua presença nas frações da segunda e primeira lavagem (canaletas 2 e 3, respectivamente).

Para confirmar se os clones estavam realmente expressando os SScFvs fusionados à cauda de polihistidina, realizou-se um experimento de Dot Blot, utilizando como anticorpo primário um anti-HIS(5) da Qiagen® (figura 11).

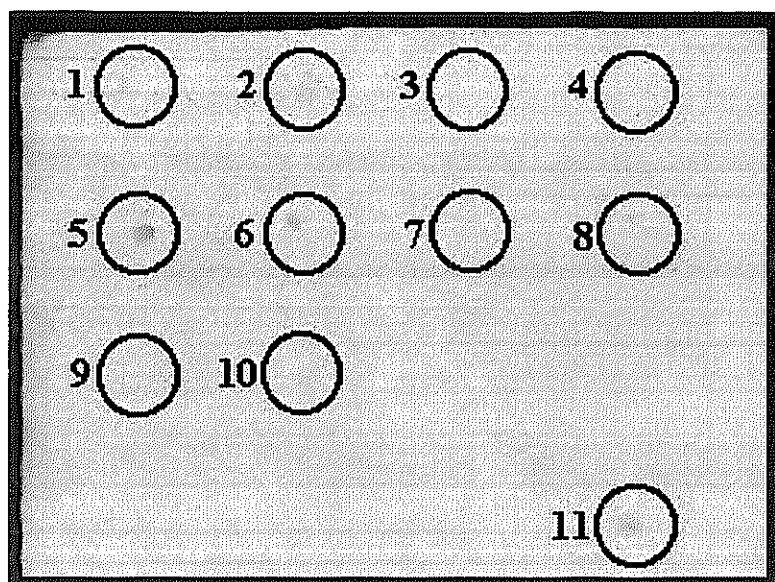


Figura 11: Dot blot de clones transformados com pProEX9-15, pProEX16-19 e pProEX25, induzidos ou não com IPTG, utilizando como anticorpo primário um anti-HIS(5): 1-proteína gp120-HIS (0,8 µg) (controle positivo), 2-proteína gp120-HIS (1,2 µg) (controle positivo), 3- Extrato celular (5 µl) de BL21/pProEX sem indução (controle negativo), 4- Extrato celular (10 µl) de BL21/pProEX sem indução (controle negativo), 5- Extrato celular (5 µl) de BL21/pProEX9-15 induzido, 6- Extrato celular (10 µl) de BL21/pProEX9-15 induzido, 7- Extrato celular (5 µl) de BL21/pProEX16-19 induzido, 8- Extrato celular (10 µl) de BL21/pProEX16-19 induzido, 9- Extrato celular (5 µl) de BL21/pProEX25 induzido, 10- Extrato celular (10 µl) de BL21/pProEX25 induzido e 11-proteína gp120-HIS (1,6 µg) (controle positivo).

De acordo com a figura 11, todos os clones testados estão expressando os SScFvs. A detecção pelo anticorpo anti-HIS(5) foi considerada muito baixa, já que foi fraca a coloração do agente cromogênico nos círculos 1, 2 e 11 da figura 11

onde foram depositados 0,8 µg, 1,2 µg e 1,6 µg de proteína fusionada à cauda de histidinas, respectivamente.

Em seguida, 7,5 µl de extrato celular das seguintes amostras de clones de BI21 transformadas com pProEX-Ht (controle negativo), pProEX9-15, pProEX16-19 e pProEX25 (ambos induzidos por 4 horas com IPTG), 7,5 µl de fração do primeiro eluído da re-purificação, 7,5 µl de fração do segundo eluído da re-purificação e 7,5 µl de proteína purificada gp120-HIS ( $\cong$  3 µg - controle positivo) foram aplicadas em gel de 10% de poliacrilamida-SDS. Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas para uma membrana de PVDF que foi submetida ao protocolo de "Western Blot" usando o anticorpo de camundongo Penta-His antibody da Qiagen® como primário e o anticorpo de cabra anti-IgG de camundongo com fosfatase alcalina conjugada como secundário. Nenhuma banda foi detectada pela reação na membrana inclusive do controle positivo. Esse resultado foi atribuído à perda de proteína que ocorre na transferência somada a baixa detecção do anticorpo vista no resultado anterior. Esse resultado também poderia ser explicado pelo fato de que o gel de poliacrilamida que foi usado para separar as amostras continha SDS. O SDS é um agente que desnatura proteína e poderia alterar o sítio de ligação do anticorpo formado pelas histidinas. No entanto, o fabricante do anticorpo primário reporta que a desnaturação da proteína melhora os resultados de detecção pelo fato da exposição do sítio de ligação, eliminando esta hipótese. Várias repetições foram feitas sendo trocados alguns reagentes, mas sem resultados positivos.

Quanto a baixa produção dos SScFvs vista nos experimentos de indução, poderia ser explicada pela degradação induzida pelo dobramento "folding" incorreto apresentado pelos SScFvs. Em *E. coli* o sistema de degradação proteolítica está ligado ao catabolismo como forma de conservar os recursos celulares pela reciclagem de proteínas com o dobramento incorreto ou com danos irreparáveis (Baneyx, 1999 e Mogk *et al.*, 2002). Foi visto que algumas proteínas de fusão tais como MBP e GST podem estabilizar seus parceiros (Baneyx, 1999 e Kapust e Waugh, 1999). Portanto, seria interessante usar sistemas de purificação que utilizam MBPs ou GST como "tags" que são expressos fundidos à proteína de interesse facilitando sua purificação por terem afinidade por resinas preparadas com maltose e glutatona, além de estabilizar as proteínas fusionadas à elas impedindo sua degradação. Breno Mello Silva expressou com êxito SScFvs em fusão com MalE (MBP), esses dados estão descritos em Nery (2001).

Outra alternativa seria clonar a fusão SScFv-GFP em um vetor de expressão qualquer e tentar purificar os SScFvs através da afinidade de GFP pelo níquel nas colunas (Li *et al.*, 2000).

## 4.2 Caracterização dos SScFvs *in vivo*

### 4.2.1 Transfecção de células de mamíferos.

Como já observado em alguns estudos realizados de expressão intracelular de ScFvs (vide introdução), estas moléculas podem interferir nos seus alvos, provocando os mais diversos efeitos na fisiologia da célula. Para verificar os possíveis efeitos causados pela expressão intracelular de minianticorpos

selecionados contra p53 na fisiologia de células de mamíferos, decidiu-se clonar os minianticorpos SScFv9-15, SScFv16-19 e SScFv25 no sistema de expressão em células de mamíferos pEGFP™ da CLONTECH® Laboratories, Inc. Este sistema possui um forte promotor (CMV) para expressar a proteína verde fluorescente (EGFP) em fusão com o gene. A fusão com EGFP se torna muito útil devido o fato da proteína verde fluorescente se tornar um marcador para as células transfectadas e, além disso, ela pode informar a localização celular das proteínas fusionadas a ela.

Os SScFvs9-15 e 16-19 foram escolhidos por se ligarem a p53 (aa 72-390) murina e SScFv25 foi escolhido para ser controle negativo nos experimentos realizados com os outros dois SScFvs porque ele não se liga a p53, além de estar sequenciado (Nery, 2001).

Os genes que codificam os minianticorpos SScFv9-15 e SScFv16-19 foram isolados do vetor pGAD424 utilizando as enzimas de restrição *EcoRI* e *BglII*. Os fragmentos foram clonados no vetor pEGFP-C2 que foi previamente digerido com *EcoRI* e *BamHI*, respeitando a fase de leitura dos fragmentos. As extremidades coesivas no DNA produto da digestão de *BglII* e *BamHI* são compatíveis, o que possibilitou a ligação sem qualquer tratamento prévio (figura 12).

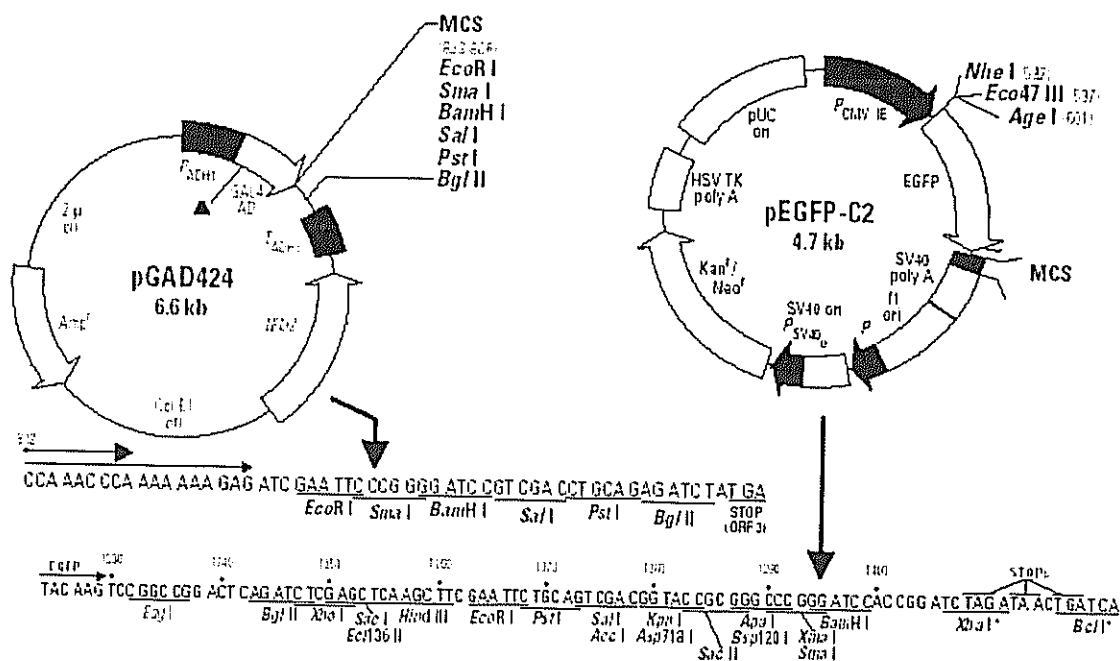


Figura 12: Figura mostrando o vetor pGAD424 de onde os minianticorpos foram extraídos e o vetor pEGFP-C2, onde foram clonados. As setas indicam o sítio múltiplo de clonagem com a fase de leitura respectiva de cada vetor.

O fragmento de DNA que corresponde ao SScFv 25, foi isolado de pGAD424, utilizando as enzimas *EcoRI* e *PstI* e clonado em pEGFP-C2 nos mesmos sítios (figura 12).

Após a ligação, os clones foram digeridos com as mesmas enzimas utilizadas na clonagem (exceto no caso de fusão *BamHI/BglII* que foi digerida por *XbaI*) para confirmar sua correta inserção. Além disso, foi realizada uma PCR utilizando os iniciadores FScFv e RScFv, que amplificam SScFvs. Em ambos os casos, tanto pela digestão quanto pela amplificação, foi possível observar a presença de um fragmento de aproximadamente 700 pb (dados não mostrados). A digestão correta com a enzima de sítio à montante da região codificadora sugere que a fase de leitura não foi alterada. Os plasmídios contendo os fragmentos de

DNA correspondentes aos SScFvs passaram a ser chamados de pEGFP9-15, pEGFP16-19 e pEGFP25.

#### 4.2.1.1 Transfecção de células de ovário de hamster (CHO)

Os plasmídios pEGFP9-15, pEGFP16-19 e pEGFP25 foram então utilizados para transfectar células de ovário de hamster chinês (CHO). O vetor "vazio" pEGFP.C2 também foi usado como controle "mock". A linhagem CHO foi escolhida por ser uma linhagem de fácil manuseio, além de termos experiência na transfecção muito eficiente de plasmídios através da eletroporação dessas células (48% das células são transfectadas). Sua seqüência de p53 possui homologia de 81% de identidade e 89% de similaridade quando comparada com a seqüência da proteína p53 de camundongo (*Mus musculus*), restrita à região a qual os anticorpos foram selecionados, isto é, do aminoácido 72 ao 390 (pesquisa BLAST conduzida no domínio do NCBI, [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)).

Após a transfecção das células CHO com os referidos plasmídios, as células foram semeadas em frascos de cultura contendo DME com 10% de SFB e incubadas por 16 horas a 37°C em estufa de CO<sub>2</sub> (5%).

A figura 13 mostra que, com exceção das células transfectadas com pEGFP-C2 (1A, B e C, controle "mock"), todas as transfecções de plasmídios expressando algum dos SScFvs causaram alterações morfológicas nas células. As células tornaram-se arredondadas e perderam a aderência quase que por completo. Além disso, foi observada a formação de "pacotes" em torno de algumas células transfectadas (figura 14). Essas características já foram vistas em células apoptóticas (Choi, *et al.*, 2004).

Como os SScFvs9-15 e 16-19 foram selecionados por interação com p53, e esta proteína está envolvida na ativação dos genes da apoptose (Roth *et al.*, 1996; Reisman e Loging, 1998 e Daujat *et al.*, 2001), haveria a possibilidade de que os SScFvs expressos intracelularmente pudessem estar induzindo apoptose nestas células. Entretanto, uma vez que o SScFv25 não se liga a p53, ao menos pelos resultados de duplo-híbrido (Nery, 2001), e os resultados foram semelhantes para todos os três SScFvs, havia evidência de que o efeito causado nas células não estava especificamente relacionado com a propriedade de SScFv9-15 e SScFv16-19 se ligarem a p53. Estes resultados sugerem que a expressão desses minianticorpos poderia ser tóxica para estas células, apesar de não haver na literatura dados semelhantes sobre esse tipo de resposta a ScFv intracelular.



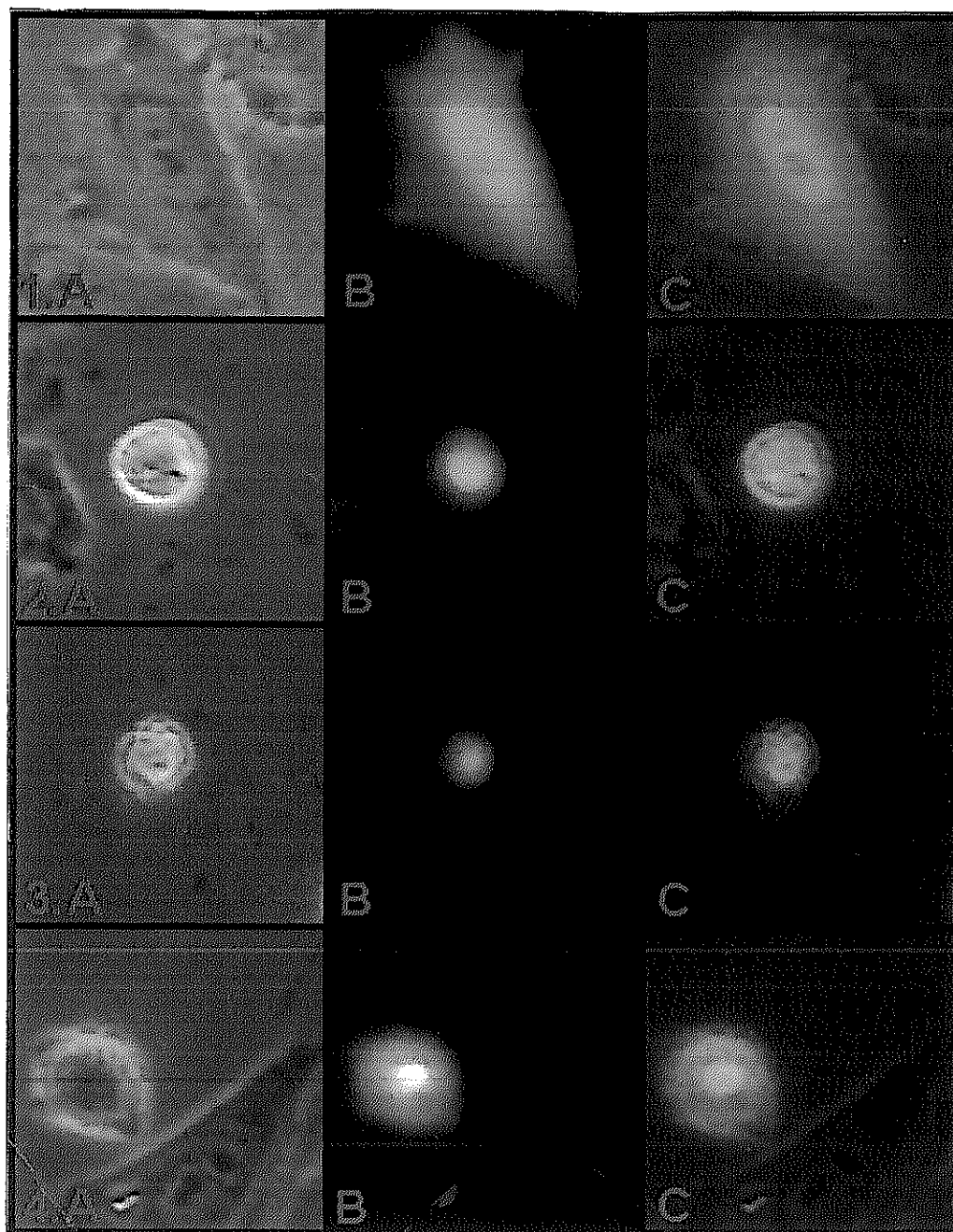


Figura 13: Células de ovário de hamster (CHO) transfectada com: 1 - pEGFP-C2 (controle expressando apenas EGFP); 2 - pEGFP9-15; 3 - pEGFP16-19; e 4 - pEGFP25. Técnica utilizada para obtenção de imagem. A - Microscopia de contraste de fase, B - Microscopia de fluorescência e C - Sobreposição das imagens.

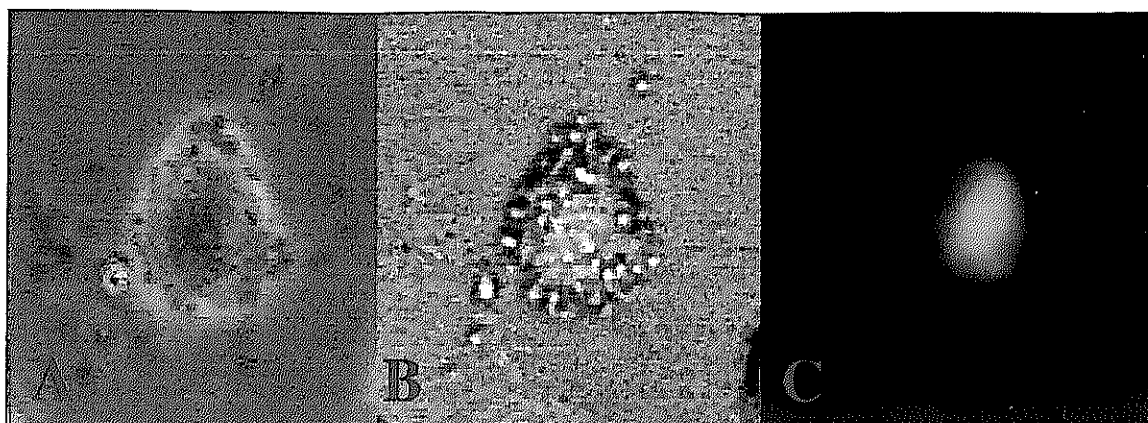


Figura 14: Célula de ovário de hamster (CHO) transfectada com pEGFP9-15 após 16 horas de incubação a 37°C em estufa com 5% de CO<sub>2</sub>. Setas indicam "pacotes" em torno das células. Técnica utilizada para obtenção de imagem: A- Microscopia de contraste de fase; B- Microscopia do tipo Nomarsky; C- Microscopia de fluorescência.

#### 4.2.1.2 Transfecção de Fibroblasto de Camundongo (3T3)

A transfecção de fibroblastos de embrião de camundongo (3T3) com os plasmídios expressando os SScFvs9-15, 16-19 e 25 apresentaram resultados semelhantes aos encontrados em CHO (dados não mostrados). Como o efeito nas duas células murinas testadas foi semelhante e, em ambos os casos, o efeito poderia ser provocado pela toxicidade da molécula de SScFvs por si só, decidiu-se transfectar outros tipos celulares para avaliar se nestas células a molécula de SScFv seria tóxica também.

Portanto, decidiu-se transfectar células humanas para verificar quais efeitos seriam provocados pela expressão intracelular dos SScFvs. As células

humanas apresentam também uma certa facilidade de observação da morfologia e da sub-localização do sinal fluorescente.

#### 4.2.1.3 Transfecção de células de epitélio cervical humano (Wish)

A linhagem Wish foi escolhida por ser uma célula humana normal. As células foram então transfectadas com os plasmídios pEGFP-C2, pEGFP9-15, pEGFP16-19 e pEGFP25 e foram incubadas por 16 horas. Novamente, os resultados foram semelhantes aos obtidos com as células CHO (figura 13) e 3T3 (resultados não mostrados). Para verificar se uma resposta específica a p53 poderia estar ocorrendo antes da manifestação da toxicidade, decidiu-se por realizar uma cinética da expressão dos anticorpos em células Wish para acompanhar o desenvolvimento das alterações morfológicas observadas, avaliar a relação entre células transfectadas aderidas e células transfectadas não aderidas, bem como avaliar a localização sub-celular do sinal fluorescente.

Os plasmídios pEGFP-C2, pEGFP9-15, pEGFP16-19 e pEGFP25 foram usados para transfectar células da linhagem Wish. Após a eletroporação, as células foram incubadas em fracos de cultura e, após 7-9 horas em estufa, as células transfectadas apresentaram fluorescência localizada (figura 15).

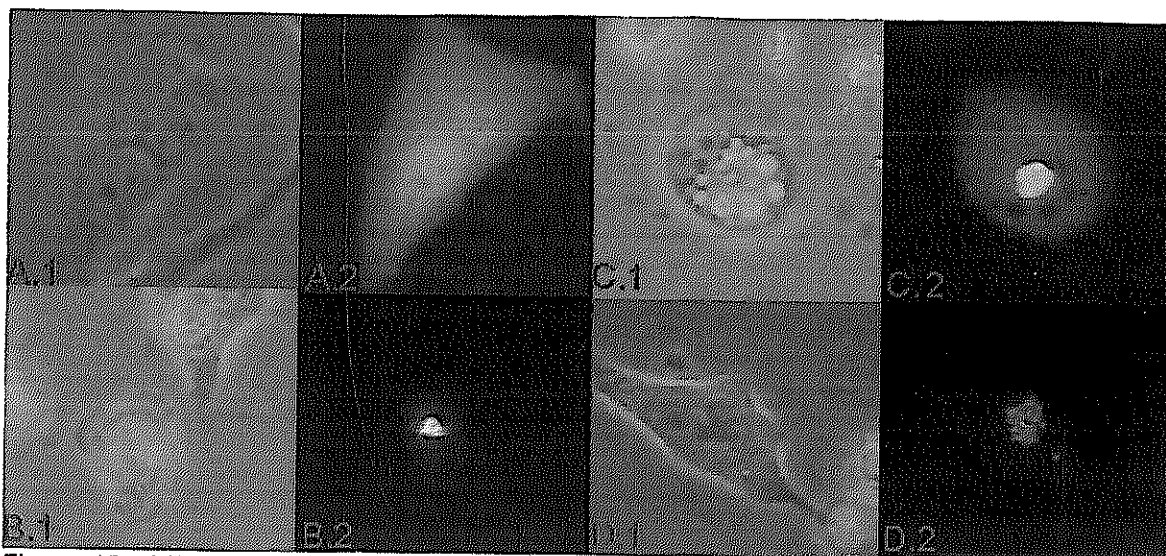


Figura 15: Células da linhagem Wish transfetadas com A - pEGFP-C2, B- pEGFP9-15, C- pEGFP16-19 e D- pEGFP25, após 7-9 horas de incubação. Técnica utilizada para obtenção de imagem: 1 - Microscopia de contraste de fase e 2 - Microscopia de fluorescência.

Em todas as células transfetadas com os SScFvs mostradas nessas fotos, a fluorescência aparentou estar localizada no núcleo ou perinuclear. No campo C.2 da figura 15 é possível ver a fluorescência espalhada pelo citoplasma, mas a concentração maior de fluorescência parece estar localizada no núcleo. O vetor pEGFP-C2 não adiciona nenhuma seqüência sinal de localização nuclear, portanto sugere-se que os SScFvs estão se ligando a algo presente no núcleo ou próximo dele. Isso poderia ser evidência de ligação à p53, pois, como p53 é um fator de transcrição, sua localização é nuclear. O SScFv25 também apresentou localização nuclear e, de acordo com os resultados obtidos com o sistema do duplo-híbrido, ele não se liga à p53. Entretanto, foi visto em experimentos utilizando o duplo-híbrido que SScFv25 é um anticorpo com baixa especificidade (Nery, 2001) e, portanto, poderia se ligar à várias outras proteínas presentes no

núcleo ou próximo a ele. Neste caso, a resposta provocada pelos SScFvs9-15 e 16-19 poderia ser específica. Outra hipótese seria que a resposta provocada pelos SScFvs9-15, 16-19 e 25 seria inespecífica. Isso poderia ser pela existência de alguma região comum a todos os três SScFvs que estivesse se ligando a algo presente no núcleo e provocando as alterações na célula, por se ligar a uma proteína e bloquear ou interferir na sua função. Todavia, sem a caracterização bioquímica das características de ligação dos SScFvs anti-p53 torna-se arriscado optar-se por uma ou outra explicação. A seleção de um outro controle negativo que não apresente a baixa especificidade do SScFv25 poderia esclarecer se a sequência dos SScFvs são tóxicas por si só ou não.

A relação entre células transfectadas aderidas e células transfectadas não aderidas (Tabela 2) revelou que à medida que o tempo de incubação aumentou o número de células que perderam a aderência também aumentou, mostrando que a toxicidade provocada por ambos os SScFvs foi gradativa.

Tabela 2: Relação entre células da linhagem Wish transfectadas e aderidas (TA) e transfectadas e não aderidas (TñA) - TA/TñA entre 8 e 12 horas de incubação e relação entre células vivas e mortas após 24 horas de incubação (coradas com brometo de etídio).

Clones	Tempo de incubação				
	8 horas	10 horas	11 horas	12 horas	24 horas (Corado com EB)
Controle negativo	17/2	19/1	15/3	12/1	15 vivas/2 mortas
SScFv9-15	15/7	9/8	5/9	3/11	3 vivas/2 mortas
SScFV16-19	7/1	18/4	13/8	11/5	8 vivas/2 mortas
SscFv25	12/9	18/17	17/15	14/15	6 mortas

As células da linhagem Wish transfectadas com os plasmídios pEGFP-C2, pEGFP9-15, pEGFP16-19 e pEGFP25 foram mantidas em incubação até completar 24 horas e foram coradas com brometo de etídio (EB) (figura 16). O brometo de etídio é um corante que se intercala entre as cadeias do DNA, mas para isso, é preciso atravessar a membrana plasmática. Portanto, EB é usado como indicador de morte celular, pois a membrana de células mortas é permeabilizada permitindo a entrada de EB.

Os resultados sugeriram que o SScFv 25 aparentemente apresentou maior toxicidade, pois, após 24 horas de incubação todas as células transfectadas já haviam morrido, enquanto que algumas células transfectadas com os SScFv9-15 e 16-19 ainda permaneciam vivas apesar de alteradas morfológicamente (figura 16).

Uma alternativa para avaliar se a resposta provocada pelos SScFvs9-15 e 16-19 estava sendo específica contra p53 seria observar a expressão intracelular desses minianticorpos em células estáveis com baixos níveis de p53. Caso, a resposta fosse específica, a expressão dos SScFvs9-15 e 16-19 interferiria pouco ou quase nada na fisiologia ou morfologia da célula.

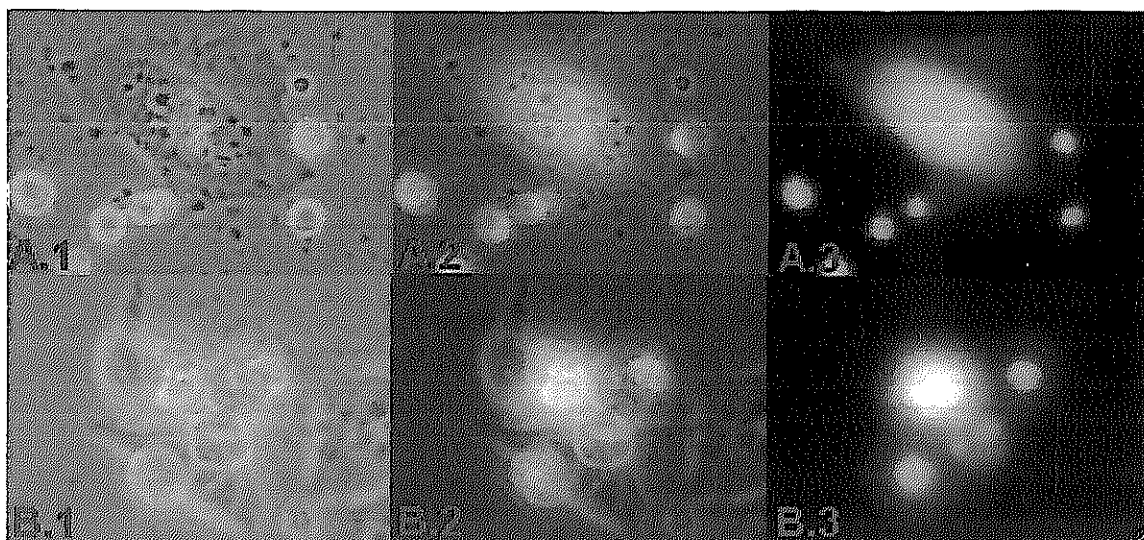


Figura 16: Células da linhagem Wish transfectadas com pEGFP-C2 (A) e PEGFP16-19 (B) e incubadas por 24 horas em estufa de CO<sub>2</sub> à 37°C. Técnica utilizada para obtenção de imagem. 1 - Microscopia de contraste de fase, 2 - Sobreposição das imagens e 3 - Microscopia de fluorescência.

#### 4.2.1.4 Transfecção de células de adenocarcinoma de epitélio cervical humano (HeLa)

As células da linhagem HeLa foram escolhidas por serem células humanas que possuem baixíssimos níveis de p53 selvagem, que é degradada pela expressão endógena da proteína E6 do HPV (vírus do papiloma humano). Portanto, seria interessante comparar os resultados obtidos com as células da linhagem Wish, que possuem níveis normais de p53, com os resultados obtidos com as células da linhagem HeLa.

Novamente decidiu-se fazer uma cinética da expressão dos SScFvs nas células da linhagem HeLa, observando as alterações morfológicas nas células

juntamente com a relação entre células transfectadas aderidas e células transfectadas não aderidas. As células foram então transfectadas com os plasmídios pEGFP-C2, pEGFP9-15, pEGFP16-19 e pEGFP25 e foram incubadas.

Entre 6-8 horas de incubação as células da linhagem HeLa transfectadas foram observadas (figura 17).

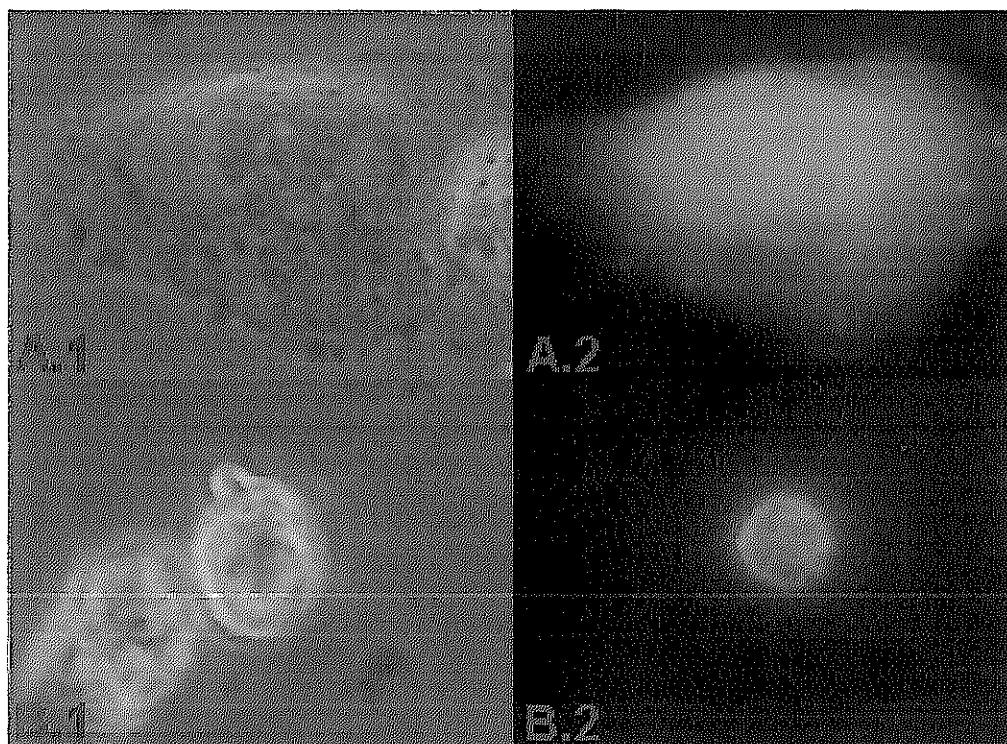


Figura 17: Células da linhagem HeLa transfectadas com: A - pEGFP-C2 e B - pEGFP9-15 e incubadas em estufa com 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C por 8 horas. Técnica utilizada para obtenção de imagem: 1 - Microscopia de contraste de fase e 2 - Microscopia de fluorescência.

Com apenas 6-8 horas de incubação já foi observada a alteração morfológica nas células transfectadas com o SScFv9-15 (figura 17), SScFv16-19 e SScFv 25 (dados não mostrados).



Não foi possível observar a transição do estado normal para o alterado, talvez porque nestas células isso ocorra instantaneamente após a expressão desses SScFvs, a falta de p53 nestas células poderia ter alguma influência, já que p53 poderia estar competindo pela ligação com as moléculas de SScFvs.

As células permaneceram incubadas e a relação TA e TñA foi observada nos intervalos de tempo 8, 12, 13 e 24 (Tabela 3).

Tabela 3: Relação entre células da linhagem HeLa transfectadas e aderidas (TA) e transfectadas e não aderidas (TñA) - TA/TñA entre 8 e 24 horas de incubação e relação entre células vivas e mortas após 48 horas de incubação (coradas com brometo de etídio).

Clones	Tempo de Incubação				
	8 horas	12 horas	13 horas	24 horas	48 horas (corado com EB)
Controle negativo	37/2	43/1	36/1	36/3	40 vivas/1 morta
SScFv9-15	0/16	0/9	0/10	0/3	0 vivas/0 mortas
SScFV16-19	2/51	13/19	18/8	10/13	1 viva/20 mortas
SscFv25	0/27	0/21	0/16	0/19	20 mortas

Como pode ser observado nas células transfectadas com SScFv9-15 e SScFv25, as células transfectadas não aderidas permanecem não aderidas até o final do período de incubação (48 horas), onde não se percebem mais células transfectadas devido ao fato de todas terem morrido, que foi confirmado pelo uso de brometo de etídio (última coluna da tabela 3). No entanto, as células transfectadas com o SScFv16-19 parecem que a princípio (8 horas de incubação) não se aderiram, mas com o aumento do período de incubação, parte dessas células aderiram na superfície do frasco de cultura (intervalo de 12 até 24 horas) (figura 18) e após 48 horas de incubação, tornam-se alteradas e perdem a

aderência. Estas últimas células foram coradas pelo EB, revelando que elas estavam mortas (figura 19).

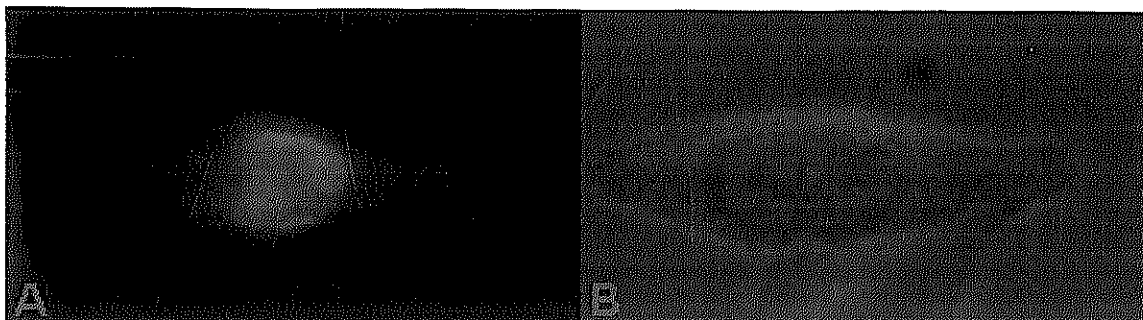


Figura 18: Células da linhagem HeLa transfectada com pEGFP16-19 e incubada por 12 horas  
Técnica utilizada para obtenção de imagem: A - Microscopia de contraste de fase e B - Microscopia de fluorescência

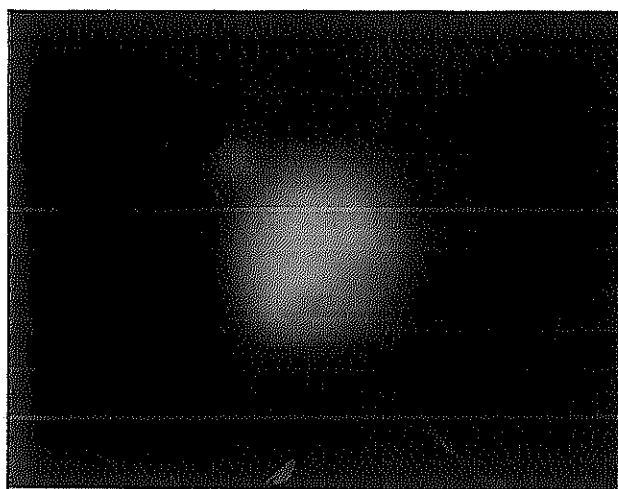


Figura 19: Célula da linhagem HeLa transfectada com pEGFP16-19 e incubada por 48 horas e corada com brometo de etídio. Técnica utilizada para obtenção de imagem: Microscopia de fluorescência.

A Comparação dos resultados obtidos da transfecção das células Wish (p53 normal) com os SScFvs com os resultados obtidos com as células HeLa (baixos níveis de p53), sugere que a resposta provocada pelos SScFvs nas células não foram específicas para p53. Entretanto, os SScFvs poderiam estar ligando-se a outros membros da família p53 que partilham regiões de alta homologia (Marin *et al.*, 1998; Zeng *et al.*, 2001 e Bénard *et al.*, 2003). Os membros, p63 e p73 podem se ligar nas sequências alvos dos genes que respondem à p53 e portanto podem induzir apoptose, a parada do ciclo celular e diferenciação celular de uma maneira como p53. Além desses membros, existem diversas isoformas descritas dos membros da família p53, como as isoformas  $\Delta$ Np63/p73, essas isoformas possuem uma deleção do amino-terminal transativador causada pela expressão a partir de um promotor alternativo localizado no íntron 3 do gene. Já foi visto que as isoformas  $\Delta$ Np63/p73 podem inibir apoptose em células neurais e apresentar outras funções antagonistas (Bénard *et al.*, 2003). Portanto a interação de SScFvs com alguma dessas isoformas podem interferir em processos do controle celular.

Os SScFvs 9-15, 16-19 e 25 aparentemente apresentaram toxicidade em todas as células testadas. A semelhança estrutural dessas moléculas seria uma explicação caso a molécula por si só estivesse provocando tal efeito, entretanto existem muitos exemplos na literatura da expressão de SScFvs intracelular que não foi observado a toxicidade deles (Cohen *et al.*, 1998, Fromentel *et al.*, 1999 e Strube e Chen 2002).

Os níveis de toxicidade foram diferentes entre os SScFvs testados, talvez por causa das diferenças entre as sequências encontradas no CDR de cada

SScFv que podem interferir na ligação entre o SScFv e o ligante (ou ligantes) responsável pelas alterações nas células.

## 5. Conclusões e Perspectivas:

Concluimos que o sistema de expressão ProEX-HT não correspondeu eficientemente às nossas necessidades. Nenhuma das tentativas de obtenção da expressão desejada tiveram êxito. Portanto, os experimentos que seriam realizados *in vitro* ficaram comprometidos. Outros sistemas devem ser testados, preferencialmente aqueles que contam com proteínas de fusão que estabilizam a proteína de interesse.

Em relação à caracterização dos SScFvs *in vivo*, concluimos que os SScFvs9-15, 16-19 e 25 são tóxicos para as células de mamíferos testadas. A semelhança dos resultados observados em células da linhagem Wish e HeLa sugeriram que as respostas provocadas pela expressão intracelular de SScFv9-15 e 16-19 são inespecíficas à propriedade de ligação desses minianticorpos com p53, embora possa haver ligação com outras isoformas da mesma família. A falta de um bom controle negativo, que não se ligue inespecificamente com muitas proteínas, compromete a avaliação de toxicidade intrínseca dos SScFvs pertencentes à biblioteca previamente construída.

A interpretação mais segura dos efeitos da expressão intracelular dos SScFvs que se ligam a p53 em levedura depende de sua caracterização bioquímica, que só será possível após a purificação.

## 6. Referências Bibliográficas

- Abbas, A. K.; Lichtman, A. H. e Pober, J. S. (1994). *Cellular and Molecular Immunology*. W. B. Saunders Company, Philadelphia.
- Abraham, R.; Buxbaum, S.; Link, J.; Smith, R.; Venti, C. e Darsley, M. (1995). Screening and kinetic analysis of recombinant anti-CEA antibody fragments. *J Immunol Methods*, 183:119-25.
- Agami, R. (2002) RNAi and related mechanisms and their potential use for therapy. *Curr Opin Chem Biol*, 6:829-34.
- Allen, J. B.; Walberg, M. W.; Edwards, M. C. e Elledge, S. J. (1995). Finding prospective partners in the library: the two-hybrid system and phage display find a match. *Trends Biochem Sci*, 20:511-6.
- Amit, A. G.; Mariuzza, R. A.; Phillips, S. E. e Poljak, R. J. (1986). Three-dimensional structure of an antigen-antibody complex at 2.8 Å resolution. *Science*, 233:747-53.
- Baneyx, F. (1999). Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Curr Opin Biotechnol*, 10:411-21.
- Barbas, C. F.; Kang, A. S.; Lerner, R. A. e Benkovic, S. J. (1991). Assembly of combinatorial antibody libraries on phage surfaces: the gene III site. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88:7978-82.
- Barbas, C. F.; Bain, J. D.; Hoekstra, D. M. e Lerner, R. A. (1992). Semisynthetic combinatorial antibody libraries: a chemical solution to the diversity problem. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89:4457-61.
- Bartel, P. L.; Chien, C. T.; Sternglanz, R. e Fields, S. (1993) Using the two-hybrid system to detect protein-protein interactions. In *Cellular Interactions in Development: A Practical Approach.*, ed. Hartley, D.A. (Oxford University Press, Oxford) pp. 153-79.
- Bénard, J.; Douc-Rasy, S. e Ahomadegbe, J. C. (2003) TP53 Family Members and Human Cancers. *Hum Mutat*, 21:182-91.
- Berry, M.J.; Davies, J.; Smith, C.G. e Smith, I. (1991). Immobilization of Fv antibody fragments on porous silica and their utility in affinity chromatography. *J Chromat*, 587:161-9.
- Bird, R. E.; Hardman, K. D.; Jacobson, J. W.; Johnson, S.; Kaufman, B. M.; Lee, S. M.; Lee, T.; Pope, S. H.; Riordan, G. S. e Whitlow, M. (1988). Single-chain antigen-binding proteins. *Science*, 242:423-6.

- Blazek, D.; Celer, V.; Navratilova, I. e Skladal, P. (2004) Generation and characterization of single-chain antibody fragments specific against transmembrane envelope glycoprotein gp46 of maedi-visna virus. *J Virol Methods*, 115(1):83-92.
- Chien, C-T.; Bartel, P. L.; Sternglanz, R. e Fields, S. (1991). The two-hybrid system: A method to identify and clone genes for proteins that interact with a protein of interest. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88:9578-82.
- Chiswell, D. J. e McCafferty, J. (1992). Phage antibodies: will new 'coliclonal' antibodies replace monoclonal antibodies? *Trends Biotechnol*, 10:80-4.
- Choi, S. E.; Sohn, S.; Cho, J-W.; Shin, E-A.; Song, P-S. e Kang, Y. (2004) 9-Hydroxyphosphoribide a-induced apoptotic death of MCF-7 breast cancer cells is mediated by c-Jun N-terminal kinase activation. *Photochem Photobiol*, 73:101-7.
- Cohen, P.A.; Mani, J. C. and Lane, D. P. (1998). Characterization of a new intrabody directed against the N-terminal region of human p53. *Oncogene*, 17:2445-56.
- Colcher, D; Bird, R.E.; Rosseli, M.; Hardman, K. D.; Jonson, S.; Pope, S. H.; Dodd, S.W.; Pantoliano, M. W.; Milenic, D. E. e Scholm, J. (1990). In vivo tumor targeting of a recombinant single chain antigen-binding protein. *J Nat Can Inst*, 82:1191-7.
- Cooke, S.P.; Pedley, R. B.; Boden, R.; Begent, R. H. J. and Chester, K. A. (2002). In vivo tumor delivery of a recombinant single-chain Fv::Tumor necrosis Factor: A fusion protein. *Bioconjug Chem*, 13:7-15.
- Cottrell, T. R. e Doering, T. L. (2003) Silence of the strands: RNA interference in eukaryotic pathogens. *Trends Microbiol*, 11(1):37-43.
- Cramer A.; Cwirla S. e Stemmer W. P. (1996). Construction and evolution of antibody-phage libraries by DNA shuffling. *Nat Med*. 2(1):100-2.
- Daujat, S.; Neel, H. e Piette, J. (2001). MDM2: life without p53. *Trends Genet*, 17(8):459-64.
- Diaz, P.I.; Zilm, P.S. e Rogers, A.H. (2000). The response to oxidative stress of *Fusobacterium nucleatum* grown in continuous culture. *FEMS Microbiol letters*, 187:31-4.
- Fashena, S. J.; Serebriiskii, I. e Golemis, E. A. (2000) The continued evolution of two-hybrid screening approaches in yeast: how to outwit different preys with different baits. *Gene*. 250:1-14.

- Fields, S. e Song, O. (1989). A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature*, 340:245-6.
- Fields, S. e Sternglanz, R. (1994). The two-hybrid system: an assay for protein-protein interactions. *TIG*, 10(8):286-91.
- Fromentel, C. C.; Gruel, N.; Venot, C.; Debussche, L.; Conseiller, E.; Dureuil, C.; Teillaud, J. L.; Tocque, B. and Bracco, L. (1999). Restoration of transcriptional activity of p53 mutants in human tumour cells by intracellular expression of anti-p53 single chain Fv fragments. *Oncogene*, 18:551-7.
- Fu, L.; Minden, M. D. e Benchimol, S. (1996) Translational regulation of human p53 gene expression. *EMBO J*, 15(16):4392-401.
- Glennie, M.J.; e Johnson, P.W.M. (2000). Clinical trials of antibody therapy. *Immunol Today*, 21(8):403-10.
- Griep, R. A.; van Twisk, C.; van der Wolf, J. M. e Schots, A. (1999). Fluobodies: green fluorescent single-chain Fv fusion proteins. *J Immunol Methods* 230:121-30.
- Gu, W. e Roeder, R.G. (1997). Activation of p53 sequence-specific DNA binding by acetylation of the C-terminal domain. *Cell*, 90:595-606.
- Hayashi, N.; Welschof, M.; Zewe, M.; Braunagel, M.; Dubel, S.; Breitling, F. e Little, M. (1994). Simultaneous mutagenesis of antibody CDR regions by overlap extension and PCR. *Biotechniques*, 17: 310, 312, 314-5.
- Ho, M. e Segre, M. (2003) Inhibition of cocaine binding to the human dopamine transporter by a single chain anti-idiotypic antibody: its cloning, expression, and functional properties. *Biochim Biophys Acta*, 2638:257-66.
- Hoffmann, A. e Roeder, R.G. (1991) Purification of his-tagged proteins in non-denaturing conditions suggests a convenient method for protein interaction studies. *Nucleic Acids Res.* 19(22):6337-8
- Holliger, P.; Wing, M.; Pound, J. D.; Bohlen, H. e Winter, G. (1997). Retargeting serum immunoglobulin with bispecific diabodies. *Nat Biotechnol*, 15: 632-6.
- Holliger, P. e Hoogenboom, H. (1998). Antibodies come back from the brink. *Nat Biotechnol*, 16:1015-16.
- Huse, W. D; Sastry, L.; Iverson, S. A.; Kang, A. S.; Alting-Mees, M.; Burton, D. R.; Benkovic, S. J. e Lerner, R. A. (1989). Generation of a large combinatorial library of the immunoglobulin repertoire in phage lambda. *Science*, 246:1275-81.



- Ito, T.; Chiba, T. e Yoshida, M. (2001). Exploring the protein interactome using comprehensive two-hybrid projects. *Trends Biotechnol*, 19(10):23-7.
- Jannot, C. B. e Hynes, N. E. (1997) Characterization of scFv – 421, a Single-Chain Antibody Targeted to p53. *Biochem Biophys Res Commun*, 230:242-6.
- Jost, C. A.; Marin, M. C. e Kaelin, W. G.(1997). P73 is a simian (correction of human) p53-related protein that can induce apoptosis. *Nature*, 389:191-4.
- Kaghad, M.; Bonnet, H.; Yang, A.; Creancier, L.; Biscan, J. C.; Valent, A.; Minty, A.; Chalon, P.; Lelias, J. M.; Dumont, X.; Ferrara, P.; McKeon, F. e Caput, D. (1997). Monoallelically expressed gene related to p53 at 1p36, a region frequently deleted in neuroblastoma and other human cancers. *Cell*, 90:809-19.
- Kang, A. S.; Barbas, C. F.; Janda, K. D.; Benkovic, S. J. e Lerner, R. A. (1991). Linkage of recognition and replication functions by assembling combinatorial antibody Fab libraries along phage surfaces. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88:4363-6.
- Kapust, R.B. e Waugh, D.S. (1999). Escherichia coli maltose-binding protein is uncommonly effective at promoting the solubility of polypeptides to which it is fused. *Protein Sci*, 8:1668-74.
- Kim, V. N. (2003). RNA Interference in Functional Genomes and Medicine. *J Korean Med Sci* 18:309-18.
- Knappik, A.; Ge, L.; Honegger, A.; Pack, P.; Fischer, M.; Wellnhofer, G.; Hoess, A.; Wolle, J.; Pluckthun, A. e Virnekas, B. (2000). Fully synthetic human combinatorial antibody libraries (HuCAL) based on modular consensus frameworks and CDRs randomized with trinucleotides. *J Mol Biol*, 296: 57-86.
- Kubbutat, M.H.G.; Jones, S.N. e Vousden, K.H. (1997). Regulation of p53 stability by Mdm2. *Nature*, 387:299-303.
- Lagerkvist, A. C.; Furebring, C. e Borrebaeck, C. A. (1995). Single, antigen-specific B cells used to generate Fab fragments using CD40-mediated amplification or direct PCR cloning. *Biotechniques*, 18: 862-9.
- Li, F. e Aitken, R. (2004). Cloning of porcine scFv antibodies by phage display and expression in Escherichia coli. *Vet Immunol Immunopathol*, 97(1-2):39-51.
- Li, Y.; Agrawal, A.; Sakon, J. e Beitle, R.R. (2000) Characterization of metal affinity of green fluorescent protein and its purification through salt promoted, immobilized metal affinity chromatography. *J Chromatogr*, 909:183-90.
- Lorimer, I. A.; Keppler-Hafkemeyer, A.; Beers, R. A.; Pegram, C. N.; Bigner, D. D. e Pastan, I. (1996). Recombinant immunotoxins specific for a mutant

epidermal growth factor receptor: targeting with a single chain antibody variable domain isolated by phage display. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93:14815-20.

Mah, D.C.; Hu, W.G.; Pon, J.K.; Masri, S.A.; Fulton, R.E.; Monette, P.L. e Nagata, L.P. (2003). Recombinant anti-botulinum neurotoxin A single-chain variable fragment antibody generated using a phage display system. *Hybrid Hybridomics*, 22(5):277-83.

Malmborg, A. C. e Borrebaeck, C. A. (1995). BIAcore as a tool in antibody engineering. *J Immunol Methods*, 183: 7-13.

Marin, M.C.; Jost, C.A.; Irwin, M.S.; DeCaprio, J.A.; Caput, D. e Kaelin JR, W.G. (1998). Viral Oncoproteins Discriminate between p53 and the p53 Homolog p73. *Mol Cell Biol*, 18(11):6316-24

Marks, J. D.; Hoogenboom, H. R.; Griffiths, A. D. e Winter, G. (1992). Molecular evolution of proteins on filamentous phage. Mimicking the strategy of the immune system. *J Biol Chem*, 267:16007-10.

McCafferty, J.; Griffiths, A. D.; Winter, G. e Chiswell, D. J. (1990). Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature*, 348: 552-4.

McElhiney, J.; Drever, M.; Lawto, L.A. e Porter, A.J. (2002). Rapid isolation of a Single-Chain antibody against the cyanobacterial toxin Microcystin-LR by Phage Display and its use in the immunoaffinity concentration of Microcystins from water. *Appl Environ Microbiol*, 68(11):5288-95.

Meek, D.W. (1998). Multisite phosphorylation and the integration of stress signals at p53. *Cell Signal*, 10:159-66.

Mogk, A.; Mayer, M. P. e Deuerling, E. (2002). Mechanisms of Protein Folding: Molecular Chaperones and Their Application in Biotechnology. *ChemBiochem*, 3:807-14.

Nery, F.C. (2001). Construção e Triagem de Bibliotecas de Anticorpos Sintéticos de Cadeia Única. Dissertação de mestrado. ICB – UFMG.133p.

Nissim, A.; Hoogenboom, H. R.; Tomlinson, I. M.; Flynn, G.; Midgley, C.; Lane, D. e Winter, G. (1994). Antibody fragments from a 'single pot' phage display library as immunochemical reagents. *Embo J*, 13: 692-8.

Nykanem, A.; Haley, B. e Zamone, P.D. (2001). ATP requirements and small interfering RNA structure in the RNA interference pathway. *Cell*. 107:309-21.

- Orlandi, R.; Gussow, D. H.; Jones, P. T. e Winter, G. (1989). Cloning immunoglobulin variable domains for expression by the polymerase chain reaction. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86: 3833-7.
- Phizicky, E.; Bastiaens, P.I.H.; Zhu, H.; Snyder, M. e Fields, S. (2003). Protein analysis on a proteomic scale. *Nature*, 422:208-15
- Plückthun, A. (1991). Antibody engineering: Advances from the use of E.coli expression system. *Biotechnology*, 9:545-51.
- Polayes D. (1996). Prokaryotic Protein Expression and Purification with the Proex™ Ht Expression System. *FOCUS*, 18(2):50-3.
- Presta, L. G. (1992). Antibody engineering. *Curr Opin Biotechnol*, 3:394-8.
- Puck T. T.; Cieciura, S. J. e Robinson, A. (1958). Genetics of somatic mammalian cells III. Long-term cultivation of euploid cells from human and animal subjects. *J Exp Med*, 108:945-56.
- Raman, V.; Martensen, S.A.; Reisman, D.; Evron, E.; Odenwald, W.F.; Jaffee, E.; Marks, J. e Sukumar, S. (2000). Compromised HOXA5 function can limit p53 expression in human breast tumors. *Nature*, 405:974-8.
- Reisman, D. e Loging, W.T., (1998). Transcriptional regulation of the p53 tumor suppressor gene. *Semin Cancer Biol*, 8:317-24.
- Reiter, Y. e Pastan, I. (1998). Recombinant Fv immunotoxins and Fv fragments as novel agents for cancer therapy and diagnosis. *Trends Biotechnol*, 16:513-520.
- Rodi, D. J. e Makowski, L. (1999). Phage-display technology--finding a needle in a vast molecular haystack. *Curr Opin Biotechnol*, 10: 87-93.
- Roth, J.; Dittmer, D.; Rea, D.; Tartaglia, J. Paoletti, E. e Levine, A.J. (1996). p53 as a target for cancer vaccines: recombinant canarypox virus vectors expressing p53 protect mice against lethal tumor cell challenge. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93: 4781-6.
- Sambrook, J.; Fritsch, E. F. e Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sastry, L.; Alting-Mees, M.; Huse, W. D.; Short, J. M.; Sorge, J. A.; Hay, B. N.; Janda, K. D.; Benkovic, S. J. e Lerner, R. A. (1989). Cloning of the immunological repertoire in Escherichia coli for generation of monoclonal catalytic antibodies: construction of a heavy chain variable region-specific cDNA library. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86: 5728-32.
- Scott, J. K. e Smith, G. P. (1990). Searching for peptide ligands with an epitope library. *Science*, 249: 386-90.

- Shaulsky, G.; Goldfinger, N.; Tosky, M.S.; Levine, A. e Rotter, V. (1991). Nuclear localization is essential for the activity of p53 protein. *Oncogene*, 6:2055-65.
- Shibui, T. e Nagahari, K. (1992) Secretion of a functional Fab fragment in *Escherichia coli* and the influence of culture conditions. *Appl Microbiol Biotechnol*, 37(3):352-7.
- Strube, R.W. and Chen, Si-Yi. (2002). Characterization of anti-cyclin E single-chain Fv antibodies and intrabodies in breast cancer cells: enhanced intracellular stability of novel sFv-Fc intrabodies. *J Immunol Methods*, 263:149-67.
- Tewari, D.; Goldstein, S.L.; Notkins, A.L. and Zhou, P. (1998). cDna encoding a single-chain antibody to HIV p17 with cytoplasmatic or nuclear retention signals inhibits HIV-1 replication. *J Immunol*, 161:2642-7.
- Turner, D. J.; Ritter, M. A. e George, A. J. (1997). Importance of the linker in expression of single-chain Fv antibody fragments: optimisation of peptide sequence using phage display technology. *J Immunol Methods* 205:43-54.
- Tuschl, T. (2001) RNA interference and small interfering RNAs. *ChemBiochem*, 2:239-45
- van der Krol, A.R.; Mur, L.A.; Beld, M.; Mol, J.N. e Stuitje, A.R. (1990). Flavonoid genes in petunia: addition of a limited number of gene copies may lead to a suppression of gene expression. *Plant Cell*, 2: 291-9.
- Ward, E. S. (1992). Antibody engineering: the use of *Escherichia coli* as an expression host. *FASEB J*, 6:2422-7.
- Webster, G.A. e Perkins, N.D. (1999). Transcriptional cross talk between NF-KappaB and p53. *Mol Cell Biol*, 19:3485-95.
- Wells, J. A. e Lowman, H. B. (1992). Rapid evolution of peptide and protein binding properties in vitro. *Curr Opin Biotechnol*, 3: 355-62.
- Winter, G.; Griffiths, A. D.; Hawkins, R. E. e Hoogenboom, H. R. (1994). Making antibodies by phage display technology. *Annu Rev Immunol*, 12: 433-55.
- Woods, D.B. e Vousden, K.H. (2001). Regulation of p53 function. *Exp Cell Res*, 264:56-66.
- Zeng, X.; Zhu, Y. e Lu, H. (2001). NBP is the p53 homolog p63. *Carcinogenesis*, 22(2):215-19.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)