



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA MOLECULAR

**Clonagem e expressão de fragmentos de anticorpos
(FABs) anti-HIV-1 em *Pichia pastoris***

KELLY CRISTINA RODRIGUES SIMI

Orientadora: Prof^a. Dra. Andrea Queiroz Maranhão

Co-Orientador: Prof. Dr. Marcelo de Macedo Brígido

Brasília – DF
Dezembro de 2009

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

Clonagem e expressão de fragmentos de anticorpos (FABs) anti-HIV-1 em *Pichia pastoris*

KELLY CRISTINA RODRIGUES SIMI

Orientadora: Prof^ª. Dra. Andrea Queiroz Maranhão

Co-Orientador: Prof. Dr. Marcelo de Macedo Brígido

Universidade de Brasília

Faculdade de Medicina

Programa de Pós-graduação em Patologia Molecular

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

Brasília – DF
Dezembro de 2009

Banca Examinadora

Dra. Lidia Maria Pepe Moraes – Externo - UnB

Dr. Márcio José Poças Fonseca – Externo - UnB

Dra. Andréa Queiroz Maranhão – Orientadora - UnB

Dr. Marcelo de Macedo Brigido – Orientador - UnB

Dra. Ildinete Silva Pereira – Suplente - UnB

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

*Dedico todo este trabalho aos meus pais, porque
sem eles nada disso seria possível!*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus por me fazer entender que na ciência (somente nela) não existem milagres e sim fatos comprovados e muitos dias trabalhados.

Aos meus orientadores, Andréa e Marcelo pela oportunidade e confiança em mim. Por me aceitarem mesmo vindo de longe, e sem ao menos conhecer meu potencial e dedicação. Espero não ter decepcionado vocês!

Aos meus colegas do Laboratório 1 e dos outros também, que me ajudaram no início, meio e fim...

A Izabel, pela mão estendida SEMPRE quando precisei (e mesmo quando não precisei...rsrsr). Por seu enorme coração e bondade, tenho certeza que coisas muito boas ainda virão. A Maryani que briga comigo o tempo todo, mas que me ama de coração (eu sei, pode confessar!), que já me ajudou, que já me atrapalhou, que me fez detestá-la quando entrei no laboratório (lembra do gel???? Eu não esqueço....rsrsrs), mas que aprendi a amar pelo seu “jeitinho” de ser... bem único, diga-se de passagem. À Barbarela, que admiro muito, com seu jeito de falar sem deixar duas interpretações, pela sua ajuda, conhecimento compartilhado, amizade! Ao Yuri, pela ajuda quando eu cheguei, e pela amizade até hoje! À Isabella, pelo companheirismo, sinceridade, coração grande... te adoro viu! À Luana, centrada, amiga, sempre disposta a ajudar! À Janaina, por ser amiga e hiper-mega-ultra divertida... você já me fez rir muito... mesmo quando você não estava no laboratório... “*Dios pire*”... é isso ai! Ao Paulo, pela atenção, disposição e amizade. A Fernandinha, claro... que sempre me ajudou. Obrigada pela amizade, pelas conversas jogadas fora, pelos subways compartilhados, pelas risadas juntas. Você sabe que te amo garota! As minhas queridas Tays, a que foi embora, mas sempre presente, e a sempre presente que não vai embora! Taissa....por tudo que passamos juntos, e Tayana, por tudo que ainda vamos passar! Obrigada pela companhia nos experimentos e pela amizade!

E claro, aos meus queridos amigos e “irmãos” de coração Victor e Rafinha... Puxa! É mais difícil que pensei escrever sobre vocês: amigos, colegas, irmãos, *brothers*...rsrsrs. Vocês não imaginam o quanto me ajudaram! Vocês foram e continuam sendo a minha alegria dentro do laboratório, não deixando a minha “peteca” cair. Rimos muito juntos, na verdade, já chorei de tanto rir! Também senti, quando vocês sentiram viú! Ah... foi um grande prazer ter vocês no momento mais feliz da minha vida... MEU CASÓRIO... *Caraca véi!* Vocês estavam lá mesmo!!! Cada um, com sua particularidade. E, embora sejam bastante parecidos, são únicos! Espero ter a amizade de vocês até ficarmos bem velhinhos... pra rirmos bastante ainda nesta vida! Amo vocês!

Aos demais colegas da biomol, Marciano, Eveline, Calli, Alex. Mariana, que não está mais no nosso laboratório, mas está sempre presente com sua amizade e alegria! Me divirto com seus “pitis”! A todos os professores da biomol: Lídia pelas dicas sobre *Pichia*, Ildinete pela sua infinita disposição em ajudar, com sua simpatia contagiante.

Aos meus pais, que nunca mediram esforços pra me ajudar, que acreditaram nos meus sonhos e financiaram todos eles. Vocês são indispensáveis para o meu sucesso! A toda a minha família, pela boa fé em mim! Aos meus irmãos, meus lindos sobrinhos... minha irmãzinha linda, Gabi... aposto todas as minhas fichas em você! E claro, a quem sempre me apoiou sem pedir nada em troca, que me ajudou quando me desesperei, que sempre me deu uma palavra boa, que aguentou meu estresse, meu desânimo, que nunca deixou eu desistir... se um dia eu tiver muito sucesso, ele será todo seu... por tudo que você é.. o meu muito obrigado... é bom te chamar de meu marido!

SUMÁRIO

Lista de Tabelas	x
Lista de Figuras	xi
Lista de Abreviações	xiii
Abstract	xv
Resumo	xvi
Introdução	1
Anticorpos	2
Anticorpos Recombinantes	9
O vírus HIV e a Síndrome da Imunodeficiência	12
Sistema de expressão em <i>P. pastoris</i>	19
Justificativa	25
Objetivos	27
Abordagem Experimental	29
Materiais e Métodos	31
Materiais	
1. Linhagens bacterianas	32
2. Plasmídios utilizados	32
3. Oligonucleotídeos utilizados para sequenciamento, clonagem e reações de PCR	33
4. Meios de Cultura e soluções para bactérias	35
5. Antibióticos	36
6. Meios de Cultura e soluções para <i>P. pastoris</i>	36
7. Soluções e material para preparo de células competentes e transformação – bactéria	40
8. Soluções para extração de DNA plasmidial	41

9. Tampões de endonucleases de restrição.....	42
10. Tampões de outras reações.....	43
11. Endonucleases de restrição.....	44
12. Outras enzimas.....	45
13. Soluções e reagentes para eletroforese em gel de agarose e de poliacrilamida.....	45
14. Soluções e materiais para os ensaios imunológicos.....	48
15. Materiais utilizados para concentração de sobrenadante.....	48
16. Marcadores moleculares para DNA e proteínas.....	49
17. Kits comerciais.....	49
18. Anticorpos utilizados nos ensaios <i>Western, Colony e Dot Blot</i>	50

Métodos

1. Preparação de DNA plasmidial.....	51
2. Digestões do DNA plasmidial com enzimas de restrição.....	53
3. Análise de DNA plasmidial em gel de agarose.....	53
4. Eluição de fragmentos de DNA de gel de agarose.....	53
5. Reação de Defosforilação com a fosfatase alcalina de camarão (SAP).....	54
6. Amplificação por PCR dos segmentos gênicos codificadores para as cadeias pesadas e leves do Fab.....	54
7. Ligação de fragmentos de DNA.....	55
8. Preparação de células competentes e transformação bacteriana.....	56
9. Sequenciamento automático de DNA e análise de sequências.....	57
10. Transformação de <i>P. pastoris</i>	58
11. Detecção de colônias produtoras por meio de <i>Colony Blot</i>	59
12. Crescimento e Indução de <i>P. pastoris</i>	60
13. Detecção das proteínas por meio de <i>Dot Blot</i>	60
14. Concentração do sobrenadante.....	61

15. Precipitação de proteína com TCA.....	61
16. Análise de proteínas em gel SDS-PAGE.....	62
17. Detecção das proteínas por meio de <i>Western Blot</i>	62
Resultado e Discussão	64
1. Amplificação por PCR dos fragmentos correspondentes aos Fabs selecionados.....	65
2. Construção do vetor de expressão pPIgLe Fab.....	69
a. Clonagem do Fab de referência, anti-Z-DNA (Burtet <i>et al.</i> , 2007) no vetor pPIgLe.....	69
b. Eliminação do sítio de <i>Xba</i> I na posição 3386 do vetor pPIgLe Fab.....	70
c. Eliminação do sítio de metilação na região do sítio de <i>Xba</i> I (posição 1580) do vetor pPIgLe Fab.....	74
3. Sub-clonagem dos fragmentos codificadores de V _H , V _L e C _κ no vetor pPIgLe Fab.....	78
a. Subclonagem dos segmentos gênicos codificadores dos domínios C _κ e V _L	78
b. Subclonagem do segmento gênico codificador da cadeia V _H	81
4. Expressão em <i>P. pastoris</i>	86
Conclusões e Perspectivas	92
Referências Bibliográficas	94

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Anticorpos Monoclonais aprovados pela FDA_____	11
Tabela 2 – Epitopos da gp41 de HIV que induz anticorpos neutralizantes_____	18
Tabela 3 – Oligonucleotídeos sintéticos utilizados_____	34
Tabela 4 – Sequências dos iniciadores desenhados para amplificação das cadeias variáveis leve e pesada (V_L e V_H) e da cadeia constante leve (C_k)_____	66
Tabela 5 – Sequência de aminoácidos deduzida correspondente as cadeias V_H e V_L dos Fabs 4C1, 5H7 e 5B8 e da cadeia C_k de 5B8_____	68
Tabela 6 – Iniciadores utilizados para eliminação do sítio de <i>Xba</i> I_____	71
Tabela 7 – Iniciadores utilizados para a amplificação da sequência codificadora da cadeia constante pesada (C_{H1})_____	74
Tabela 8 – Iniciadores utilizados para amplificação do segmento gênico codificador de V_H para inserção de sítio de <i>Sac</i> I_____	82
Tabela 9 – Sequência de aminoácidos deduzida correspondente ao pré-propeptídeo do fator alfa, sítio de reconhecimento de Kex e Ste13p e os Fabs de 5B8 e 5H7_____	87

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura de uma Imunoglobulina G (IgG)	3
Figura 2 – Regiões Determinantes de Complementariedade (CDRs)	4
Figura 3 – Rearranjo e expressão dos genes da cadeia leve κ	5
Figura 4 – Rearranjo e expressão dos genes da cadeia pesada μ ou δ	6
Figura 5 – Fragmentos de uma molécula de anticorpo	8
Figura 6 – Quadro estimativo de adultos e crianças infectadas por HIV em 2007	13
Figura 7 – Esquema geral do genoma do vírus HIV	14
Figura 8 – Estrutura do vírus HIV	15
Figura 9 – Estágios iniciais da infecção por HIV	16
Figura 10 – Sítio de clivagem da endoprotease Kex2	20
Figura 11 – Via metabólica da oxidação do metanol em formaldeído na levedura <i>P. pastoris</i>	21
Figura 12 – Substituição gênica por duplo <i>crossing over</i> no locus <i>AOX1</i> em <i>P. pastoris</i>	22
Figura 13 – Inserção gênica por simples <i>crossing over</i> no locus <i>his4</i> em <i>P. pastoris</i>	23
Figura 14 – Diferenças estruturais entre os vetores originais	66
Figura 15 – Obtenção por PCR dos segmentos gênicos codificadores dos domínios variáveis e do domínio C κ dos FABs selecionados	67
Figura 16 – Obtenção do vetor pPIgLe Fab	69
Figura 17 – Construção do vetor pPIgLeFab	70
Figura 18 – Estratégia para eliminação do sítio de <i>Xba I</i>	72
Figura 19 – Estratégia para eliminação do sítio de <i>Xba I</i> na posição 3386	73
Figura 20 – Clonagem do fragmento C $_H1$ Kex no vetor pGEM-T Easy	75

Figura 21 – Análise dos clones contendo a região codificadora do domínio C _{H1} Kex reamplificada_____	75
Figura 22 – Eliminação do sítio passível de metilação (<i>Xba</i> I)_____	76
Figura 23 – Obtenção do vetor pPIgLe scFvck_____	77
Figura 24 – Obtenção do vetor pPIgLe Fab sem sítio passível de metilação_____	78
Figura 25 – Clonagem do segmento gênico codificador da cadeia constante leve (C _k)_____	79
Figura 26 – Clonagem da cadeia VL no vetor pIg16 (com C _k)_____	80
Figura 27 – Clonagem dos segmentos gênicos V _L e C _k no vetor pPIgLe Fab_____	81
Figura 28 – Deleção da base nitrogenada Guanina do sítio de <i>Xma</i> I do vetor pPIgLe Fab_____	82
Figura 29 – Obtenção do vetor Intermediário_____	83
Figura 30 – Obtenção do vetor Intermediário_____	84
Figura 31 – Clonagem do segmento gênico da cadeia V _L de 4C1_____	85
Figura 32 – Anelamento dos iniciadores utilizados para sequenciamento do Fab_____	86
Figura 33 – Imunodeteção (do tipo <i>Dot Blot</i>) das proteínas produzidas nos diferentes tempos de indução de <i>P. pastoris</i> _____	89
Figura 37 – Análise por SDS-PAGE da expressão do Fab em <i>P. pastoris</i> _____	89
Figura 38 – Índice de Adaptação de Codon_____	91

LISTA DE ABREVIACÕES

Amp^R	Gene de resistência à ampicilina (β -lactamase).
APS	Persulfato de Amonia.
AOXI, 2	Genes da álcool oxidase 1 e 2.
BCIP	5-Bromo-4-Cloro-indolil fosfato.
BSA	Albumina bovina sérica.
°C	Graus Celsius.
CDR	Região determinante de complementaridade.
ColE1	Origem de replicao de <i>E. coli</i> .
C-terminal	Extremidade Carboxi-terminal.
Da	Dalton.
DNA	cido Desoxirribonucléico.
EDTA	cido Etilenodiaminotetracético.
Fab	Fragmento de anticorpo de ligao ao antígeno.
Fc	Fragmento cristalizável de anticorpo (poro constante).
FR	Arcabouço (<i>Framework</i>).
Fv	Fragmento variável do anticorpo.
FvFc	Fragmento variável fusionado ao Fc
g	Grama.
h	<i>Hora</i> .
HIS 4	<i>Gene histidinol desidrogenase</i> .
Ig	<i>Imunoglobulina</i> .
KCl	<i>Cloreto de potsio</i> .
kb	<i>Kilobase</i> .
kDa	<i>Kilodalton</i> .
L	<i>Litro</i> .
M	<i>Molar</i> .
µg	<i>Micrograma</i> .
µl	<i>Microlitro</i> .
µm	<i>Micrmetro</i> .
µM	<i>Micromolar</i> .
mA	<i>Miliamper</i> .
mg	<i>Miligrama</i> .
min	<i>Minutos</i> .
mL	<i>Mililitro</i> .
mM	<i>Milimolar</i> .
MgCl₂	<i>Cloreto de Magnsio</i> .
MgSO₄	<i>Sulfato de Magnsio</i> .
mL	<i>Mililitro</i> .
mM	<i>Milimolar</i> .
MM	<i>Massa molecular</i> .
NaCl	<i>Cloreto de Sdio</i> .
NaOH	<i>Hidrxido de Sdio</i> .
NBT	<i>Nitro Blue Tetrazole</i> .

ng	<i>Nanograma.</i>
OD600	<i>Densidade ótica a 600nm.</i>
OKT3	<i>Anticorpo monoclonal anti-CD3.</i>
Ori	<i>Origem de replicação.</i>
Pb	<i>Pares de base.</i>
PBS	<i>Tampão Fosfato - Salina.</i>
PCR	<i>Reação em cadeia da polimerase.</i>
pep 4	<i>Linhagem protease menos.</i>
pH	<i>Potencial hidrogeniônico.</i>
PMSF	<i>Fluoreto de fenilmetilsulfonato.</i>
p/v	<i>Peso/Volume.</i>
RNA	<i>Ácido Ribonucléico.</i>
RNAse	<i>Ribonuclease.</i>
rpm	<i>Rotações por minuto.</i>
scFv	<i>Fragmento variável de anticorpo cadeia única (Single chain Fragment Variable).</i>
SDS-PAGE	<i>Gel de poliacrilamida desnaturante (com SDS).</i>
TEMED	<i>N,N,N',N'- tetrametil etilenodimetilamina.</i>
Tris-Base	<i>Tris(hidroximetil)aminometano.</i>
U	<i>Unidade enzimática.</i>
UV	<i>Ultravioleta.</i>
v	<i>Volume.</i>
V_H	<i>Domínio variável da cadeia pesada de um anticorpo.</i>
V_L	<i>Domínio variável da cadeia leve de um anticorpo.</i>
v/v	<i>Volume/Volume.</i>
YNB	<i>Yeast Nitrogen Base.</i>

ABSTRACT

The Acquired Immunodeficiency Syndrome (AIDS) is a pandemic deficiency through out the continent. At the moment there is not an efficient vaccine against immunodeficiency virus (HIV) due the virus efficient escape of from the immune system. However, recent studies have used glycoprotein of HIV as a potential target to development a vaccine to inhibit the virus entry into host cells. Recently, our group selected antibody fragments (Fabs) from an antibody combinatorial library of osteosarcoma patients directed to a synthetic biotinilated peptide gp41 neutralizing epitope (576 to 619 amino acids residues). In this work, the Fabs anti-gp41-HIV into a *Pichia pastoris* were cloned into expression vector. Three Fabs were cloned into this vector with correct sequence. *Pichia pastoris* has been used extensively and successfully to express recombinant proteins. Unfortunately, the recombinant proteins were expressed in low levels. However, this Fabs showed to have a good codon adaptation index to be expressed in *Pichia pastoris*, thus adjustment in the protocol must be performed.

Key Words: HIV, gp41, Fab, *Pichia pastoris*

Supported by CNPq

RESUMO

A Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) é uma doença pandêmica que atinge diversos países no mundo todo. Atualmente, não existe uma vacina eficiente contra o vírus da imunodeficiência (HIV) devido a habilidade do vírus de escapar do sistema imune. Contudo, estudos recentes têm utilizado glicoproteínas do envelope do HIV como potencial alvo para o desenvolvimento de uma vacina capaz de inibir a entrada do vírus na célula hospedeira. Recentemente, nosso grupo selecionou fragmentos de anticorpos (Fabs) de uma biblioteca combinatória de anticorpos de pacientes com osteosarcoma direcionados para um peptídeo sintético de um epítipo neutralizante da gp41. No presente trabalho, foram clonados os Fabs anti-gp41-HIV em vetor de expressão de *Pichia pastoris*. Após a obtenção das clonagens dos Fabs nesse vetor as respectivas sequências foram confirmadas. A levedura *Pichia pastoris* tem sido largamente utilizada para a produção de proteínas recombinantes com sucesso. O nível de expressão obtido para os Fabs na levedura *Pichia pastoris* foi muito baixo. Esses Fabs demonstraram possuir um bom índice de adaptação de códon para a expressão em *Pichia pastoris*. Dessa forma, ajustes no protocolo de expressão deverão ser realizados.

Palavras-chave: *HIV, gp41, Fab, Pichia pastoris*

Apoio CNPq

Introdução

INTRODUÇÃO

ANTICORPOS

O sistema imune é um sistema de defesa versátil, responsável pela proteção de animais da invasão de microorganismos patogênicos, além da manutenção da homeostase, prevenindo eventos anormais como o câncer. Pode ser categorizado em imunidade inata e adquirida, componente menos específico e mais específico, respectivamente. A imunidade inata é a primeira linha de defesa contra os microorganismos e consiste de peptídeos antimicrobianos, fagócitos, células *killer* e sistema complemento, que agem rapidamente e têm um importante papel nas infecções virais. A imunidade adquirida consiste na resposta humoral e celular, mediadas por linfócitos B e T, respectivamente e é caracterizada pela grande especificidade para as distintas moléculas e a capacidade de responder vigorosamente a repetidas exposições ao mesmo antígeno.

Considerando-se a imunidade humoral, essa especificidade se deve à interação dos antígenos com os receptores presentes na membrana dos linfócitos B, que inicia uma cascata de sinalização culminando com o desenvolvimento destas células em plasmócitos, células produtoras de anticorpos, moléculas-chaves do reconhecimento antigênico.

Os anticorpos (Ac) ou imunoglobulinas (Ig) são glicoproteínas de elevada massa molecular, classificadas em imunoglobulina G, (IgG), M (IgM), A (IgA), D (IgD) e E (IgE), e representam cerca de 20% das proteínas do sangue. Além de possuírem grande especificidade pelo antígeno que os induz, os anticorpos são capazes de recrutar sistemas efetores para destruir esses antígenos. A molécula de anticorpo é de natureza tetramérica e sua estrutura é composta de duas cadeias pesadas (H), com massa molecular de 55 kDa e duas cadeias leves (L) idênticas com aproximadamente 25 kDa. As cadeias são unidas por pontes dissulfeto e por uma extensa rede de interações moleculares intra e inter-cadeias (Roitt, 1987). Cada cadeia leve e pesada de uma imunoglobulina apresenta regiões variáveis (V) e regiões constantes (C) nas extremidades amino- e carboxi-terminais (Figura 1). Sua região amino-terminal apresenta uma composição de aminoácidos diversificada capaz de gerar variabilidade superficial que possibilita o reconhecimento de diferentes moléculas. Por sua vez, a região carboxi-terminal é constante, com pouca variabilidade, sendo responsável pelo recrutamento dos sistemas efetores da resposta imune (Goldsby *et al.*, 2000).

complementaridade ao epítipo, essa superfície de contato é também conhecida como paratopo (Maynard e Georgiou, 2000). As CDRs foram inicialmente denominadas de regiões hipervariáveis devido a sua alta variabilidade. Essas regiões formam estrutura em voltas ou *loops* que conectam as folhas β dos domínios V_H e V_L . Cada um desses domínios possuem três CDRs (Figura 2-a). As regiões que exibem menos variabilidade são conhecidas como regiões de arcabouço, do inglês *frameworks* (FRs) e atuam como se fossem um andaime que suportam os três *loops* que constituem as CDRs (Goldsby, 2000).

A alta especificidade das moléculas de anticorpos é definida pelas CDRs que participam ativamente na ligação ao antígeno (Figura 2-b). Em geral, mais resíduos de aminoácidos das CDRs da cadeia pesada entram em contato com o antígeno, tornando esta cadeia dominante na interação anticorpo-antígeno.

A grande variabilidade dos anticorpos é devida ao rearranjo dos segmentos gênicos codificadores de cada cadeia. Essa dinâmica genética é capaz de gerar mais que 10^6 combinações diferentes e esse número pode exceder pelo menos três grandezas por meio de processos subsequentes ao rearranjo.

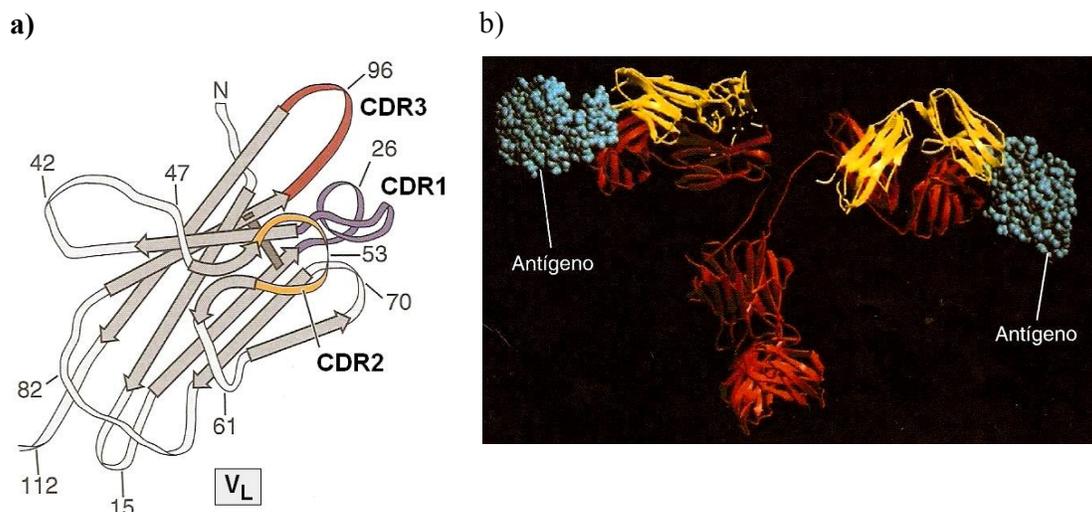


Figura 2 - Regiões Determinantes de Complementaridade (CDRs). a) Visão tridimensional das alças hipervariáveis CDR em um domínio variável (V) de uma cadeia leve. As alças que formam os *loops* da CDR1, CDR2 e CDR3 estão em azul, amarelo e vermelho respectivamente. As regiões menos variáveis que formam o *framework* estão em cinza. b) Modelo de cristalografia de um anticorpo ligando-se ao antígeno. As cadeias pesadas estão em vermelho e as leves em amarelo. O antígeno está representado em azul. (Adaptado de Abbas e Lichtman, 2005)

Os genes das imunoglobulinas estão organizados em famílias distintas. As famílias da cadeia leve κ ou λ contém os segmentos V, J e C. O rearranjo dos segmentos gênicos VJ codifica

a região variável das cadeias leves (Figura 3). A família da cadeia pesada contém os segmentos V, D, J e C. O rearranjo do segmento gênico VDJ codifica a região variável da cadeia pesada (Figura 4). Em cada família gênica o segmento C codifica as regiões constantes das cadeias. Cada segmento gênico V termina com um pequeno exon na extremidade 5' que codifica um pequeno peptídeo sinal que guia as cadeias pesada ou leve através do retículo endoplasmático. O peptídeo sinal é posteriormente clivado e as cadeias se associam para finalizar a molécula da imunoglobulina (Goldsby, 2000).

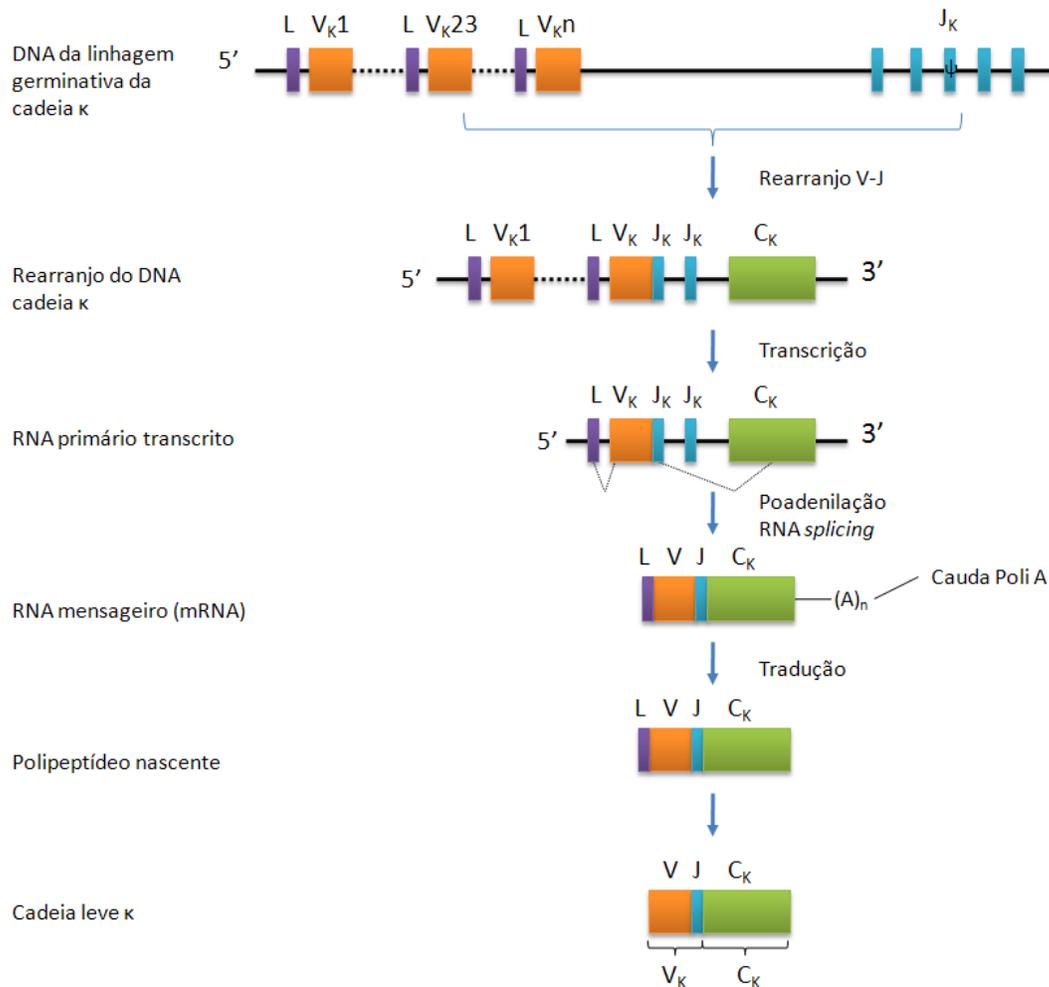


Figura 3 – Rearranjo e expressão dos genes da cadeia leve κ . A recombinação do DNA começa na junção de V, J, um pequeno exon e a região constante C κ . As sequências rearranjadas da cadeia leve são transcritas pela RNA polimerase gerando um RNA primário transcrito. Os introns do transcrito primário são removidos resultando num RNAm da cadeia leve que será traduzido. O peptídeo sinal é removido e a cadeia leve é montada (Adaptado de Kuby, 2000).

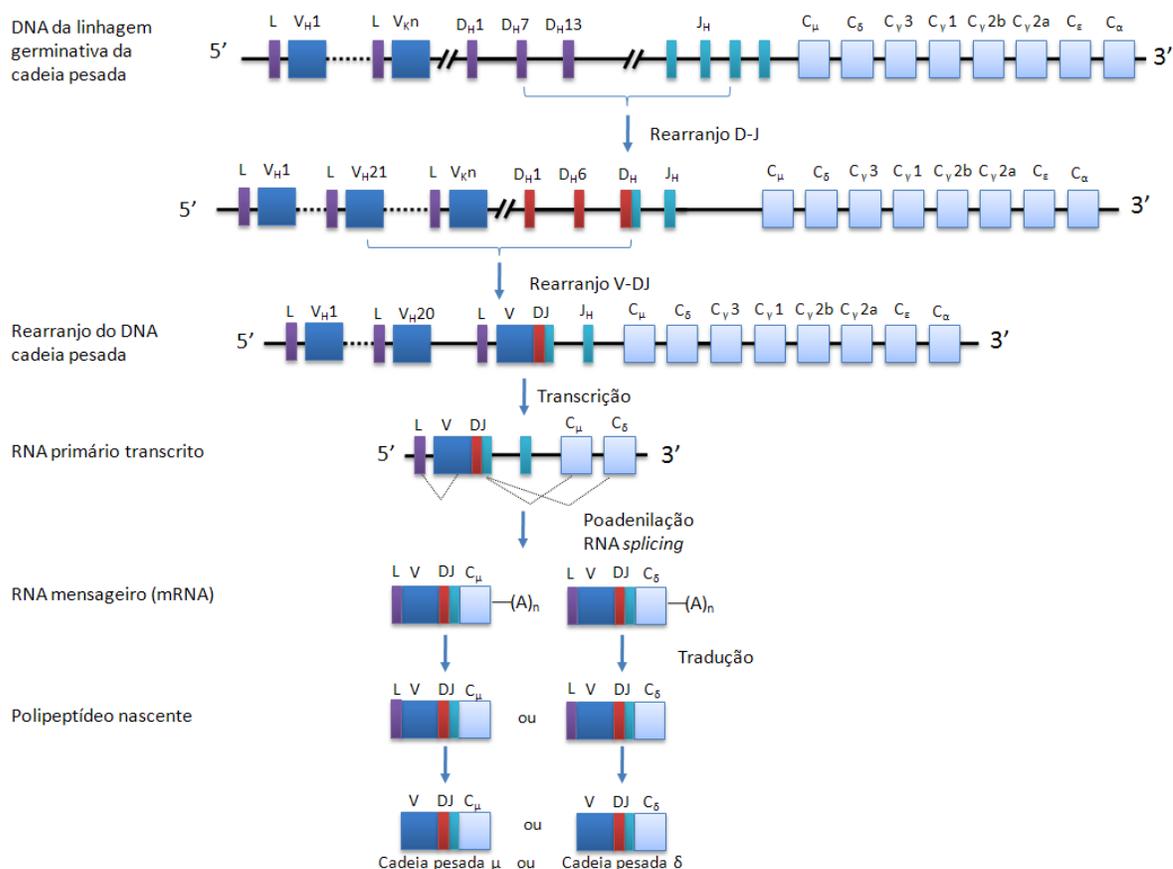


Figura 4 – Rearranjo e expressão dos genes da cadeia pesada μ ou δ . A recombinação do DNA começa na junção de D, J, um pequeno exon e a região constante pesada. As seqüências rearranjadas da cadeia pesada são transcritas pela RNA polimerase gerando um RNA primário transcrito. Os introns do transcrito primário são removidos resultando num RNAm da cadeia pesada que será traduzido. O peptídeo sinal é removido e a cadeia pesada é montada. (Adaptado de Kubly, 2000)

Além da função de ligação ao antígeno, a imunoglobulina possui vários outros papéis biológicos, que são determinados pelos domínios constantes. Os domínios C_{H1} e C_L servem para estender os “braços” do Fab da molécula do anticorpo, facilitando a interação com o antígeno aumentando ao máximo a superfície de contato, além de conferir uma estabilidade maior a essa região. A região *hinge* do anticorpo (Figura 1), encontrada apenas nas cadeias pesadas do tipo α , δ , e γ , é rica em resíduos de prolina e é flexível. Como resultado, os dois “braços” Fabs podem assumir diversos ângulos quando o antígeno está ligado ao anticorpo.

Os anticorpos geralmente não matam ou removem os patógenos somente pela sua ligação a eles. Para ser efetivo seu papel, os anticorpos não apenas reconhecem e se ligam aos

antígenos, mas também invocam respostas (funções efetoras) que resultam na remoção do antígeno e morte do patógeno.

Enquanto as regiões variáveis do anticorpo são apenas agentes de ligação, as regiões constantes pesadas (C_H) são responsáveis por uma variedade de interações em colaboração com outras proteínas, células, e tecidos que resultam em funções efetoras da imunidade humoral.

A molécula de anticorpo pode ser fragmentada proteoliticamente. Nas moléculas de IgG, a dobradiça entre C_{H1} e C_{H2} das cadeias pesadas é a região mais suscetível à clivagem proteolítica. Quando a IgG é tratada com a enzima papaína, a enzima age na região de dobradiça e cliva a IgG em três pedaços separados: dois Fabs inteiros, e a região Fc (Figura 5-a). Quando se usa pepsina para clivar a IgG, a proteólise é restrita à porção carboxiterminal da região de dobradiça, gerando um fragmento que liga ao antígeno (Fab) que contém a dobradiça e as pontes de dissulfeto entre as cadeias intactas. Fragmentos Fab que retêm a região da dobradiça são chamados de Fab', quando as pontes de dissulfeto entre as cadeias são preservadas, os dois fragmentos Fab' permanecem ligados em uma forma conhecida como $F(ab')_2$ (Figura 5-b).

Os fragmentos Fab e $F(ab)_2$ são ferramentas experimentais úteis, uma vez que podem se ligar ao antígeno sem ativar os mecanismos efetores dependentes do fragmento Fc (Vaz e Faria, 1993; Hayden *et al.*, 1997)

Outros fragmentos de anticorpos podem ser obtidos sem perder sua função biológica. O fragmento scFv (*single chain variable fragment*) composto pelas cadeias variáveis leve e pesada pode ser obtido na forma recombinante (Figura 5-c). Esse fragmento, assim como os dois tipos de Fab retêm a atividade ligante ao antígeno e não tem função efetora. Esses fragmentos têm sido a forma mais corrente e podem ser expressos em bactérias e em eucariotos inferiores (Choi *et al.*, 2004, Cunha *et al.*, 2004).

Outras variações de fragmentos também podem ser expressos em sistemas microbianos, como por exemplo, o FvFc, que constitui-se em um scFv unido aos domínios C_{H2} e C_{H3} de IgG (Figura 5-c), retendo a capacidade de ligação ao antígeno e atividade efetora. A afinidade desse fragmento é comparável com o anticorpo monoclonal parental (Andrade *et al.*, 2005; Andrade *et al.*, 2000; Maranhão e Brigido, 2000).

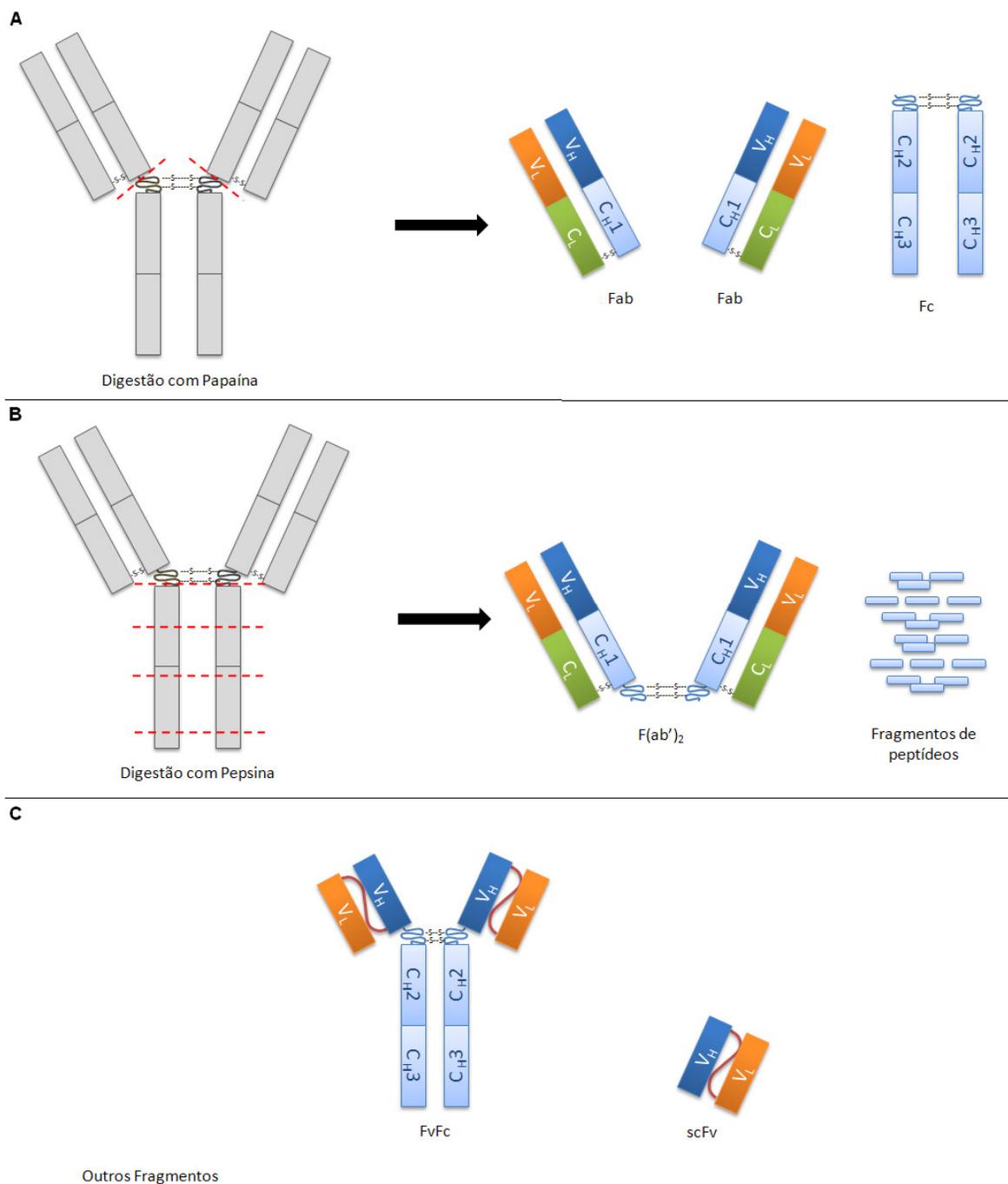


Figura 5 – Fragmentos de uma molécula de anticorpo. Moléculas de IgG são clivadas proteoliticamente pelas enzimas papaína (A) e pepsina (B) nos locais indicados pelas linhas tracejadas. A digestão com papaína permite a separação de dois fragmentos que se ligam ao antígeno (Fab) e de um fragmento efetor (Fc). A pepsina gera um único fragmento bivalente que liga ao antígeno, $F(ab')_2$. Em (C) está representado outros fragmentos que podem ser obtidos por engenharia de anticorpos. Um fragmento FvFc que possui a região de ligação ao antígeno e a efetora e o fragmento scFv de ligação ao antígeno. O fragmento scFv possui um peptídeo conector ou *linker* (em vermelho) que liga as cadeias variáveis leve e pesada.

ANTICORPOS RECOMBINANTES

O avanço na engenharia de anticorpos iniciou-se por volta dos anos 80 quando sistemas eficientes para clonagem e expressão de genes de anticorpos em bactéria foram desenvolvidos. A clonagem dos genes de anticorpos monoclonais de hibridomas murinos foi amplamente simplificada depois da descoberta da reação em cadeia da polimerase (PCR) e sistemas de expressão em bactéria permitiram a rápida e fácil produção de fragmentos funcionais de anticorpos recombinantes para análises (Maynard e Georgiou, 2000).

A partir daí, diversas técnicas para produção de anticorpos recombinantes foram introduzidas. Estas incluem ainda refinamentos na estrutura das moléculas produzidas como a conversão de anticorpos murinos em humanos por meio da humanização de anticorpos (Maranhão e Brigido, 2002).

A aplicação terapêutica de anticorpos murinos enfrenta alguns desafios, uma vez que o seu uso acarreta numa resposta imunológica conhecida como resposta HAMA (Human Anti-Mouse Antibodies). No pior caso essa resposta leva a uma hipersensibilidade alérgica séria conhecida como doença do soro. Para resolver esse problema, técnicas avançadas de humanização de anticorpos murinos têm sido bem sucedidas. Uma dessas técnicas consiste em substituir a porção Fc do anticorpo (principal responsável pela resposta HAMA) por um segmento Fc humano, mantendo a porção ligante de origem murina. O anticorpo gerado com essa técnica é conhecido como anticorpo quimérico, por ser metade murino e metade humano.

Contudo, esse anticorpo quimérico ainda se apresenta com certo grau de imunogenicidade. Desta forma, passou-se a transplantar apenas as CDRs murinas em um anticorpo totalmente humano (Silva *et al.*, 2009). Esse anticorpo quase 100% humano é praticamente invisível ao sistema imune, não invocando nenhum tipo de resposta.

Outra técnica bastante eficiente para a produção de anticorpos recombinantes humanos é a técnica de apresentação de anticorpos na superfície de fagos filamentosos, comumente conhecida como *Phage Display*. A técnica de *phage display* é uma técnica poderosa que permite a geração de milhões (ou até bilhões) de diferentes variantes de peptídeos ou proteínas. A aplicação mais bem sucedida desta técnica tem sido o isolamento de anticorpos monoclonais usando uma biblioteca de anticorpos bem representativa apresentada em fagos (Brigido e Maranhão, 2002). O princípio do *phage display* consiste na clonagem do DNA que codifica a(s) proteína(s) de interesse no genoma do fago fusionada(s) aos genes que expressam as proteínas

virais de superfície (pIII, pVI ou pVIII). Quando essas proteínas de superfície são expressas, é expressa juntamente com elas a(s) proteína(s) de interesse (Hoogenboom *et al.*, 1999). O repertório combinatório das proteínas gerado com essa técnica é muito alta, além disso, esse repertório fica acessível ao reconhecimento de um ligante, possibilitando a seleção dessas proteínas por meio de antígenos de interesse. No caso da geração de biblioteca combinatória de anticorpos ou fragmentos de anticorpos a aplicação terapêutica é ampla.

A produção de anticorpos recombinantes vem crescendo nos últimos anos e é de grande interesse biotecnológico. A possibilidade da utilização de anticorpos inteiros ou de fragmentos de anticorpos em terapias ou diagnósticos tem propulsionado a busca de métodos alternativos para a produção em larga escala.

Os anticorpos recombinantes e seus fragmentos agora representam mais de 30% das proteínas utilizadas em testes clínicos para diagnósticos e terapia. Diversos anticorpos já foram aprovados (Tabela 1) pelo órgão regulador americano FDA (*Food and Drug Administration*) para diversos fins terapêuticos. O primeiro anticorpo a ser aprovado pelo órgão foi em 1986, para uso em eventos de rejeição aguda de enxertos (Muronomab ou Orthoclone) (Cosimi *et al.*, 1981; Group, 1985). Esse anticorpo é específico para o antígeno CD3. Desenvolvido inicialmente como um marcador de linfócitos T (OKT3), este anticorpo se mostrou eficiente na depleção desses linfócitos em pacientes e, assim, passou a ser comercializado para uso em humanos.

Recentemente o grupo de Imunologia Molecular da Universidade de Brasília gerou uma biblioteca de Fab humano apresentada na superfície de fagos filamentosos que foi construída a partir do repertório imune de 11 pacientes com osteosarcoma (Dantas-Barbosa *et al.*, 2005). Essa biblioteca apresenta $1,45 \times 10^8$ formas diferentes de Fab e foi construída a partir da amplificação dos genes de domínios variáveis pesados de IgM e IgG e domínios variáveis leve de cadeias capa, a partir de cDNA de linfócitos periféricos desses pacientes. Os pares V_H-V_L foram clonados no fagomídeo pComb 3X (Andris-Whidhopf *et al.*, 2000). As análises de *fingerprinting* com enzimas de restrição e de sequências de nucleotídeos clones aleatórios revelam que a biblioteca apresenta grande diversidade (Dantas-Barbosa *et al.*, 2005). Essa biblioteca foi utilizada para selecionar Fab com capacidade de reconhecimento de células derivadas de tumores ósseos em cultura. Diversos anticorpos, reconhecendo diferentes antígenos dessas linhagens celulares foram selecionados (Barbosa *et al.*, 2005).

Tabela 1 – Anticorpos Monoclonais aprovados pelo FDA

ANTICORPO	NOME	APROVAÇÃO	TIPO	ALVO	INDICAÇÕES
Muronomab-CD3	Orthoclone OKT3	1986	Murino	Receptor CD3 de Célula T	Rejeição em transplante
Abciximab	ReoPro	1994	Quimérico	Inibição da glicoproteína IIb/IIIa	Doença cardiovascular
Rituximab	Rituxan, Mabthera	1997	Quimérico	CD20	Linfoma de <i>non-Hodgkin</i>
Daclizumab	Zenapax	1997	Humanizado	Receptor IL-2R α (CD25)	Rejeição em transplante
Basiliximab	Simulect	1998	Quimérico	Receptor IL-2R α (CD25)	Rejeição em transplante
Infliximab	Remicade	1998	Quimérico	Inibição da sinalização de TNF- α	Diversas desordens autoimunes
Palivizumab	Synagis	1998	Humanizado	Epitopo da proteína RSV F	Virus sincicial respiratório
Trastuzumab	Herceptin	1998	Humanizado	ErbB2	Câncer de mama
Gemtuzumab	Mylotarg	2000	Humanizado	CD33	Leucemia mielógena aguda (com caliqueamicina)
Alemtuzumab	Campath	2001	Humanizado	CD52	Leucemia Linfocítica Crônica (CLL)
Adalimumab	Humira	2002	Humano	TNF- α	Diversas desordens autoimunes
Efalizumab	Raptiva	2002	Humanizado	CD11a	Psoríases
Ibritumomab tiuxetan	Zevalin	2002	Murino	CD20	Linfoma de <i>non-Hodgkin</i> (com yttrium-90 ou indium-111)
Tositumomab	Bexxar	2003	Murino	CD20	Linfoma de <i>non-Hodgkin</i>
Bevacizumab	Avastin	2004	Humanizado	Fator de crescimento endotelial vascular (VEGF)	Câncer Colo-retal
Cetuximab	Erbix	2004	Quimérico	Receptor de fator de crescimento epidermal	Câncer Colo-retal, de cabeça e pescoço
Omalizumab	Xolair	2004	Humanizado	Imunoglobulina E (IgE)	Principalmente alergia relacionada a asma
Natalizumab	Tysabri	2006	Humanizado	Integrina α -4	Esclerose múltipla e doença de Crohn
Panitumumab	Vectibix	2006	Humano	Receptor de fator de crescimento epidermal	Câncer Colo-retal
Ranibizumab	Lucentis	2006	Humanizado	Fator de crescimento endotelial vascular A (VEGF-A)	Degeneração macular
Eculizumab	Soliris	2007	Humanizado	Proteína C5 do sistema complemento	Hemoglobinúria paroxismal noturna
Certolizumab pegol	Cimzia	2008	Humanizado	Inibição da sinalização de TNF- α	Doença de Crohn
Ofatumumab	Arzerra	2009	Humano	CD20	Leucemia Linfocítica Crônica (CLL)

Em outro trabalho de nosso grupo utilizamos essa biblioteca de Fab humano como uma fonte de anticorpos monoclonais capaz de reconhecer diferentes antígenos, dentre eles o peptídeo (GIKQLQARILAVEERYLKDQQLLG), correspondente aos resíduos 576 a 619 da porção extramembrana da proteína do envelope de HIV - 1 gp 41. Esse peptídeo tem sido caracterizado com um epitopo imunodominante (Zolla-Pasner, 2004) e neutralizante, imunogênico e protetor (Clerici *et al.*, 2002). O peptídeo é reconhecido por anticorpos, IgA em particular, de indivíduos refratários à infecção por HIV (indivíduos expostos, mas não infectados, como por exemplo indivíduos HIV negativo de casais discordantes) (Clerici *et al.*, 2002).

A capacidade de neutralização, em especial de prevenção da entrada do vírus através das mucosas, desempenhada por anticorpos tem sido sugerida como uma importante característica a ser buscada em anticorpos. Testes em macacas mostram que esses anticorpos poderiam ser incorporados em géis microbicidas e inibir a transmissão do vírus através de mucosas (vaginal) (Veazey *et al.*, 2003), prevenindo a disseminação da doença.

O VÍRUS HIV E A SÍNDROME DA IMUNODEFICIÊNCIA

A síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) é uma doença pandêmica que tem como agente etiológico o vírus HIV (Human Immunodeficiency Virus), um retrovírus pertencente à subfamília *Lentiviridae* (Peçanha *et al.*, 2002).

Em 1983, o vírus foi isolado pela primeira vez como agente etiológico da AIDS pelos pesquisadores Robert Gallo, nos Estados Unidos e Luc Montagnier, na França (Kuby, 2000) sendo que em 1986, um comitê internacional recomendou o termo HIV (vírus da imunodeficiência humana) para denominá-lo reconhecendo-o como capaz de infectar seres humanos.

Segundo o relatório da UNAIDS de 2007 cerca de 33 milhões de pessoas no mundo foram infectadas com o vírus HIV, e estima-se que aproximadamente 2 milhões de mortes ocorreram naquele ano. O continente africano ainda é o mais atingido pela doença e estima-se que 28 milhões de infectados estão nessa região. A África Sub-saariana é a mais atingida com mais de 22 milhões (Figura 6). Segundo o mesmo relatório, no Brasil o número de infectados ultrapassa 600 mil.

Somente dez anos depois da descoberta do vírus HIV como agente etiológico da AIDS, três drogas anti-virais entraram no mercado: AZT, ddl e ddC, todos eles atuando no nível da

transcriptase reversa. E mais de vinte anos depois, ainda não se obteve uma vacina segura e eficaz para a prevenção da infecção por HIV.

Atualmente, diversos esforços no sentido de prevenir a disseminação da doença têm sido a maneira mais eficaz para diminuir a prevalência do vírus. Contudo, em diversos países, principalmente os menos desenvolvidos, a doença tem sido implacável, tornando essas regiões vulneráveis.

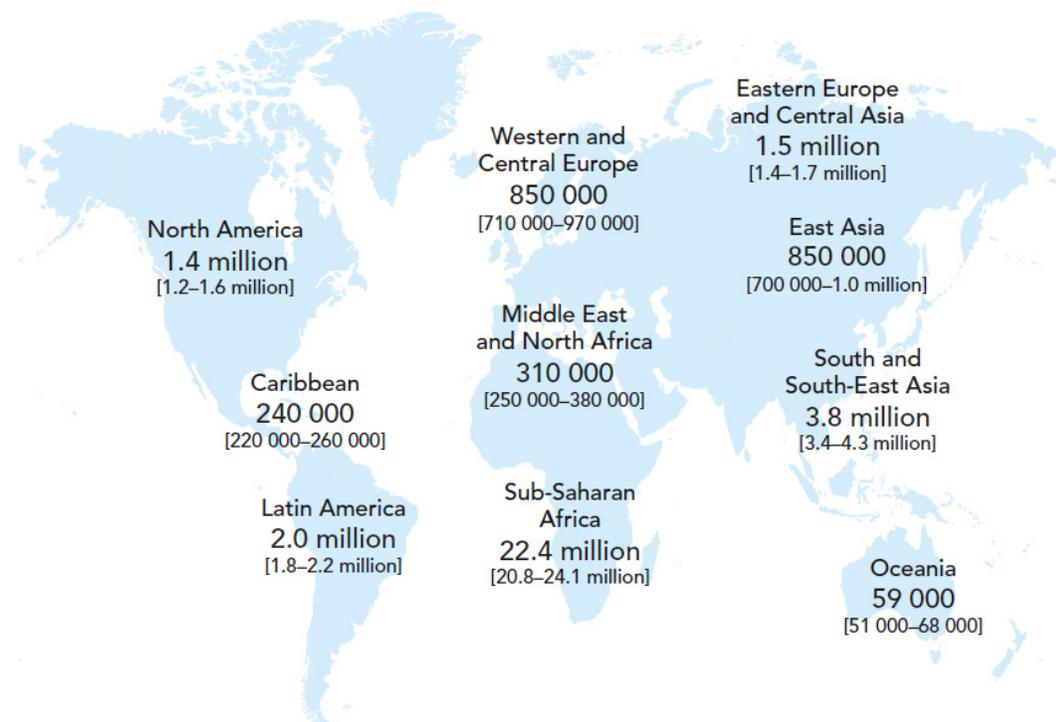


Figura 6 – Quadro estimativo de adultos e crianças infectados por HIV em 2007. (Adaptado do relatório Unaid www.unaids.org, 2009)

No que diz respeito à vacina contra o HIV, tem-se constatado que a dificuldade para a produção da mesma é devido à complexidade biológica do vírus HIV.

O genoma do vírus HIV é codificado por uma molécula simples de RNA de aproximadamente 10 kb de comprimento, que codifica 16 proteínas distintas. Estas proteínas são componentes estruturais e enzimáticos requeridos por todas as retrovíroses e derivam dos genes *gag* (*group-specific antigen*), *pol* (polimerase) e *env* (envelope) (Andrade *et al.*, 2001). A região **gag** codifica as proteínas estruturais internas p17, p24, p7 e p6; a região **pol** codifica a protease, transcriptase reversa e integrase; e, finalmente a região **env**, responsável pela codificação das proteínas do envoltório, gp120 e gp41 (Peçanha *et al.*, 2002). Além dessas, outras proteínas codificadas têm papel regulatório ou na maturação da partícula viral. O esquema da estrutura clássica de um genoma retroviral é: 5' LTR-*gag*-*pol*-*env*-LTR 3'. As regiões LTR (*long terminal*

repeats) representam as duas extremidades do genoma viral que estão ligadas ao DNA celular da célula hospedeira após a integração e que não codificam nenhuma proteína (Figura 7).

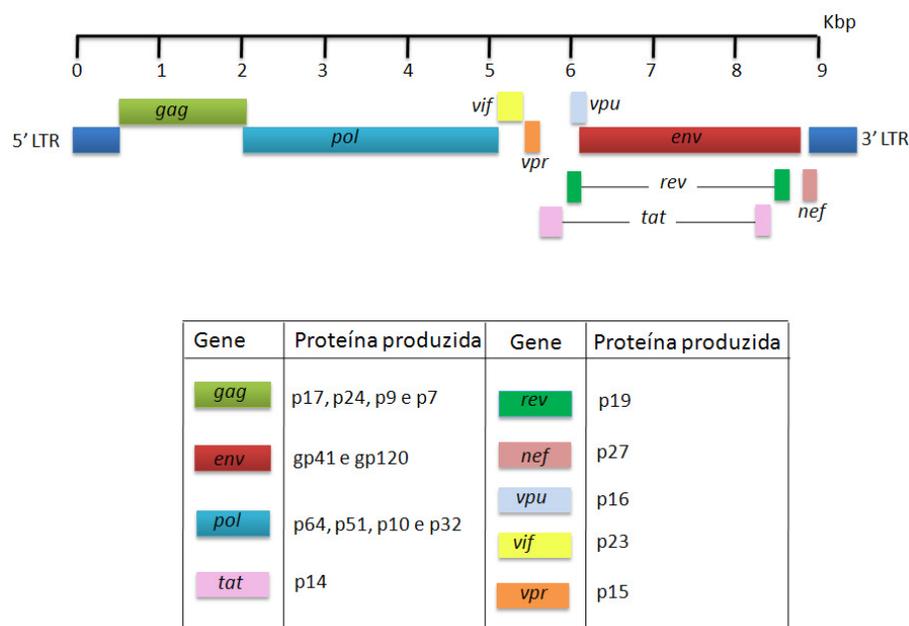


Figura 7 – Esquema geral do genoma do vírus HIV. Os três principais genes – *gag*, *pol* e *env* – codificam proteínas do nucleocapsídeo, enzimas requeridas para a replicação e proteínas do envelope viral. Dos outros seis genes, três (*tat*, *ver* e *nef*) codificam proteínas regulatórias que tem como papel principal o controle da expressão; duas (*vif* e *vpu*) codificam proteínas requeridas na maturação; e uma (*vpr*) codifica um ativador transcricional. A repetição longa terminal (LTR) 5' contém sequências na qual várias proteínas regulatórias se ligam (Adaptado de Kuby, 2000).

As partículas virais de HIV têm um diâmetro de 100nm e estão envoltas por uma membrana lipoprotéica. Cada partícula contém 72 complexos glicoprotéicos que estão integrados na membrana lipídica (Kuby, 2000).

A glicoproteína gp160 é sintetizada como um precursor, clivada por uma enzima similar a furina no transgolgi em subunidades gp120 e gp41 que se associam não-covalentemente e se reúnem em heterotrímeros (Feng *et al.*, 1996). A gp120 determina o tropismo viral pela ligação ao receptor da célula alvo, enquanto que a gp41 media a fusão das membranas viral e celular (Chan *et al.*, 1997). Durante o processo de formação de vesículas, o vírus também pode incorporar em sua bicamada lipídica algumas proteínas da célula hospedeira, como as proteínas MHC de classe I e II, ou outras proteínas de adesão, como a ICAM-1 que podem facilitar a adesão a outras células alvos.

O envelope viral, ou nucleocapsídeo, é composto por uma camada composta pela proteína p17 que é ancorada ao interior da membrana lipoproteica. Mais internamente, existe uma camada composta pela proteína p24. Essa duas camadas de proteínas protegem o genoma do vírus HIV, que consiste em duas cópias de fita simples de RNA, na qual estão associadas com duas moléculas de transcriptase reversa (p64) e proteínas nucleicas, p10, uma protease e p32, uma integrase (Figura 8).

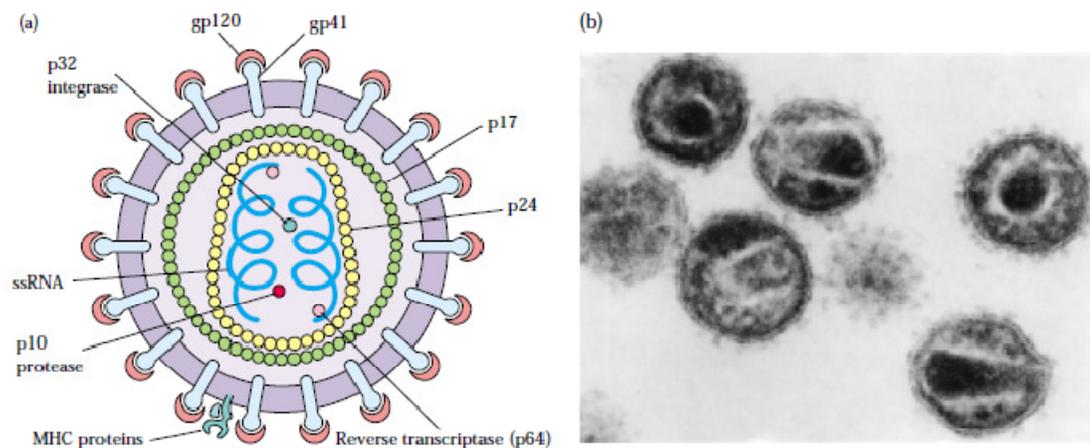


Figura 8 – Estrutura do vírus HIV. a) Diagrama esquemático do vírus HIV. A glicoproteína gp41 é uma proteína transmembrânica que se projeta até a bicamada lipídica do envelope viral. A gp120 está associada com a gp41 e serve como um ligante ao receptor CD4 das células hospedeiras. O envelope viral é derivado da célula hospedeira e contém algumas proteínas da membrana celular do hospedeiro, incluindo moléculas MHC de classe I e II. Dentro do envelope está o núcleo viral, ou nucleocapsídeo, no qual inclui uma camada composta pela proteína p17 e uma camada mais interna composta pela p24. O genoma do HIV consiste em duas cópias de fita simples de RNA, na qual estão associadas com duas moléculas de transcriptase reversa (p64) e proteínas nucleicas, p10, uma protease e p32, uma integrase. b) Micrografia eletrônica do vírus HIV num aumento de 200.000 vezes. (Adaptado de Kuby, 2000).

A etapa inicial da infecção por HIV é sua entrada no interior da célula. Esse processo envolve interações moleculares coordenadas que são fundamentais para iniciar o ciclo replicativo do vírus dentro da célula alvo.

Dentre os componentes moleculares responsáveis nesse processo destaca-se o complexo glicoprotéico do vírus, gp120/gp41 e, dois componentes do complexo receptor celular, o receptor CD4 e co-receptor de quimiocina. Essas interações resultam na entrada do vírus na célula devido à fusão da membrana viral com a celular e conseqüentemente a introdução da maquinaria replicativa do vírus. Esta fusão resulta da ligação da gp120 no receptor CD4 o que gera uma

mudança conformacional da gp41. Essa mudança desencadeia todo o processo de fusão celular (Figura 9). Um resíduo peptídico N-terminal hidrofóbico, rico em glicina, presente na gp41 parece iniciar a fusão, enquanto a região transmembrana é importante tanto para a fusão quanto para a ancoragem da proteína Env na membrana viral (Lu e Kim, 1997).

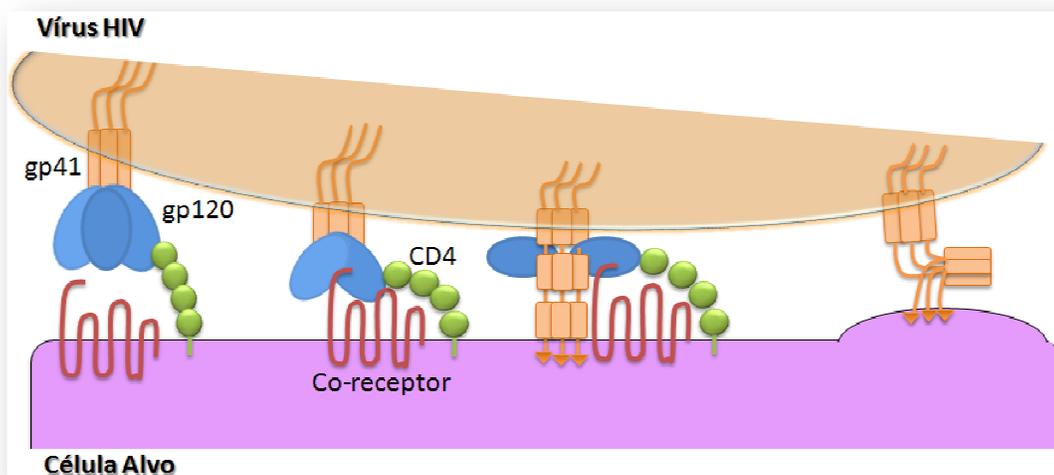


Figura 9 – Estágios iniciais da infecção por HIV. A infecção por HIV inicia-se com a ligação da gp120 ao receptor da célula alvo CD4, disparando uma mudança conformacional que expõe o sítio de ligação ao co-receptor. A gp120 liga-se ao co-receptor e uma nova mudança conformacional das proteínas do envelope acontece levando a inserção do peptídeo de fusão gp41 na membrana da célula alvo. A fusão da gp41 a membrana da célula alvo permite a entrada da maquinaria replicativa do vírus no interior da célula (Adaptado de Willey e Aasa-Chapman, .2008)

Existem duas grandes classes de vírus HIV-1 que diferem quanto ao seu tropismo celular. Essa seletividade é controlada pelo co-receptor que a gp120 se liga. A classe que apresenta tropismo por células T (T-tropismo) necessitam dos co-receptores de quimicima CXCR4 (R4) e as que apresentam tropismo por macrófagos (M-tropismo), utilizam-se do co-receptor CCR5 (R5) para a interação celular (Berger *et al.*, 1999). O alvo principal do vírus HIV durante a fase inicial da infecção é o linfócito T CD4+, o que resulta na depleção dessas células e uma imunodeficiência progressiva (Gandhi e Walker, 2002). Nesse estágio o sistema imune não é mais capaz de inibir a ação do vírus HIV.

Como a maioria dos patógenos, o vírus HIV induz a resposta de anticorpos policlonais para um vasto número de epítopos de diferentes proteínas virais. Atualmente, diversos estudos

estão sendo direcionados para a identificação de epítopos antigênicos que induz a geração de anticorpos com potencial neutralizantes para o vírus HIV (Zhou *et al.*, 2007, Scheid *et al.*, 2009).

Até hoje não se tem uma vacina eficiente contra o vírus por causa da habilidade do HIV-1 de escapar da neutralização natural mediada por anticorpos (Weiss *et al.*, 1985). Atualmente, diversos estudos têm focado o envelope glicoproteico para o desenvolvimento de novos agentes antivirais que tenham a capacidade de neutralizar a entrada do vírus HIV na célula de forma eficiente e ampla (Holl *et al.*, 2006, McCaffrey *et al.*, 2004, Park *et al.*, 2000). Anticorpos neutralizantes bloqueiam a entrada do vírus pelo reconhecimento de epítopos da gp41 ou gp120 que são fundamentais para a ligação com receptor, co-receptores ou fusão (Lee *et al.*, 2004).

Alguns anticorpos reconhecem regiões altamente conservadas da gp120. Uma dessas regiões encontra-se no domínio de ligação ao receptor CD4, domínio responsável pela interação do vírus HIV com a superfície das células-alvos. O anticorpo monoclonal b12 é uma IgG1 que têm a capacidade de se ligar a essa região e consequentemente neutralizar a entrada do vírus. Esse anticorpo foi capaz de neutralizar quase 75% dos isolados primários, possuindo ampla atividade neutralizante (Burton *et al.*, 1994). Outro anticorpo identificado que possui ampla atividade neutralizante é o anticorpo 2G12. Esse anticorpo reconhece carboidratos associados à superfície da gp120 (Scanlan *et al.*, 2002)

Outros epítopos que têm sido bastante estudados estão localizados na gp41. Essa glicoproteína possui uma região imunodominante que induz altos níveis de anticorpos não neutralizantes e uma região transmembrana proximal, bastante conservada. Vários anticorpos monoclonais específicos para a epítopos da gp41 têm sido identificados. Contudo, apenas uma pequena minoria apresentou atividade neutralizante. O anticorpo monoclonal humano, 2F5, mostrou ter uma atividade amplamente neutralizante para diversos isolados primários de HIV-1, reconhecendo um epítopo de seis aminoácidos (ELDKWA) localizados numa região relativamente conservada do ectodomínio da gp41 (Muster *et al.*, 1993). Outros dois anticorpos monoclonais humanos, 4E10 e Z13 também se destacam pela sua ampla atividade neutralizante. Esses anticorpos reconhecem uma sequência específica da região transmembrana proximal da gp41, região bem próxima ao sítio de reconhecimento do anticorpo 2F5 (Tabela 2) (Zolla-Pazner, 2004).

Alguns estudos demonstram que a exposição desses epítopos é alterada pela mudança das proteínas do envelope induzida pela ligação ao receptor CD4 (Sattentau *et al.*, 1995). Esses determinantes antigênicos são expostos em um período limitado durante infecção viral e são

caracterizados como epítopos transacionais, um termo também aplicado para outros epítopos do envelope viral (Zolla-Pazner, 2004).

Tabela 2 – Epítopos da gp41 de HIV que induz anticorpos neutralizantes (Adaptado de Zolla-Pazner, 2004).

Epítopo	Anticorpos monoclonais humanos representativos	Características	Referências
Cluster I da gp41	Clone 3, 246-D	Epítopo altamente imunogênico, mas o clone 3 é apenas um dos muitos anticorpos monoclonais específicos para este epítopo e que tem atividade neutralizante	Cotropia <i>et al.</i> , 1996; Ferrantelli <i>et al.</i> , 2004; Hioe <i>et al.</i> , 1997.
Região transmembrana proximal da gp41	2F5, 4E10 e Z13	Pouco imunogênico, mas anticorpos para esta região é amplamente neutralizante	Trkola <i>et al.</i> , 1995; Zwick <i>et al.</i> , 2001; Muster <i>et al.</i> , 1993

O grande desafio para os anticorpos neutralizantes, além desses epítopos transacionais, é possuir a capacidade de neutralizar diversos isolados virais de diversos clados. Além de que não é inesperado que o vírus HIV possua múltiplos mecanismos para se proteger da ligação dos anticorpos. Logo, os anticorpos que apresentam resultados mais promissores são os que conseguem impedir a ligação ao receptor CD4 ou aos co-receptores, impossibilitando as alterações conformacionais dessas proteínas para que ocorra a entrada do vírus na célula alvo e, além disso, conseguem neutralizar diversos isolados virais.

SISTEMA DE EXPRESSÃO EM *P. pastoris*

A produção de anticorpos recombinantes em larga escala ainda não é um método trivial. Diversos sistemas de expressão de proteínas heterólogas têm sido utilizados.

Entre os sistemas alternativos de expressão de proteínas que apresentam vantagens sobre o sistema de expressão em bactérias ou em células de mamíferos destaca-se a levedura metilotrófica *P. pastoris*. Esta levedura é capaz de crescer em meio de cultura contendo metanol como única fonte de carbono, produzindo altos níveis protéicos (Cereghino e Cregg, 2000).

O promotor álcool oxidase (*AOXI*) controla a expressão do álcool oxidase na qual catalisa o primeiro passo do metabolismo do metanol. Tipicamente, 30% do total de proteína solúvel na indução das células por meio de metanol é álcool oxidase. Diversos vetores de expressão em *Pichia* utilizam do promotor forte *AOXI* e usa o metanol para induzir alto nível de expressão do gene de interesse.

Além disso, a levedura *P. pastoris* é capaz de realizar modificações pós-traducionais, tais como, processamento proteolítico, dobramento da molécula, formação de pontes dissulfeto e a glicosilação. Isso não é observado em sistemas de expressão em bactérias.

Freyre e colaboradores (2000) compararam a atividade ligante ao antígeno de scFv obtidos por expressão em *Escherichia coli* e em *P. pastoris* e demonstraram que o fragmento obtido por expressão em levedura apresentou uma atividade específica superior ao obtido por expressão em bactérias.

Outra vantagem do sistema de expressão em *P. pastoris* é a presença da endoprotease dependente de cálcio conhecida como Kex2. Essa protease é utilizada para o processamento do peptídeo sinal e, no caso deste trabalho, também da proteína heteróloga expressa. Esse sinal é responsável pelo transporte da pró-proteína pelo retículo endoplasmático e sua subsequente clivagem. A pró-proteína é clivada pela Kex2 liberando a proteína madura (Daly e Hearn, 2005). O processamento do peptídeo sinal envolve três passos. Primeiro, o pré-sinal é removido pela peptidase no retículo endoplasmático, em seguida, a endopeptidase Kex2 cliva após os resíduos de Lisina (K) e Arginina (R) na sequência pró-sinal da extremidade C-terminal (Figura 10). Por último, ocorre a clivagem da repetição dos resíduos de Glutamato (E) e Alanina (A) da extremidade N-terminal pela aminopeptidase Ste13 (Bevan *et al.*, 1998).

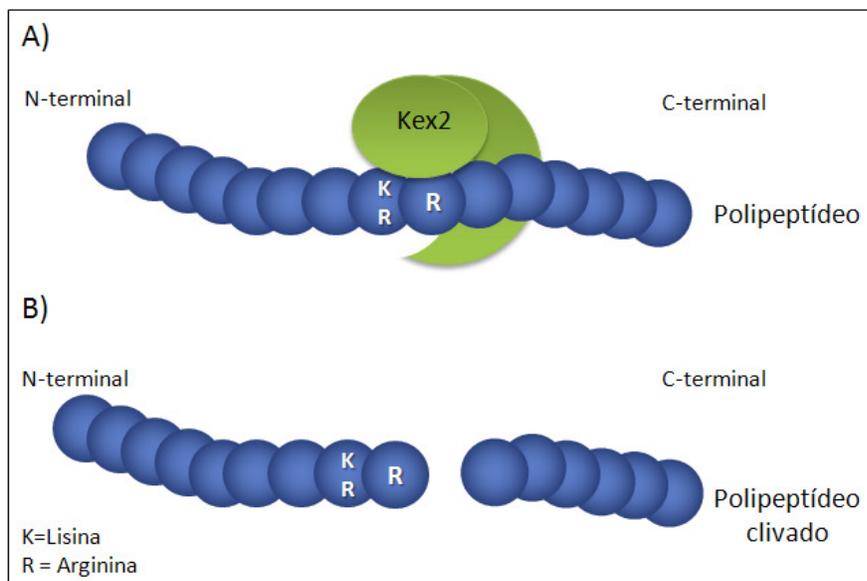


Figura 10 – Sítio de clivagem da endoprotease Kex2. A) A endopeptidase Kex2 reconhece os resíduos de Lisina (K) e Arginina (R) na sequência pró-sinal da extremidade C-terminal. B) Essa endopeptidase cliva entre após o resíduo de arginina e libera a proteína de interesse para a secreção.

As leveduras metilotróficas requerem a presença de metanol no seu metabolismo. Algumas enzimas participam da via metabólica do metanol no sistema de expressão em *P. pastoris*. A primeira enzima nesta via é a álcool oxidase (Aox), codificada por dois genes relacionados: *AOX1* e *AOX2*. O primeiro é responsável por cerca de 95% da atividade enzimática observada (Cregg *et al.*, 1989).

A enzima álcool oxidase (Aox) catalisa o primeiro passo na utilização de metanol da via (Figura 11). Essa reação requer oxigênio (O_2) e forma o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e formaldeído (HCHO). O H_2O_2 produzido pela reação da Aox é convertido em água pela Peroxissomo catalase. Parte do formaldeído gerado pela Aox deixa o peroxissomo e é oxidado por duas deidrogenases citoplasmáticas, formando o dióxido de carbono. Essa reação é fonte de energia para o crescimento celular na presença de metanol. A outra parte de formaldeído é assimilado para formar constituintes celulares por uma via cíclica que começa com a condensação de formaldeído com xilulose-5-monofosfato (Xu_5P), uma reação catalisada por uma terceira enzima peroxissomal, a dihidroxiacetona sintase (DHAS). (Cereghino e Cregg, 2000).

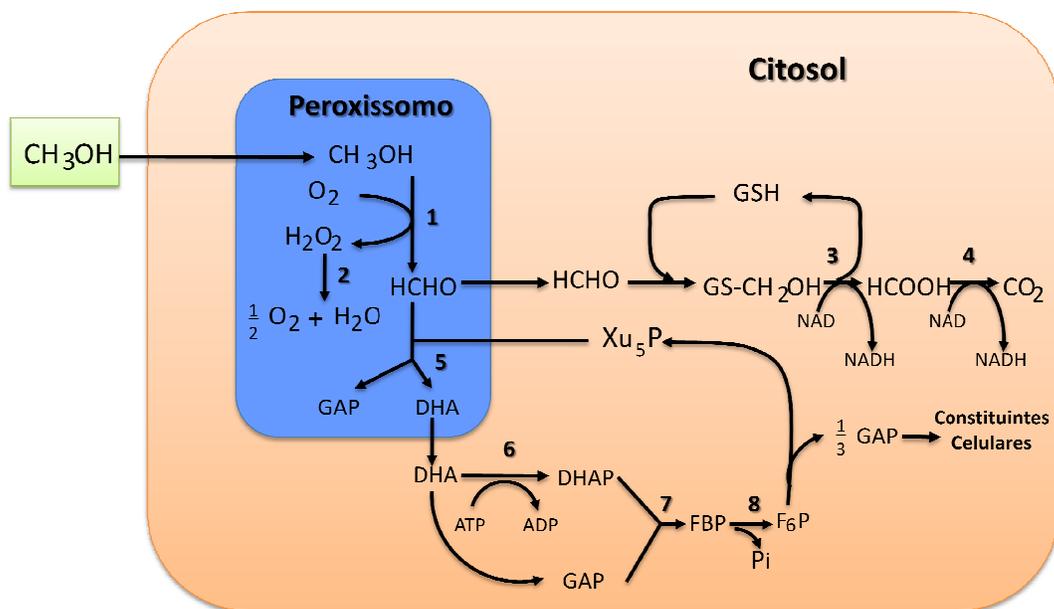


Figura 11 – Via metabólica da oxidação do metanol em formaldeído na levedura *P. pastoris*. Álcool oxidase (1); Catalase (2); Formaldeído deidrogenase (3); Formato deidrogenase (4); Diidroxiacetona sintase (5); Diidroxiacetona quinase (6); Frutose 1,6-Bifosfato adolase (7); Frutose 1,6-bifosfatase (8). (Adaptado de Cereghino e Cregg, 2000).

Diversas linhagens de *P. pastoris* possuem uma ou mais mutações auxotróficas que possibilita a seleção de clones recombinantes. A linhagem SMD1168 possui uma mutação no gene *HIS4* que inibe a síntese de histidina. Quando transformadas com plasmídios de expressão que carregam o gene *HIS4* para complementar o gene *his4-* da hospedeira, os transformantes podem ser facilmente selecionados pela habilidade de crescer em meio deficiente em histidina.

Para aumentar a estabilidade do sistema de expressão, os vetores comercialmente disponíveis possuem características que favorecem a recombinação homóloga e a integração do gene clonado ao genoma da levedura *P. pastoris* (Invitrogen). Esses vetores foram desenvolvidos tanto para a transformação em *E. coli* quanto em *P. pastoris*. Para manutenção em *E. coli*, os plasmídios contêm uma origem de replicação bacteriana e o gene de resistência a ampicilina. Possuem um cassete de expressão formado pelo promotor e pela região terminadora de transcrição do gene *AOX1* (Figura 12), além de uma marca de seleção, sendo a mais utilizada a de seleção auxotrófica pelo gene histidinol deidrogenase (*HIS4*), usada em combinação com linhagens *his4-*. Um dos vetores mais utilizados é o plasmídio pPIC9 (Invitrogen), que possui como sinal de secreção o peptídeo sinal do fator α de *S. cerevisiae* (Torres e Moraes, 2000).

A recombinação homóloga para a integração dos plasmídios pode ocorrer nos *locus HIS4* ou no *locus AOX1*. Quando a recombinação ocorre nos *locus AOX1* por meio de um duplo *crossing over* entre regiões do vetor e do genoma, a região codificadora *AOX1* é completamente removida (Figura 12). O fenótipo resultante Mut^s (*Methanol utilization slow*) é causado pela perda de atividade de álcool oxidase codificada pelo gene *AOX1*, restando apenas o *AOX2*. Isto resulta num fenótipo de crescimento lento em meio com metanol. Quando a recombinação homóloga ocorre através de um *crossing over* simples, levando à inserção gênica no *locus HIS4* ou no *locus AOX1*, o fenótipo resultante é Mut^+ (*Methanol utilization plus*). Este fenótipo se refere à habilidade de metabolizar metanol como única fonte de carbono comparável às linhagens selvagens (Figura 13). Algumas proteínas são melhores expressas em um tipo de fenótipo do que em outro (Mut^s ou Mut^+).

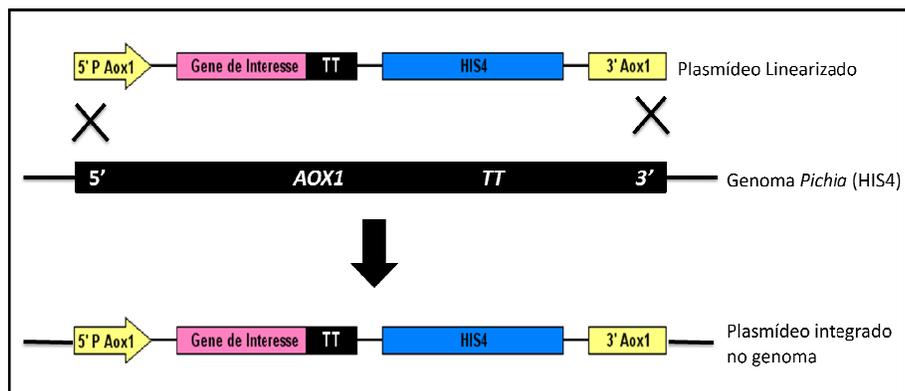


Figura 12. Substituição Gênica por duplo *crossing over* no locus *AOX1* em *P. pastoris*. A figura acima mostra a substituição gênica no locus *AOX1*. Numa cepa *his4* como a SMD1168, a substituição gênica (inserção ômega) é originada por um duplo *crossing over*, do promotor *AOX1* e da região 3' *AOX1*, entre o vetor e o genoma. Isto resulta numa remoção completa da região codificadora do *AOX1* genômico. O fenótipo resultante é $His^+ Mut^s$. Os transformantes His^+ podem ser facilmente localizados pelo seu fenótipo e o Mut^s serve como indicador da integração via substituição do locus *AOX1*. O resultado deste tipo de substituição gênica é a perda do locus *AOX1* (Mut^s) e o ganho de um cassete de expressão contendo P_{AOX1} , o gene de interesse e *HIS4*. (adaptado do Manual do Kit de expressão em *Pichia*, Invitrogen, 2002)

Para a expressão de anticorpos recombinantes deve-se considerar cuidadosamente o vetor utilizado. Os vetores utilizados são normalmente plasmídios contendo um cassete de expressão

compatível com o tipo celular utilizado como hospedeiro. O vetor utilizado neste trabalho, foi inicialmente construído para posterior produção do fragmento de anticorpo de interesse. É um vetor na forma monocistrônica que possui um cassete de fragmento de anticorpo, contendo segmentos gênicos codificadores das cadeias pesadas e leves. Possui também o promotor AOX1 para o controle da expressão gênica da molécula de Fab de cadeia única. A molécula do Fab deve ser clivada separando as cadeias leve e pesada. Isso é conseguido com a utilização de um peptídeo conector contendo o sítio de processamento da endoprotease Kex do retículo endoplasmático, facilitando o processamento e montagem da molécula de Fab para sua posterior secreção (Burtet *et al.*, 2008).

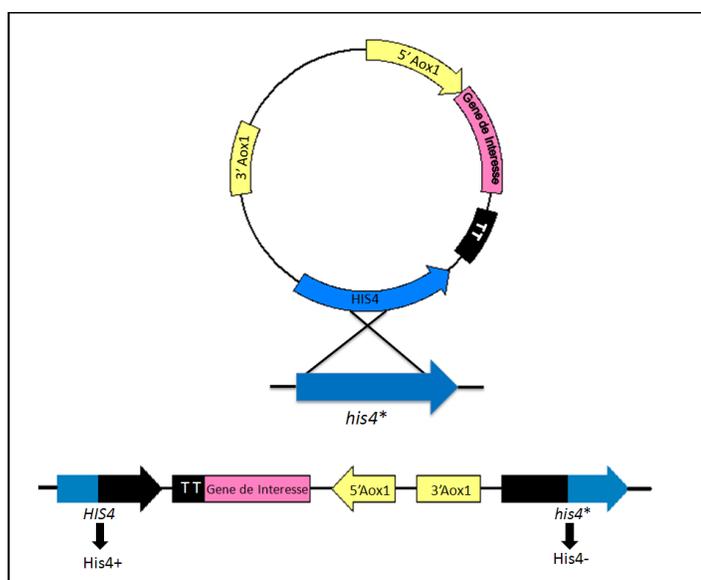


Figura 13 . Inserção Gênica por simples crossing over no locus *his4* em *P. pastoris*. A figura acima mostra o resultado da inserção de um plasmídeo, com uma cópia *HIS4*, no locus do gene *his4*, provocando a ruptura do mesmo e a reversão do fenótipo por complementação gênica. Tanto na cepa SMD1168 (Mut⁺) quanto KM71 (Mut^S), os eventos de inserção gênica no locus *his4* resultam do simples *crossing over* entre esse locus e do gene *HIS4* do vetor, culminando na inserção de uma ou mais cópias do vetor. Desde que o *AOX1* genômico ou os loci *aox::ARG4* não estejam envolvidos neste evento de recombinação, o fenótipo de cada transformante His⁺ será o mesmo fenótipo Mut da cepa original. Com a linearização do vetor recombinante em sítios de restrição enzimática localizados nos genes *HIS4*, os fenótipos Mut⁺ ou Mut^S podem ser convenientemente gerados dependendo da cepa hospedeira utilizada (adaptado do Manual do Kit de expressão em *Pichia*, Invitrogen, 2002).

Neste projeto o vetor de expressão pPIgLe Fab foi construído de forma a possibilitar a clonagem individual dos segmentos gênicos codificadores das cadeias pesadas e leves de cinco Fabs anti-HIV originados do vetor de expressão de bactéria pComb 3X. Esses Fabs foram selecionados contra o peptídeo correspondente aos resíduos 576 a 619 da região extramembrana da gp41 do envelope de HIV-1.

Justificativa

JUSTIFICATIVAS

Para uma melhor caracterização dos Fabs selecionados estamos propondo a modificação de um vetor de expressão em *P. pastoris* para a clonagem dos genes codificadores dos Fabs e sua futura expressão na levedura metilotrófica *P. pastoris*.

Com essa estratégia esperamos possibilitar a obtenção de maiores quantidades dessas proteínas recombinantes para a caracterização imunológica futura dos Fab selecionados quanto ao seu potencial ligante e neutralizante.

Esse projeto representa um esforço no sentido de encontrar alternativas para a prevenção da infecção de HIV-1.

Objetivos

OBJETIVOS

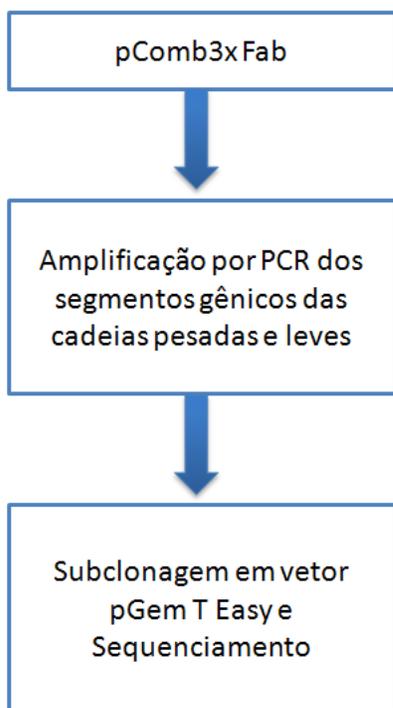
- Construir um vetor de expressão de *P. pastoris* para possibilitar a montagem dos genes codificadores de Fabs humanos selecionados contra o peptídeo sintético da gp41;
- Clonar os genes codificadores das cadeias leves e pesadas dos Fabs anti-HIV no vetor de expressão pPIgLe Fab;
- Expressar os Fabs humanos em *P. pastoris*.

Abordagem

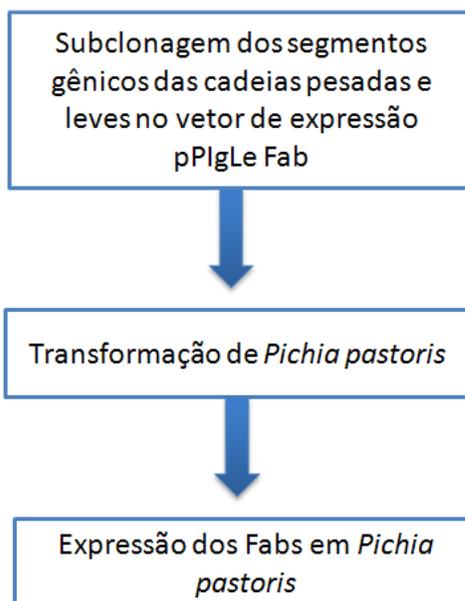
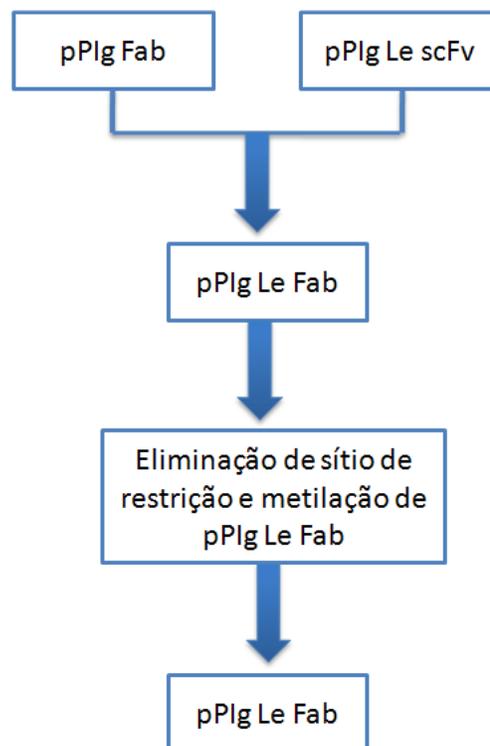
Experimental

ABORDAGEM EXPERIMENTAL

Obtenção dos segmentos gênicos dos Fabs anti-HIV



Construção do vetor de expressão



Materiais e Métodos

MATERIAIS

1) Linhagens Celulares

a) Bactérias

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

- **XL10-gold (Stratagene)** - Tet^rD (*mcrA*)183 D (*mcrCB-hsdSMR-mrr*)173 *endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte* [F' *proAB lacIqZDM15 Tn10 (Tet^r) Amy Cam^r*]. Os genes listados indicam alelos mutantes. Esta linhagem de *E. coli* foi desenvolvida para a transformação de moléculas de DNA grandes, e com alta eficiência.

- **DH5α (Invitrogen)**® – F- /*endA1 hsdR17(r_K⁻ m_K⁺) supE44 thi⁻¹ recA1 gyrA (Nal^r) relA1 D(lacIZYA-argF)U169 deoR (F80dlacD(lacZ)M15)*.

Essas linhagens foram utilizadas nos procedimentos de construção da versão Fab do anticorpo.

b) *P. pastoris*

- **SMD1168** → $\Delta pep4, his4$. Fenótipo: His⁻, Mut⁺. Deficiente de protease. O gene *PEP4* codifica proteinase A, requerida para ativação de outras proteases vacuolar, tais como carboxipeptidase Y e proteinase B (Creeg *et al.*, 2000).

- **GS115** → *his4*. Fenótipo: His⁻, Mut⁺ (Creeg *et al.*, 2000).

Estas linhagem de *P. pastoris* foram utilizadas para a integração, no locus *HIS4* genômico do plasmídio com o gene de interesse, para a expressão do Fab anti-HIV recombinante sob controle do promotor *AOX1*.

2) Plasmídios Utilizados

- **pComb3X** – f(-) – 4,5 kb, promotores *plac,ori ColE1, ori f1, Amp^R* e imediatamente após a região de clonagem, do gene do anticorpo (VH-CH1) possui uma região com seis histidinas (H6) para a purificação em coluna de níquel ou para a detecção com anticorpo monoclonal anti-His Tag. Esse vetor possui os Fabs anti-HIV clonados.

- **pPIgLe scFv Z22** – 8,95 kb, contém o fragmento scFv, múltiplos sítios de clonagem, ori ColE1, Amp^R, Aox1 5', 3' e 3' termination. Utilizado para a clonagem do Fab inteiro substituindo o scFv.

pPIg Fab – 9,32kb, contém o fragmento Fab, fragmentos 5' e 3' do promotor *AOX1*, sinal de secreção do fator α , múltiplos sítios de clonagem, fragmento 3' *AOX1* TT, *HIS4* ORF, ori ColE1, Amp^R, derivado do pIg16. Utilizado como doador do Fab inteiro para posterior clonagem no vetor pPIgLe scFv Z22.

- **pPIgLe Fab** – 9,38kb, contém o fragmento Fab, fragmentos 5' e 3' do promotor *AOX1*, sinal de secreção do fator α , múltiplos sítios de clonagem, fragmento 3' *AOX1* TT, *HIS4* ORF, ori ColE1, Amp^R. Utilizado para montagem do Fab anti-HIV-1.

- **pIg16 Z22** – 4,8kb, VH-Linker-VL-spA anti-zDNA (scFv conjugado a proteína A), múltiplos sítios de clonagem, , ori ColE1, Amp^R.

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

3) Oligonucleotídeos utilizados para sequenciamento, clonagem e reações de PCR

Os oligonucleotídeos foram fornecidos pela *Integrated DNA Technologies* - IDT® e solubilizados em água Mili-Q para concentração de uso de 10 μ moles/ μ L. A tabela 3 mostra as sequências e utilização de cada um dos oligonucleotídeos.

Tabela 3 – Oligonucleotídeos sintéticos utilizados.

Oligo	Sequência	Utilização
M13 Universal	5' GTAAAACGACGGCCAGT 3'	Sequenciamento de fragmentos de PCR clonados no vetor pGEM T- Easy.
M13 Reverso	5' CAGGAAACAGCTATGAAC 3'	Sequenciamento de fragmentos de PCR clonados no vetor pGEM T- Easy.
P1	5'GCTACCGTGGCCAGCGGAGATCTGCTC 3'	Utilizado como iniciador de PCR para a amplificação da cadeia VL a partir da extremidade 5' e inserção do sítio de restrição para <i>Bgl</i> II.
P2	5' GAAGACAGCTCGAGGCGCACACAGT 3'	Utilizado como iniciador de PCR para a amplificação da cadeia VL a partir da extremidade 3' e inserção do sítio de restrição para <i>Xho</i> I.
P3	5' GTGGTGCCCTCGAGCCAATCTGTGC 3'	Utilizado como iniciador de PCR para a amplificação da cadeia Ck a partir da extremidade 5' e inserção do sítio de restrição para <i>Xho</i> I.
P4	5'TTTGAATTCCTCCTAATGGTGGTGGATGGTGATGACA CTCTCCCTG 3'	Utilizado como iniciador de PCR para a amplificação da cadeia ck com cauda de 6-His a partir da extremidade 3' e inserção do sítio de restrição para <i>EcoR</i> I.
P5	5' GTCGCCCAAGCCCGCCGAG 3'	Utilizado como iniciador de PCR para a amplificação da cadeia VH a partir da extremidade 5' e inserção do sítio de restrição para <i>Xma</i> I.
P6	5' GGAAGACCGATGGGCCCTTCTAGAGGC 3	Utilizado como iniciador de PCR para a amplificação da cadeia VH a partir da extremidade 3' e inserção do sítio de restrição para <i>Xba</i> I.
P7	5' GCAACTAGTCTTCAACAGCA 3'	Utilizado como iniciador de PCR para a amplificação da região de HIS 4 a partir da extremidade 5' e inserção do sítio de restrição para <i>Spe</i> I.
P8	5' CCAATTGTCGACAATGTTTCGT 3'	Utilizado como iniciador de PCR para a amplificação da região de HIS 4 a partir da extremidade 3' mantendo o sítio de restrição existente <i>Sal</i> I
P9	5' GTCCTCTAGAGCCTCCACCAAGGGC 3'	Utilizado como iniciador de PCR para a amplificação da cadeia CH1Kex a partir da extremidade 5' e inserção do sítio de restrição para <i>Bgl</i> II. E eliminação do sítio de metilação de <i>Xba</i> I
P10	TGGGTCATCTGGAGATCTGGAGCAC 3'	Utilizado como iniciador de PCR para a amplificação da cadeia CH1Kex a partir da extremidade 3' e inserção do sítio de restrição para <i>Bgl</i> II.
P11	5'AACCAGCCATGGAGCTGTCGAGCTG 3'	Utilizado como iniciador de PCR para a amplificação da cadeia VH a partir da extremidade 5' e inserção do sítio de restrição para <i>Sac</i> I.
5' Aox	GACTGGTCCAATTGACAAGC	Utilizado para sequenciamento do Fab no vetor pPigLe Fab
3' Aox	GCAAAATGGCATTTGACATCC	Utilizado para sequenciamento do Fab no vetor pPigLe Fab
Mmb4	GCTCCGCTCGTATGTTGT	Utilizado para sequenciamento do Fab no vetor pComb 3x
Mmb5	CGTTTGCCATCTTTCATAATC	Utilizado para sequenciamento do Fab no vetor pComb 3x

4) Meios de Cultura e soluções para bactérias

Meio LB (*Luria-Bertani*)

Peptona de caseína 1,0% (p/v)

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

NaCl 1,0% (p/v)

Preparado em H₂O destilada para o volume necessário e autoclavado.

pH ajustado para 7,0.

Meio LB ágar

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

Meio SB (*Super Broth*)

Peptona de caseína 3,0% (p/v)

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

MOPS 1,0% (p/v)

Preparado em H₂O destilada para o volume necessário e autoclavado.

pH ajustado para 7,0.

Meio SOB

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

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

NaCl 0,06% (p/v)

KCl 0,002% (p/v)

Preparado em H₂O destilada para o volume necessário e autoclavado.

pH ajustado para 7,0.

Meio SOC

Meio SOB 98 mL

Solução estoque de Mg²⁺ 2 M 1 mL

Solução estoque de glicose 2 M 1 mL

Solução estoque de glicose 2 M

Preparada em H₂O destilada e filtrada. Solução conservada a 4°C.

Solução estoque de Mg 2 MMgCl₂ 1 MMgSO₄ 1 M

Preparada em H₂O destilada e filtrada. Solução conservada a 4°C.

A autoclavagem foi realizada durante 20 minutos a 120°C. A filtração foi realizada usando filtros da Millipore de 0,22µm.

5) Antibióticos**Ampicilina**

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

Tetraciclina

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

6) Meios de Cultura e soluções para *P. pastoris***Meio YP 10x – Solução estoque**

Peptona de caseína 20% (p/v)

Extrato de levedura 10% (p/v)

Preparado em H₂O destilada para o volume de 100mL e autoclavado.

Meio YNB (*Yeast Nitrogen Base*) 10x – Solução estoque

YNB sem aminoácido e sem sulfato de amônio 3,4% (p/v)

Sulfato de amônio 10% (p/v)

Preparado em H₂O destilada para o volume de 100mL. Filtrado e conservado a 4°C com papel alumínio

Meio Ágar 2%

Ágar 4g

Preparado em H₂O destilada para o volume de 200mL e autoclavado.

Meio YPD

Meio YP 10% (v/v)

Glicose 2% (v/v)

Preparado em H₂O destilada estéril para o volume necessário.

Meio de Crescimento BMGY (*Buffered Glycerol Complex Medium*)

Meio YP 10%

Meio YNB 1,34% (p/v)

Tampão Fosfato pH 6,0 100mM

Biotina 4x10⁻⁵ % (p/v)

Glicerol 1% (v/v)

Preparado em H₂O destilada estéril para o volume necessário.

Meio de Indução BMMY (*Buffered Methanol Complex Medium*)

Meio YP 10%

Meio YNB 1,34% (p/v)

Tampão Fosfato pH 6,0 100mM

Biotina 4x10⁻⁵ % (p/v)

Metanol 1% (v/v)

EDTA 1mM

PMSF 1mM

Preparado em H₂O destilada estéril para o volume necessário.

Meio Mínimo MD (*Minimal Dextrose Medium*)

Meio YNB 1,34% (p/v)

Biotina 4x10⁻⁵ % (p/v)

Glicerol 1% (v/v)

Preparado em Ágar 2% estéril para o volume necessário.

Meio Mínimo MM (*Minimal Methanol Medium*)

Meio YNB	1,34% (p/v)
Biotina	4×10^{-5} % (p/v)
Metanol	1% (v/v)

Preparado em Ágar 2% estéril para o volume necessário.

Tampão Fosfato 1M pH 6,0

K ₂ HPO ₄	23g
KH ₂ PO ₄	118g

pH ajustado para 6,0 com KOH.

Preparado em H₂O destilada para o volume de 1L e autoclavado.

Glicerol 50%

Glicerol 50mL

Preparado em H₂O destilada para o volume de 100mL e autoclavado

Glicose 20%

Glicose 20g

Preparado em H₂O destilada para o volume de 100mL e autoclavado.

Metanol 100%

Sorbitol 1M

D-Sorbitol 18,21g

Preparado em H₂O destilada para o volume 100mL e autoclavado.

DTT

Ditiotreitol 100mM

Preparado em H₂O destilada para o volume necessário e filtrado.

Acetato de Lítio 1M

Acetato de Lítio 2,04g

Preparado em H₂O destilado para o volume final de 20 mL e filtrado.

Tris-HCl 100mM pH 7,5

Tris 0,6g

Preparado em H₂O destilada para o volume final de 50 mL e filtrado.

pH ajustado com HCl para 7,5

Tampão de Pré-tratamento (TPT)

Acetato de Lítio 100mM

DTT 10mM

Sorbitol 0,6M

Tris-HCl pH 7,5 10mM

Preparado em H₂O estéril.

A autoclavagem foi realizada durante 20 minutos a 120°C. A filtração foi realizada usando filtros da Millipore de 0,22µm.

6) Soluções e tampões de uso geral

Azida Sódica – Solução estoque 100X

Azida sódica 5% (p/v)

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

Tampão TE

Tris-HCl pH 8,0 10 mM

EDTA pH 8,0 1 mM

Tampão Tris

Tris-HCl pH 8,0 10mM

Glicogênio

Glicogênio 20mg/mL

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

NaCl 1,5 M

Na₂HPO₄ 0,1 M

NaN₃ 0,02% (p/v)

Tampão PBST 1X, pH 7,4

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

PMSF (*Phenylmethylsulfonyl Fluoride*) 0,2M

Preparado em Isopropanol para o volume final de 100mL. Conservado a 4°C.

EDTA (Ácido Tetracético Etilenodiamina) 0,5M

Dissolvido em água em pH 8-9. Conservado a estocada a 4°C.

7) Soluções e material para preparo de células competentes e transformação – bactéria**Solução de CaCl₂**

CaCl₂ 50 mM

Preparada em H₂O destilada para o volume necessário e autoclavada. Solução conservada a 4°C.

Solução de CaCl₂ + 15% de Glicerol (v/v)

CaCl₂ 50 mM

Glicerol 15%

Preparada em H₂O destilada para o volume necessário e autoclavada. Solução conservada a 4°C.

Solução de Glicerol

Glicerol 10% (v/v)

Solução de X-Gal

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

Solução de IPTG

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

Cubetas de eletroporação (BioAgency[®], n^o catálogo: 165-2086N)

8) Soluções para extração de DNA plasmidial**Solução I**

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

Solução II

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

Solução III

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

RNase A

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

Clorofane

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

Clorofil

Clorofórmio	24 v
-------------	------

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

Etanol 100%

Etanol 100% (v/v)

Etanol 70%

Etanol 70% (v/v)

Isopropanol 100%

Isopropanol 100% (v/v)

Acetato de amônio 7,5 M

Utilizada para precipitação de DNA em preparação de larga escala.

9) Tampões de Endonucleases de Restrição

a. Fermentas[®] :

Tango[™] (10X)

Tris-Acetato pH 7,9 33 mM

Acetato de Magnésio 10 mM

Acetato de Potássio 66 mM

BSA 0,1 mg/mL

b. New England Biolabs[®] :

NEBuffer 1 (1X)

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

MgCl₂ 10 mM

DTT 1 mM

NEBuffer 2 (1X)

Tris-HCl pH 7,9 10 mM
 MgCl₂ 10 mM
 DTT 1 mM

NEBuffer 3 (1X)

Tris-HCl pH 7,9 150 mM
 MgCl₂ 10 mM
 NaCl 100 mM
 DTT 1 mM

NEBuffer 4 (1X)

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

NEBuffer *EcoR* I (1X)

Tris-HCl pH 7,5 100 mM
 MgCl₂ 10 mM
 NaCl 50 mM
 Triton X-100 0,025% (v/v)

10) Tampões de outras reações

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

Tris-HCl pH 9,0 500 mM
 MgCl₂ 100 mM

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

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

Na PCR foi adicionado cloreto de magnésio para uma concentração final de 1mM e e uma mistura de dNTPs com dGTP, dATP, dCTP e dTTP na concentração de 10 mM cada.

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

Tris-HCl 250 mM

MgCl₂ 50 mM

ATP 5 mM

DTT 5 mM

PEG-8000 25% (p/v)

pH 7,6

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

Tris-HCl pH 7,5 500 mM

MgCl₂ 100 mM

DTT 100 mM

ATP 10 mM

11) Endonucleases de restrição

a. Fermentas[®] :

Bgl II (Catalogo nº FD0084 - Fast Digest)

*Cfr*⁹ I (Catalogo nº ER0172 – 10u/µL)

*Eco*R I (Catalogo nº FD0274 - Fast Digest)

Hind III (Catálogo nº FD0504 – Fast Digest)

Not I (Catalogo nº FD0594 - Fast Digest)

Psi I (Catalogo nº FD2064 - Fast Digest)

Pst I (Catalogo nº ER0611 – 3u/ µL)

Sal I (Catálogo nº FD0648 – Fast Digest)

Sbf I (Catalogo nº ER1191 – 10u/ µL)

Sma I (Catalogo nº FD0668 - Fast Digest)

Xba I (Catálogo nº ER0685 - 3u/ µL)

Xho I (Catálogo nº FD0694 - Fast Digest)

b. New England Biolabs[®] :

*Bam*H I (20U/ μ L)

Bgl II (10U/ μ L)

*Eco*R I (20U/ μ L)

Hind III (20U/ μ L)

Mfe I (10U/ μ L)

Nco I (10U/ μ L)

Nde I (20U/ μ L)

Not I (2,5U/ μ L)

Pvu II (5U/ μ L)

Sac I (20U/ μ L)

Sfi I (20U/ μ L)

Spe I (10U/ μ L)

Sma I (20U/ μ L)

Xba I (20U/ μ L)

Xho I (20U/ μ L)

Xma I (10U/ μ L)

12) Outras enzimas

T4 DNA Ligase (1U/ μ L) (Invitrogen[®])

T4 DNA Ligase (1U/ μ L) (New England Biolabs[®])

Taq DNA polimerase (2U/ μ L) (Cenbiot/RS[®])

13) Soluções e reagentes para eletroforese em gel de agarose e de poliacrilamida

Tampão de corrida TEB 10X

Trizma base 0,89 M

Ácido Bórico 0,89 M

EDTA pH 8,0 0,02 M

dH₂O q.s.p. 1 L

Tampão de corrida TAE 50X

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

Tampão de amostra para gel de agarose 10X

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

Solução de brometo de etídeo 20.000X

Brometo de etídeo	10 mg/mL
-------------------	----------

Tampão de corrida para SDS-PAGE 5X

Trizma base	125 M
Glicina	125 mM
SDS	0,5% (p/v)

Tampão de amostra 5X para SDS-PAGE

Tris-HCl pH 6,8	250 mM
SDS	10% (p/v)
Glicerol	50% (v/v)
β-mercaptoetanol	10% (v/v)
Azul de bromofenol	0,5% (p/v)

Acrilamida 30% (29:1)

Acrilamida	145 g
Bis-acrilamida	5 g
dH ₂ O q.s.p.	500 mL

Estocar a 4°C ao abrigo da luz.

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

Tris 36,34 g
 dH₂O q.s.p. 200 mL

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

Tris 12,11 g
 dH₂O q.s.p. 200 mL

SDS 10%

SDS 10 g
 dH₂O q.s.p. 100 mL

APS 10% (p/v)

Persulfato de amônio 100 mg/mL de água

TEMED (N,N,N',N'- tetrametil etilenodimetilamina)**Gel Concentrador SDS-PAGE**

Solução Acrilamida/Bis-acrilamida (29:1)	4% (p/v)
Tris-HCl pH 6,8	125 mM
SDS	0,1% (p/v)
APS	0,1% (p/v)
TEMED	0,01% (p/v)

Gel Separador SDS-PAGE

Solução Acrilamida/Bis-acrilamida (29:1)	10% (p/v)
Tris-HCl pH 8,8	400 mM
SDS	0,1% (p/v)
APS	0,1% (p/v)
TEMED	0,01% (p/v)

14) Soluções e materiais para os ensaios imunológicos (*Western, Colony e Dot blotting*)**Tampão de Fosfatase Alcalina (APB)**

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

Tampão para Transferência Semi-Seca de Proteínas

Trizma-base	48 mM
Glicina	39 mM
SDS	0,037% (p/v)
Metanol	20% (v/v)

Solução de Bloqueio

Leite em pó desnatado 5% (p/v)

Dissolvido em PBST 1X

Solução Reveladora para *Western, Colony e Dot blot*

O NBT (Nitro Blue Tetrazole) e o BCIP (5-Bromo-4-Cloro-indolil fosfato) foram preparados numa solução estoque de 50 mg/mL. O NBT solubilizado em N,N-dimetil formamida e o BCIP, em água. Para preparar 10 mL da solução reveladora, 66 µL do estoque de NBT foram adicionados em 10 mL de APB e em seguida 33 µL do estoque de BCIP. Esta ordem deve ser respeitada para se evitar a precipitação dos reagentes.

Membrana de Nitrocelulose

Hybond-C Extra (Amersham[®] Bioscience n.º. catálogo. RPN 303E)

15) Materiais utilizados para concentração de sobrenadantes de cultura e**Concentradores Amicon[®] Bioseparations:**

- Centricon YM-10
- Centriprep YM-30

16) Marcadores moleculares para DNA e proteína

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

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

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

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

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

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

Spectra[™] Multicolor Broad Range Protein Ladder (Fermentas[®] n.º catálogo SM1842)

Fragmentos de proteínas em kDa: 260; 140; 100; 70; 50; 40; 35; 25; 15 e 10.

17) Kits comerciais

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

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

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

Invisorb Fragment CleanUp - Para extração de DNA de gel de agarose (Invitrogen[®], n.º catálogo 10203002).

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

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

PlusOne Silver Staining kit Protein. Para coloração de géis de poliacrilamida com prata. (GE lifescience, n.º. catálogo. 17-1150-01).

18) Anticorpos utilizados nos ensaios de *Western, Colony e Dot Blot*

Anti – IgG humana (Ck específico) feito em cabra (Pierce[®] n.º catálogo: A9544)

Concentração: 1 mg/mL - Titulação de uso: 1:3.000

Anti – IgG de cabra feito em coelho conjugado com fosfatase alcalina (Sigma[®] n.º catálogo: A-4187)

Concentração: 1 mg/mL - Titulação de uso: 1:5.000

MÉTODOS

1) Preparação de DNA plasmidial

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

- 1) Três mililitros de cultura de células de *E. coli*, transformadas com o plasmídeo de interesse, crescidas em meio LB/Amp (150 µg/mL) durante 16 horas a 37°C, foram coletados por meio de duas centrifugações de 5 min a 5.000 rpm em microtubos de 1,5 mL, sendo o sobrenadante desprezado a cada centrifugação.
- 2) O sedimento foi ressuscitado em 200 µL de Solução I. Incubou-se as amostras no gelo por 5 min.
- 3) Foram adicionados 400 µL de Solução II e as amostras foram homogeneizadas, por meio de inversão do tubo várias vezes, e estas foram incubadas à temperatura ambiente por 5 min.
- 4) Foram adicionados 300 µL de Solução III, o mesmo procedimento de homogeneização foi repetido, e as amostras foram incubadas no gelo por 10 min.
- 5) As amostras foram centrifugadas a 12.000 rpm por 15 min a 4°C.
- 6) Ao sobrenadante foram adicionados 5 µL de RNase A e incubou-se por 1 hora a 37°C.
- 7) Foram adicionados 300 µL de clorofane e, após forte homogeneização, as amostras foram centrifugadas por 5 min a 5.000 x g à temperatura ambiente, a fase aquosa foi coletada para outro tubo.
- 8) Foram adicionados 300 µL de clorofil e o mesmo procedimento anterior de homogeneização, centrifugação e coleta foram repetidos.
- 9) Foram adicionados 2v de etanol absoluto gelado e as amostras foram incubadas a -20°C por no mínimo 2 horas.
- 10) As amostras foram centrifugadas a 12.000 rpm por 45 min a 4°C. O sobrenadante foi desprezado.
- 11) Foi adicionado 1 mL de etanol 70% gelado e as amostras foram novamente centrifugadas a 12.000 rpm por 15 min a 4°C. O sobrenadante foi desprezado.
- 12) O sedimento foi seco a vácuo ou por simples exposição ao ar.
- 13) O sedimento foi ressuscitado em 50 µL de TE. E as amostras conservadas a -20°C.

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

- 1) Duzentos mililitros de cultura de células de *E. coli*, transformadas com o plasmídeo de interesse, crescidas em meio LB/Amp (150 µg/mL) durante 16 horas a 37°C, foram coletados por meio de centrifugação de 15 min a 3.000 x g, desprezando-se o sobrenadante.
- 2) O sedimento foi ressuspensionado em 5 mL de Solução I sob forte agitação. As amostras foram incubadas no gelo por 10 min.
- 3) Foram adicionados 10 mL de Solução II e as amostras foram homogeneizadas, por meio de inversão do tubo várias vezes. Estas foram incubadas à temperatura ambiente por 5 min.
- 4) Foram adicionados 7,5 mL de Solução III, o mesmo procedimento de homogeneização foi repetido, e as amostras foram incubadas no gelo por 10 min.
- 5) As amostras foram centrifugadas a 10.000 x g por 30 min a 4°C.
- 6) O sobrenadante foi filtrado em papel de filtro e ao sobrenadante foram adicionados 0,6v de isopropanol. Após uma incubação de 5 min à temperatura ambiente, as amostras foram centrifugadas a 12.000 x g por 20 min a temperatura ambiente.
- 7) O sobrenadante foi descartado e, após a secagem por exposição ao ar, o sedimento foi ressuspensionado em 500 µL de TE ao qual foram adicionados 10 µL de RNase A. As amostras foram incubadas por 1 hora a 37°C.
- 8) Foram adicionado 1v de clorofane e, após forte homogeneização e centrifugação de 5 min a 5.000 x g à temperatura ambiente, a fase aquosa foi coletada para outro tubo.
- 9) O passo anterior foi repetido mais uma vez.
- 10) Foi adicionado então 1v de clorofil e o mesmo procedimento anterior de homogeneização, centrifugação e coleta foram repetidos.
- 11) Foram adicionados 0,5v de acetato de amônio 7,5M e 2,0v de etanol 100% gelado e as amostras foram incubadas por, no mínimo 2 horas a -20°C.
- 12) As amostras foram centrifugadas a 12.000 rpm por 45 min a 4°C. O sobrenadante foi desprezado.
- 13) Foi adicionado 1 mL de etanol 70% gelado e as amostras foram novamente centrifugadas a 12.000 rpm por 15 min a 4°C. O sobrenadante foi desprezado.
- 14) O sedimento foi seco a vácuo ou por simples exposição ao ar.
- 15) O sedimento foi ressuspensionado em 200 µL de TE. E as amostras conservadas a -20°C.

2) Digestão do DNA plasmidial com enzimas de restrição.

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

3) Análise de DNA plasmidial em gel de agarose (Sambrook e Russel, 2001).

A agarose foi preparada numa concentração de 0,7 a 1,2% dependendo da amostra em tampão TEB 1X ou TAE 1X com 0,5 µg/mL de brometo de etídeo. As amostras de DNA foram aplicadas com tampão de amostra para gel de agarose no gel e foram submetidas à eletroforese em tampão TEB ou TAE 0,5X, como descrito por (Sambrook e Russel, 2001). Para visualização do DNA luz ultravioleta foram incididas no gel utilizando um transluminador (UVP-Upland[®]) e a imagem foi digitalizada em aparato de fotodocumentação.

4) Eluição de fragmentos de DNA de gel de agarose

As bandas contendo os fragmentos de DNA eluídos por meio de eletroforese foram cortadas do gel de agarose. A extração do DNA do gel procedia por meio do kit Qiaquick Gel Extraction kit, Qiagen[®] ou Invisorb Fragment CleanUp, Invitex[®] conforme instruções do fabricante ou por meio de freeze-squeeze. Este último procedimento foi feito da seguinte forma: A banda do DNA cortada do gel foi transferida para uma bolsa feita utilizando um pedaço de Parafilm[®]. A bolsa contendo o fragmento foi congelada a -40^o C. Após o total congelamento, a banda foi macerada até o gel se liquefazer. O líquido e parte do gel foram transferidos para colunas Ultrafree DA Centrifugal Unit (Millipore[®]). O material foi centrifugado por 5 minutos a 12.000 x g a temperatura ambiente. Após a centrifugação o material foi precipitado com a adição de 0,5 v de acetato de amônio 7,5M, 60 µg de glicogênio e 2,5v etanol 100% (v/v) gelado. As amostras foram incubadas a -20°C durante a noite. Após a incubação procedia-se a sedimentação do DNA por meio de centrifugação durante 45 minutos a 12.000 rpm, seguida de lavagem do pellet com 300µL de Etanol 70% (v/v) gelado. O sedimento foi centrifugado novamente por 15 minutos a 12.000 rpm e secado a temperatura ambiente. O DNA foi ressuspenso em H₂O destilada ou TE.

5) Reação de Defosforilação com a fosfatase alcalina de camarão (SAP)

A enzima SAP remove o grupo fosfato presente nas extremidades 5' de dsDNA digeridos com enzimas de restrição. Dessa forma, ela impede uma auto-ligação do DNA plasmidial digerido sem a inserção do inserto. As amostras que necessitavam desse tratamento foram submetidas ao seguinte procedimento: Cinco a dez microgramas de dsDNA digerido foram incubados com 3 a 5 μL da fosfatase alcalina e tampão apropriado da enzima em 1X para um volume final de 50 μL por 1h a 37 $^{\circ}\text{C}$. Após a incubação, o sistema foi inativado por 15 minutos a 65 $^{\circ}\text{C}$. A partir desse ponto, o sistema foi utilizado em sistema de ligação para posterior transformação de células competentes *E. coli*.

6) Amplificação por PCR dos segmentos gênicos codificadores para as cadeias pesadas e leves do Fab

As reações de PCR foram feitas da seguinte forma:

DNA molde	10-50ng
Primer 5'	10 μM
Primer 3'	10 μM
Tampão de reação da enzima 10X	1X
MgCl ₂	2mM
dNTPs	2,5mM de cada
Taq DNA polimerase	0,5U/reação

O volume final de reação foi de 50 μL e a reação foi feita no termociclador Eppendorf nas seguintes condições:

Para amplificação do fragmento de C κ

- 1) 94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min
- 2) 4 ciclos : 94 $^{\circ}\text{C}$ 1 min
 50 $^{\circ}\text{C}$ 1 min 30 seg
 72 $^{\circ}\text{C}$ 2 min
- 3) 30 ciclos: 94 $^{\circ}\text{C}$ 1 min
 60 $^{\circ}\text{C}$ 1 min 30 seg

72°C 2 min
 4) 72°C 10 min

Para amplificação dos demais fragmentos

1) 94°C 3 min
 2) 30 ciclos : 94°C 1 min
 60°C 1 min 30 seg
 72°C 2 min
 4) 72°C 10 min

7) Ligação de fragmentos de DNA

a) Ligação do produto de PCR no vetor pGemT Easy

Para a ligação dos segmentos gênicos obtidos por PCR utilizava-se 25ng do inserto, 5µL do tampão da promega 2x, 1 µL do vetor pGEM-T Easy e 1 µL da enzima T4 DNA Ligase (Promega). O volume do sistema foi completado para 10 µL quando necessário com H₂O MilliQ. O sistema foi incubado durante 16 horas a 4°C. Após este período, o sistema foi transformado em células competentes de *E. coli*.

b) Ligação de vetor e inserto das clonagens

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

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

As reações de ligação foram preparadas em tampão de ligase 1X contendo 1U de T4 DNA ligase. Os sistemas possuíam 10 a 20 µL de volume final, sendo incubados por 16 horas a 16°C ou 4°C. Após este período, o sistema foi transformado em células competentes de *E. coli*.

8) Preparação de células competentes e transformação bacteriana

a. Quimiocompetente (adaptado de Maranhão, 2003).

- 1) Foram inoculados 500 μ L de um pré-inóculo, feito a partir de uma colônia isolada da célula de interesse, em 50 mL de meio LB. O inóculo foi incubado a 37°C a 220 rpm até a cultura atingir uma densidade óptica a 600nm (OD_{600nm}) de 0,1 a 0,3.
- 2) O inóculo foi centrifugado a 3.000 x g por 15 min a 4°C, o sobrenadante foi desprezado. (Após essa etapa é importante que em todas as etapas subsequentes as células sejam mantidas resfriadas para evitar uma perda de eficiência).
- 3) O sedimento foi ressuspendido em 10 mL de solução de $CaCl_2$ 50mM estéril gelada, com movimentos suaves.
- 4) Foi feita uma centrifugação a 3.000 x g por 15 min a 4°C, o sobrenadante foi desprezado.
- 5) O sedimento foi ressuspendido em 1 mL de solução de $CaCl_2$ 50mM estéril gelada, com movimentos suaves.
- 6) Após incubação de 1 hora em banho de água/gelo, as células foram aliqüotadas e estas podiam ser utilizadas por um período máximo de 24 horas.
- 7) Foram incubados de 100 a 200 μ L de célula competente com o plasmídio de interesse a ser transformado em banho de água/gelo por 30 min.
- 8) O choque térmico foi realizado por meio de incubação do sistema de transformação em banho a 42°C por 3 min.
- 9) Foi adicionado imediatamente 1 mL de meio LB e o sistema foi incubado por 1 h a 37°C.
- 10) Foram semeadas quantidades variáveis do sistema de transformação em placas contendo meio LB-ágar contendo ampicilina a 150 μ g/mL. As placas foram mantidas na estufa a 37°C por 16 horas.

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

- 1) Uma colônia isolada da célula de interesse foi inoculada em 10 mL de meio SB contendo o antibiótico de interesse. Esse pré-inóculo foi mantido a 37° sob agitação de 220 rpm por 16 horas.
- 2) Foi inoculado 1 mL do pré-inóculo em 500 mL de meio SB contendo 2,5 mL da solução estoque de glicose 2M e 2,5 mL da solução estoque de Mg 2M. O inóculo foi incubado a

- 37°C a 220 rpm até a cultura atingir uma OD_{600nm} de 0,7 a 0,9.
- 3) O inóculo foi centrifugado a 3.000 x g por 20 min a 4°C, o sobrenadante foi desprezado e a célula foi mantida sempre gelada a partir desse momento.
 - 4) O sedimento foi ressuspensionado em 25 mL de glicerol 10% estéril gelado e a seguir foram adicionados mais 75 mL de glicerol 10% gelado.
 - 5) Foi feita outra centrifugação a 3.000 x g por 20 min a 4°C, repetindo a etapa anterior.
 - 6) O sedimento foi ressuspensionado em 25 mL de Glicerol 10% estéril gelado e submetido a última centrifugação a 3.000 x g por 20 min a 4°C.
 - 7) O sedimento final foi ressuspensionado em 1 a 2 mL de glicerol 10% e as células foram aliqüotadas, congeladas em banho de gelo seco com etanol e armazenadas imediatamente a -80°C.
 - 8) Para a transformação, o plasmídeo foi adicionado, já em um tubo resfriado previamente, à célula competente e imediatamente colocado na cubeta de eletroporação (BioAgency[®]) também já resfriada.
 - 9) A eletroporação foi feita seguindo os seguintes parâmetros elétricos: 2,5 kV, 25 µF e 200 Ω, no aparelho Gene Pulser com Pulser Controller da BioRad. O τ esperado nessas condições é de 4,0 a 5,0 milissegundos.
 - 10) Imediatamente após o choque a cubeta foi lavada com 3 mL de meio SOC e o meio foi recolhido para um tubo de centrifugação de 50 mL.
 - 11) Após uma incubação de 1 h a 37°C e 220 rpm, diluições da transformação foram semeadas em placas contendo ampicilina a 200 µg/mL. As placas foram mantidas na estufa a 37°C por 16 horas.

9) Sequenciamento automático de DNA e análise de sequências.

Após ter sido realizada uma análise de restrição, os plasmídios foram sequenciados utilizando o sequenciador automático MegaBACE 500 plus (Molecular Dynamics[®]). foram utilizadas de 150 a 250 ng do vetor, 5 picomoles do oligonucleotídeo apropriado e o kit “DyeEnamic ET DYE Terminator Cycle Sequencing”.

As sequências obtidas por meio do sequenciamento automático foram analisadas utilizando ferramentas de bioinformática: Phred e CAP3 disponíveis na página: www.biomol.unb.br. Depois da análise de qualidade, as sequências foram submetidas à

ferramenta de procura de alinhamentos básicos locais (BLAST, do inglês, Basic Local Alignment Search Tool, www.ncbi.nlm.nih.gov/blast) para análise de identidade com sequências já depositadas no GenBank. As sequências também foram manipuladas e analisadas com sequências, depositadas em um banco de dados pessoal, utilizando o programa BioEdit Sequence Alignment Editor (Hall, 2007).

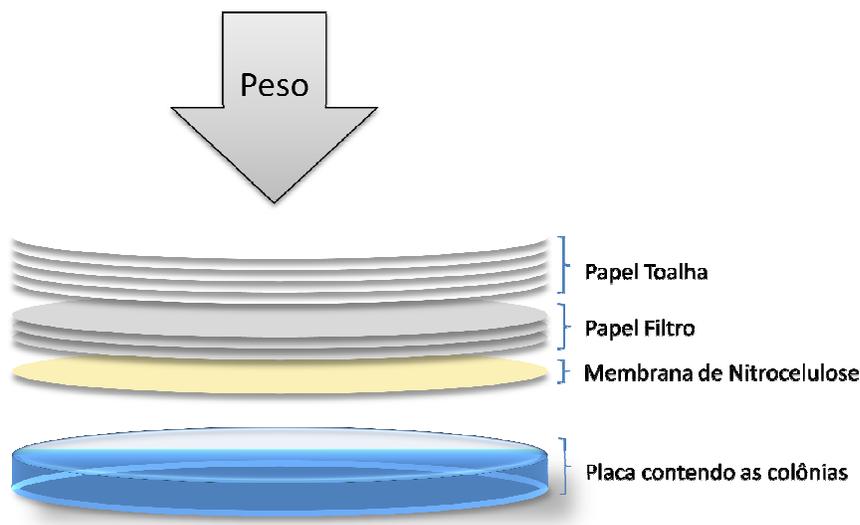
10) Transformação de *P. pastoris*

Esta é uma versão modificada do protocolo descrito por Wu e Letchworth, 2004.

- 1) Inoculou-se uma colônia da linhagem GS115 ou SMD1168 de *P. pastoris* em 10mL de meio YPD e incubou-se durante a noite no shaker 200rpm a 30°C.
- 2) Diluiu-se o pré-inóculo crescido a noite em 100mL de meio YPD para uma OD₆₀₀ inicial de 0,3. Incubou-se no shaker 200rpm a 30°C até atingir uma OD₆₀₀ de 1,3-1,5.
- 3) Centrifugou-se a cultura a 3.000x g por 10 minutos a temperatura ambiente.
- 4) Ressuspendeu-se o pellet com 8 mL do tampão de pré-tratamento (TPT). Incubou-se por 30 minutos a temperatura ambiente.
- 5) Centrifugou-se a cultura a 3.000x g por 10 minutos a 4°C.
- 6) Ressuspendeu-se o pellet com 1,5 mL de Sorbitol 1M e centrifugou-se a cultura a 3.000x g por 10 minutos.
- 7) Procedeu-se o passo seis por três vezes.
- 8) Ressuspendeu-se o pellet com sorbitol 1M deixando as células numa concentração de 10⁸⁻¹⁰.
- 9) Procedeu-se a transformação por eletroporação das células preparadas.
- 10) Incubou-se de 5 a 10µg de DNA linearizado com 80µL de células em cubeta de eletroporação (BioAgency[®]) previamente resfriada durante 5 minutos.
- 11) A eletroporação foi feita seguindo os seguintes parâmetros elétricos: 1,5 kV, 25 µF e 200 Ω, no aparelho Gene Pulser com Pulser Controller da BioRad.
- 12) Placas contendo meio MD foram semeadas com 100µL da diluição de 1:10 e 1:100 das células eletroporadas.
- 13) As placas foram incubadas em estufa a 30°C até o aparecimento de colônias.

11) Detecção de colônias produtoras por meio de *Colony Blot*

- 1) As colônias crescidas na placa MD da transformação por eletroporação foram estriadas em placas contendo meio MD e meio MM.
- 2) As placas foram incubadas em estufa a 30°C durante 48 horas. Procedia-se a adição de 200 µL de metanol 100% nas tampas das placas MM depois de 24 horas.
- 3) Após 48 horas as placas MD foram reservadas a 4°C e procedia-se a detecção das colônias produtoras por meio de *Colony Blot*.
- 4) As placas MM foram “chapadas” com um sanduíche contendo 1 membrana de nitrocelulose em contato com as colônias, 3 folhas de papel filtro e 5 folhas de papel toalha conforme o figura 14 abaixo. As placas foram incubas na estufa 37°C com um peso em cima durante 1 hora e 30 minutos.



- 5) A membrana de nitrocelulose foi lavada com PBST 1x para retirar o excesso de colônias.
- 6) A membrana foi incubada com a solução de bloqueio contendo Molico 3% durante 2 horas ou durante a noite.
- 7) Lavou-se a membrana com PBST 1x 3 vezes e incubou-se com o anticorpo primário Anti – IgG humana (Ck específico) feito em cabra na titulação de 1:3.000 durante 1 hora e 30 minutos.
- 8) Lavou-se a membrana com PBST 1x 3 vezes e incubou-se com o anticorpo secundário Anti Anti – IgG de cabra feito em coelho conjugado com fosfatase alcalina na titulação de 1:3.000 durante 1 hora e 30 minutos.
- 9) Lavou-se a membrana com PBST 1x 3 vezes e uma vez com APB.
- 10) A membrana foi revelada com NBT/BCIP.

12) Crescimento e Indução de *P. pastoris*

- 1) Inoculou-se uma colônia produtora em 5 mL de meio BMGY em falcon de 50mL novo e estéril e incubou-se durante a noite no shaker 200rpm a 30°C.
- 2) Inoculou-se 1% do pré-inóculo crescido durante a noite em 200mL de meio BMGY e incubou-se durante 18-24 horas no shaker 200rpm a 30°C.
- 3) Centrifugou-se a cultura e coletou-se o pellet e 20mL do sobrenadante foi reservado para compor o tempo 0 h de indução. Ressuspendeu-se em o pellet em meio BMMY com o inibidor PMSF na concentração final de 10mM e incubou-se durante a noite no shaker 200rpm a 30°.
- 4) Depois de 24 horas 50% da amostra (100mL) foi coletada e reservada. Com os outros 50% (100mL da amostra) procedeu-se a adição de 1% de metanol e incubou-se por mais 24 horas no shaker 200rpm a 30°.
- 5) Os cem mililitros da amostra da coleta de 24 horas foram centrifugados a 3000x g a 4°C e o sobrenadante foi filtrado em membrana de 0,45µm. O sobrenadante foi conservado a 4°C com PMSF na concentração final de 10mM e EDTA na concentração final de 5mM.
- 6) Depois de 48 horas de indução coletou-se os cem mililitros restantes por centrifugação a 3000x g a 4°C. O sobrenadante foi filtrado em membrana de 0,45µm e conservado a 4°C com PMSF na concentração final de 10mM e EDTA na concentração final de 5mM.
- 7) Com os sobrenadantes procedeu-se a detecção das proteínas recombinantes por meio de *Dot Blot e Western Blot*.

13) Detecção das proteínas por meio de *Dot Blot*

- 1) Depois da indução e filtração dos sobrenadantes dos tempos obtidos, 5µL de cada sobrenadante foi aplicado na membrana de nitrocelulose.
- 2) A membrana foi incubada com a solução de bloqueio contendo Molico 3% durante 2 horas ou durante a noite.
- 3) A membrana de nitrocelulose foi lavada com PBST para retirar o excesso de solução de bloqueio.
- 4) Incubou-se com o anticorpo primário Anti – IgG humana (Ck específico) feito em cabra na titulação de 1:3.000 durante 1 hora e 30 minutos.

- 5) Lavou-se a membrana com PBST 3 vezes e incubou-se com o anticorpo secundário Anti Anti – IgG de cabra feito em coelho conjugado com fosfatase alcalina na titulação de 1:3.000 durante 1 hora e 30 minutos.
- 6) Lavou-se a membrana com PBST 3 vezes e uma vez com APB.
- 7) A membrana foi revelada com NBT/BCIP.

14) Concentração do sobrenadante

- 1) O sobrenadante de cultura foi concentrado utilizando-se coluna da Amicon Centriprep YM-30 com capacidade de 15 mL.
- 2) A coluna contendo o sobrenadante foi submetida a centrifugação durante 30 minutos a 1500 x g a 4°C. As proteínas que tinham uma massa molecular acima de 30 kDa ficavam mantida abaixo da membrana e atravessava a membrana somente as proteínas menores.
- 3) O sobrenadante retido abaixo da coluna foi coletado e dialisado com PBS 1x. O volume final retido com esse procedimento foi de 4 mL.
- 4) Para obter um volume menor, as amostras dialisadas foram transferidas para a coluna da Amicon centricon YM-10. Essa coluna foi submetida a centrifugação por 30 minutos a 5000 x g a 4°C. foi coletado a amostra que ficava retida na membrana. O volume final obtido variava de 400 a 600µL. A utilização dessa coluna foi somente para diminuir o volume, já que não existiam mais proteínas abaixo de 10 kDa.

15) Precipitação de proteína com TCA

- 1) Os sobrenadantes foram transferidos para tubos do tipo *ependorf*. Adicionou-se TCA para uma concentração final de 10% e incubou-se no gelo por pelo menos 30 minutos.
- 2) Centrifugou-se a 13.000rpm por 15 minutos a 4°C em microcentrífuga.
- 3) Os sobrenadantes foram descartados e os sedimentos foram gentilmente lavados com 1 mL de acetona gelada. Deixava-se em repouso no gelo por pelo menos 15 minutos.
- 4) Repetia-se o passo três por mais duas vezes.
- 5) A acetona foi finalmente descartada e os tubos foram deixados em repouso por aproximadamente 15 minutos para secar o sedimento. Os sedimentos foram ressuspendidos em 50µL de tampão de amostra para SDS-PAGE e analisados em gel de poliacrilamida.

16) Análise de proteínas em gel SDS-PAGE

- 1) As amostras obtidas dos sobrenadantes e precipitadas com TCA foram analisadas por eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida.
- 2) Preparou-se o gel separador a 12% (p/v), sendo a polimerização catalisada pela adição de 0,045% (p/v) de persulfato de amônio (APS) e 0,2% (v/v) de TEMED.
- 3) Após a polimerização do gel separador, verteu-se o gel concentrador preparado na concentração de 4% (p/v), sendo a polimerização catalisada pela adição de 0,12% (p/v) de APS e 0,2% (v/v) de TEMED.
- 4) Uma vez vertido o gel concentrador, introduziu-se o pente para permitir a formação dos poços.
- 5) O gel foi acoplado no aparato de eletroforese. Antes da aplicação das amostras os poços foram lavados com tampão de corrida.
- 6) As amostras foram imediatamente fervidas durante 10 minutos a 100°C antes da aplicação.
- 7) Após a corrida do gel a 25mA, o mesmo foi submetido a transferência para a realização do experimento de detecção por meio de *Western Blot*.

17) Detecção das proteínas por meio de *Western Blot*

- 1) Após a corrida, o gel de poliacrilamida foi transferido para membrana de nitrocelulose utilizando-se o sistema de transferência semi-seca com eletrodos grafite (Pharmacia-LKB).
- 2) Conforme instruções do fabricante, fazia-se um “sanduíche” de papéis filtro, previamente embebidos com o tampão de transferência e tendo internamente a membrana e o gel.
- 3) O sanduíche foi montado entre os dois eletrodos de grafite e foi submetido a uma corrente elétrica de 0,8mA/cm² de membrana por 1 hora e 45 minutos.
- 4) A membrana contendo as proteínas transferidas foi bloqueada em solução de molico 5% durante 1 hora ou por 16 a 20 horas em temperatura ambiente sob agitação branda.
- 5) Lavou-se a membrana 3 vezes com PBST para retirar o excesso da solução de bloqueio.
- 8) Incubou-se a membrana com o anticorpo primário Anti – IgG humana (Ck específico) feito em cabra na titulação de 1:3000 durante 1 hora e 30 minutos.

- 9) Lavou-se a membrana com PBST 3 vezes e incubou-se com o anticorpo secundário Anti Anti – IgG de cabra feito em coelho conjugado com fosfatase alcalina na titulação de 1:3000 durante 1 hora e 30 minutos.
- 10) Lavou-se a membrana com PBST 3 vezes e uma vez com APB.
- 11) A membrana foi revelada com NBT/BCIP.

Resultado e Discussão

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Amplificação por PCR dos fragmentos correspondentes aos Fabs selecionados

Os Fabs utilizados neste trabalho foram selecionados por Albuquerque (2006) pela sua capacidade ligante a um peptídeo sintético correspondente à porção extra-membrana (NHR) da gp 41 (resíduos 576 a 619). Esses Fabs foram originados de uma biblioteca construída por Dantas-Barbosa e colaboradores (2005). Essa biblioteca combinatória foi construída misturando de maneira aleatória os segmentos variáveis codificadores das cadeias V_H e V_L do repertório de 11 pacientes de osteosarcoma. Para a construção da biblioteca os genes amplificados foram fusionados aos domínios constantes (V_H-C_{H1} e V_L-C_{κ}) e clonados no vetor pComb 3X (Scott and Barbas, 2001).

Devido as diferenças estruturais entre o vetor bacteriano pComb 3X e o vetor de expressão em levedura pPIgLe Fab foi necessária a realização de ampliações por PCR dos segmentos de DNA codificadores das cadeias V_H e V_L dos cinco Fabs selecionados contra o peptídeo sintético da gp41. Esses Fabs foram nomeados de 5H7, 5B8, 4C1, 4G1 e 4B6. As diferenças estruturais consistiam na ordem dos segmentos gênicos codificadores das cadeias pesadas e leves nesses dois plasmídios: $V_L-C_{\kappa}-V_H-C_{H1}$, no bacteriano e $V_H-C_{H1}-V_L-C_{\kappa}$ no de levedura, além de sítios de restrição distintos (Figura 14).

Para resolver essas diferenças estruturais, iniciadores foram desenhados para amplificar os segmentos gênicos codificadores das cadeias variáveis leves e pesadas (V_L e V_H) e da cadeia constante leve (C_{κ}), inserindo os sítios de restrição para permitir a subclonagem no vetor de expressão de *P. pastoris*. Os sítios de restrição para as endonucleases *Xma* I e *Xba* I foram inseridos nas extremidades 5' e 3' respectivamente para os segmentos gênicos codificadores da cadeia variável pesada (V_H). Para a cadeia variável leve (V_L) foram inseridos sítios de restrição para as endonucleases *Bgl* II e *Xho* I nas extremidades 5' e 3' respectivamente. Para a cadeia constante leve C_{κ} , os sítios de *Xho* I e *EcoR* I foram inseridos para as mesmas extremidades. As sequências desses oligonucleotídeos estão listadas na Tabela 4. Posteriormente, esses fragmentos foram obtidos por PCR e foram clonados no vetor comercial pGEM-T Easy (Promega) e em seguida, clonados no vetor de expressão pPIgLe Fab.

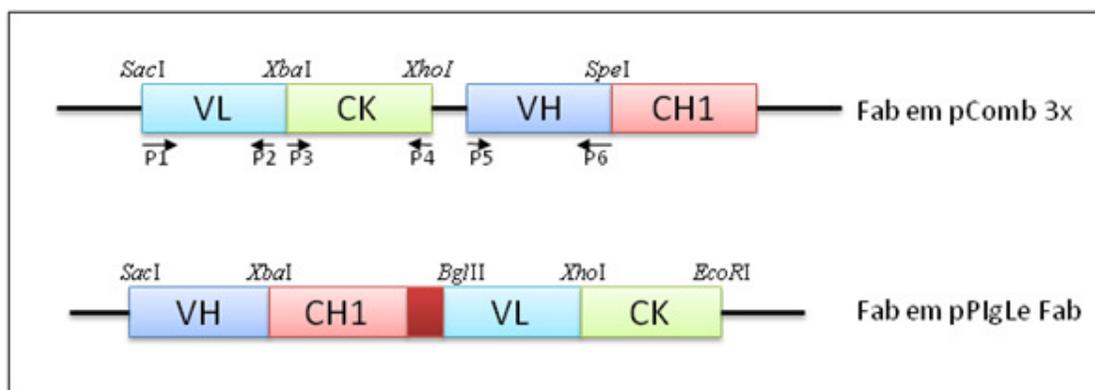


Figura 14 – Diferenças estruturais entre os vetores originais. Ordem dos segmentos gênicos codificadores das cadeias pesadas e leves no vetor pComb 3x (A) e no vetor pIgLLe Fab (B). P1, P2, P3, P4, P5 e P6 representam os iniciadores (Tabela 3) e posição de anelamento. Esses iniciadores foram desenhados a fim de introduzir os sítios reconhecidos pelas endonucleases de restrição que possibilitam as subclonagens no vetor pIgLLe Fab. Os sítios de restrição introduzidos nas regiões codificadoras das cadeias de ambos os Fabs estão demonstrados.

Tabela 4 – Sequências dos iniciadores desenhados para amplificação das cadeias variáveis leve e pesada (V_L e V_H) e da cadeia constante leve (C_K).

Iniciador	Cadeia	Sítios	Sequência
P1	V_L 5'	<i>Bgl</i> II	5' GCTACCGTGGCCCAGGCGGCAGATCTGCTC 3'
P2	V_L 3'	<i>Xho</i> I	5' GAAGACAGCTCGAGGGCAGCCACAGT 3'
P3	C_K 5'	<i>Xho</i> I	5' GTGGCTGCCCTCGAGCCATCTGTC 3'
P4	C_K 3'	<i>Eco</i> R I	5' TTTGAATTCCTCCTAATGGTGGTGATGGTGATGACACTCTCCCCTG 3'
P5	V_H 5'	<i>Xma</i> I	5' GTCGCCCAAGCCCGGGCCGAG 3'
P6	V_H 3'	<i>Xba</i> I	5' GGAAGACCGATGGGCCCTTTCTAGAGGC 3'

Os segmentos gênicos foram amplificados e o tamanho do fragmento de DNA foi analisado por eletroforese. As bandas amplificadas apresentaram o tamanho esperado para cada segmento: aproximadamente 350 pb para as cadeias leves e 400 pb para as cadeias pesadas. As cadeias V_H e V_L dos Fabs 4C1, 5H7 e 5B8 foram corretamente amplificadas por PCR, porém, as cadeias de 4G1 e 4B6 não foram obtidas, conforme demonstrada na Figura 15.

O segmento gênico codificador da cadeia constante leve (C_K), comum a todos os Fabs, foi amplificado usando o DNA plasmidial de pComb3x 5B8 como molde. Esse segmento foi amplificado inserindo uma sequência na extremidade 3' que codificava seis resíduos do aminoácido histina denominada de His Tag. Essa cauda possibilita a purificação dos Fabs do sobrenadante de expressão de *P. pastoris* em coluna de níquel, por exemplo. A cadeia C_K foi

corretamente amplificada por PCR (Figura 15) conforme descrito no item 6 de materiais e métodos.

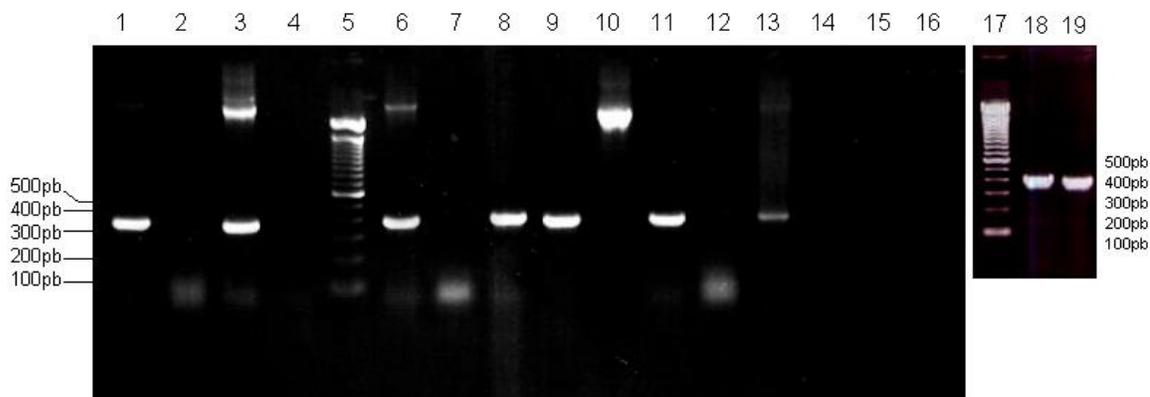


Figura 15 – Obtenção por PCR dos segmentos gênicos codificadores dos domínios variáveis e do domínio C κ dos FABS selecionados. Amostras: 1) V_L do Fab 5H7; 2) V_L do Fab 4G1; 3) V_L do Fab 5B8; 4) V_L de 4B6; 5 e 17) Marcador de Massa Molecular 100 pb (Invitrogen); 6) V_L do Fab de 4C1; 7) V_H do Fab 4B6; 8) V_H do Fab 5H7; 9) V_H do Fab 5B8; 10) V_H do Fab 4G1; 11) V_H do Fab 4C1. 12) Controle sem DNA; 13 e 14) Controles sem iniciador 3' e 5' de VL respectivamente 15 e 16) Controles sem iniciador 3' e 5' de V_H respectivamente. 18 e 19) Cadeia C κ .

Os fragmentos gênicos obtidos por PCR foram clonados no vetor comercial da Promega pGEM-T Easy. Os clones bacterianos recombinantes de pGEM-T Easy foram selecionados positivamente por meio da digestão com a enzima de restrição *EcoR* I. O vetor pGEM-T Easy apresenta sítio para *EcoR* I margeando ambas as extremidades do sítio de clonagem de fragmentos de PCR. Assim, o perfil esperado para as clonagens positivas é a liberação de um fragmento de aproximadamente 350 pb e 400 pb para as cadeias leves e pesadas, respectivamente. Foi observada a liberação do fragmento de aproximadamente 400 pb que correspondia aos fragmentos de DNA das cadeias V_H dos clones 5B8, 5H7 e 4C1; e a liberação de aproximadamente 350 pb que correspondia aos fragmentos de DNA das cadeias V_L de 5B8 e 5H7 e da cadeia C κ de 5B8. A digestão com *EcoR* I de pGEM-T Easy contendo o fragmento de DNA da cadeia V_L de 4C1 liberou dois fragmentos que somam 350 pb. Foi confirmado por meio de sequenciamento que o fragmento V_L contém internamente o sítio de *EcoR* I, justificando esse perfil diferenciado. Com todos esses perfis, foi confirmado o sucesso das clonagens desses fragmentos obtidos por PCR no vetor pGEM-T Easy.

As amostras de DNA dos clones obtidos na clonagem em pGEM-T Easy foram preparadas e sequenciadas com iniciador específico para esse vetor. As sequências foram analisadas em BLASTx para verificar se estas correspondiam a sequências de anticorpos.

Posteriormente elas foram comparadas com as sequências conhecidas desses Fabs em pComb 3x. Todas as sequências dos segmentos codificadores de V_H e V_L e de C_k estavam corretas conforme mostra a Tabela 5 .

Tabela 5 – Sequência de aminoácidos deduzidas correspondente as cadeias V_H e V_L dos Fabs 4C1, 5H7 e 5B8, e da cadeia C_k de 5B8

Sequências de aminoácidos das cadeias pesadas (V_H)				
	FR1	CDR1	FR2	CDR2
4C1	VQLVESGGGLVQPGGSLRLSCASGFTFS	IYAMH	WVRQAPGKGLGYVS	AISSNGVSTYYADSVKG
5H7	VQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGFTFS	GSGLH	WVRQASGKLEWVG	RIKTKANNYATAYAVSVKG
5B8	VQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS	SYEMN	WVRQAPGKLEWVS	YISSSGSTIYYADSVKG
	FR3	CDR3	FR4	
4C1	RFTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCAR	DPRGGNIFYD	WGQGLVTVSSA	
5H7	RFTISRDDSKNTAYLQLNSLKTEDTAVYYCAT	RGDLTSGWHY	WGQGLVTVSSA	
5B8	RFTISRDNKNSVYLQLNSLRAEDTAVYYCAR	EMWGPPEY	WGPGLVTVSSA	
Sequências de aminoácidos das cadeias leves (V_L)				
	FR1	CDR1	FR2	CDR2
4C1	LLVMTQSPSLPVTTPGPASISC	RSSQALIHIDGNTYLS	WYQQRPGQSPRRLIY	KVSIRDS
5H7	LLVMTQSPSLPVTLPQPASISC	RSSQSLVHSDGNVYLS	WFQQRPGQSPRRLIY	KVSNRAS
5B8	LLTQSPGTLSPGERATLSC	RASHSVSRAYLA	WYQKPGQAPRLLIY	GTSSRAT
	FR3	CDR3	FR4	
4C1	GVPDRFSGSGSTEFTLKISRVEAEDVAVYYC	WQGSHPWPWT	FGQGTVEINRTVAAL	
5H7	GVPDRFSGSGSDFTLKISRVEAEDVGVYYC	MQGSHPWPWT	FGQGTRVEIKRTVAAL	
5B8	GIPDRFSGSGSDFTLISRLEPEDFAVYYC	QQYGGSPW	FGQGTKVELKRTVAAL	
Sequências de aminoácidos da cadeias constante leve (C_k)				
5B8	EPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNFFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSLPVTKSFNRGECHEHHHHH			

2. Construção do vetor de expressão pPIgLe Fab

a) Clonagem do Fab de referência, anti-Z-DNA (Burtet *et al*, 2007) no vetor pPIgLe.

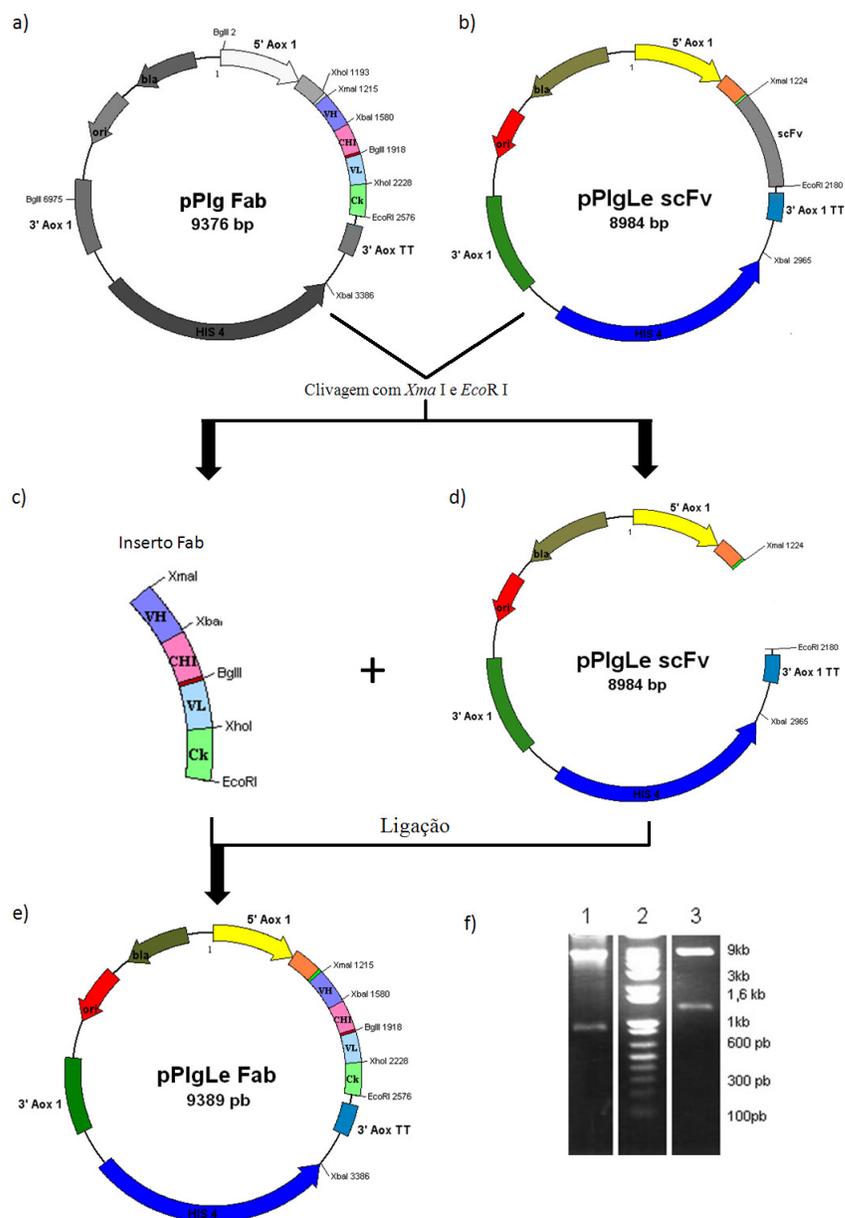


Figura 16 – Obtenção do vetor pPIgLe Fab. a) Vetor original de pPIgFab. b) Vetor original pPIgLe scFV. c) Separação do Fab por meio da clivagem do vetor pPIg Fab com as enzimas de restrição *Xma* I e *EcoR* I. d) Separação do vetor pPIg Le por meio da clivagem do vetor pPIgLe scFv com as enzimas de restrição *Xma* I e *EcoR* I. e) Vetor pPIgLe Fab originado da ligação do Fab no vetor pPIgLe. f) Digestão dos vetores pPIgLe scFv e pPIg Fab com *EcoR* I e *Xma* I – Amostra 1, pPIgLe scFv; 3, pPIg Fab; 2, Marcador de Massa Molecular 1 kb Plus (Invitrogen) (Regiões em cinza dos desenhos são as regiões que não foram utilizadas na clonagem).

Essa clonagem foi realizada por meio da clivagem dos vetores pPIgLe scFv e pPIg Fab com as enzimas de restrição *Xma* I e *Eco*R I. O vetor pPIgLe scFv liberou um fragmento de aproximadamente 900 pb que correspondia ao segmento scFv. O vetor pPIg Fab liberou um fragmento de aproximadamente 1,4 kb que correspondia ao segmento Fab inteiro como demonstrado na Figura 16. Após eletroforese em gel de agarose, o fragmento de DNA correspondente ao inserto Fab foi eluído do gel, purificado e a seguir clonado no vetor empregando a razão molar de 1:5 (vetor:inserto). O sistema de ligação foi transformado e os clones foram posteriormente analisados. Para verificar os clones positivos foram realizadas digestões com *Xho* I e com *Eco*R I juntamente com *Xma* I. O DNA dos clones positivos foi linearizado quando tratados com *Xho* I, pois o inserto Fab possui um sítio de *Xho* I internamente mas, o inserto scFv não possui. A digestão com *Eco*R I e *Xma* I foi realizada para confirmar o tamanho do inserto. O inserto liberado correspondeu ao tamanho do inserto do Fab de aproximadamente 1,4 kb (Figura 17). O segmento scFv possui um tamanho aproximado de 900 pb.

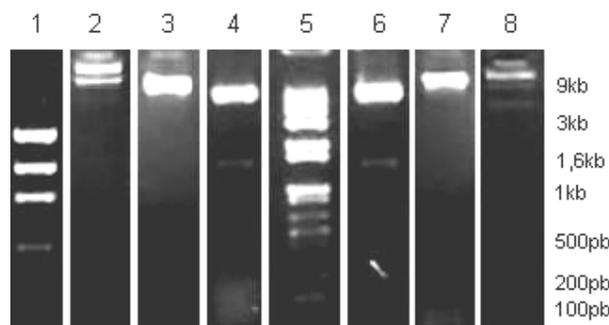


Figura 17 – Construção do vetor pPIgLe Fab. Amostras 2, 3 e 4 correspondem ao clone 1 obtido, e as amostras 6, 7 e 8 correspondem ao clone 2. As amostras 2 e 8 corresponde aos plasmídios intactos, 3 e 7 correspondem aos plasmídios digeridos com *Xho* I. Amostras 4 e 6 correspondem aos plasmídios digeridos com *Xma* I e *Eco*R I. Amostras 1 e 5 correspondem aos Marcadores de Massa Molecular High Mass e 1 Kb Plus (Invitrogen) respectivamente

b) Eliminação do sítio de *Xba* I na posição 3386 do vetor pPIgLe Fab. O vetor pPIgLe Fab ainda possuía o sítio de restrição *Xba* I que impedia a sub-clonagem das cadeias pesadas (VH), conseqüentemente foi necessária a eliminação do mesmo. A estratégia utilizada para esta clonagem foi a seguinte. Foram desenhados iniciadores (Tabela 6) para amplificar a região de 2965 a 4110 (do sítio de *Xba* I a *Sal* I) do vetor pPIgLe scFv.

Tabela 6 – Iniciadores utilizados para eliminação do sítio de *Xba* I

Iniciador	Tipo	Sequência
P7	5'	5' GCAACTAGTCCTTCAACAGCA 3'
P8	3'	5' CCAATTGTCGACAATGTTCGT 3'

O oligonucleotídeo da extremidade 5' que anelou na posição 2965 inseriu um sítio de *Spe* I substituindo o sítio de *Xba* I. O iniciador da extremidade 3' manteve o sítio de *Sal* I após a amplificação. Após a checagem da amplificação, os produtos de PCR foram clonados no vetor comercial da Promega pGEM-T Easy (Figura 18). O DNA dos clones foram digeridos com *EcoR* I, para confirmação dessa subclonagem, o que foi visualizado pela liberação de um fragmento de DNA de aproximadamente 1,1 kb.

Posteriormente, o vetor pGEM-T Easy (HIS4 – *Spe* I/*Sal* I) de 4,1 kb foi linearizado com *Spe* I e o vetor pPIgLe scFv foi digerido com *Xba* I para liberar um fragmento de 1,4 kb. Este fragmento foi ligado ao vetor pGEM-T Easy linear. Com essa ligação ambos os sítios de *Xba* I e *Spe* I não foram reconstituídos (Figura 18). Para checar se a clonagem ocorreu foram realizadas digestões com *Bgl* II. Somente os clones que linearizaram possuíam o inserto.

Para finalizar a estratégia de eliminação do sítio de *Xba* I, o vetor pGemTEasy (HIS4-Aox-PtA-VL-L) e o vetor pPIgLe Fab foram digeridos *Sal* I e *EcoR* I. O fragmento de DNA do vetor pGEM-T Easy foi clonado no vetor pPIgLe Fab. Com essa clonagem o fragmento de pPIgLe Fab que possui o sítio de *Xba* I foi substituído pelo fragmento idêntico porém com esse sítio eliminado. Com essa clonagem foi então obtido o vetor pPIgLe Fab sem o sítio de *Xba* I na posição 3386. Para confirmar essa clonagem foram realizadas digestões com *EcoR* I e com *Xba* I. O perfil da digestão com *Xba* I foi o mesmo que o do vetor intacto. Embora haja outro sítio de *Xba* I dentro do Fab do vetor pPIgLe Fab, este não foi clivado por causa da metilação na região ao lado do sítio de *Xba* I. O perfil da digestão com *EcoR* I foi de DNA linearizado com o tamanho aproximado de 9 kb (Figura 19). Essa digestão foi realizada apenas para checar o tamanho do vetor e ter certeza de que não foi o vetor pGEM-T Easy recuperado.

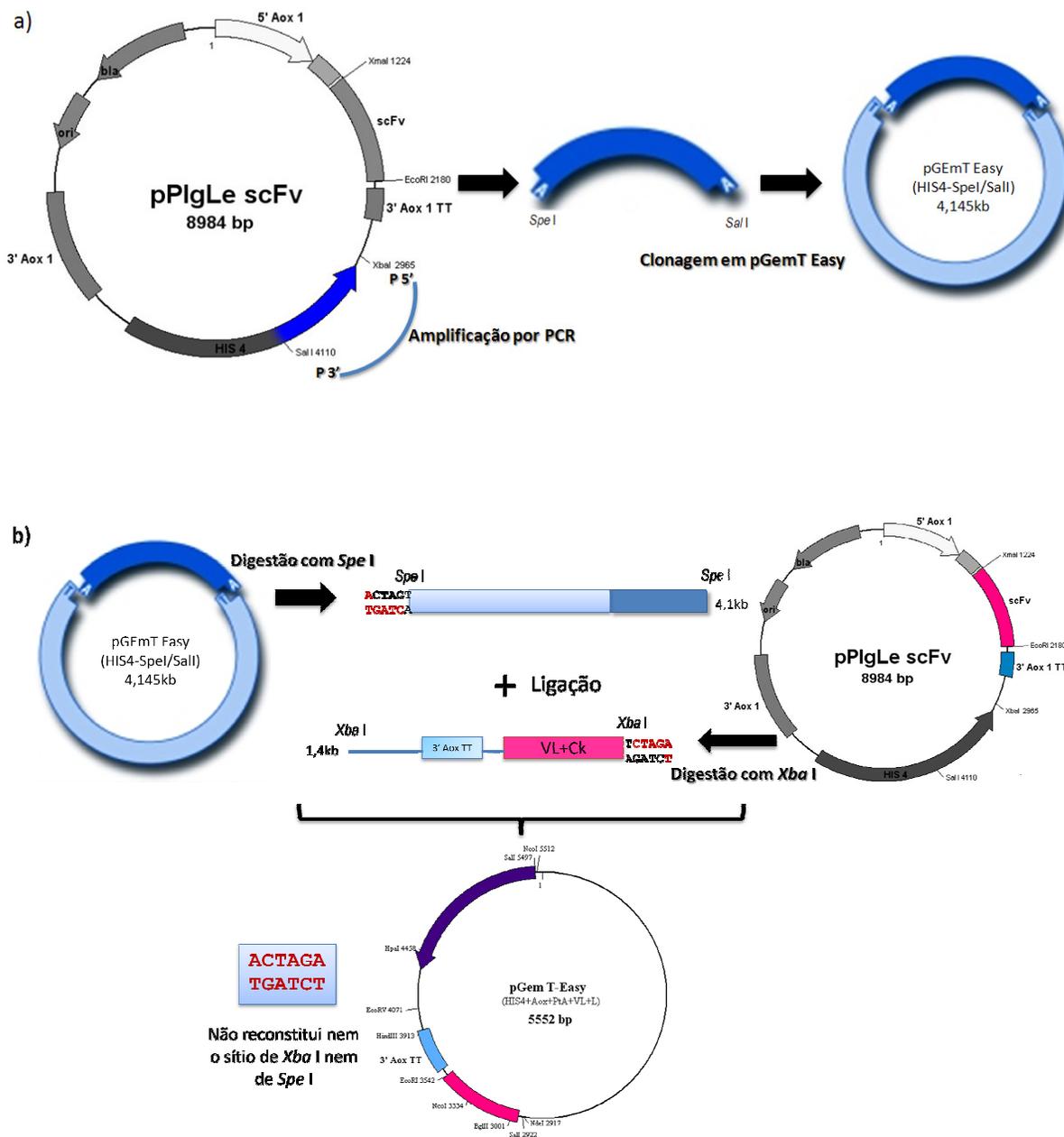


Figura 18 – Estratégia para eliminação do sítio de *Xba* I – a): Desenho esquemático da região amplificada por PCR utilizando iniciadores 5' (P5' – inserindo sítio de *Spe* I no lugar de *Xba* I) e 3' (P3' – mantendo sítio de *Sal* I). O fragmento de 1,1 kb foi clonado em pGEM-T Easy. (Regiões em cinza dos desenhos são as regiões que não foram utilizadas na clonagem). b) O vetor pGem-T Easy (HIS4 – *Spe* I/*Sal* I) foi linearizado com *Spe* I e o vetor pPIgLe scFv foi clivado com *Xba* I. O fragmento de pPIgLe scFv foi clonado ao vetor pGEM-T Easy (HIS4 – *Spe* I/*Sal* I) linearizado e consequentemente não foi reconstituído ambos os sítios de *Spe* I e *Xba* I. O vetor resultante possui os seguintes fragmentos gênicos HIS4-Aox-PtA-VL-L. (Regiões em cinza dos desenhos são as regiões que não foram utilizadas na clonagem)

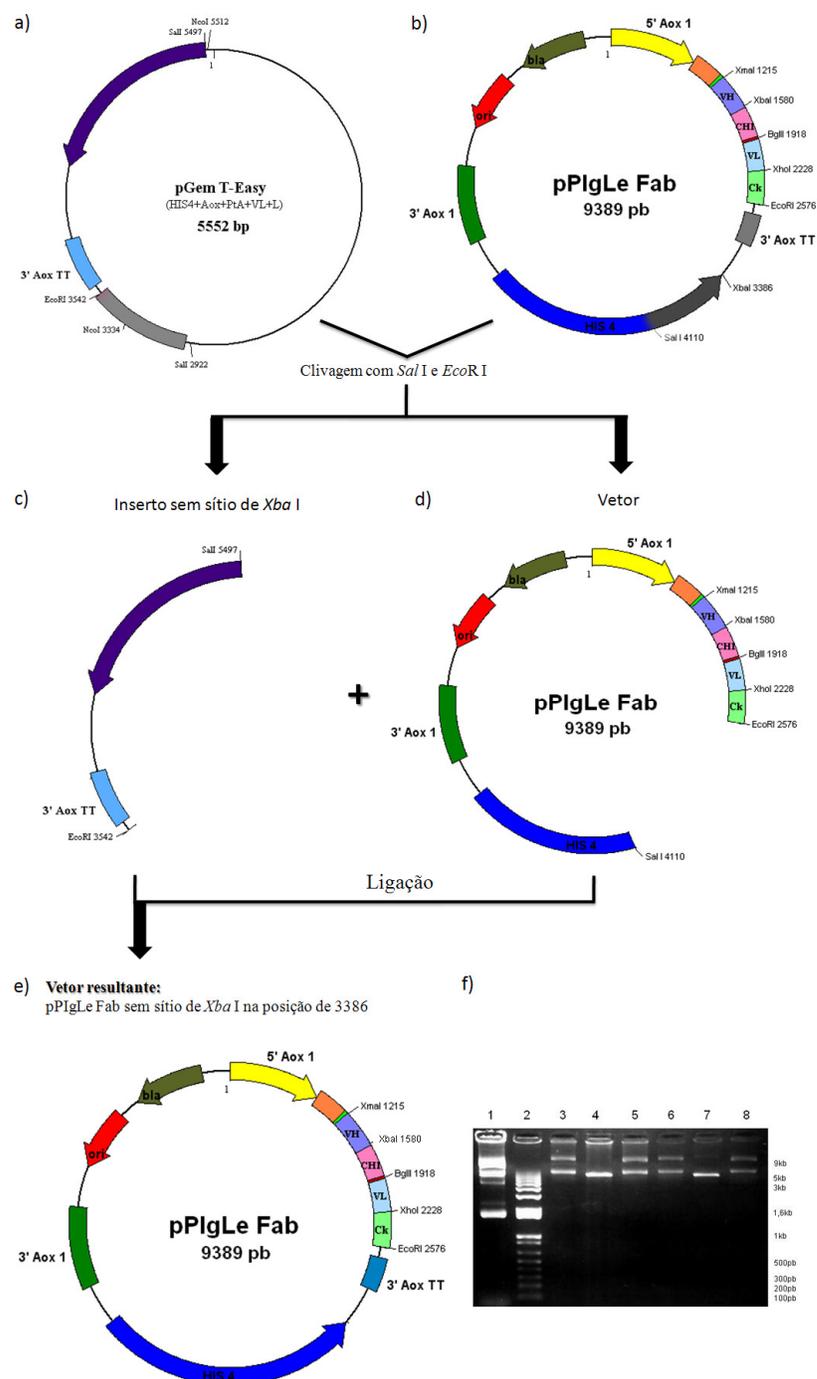


Figura 19 – Estratégia para eliminação do sítio de *Xba* I na posição 3386 – Os vetores pGEM-T Easy (HIS4-Aox-PtA-VL-L) (a) e pPIgLe Fab (b) foram digeridos com *Sal* I e *Eco* R I. O inserto de pGEM-T Easy (c) e o vetor pPIgLe Fab (d) foram ligados. O vetor resultante dessa clonagem foi o vetor pPIgLe Fab sem o sítio de *Xba* I na posição 3386 (e). Essa clonagem foi checada por meio da digestão com *Eco* R I e *Xba* I (f). Amostras: 1, vetor pPIgLe Fab intacto. 3, 4 e 5, Clone 1 intacto, digerido com *Eco* R I e digerido com *Xba* I respectivamente. 6, 7 e 8, Clone 2 intacto, digerido com *Eco* R I e digerido com *Xba* I respectivamente. (Regiões em cinza dos desenhos são as regiões que não foram utilizadas na clonagem). Amostra 2, Marcador de massa Molecular 1 kb Plus (Invitrogen)

c) **Eliminação do sítio de metilação na região do sítio de *Xba* I (posição 1580) do vetor pPIgLe Fab.** O vetor pPIgLe Fab ainda possuía um impedimento para a subclonagem do segmento gênico da cadeia pesada V_H - um sítio de metilação na posição 1580, correspondente ao sítio reconhecido por *Xba* I (início da região codificadora do domínio C_{H1}) que seria utilizado para as subclonagens dos segmentos gênicos correspondente aos domínios V_H . Por meio de Sequenciamento esse sítio foi confirmado. As metiltransferases de DNA transferem um grupo metil de S-adenosilmetionina para outros resíduos de Adenina ou Citosina. Elas são encontradas em uma larga variedade de procariotos e eucariotos. Quando a metilação ocorre dentro de um sítio de restrição reconhecido por determinada endonuclease, a clivagem desse sítio pode ser bloqueada dependendo da enzima de restrição. Em procariotos, as metiltransferase têm sido freqüentemente identificadas como elementos de sistemas de modificação ou restrição que agem para proteger o DNA do hospedeiro de clivagem por endonuclease de restrição específica (Marinus e Morris, 1973). A maioria das linhagens de *E. coli* de laboratório contém três metilases de DNA sítio-específica: a Dam metilase, a Dcm metilase e a EcoKI metilase.

Para resolver esse problema, dois iniciadores foram desenhados para amplificar a cadeia $C_{H1}Kex$ inteira do pPIgLe Fab. O iniciador 5' anelava na extremidade 5' de $C_{H1}Kex$ onde encontrava-se o sítio de metilação. Este oligonucleotídeo modificou a sequência passível de metilação para TCTAGAGC, preservando o sítio de *Xba* I e a sequência codificadora do domínio C_{H1} (Tabela 7).

Tabela 7 – Iniciadores utilizados para amplificação da sequência codificadora da cadeia constante pesada (C_{H1}).

Iniciador	Tipo	Sequência
P9	5'	5' GTCTCCTCTAGAGCCTCCACCAAG 3'
P10	3'	5' TCGGTCATCTGGAGATCTGGAGCAC 3'

O fragmento obtido por PCR possuía o tamanho esperado de 400 pb. Esse fragmento de DNA foi clonado em pGEM-T Easy e sua presença foi comprovada por meio da digestão com *EcoR* I (Figura 20). Todos os clones liberaram um fragmento de aproximadamente 400 pb. Amostras de DNA dos clones positivos foram analisados por sequenciamento e o clone 3 que possuía a sequência correta (Figura 21) foi utilizado nas clonagens seguintes.

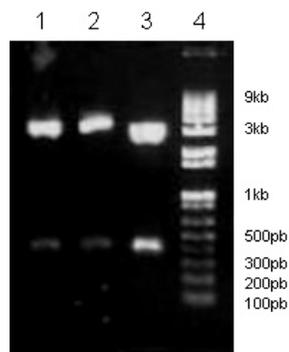


Figura 20 – Clonagem do fragmento CH1Kex no vetor pGemT Easy. Digestão com *EcoR* I. Amostra 1, 2 e 3, clones 1, 2 e 3 respectivamente clivados com *EcoR* I. Amostra 4, Marcador de Massa Molecular 1 kb Plus (Invitrogen).



Figura 21 – Análise dos clones contendo a região codificadora do domínio CH1Kex reamplificada. Sequência de nucleotídeo em amarelo corresponde a região de anelamento do iniciador, em verde, as regiões que apresentam os sítios de restrição *Xba* I e *Bgl* II. A sequência GC em negrito ao lado do sítio de restrição de *Xba* I é a sequência modificada com o iniciador 5' desenhado (Sequência gerada no programa BioEdit).

O segmento gênico C_{H1} Kex com a sequência passível de metilação modificada não pôde ser clonada diretamente no vetor pPIgLe Fab, uma vez que essa clonagem deveria ser realizada por meio de digestões com as enzimas *Xba* I e *Bgl* II. O sítio de *Xba* I do vetor pPIgLe Fab não era passível de clivagem devido ao sítio de metilação. Desta forma, para possibilitar a clonagem da cadeia C_{H1} Kex (sem o sítio de metilação) no vetor pPIgLe Fab foi necessária a criação do vetor denominado de Intermediário I. Esse vetor foi construído utilizando o vetor pIgl6 e o vetor pPIgLe Fab conforme a Figura 22.

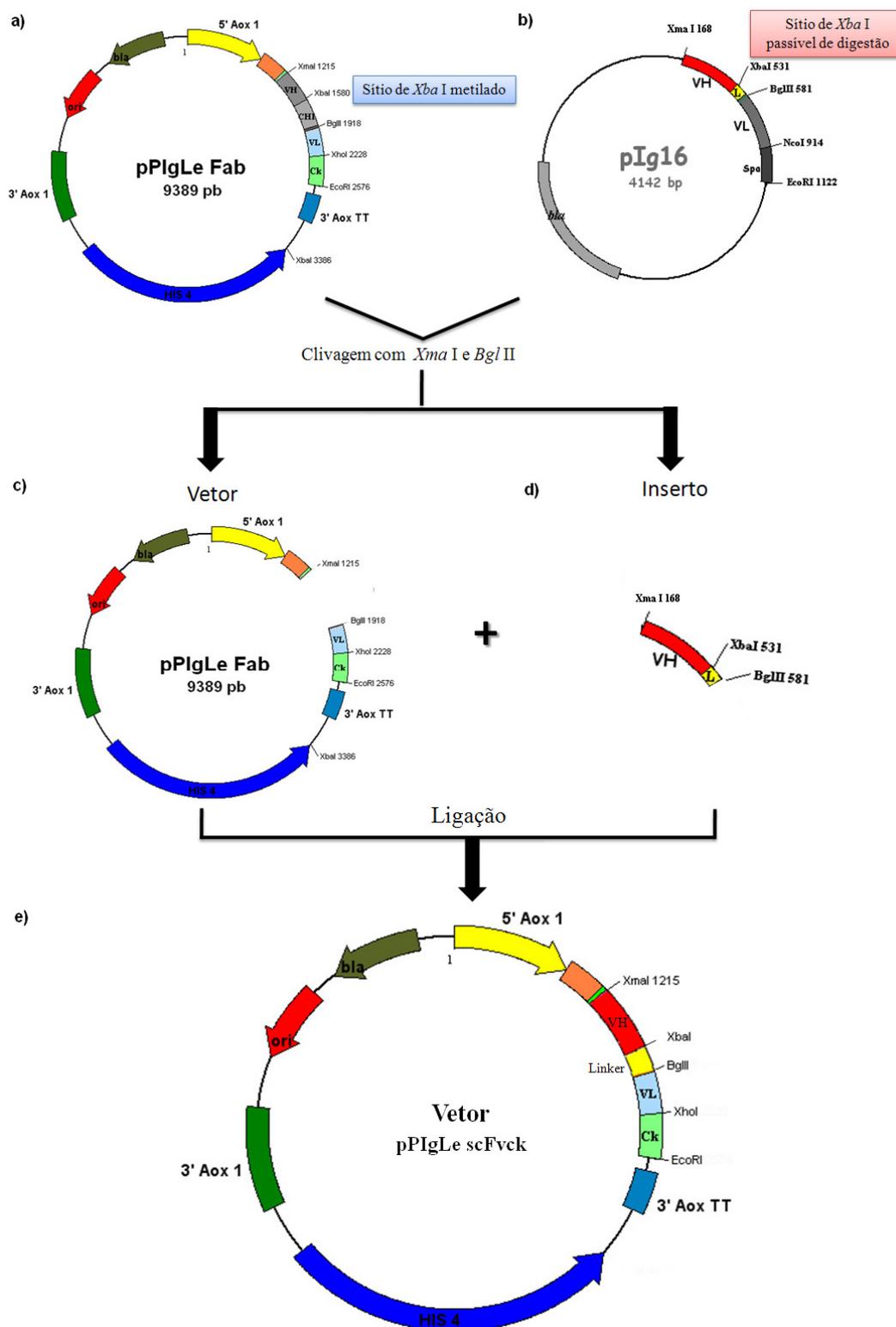


Figura 22 – Eliminação do sítio passível de metilação (*Xba* I) – Os vetores pPIgLe Fab (a) e pIg16 (b) foram clivados com as enzimas *Xma* I e *Bgl* II. O vetor pPIgLe Fab (c) foi ligado ao inserto VH+Linker (c) dando origem ao vetor pPIgLe scFvck. (Regiões em cinza dos desenhos são as regiões que não foram utilizadas na clonagem).

O vetor pIg16 contém o seguinte segmento gênico: V_H-Linker-V_L-Proteína A. No início do segmento do V_H existe o sítio de *Xma* I, entre o V_H e o *linker*, *Xba* I e no final do *linker*, antecedendo a região codificadora de VL, *Bgl* II. O vetor pIg16 e pPIgLe Fab foram digeridos com *Xma* I e *Bgl* II. O inserto de pIg16 que correspondia ao V_H e Linker de aproximadamente 400 pb foi clonado em substituição às regiões dos domínios V_H e C_H1Kex do vetor pPIgLe Fab por meio da ligação do inserto com este vetor. Os clones positivos desta clonagem linearizam com a digestão de *Xba* I. Dos clones obtidos apenas os clones 4, 5 e 6 foram confirmados. O Clone 4 foi utilizado para as clonagens seguintes. Embora os clones 1 e 2 linearizaram com a digestão de *Xba* I, o tamanho desses vetores não corresponderam ao tamanho do vetor pPIgLe Fab que é de aproximadamente 9 kb. Provavelmente, esse vetores é o próprio vetor pIg16 recuperado, já que este possui um tamanho de aproximadamente 4 kb e lineariza com *Xba* I (Figura 23).

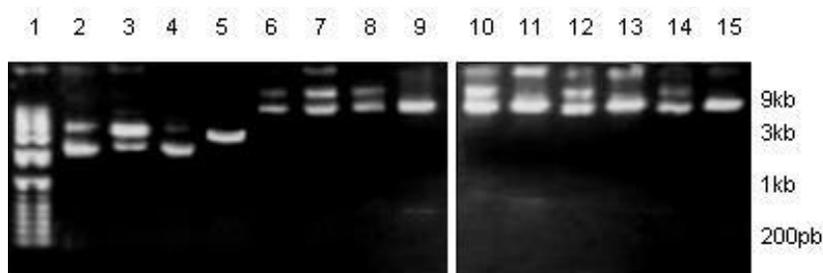


Figura 23 – Obtenção do Vetor pPIgLe scFvck. Amostra 1, Marcador de Massa Molecular 1 kb Plus (Invitrogen). Amostras pares, DNA de diferentes plasmídios intactos, amostras ímpares, os mesmos plasmídios clivados com *Xba* I.

Depois de obtido o Vetor pPIgLe scFvck foi possível a subclonagem da cadeia C_H1Kex sem o sítio passível de metilação clonado em pGEM-T Easy. Para isto, ambos os vetores foram digeridos com *Xba* I e *Bgl* II. O fragmento de 400 pb que correspondia a C_H1Kex foi posteriormente ligado no Vetor pPIgLe scFvck. Após a clonagem, foi feita a verificação dos clones positivos. Foi realizada a digestão com *Xba* I e *Xho* I. Os clones positivos liberaram um fragmento de aproximadamente 700 pb que correspondia aos segmentos gênicos de C_H1Kex e VL juntos. Os clones negativos liberaram um fragmento de aproximadamente 400 pb correspondendo aos segmentos gênicos Linker e V_L juntos (Figura 24). Com essa clonagem, o vetor pPIgLe Fab estava pronto para a realização das subclonagens dos segmentos gênicos de V_H, V_L e C_K dos Fabs 5B8, 4C1 e 5H7 selecionados.

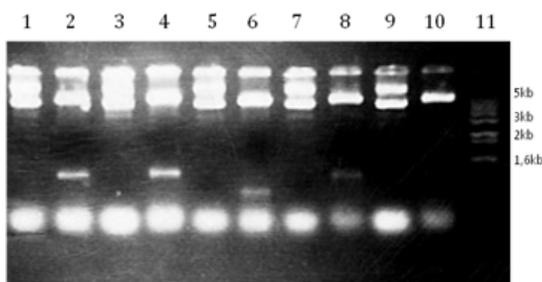


Figura 24 – Obtenção do vetor pIgLLe Fab sem sítio passível de metilação. Amostras ímpares, DNA de diferentes plasmídios intactos, amostras pares, os mesmos plasmídios clivados com *Xba* I e *Xho* I. Amostra 11, Marcador de Massa Molecular 1 kb Plus (Invitrogen).

3. Sub-clonagem dos fragmentos codificadores de V_H , V_L e C_K no vetor pIgLLe Fab (sem sítio de metilação e sem sítio de *Xba* I na posição 2695)

a. Subclonagem dos segmentos gênicos codificadores dos domínios C_K e V_L : O primeiro segmento gênico clonado foi o codificador da cadeia leve constante (C_K) por ser comum aos três Fabs obtidos. Essa clonagem não foi conseguida diretamente no vetor pIgLLe Fab, por não haver possibilidade de comprovar a clonagem, uma vez que o segmento de C_K com a histag substituiria outro segmento C_K idêntico, porém, sem histag. Dessa forma foi necessária a preparação de um vetor denominado de pIg16 scFvck conforme Figura 25. Esse vetor foi montado por meio da digestão de pGEM-T Easy com C_K e pIg16 com *Nco* I e *Sal* I. O fragmento liberado por pGEM-T Easy foi clonado então no vetor pIg16. Esse fragmento continha não apenas o segmento gênico da cadeia C_K com HIS TAG, mas também algumas sequências do vetor pGEM-T Easy. Dessa forma a clonagem pôde ser confirmada utilizando-se enzimas cujos sítios de restrição estavam contidos no pequeno fragmento de pGEM-T Easy clonado.

A análise dos clones recombinantes foi realizada pela digestão com *Not* I. E para comprovar que realmente esse fragmento tinha sido clonado em pIg16, e não era o vetor pGEM-T Easy que tinha sido recuperado, foi feita digestão com *Bgl* II. A digestão com *Not* I liberou um fragmento que correspondia a cadeia C_K (~350 pb). E a digestão com *Bgl* II linearizou o vetor, comprovando que de fato era o vetor pIg16 e não pGEM-T Easy recuperado (Figura 25-f). O vetor resultante dessa clonagem foi denominado de vetor pIg16 scFvck.

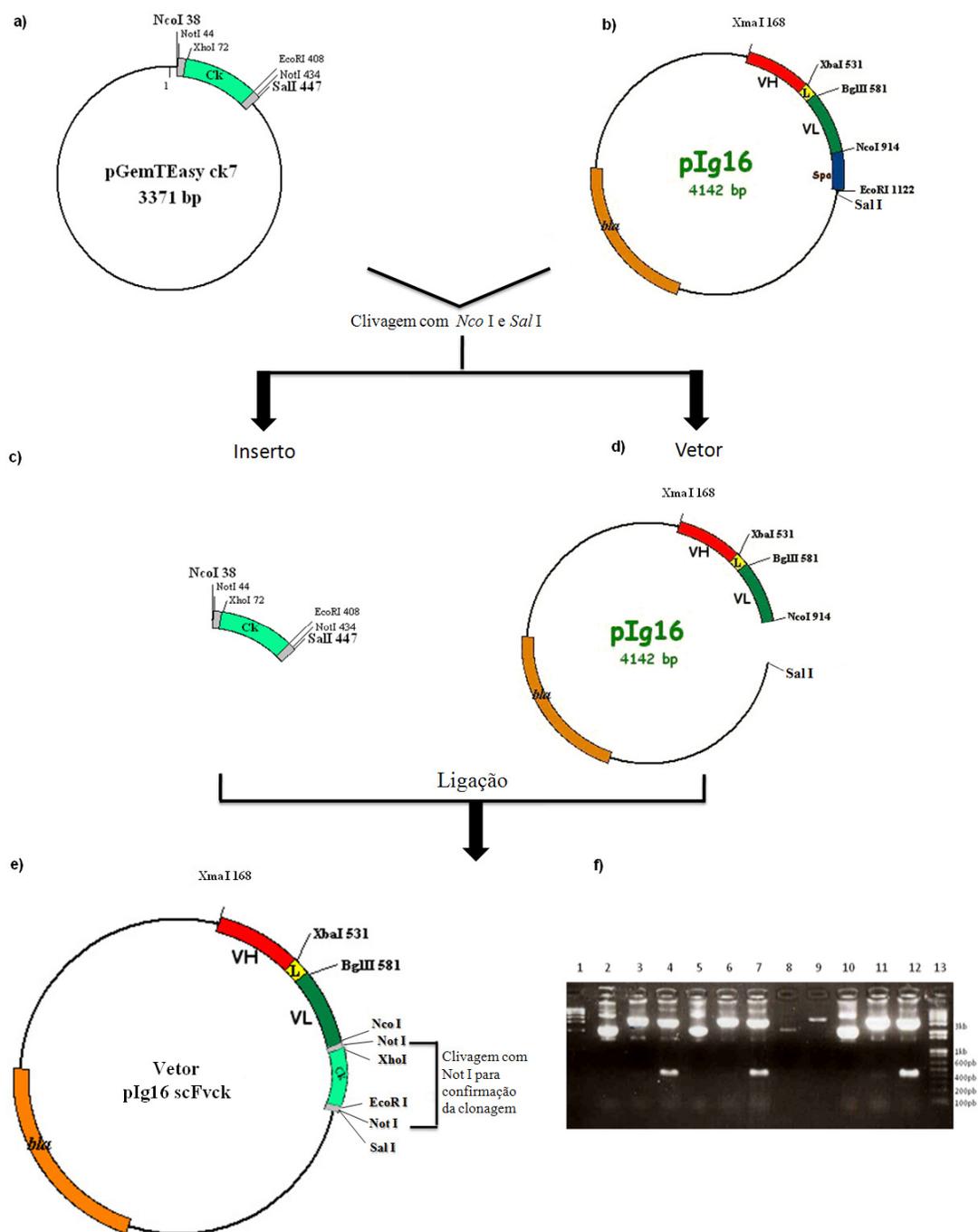


Figura 25 – Clonagem do segmento gênico codificador da cadeia constante leve (C κ). Os vetores pGEM-T Easy-ck (a) e pIg16 (b) foram clivados com as enzimas *Nco* I e *Sal* I. O inserto Ck (c) foi clonado no vetor pIg16 (d) resultando no vetor pIg16 ck. A clonagem foi confirmada por meio da digestão com *Not* I. Os clones positivos liberaram um fragmento de aproximadamente 350 pb (f). Amostras: 2, 3 e 4, clone 1 intacto, clivados com *Bgl* II e com *Not* I respectivamente; 5, 6 e 7, clone 2 intacto, *Bgl* II e *Not* I respectivamente; 8 e 9, clone 3 intacto e com *Bgl* II respectivamente; 10, 11 e 12, clone 4 intacto, *Bgl* II e *Not* I respectivamente; 1 e 13, Marcadores de Massa Molecular Low Mass Ladder e 1 kb Plus (Invitrogen).

Para a clonagem dos segmentos gênicos das cadeias correspondentes aos domínios V_L 's dos Fabs 5H7 e 5B8, os vetores pGEM-T Easy contendo V_L de 5B8 e 5H7 foram digeridos com *Bgl* II e *Xho* I, juntamente com o vetor pIg16 scFvck. Essas clonagens foram confirmadas por digestões com *Pst* I. Os clones positivos liberaram um fragmento de quase 700 pb que correspondia a parte do V_L e C_k juntos (Figura 26). O vetor resultante dessa clonagem foi denominado de pIg16 $V_L + C_k$.

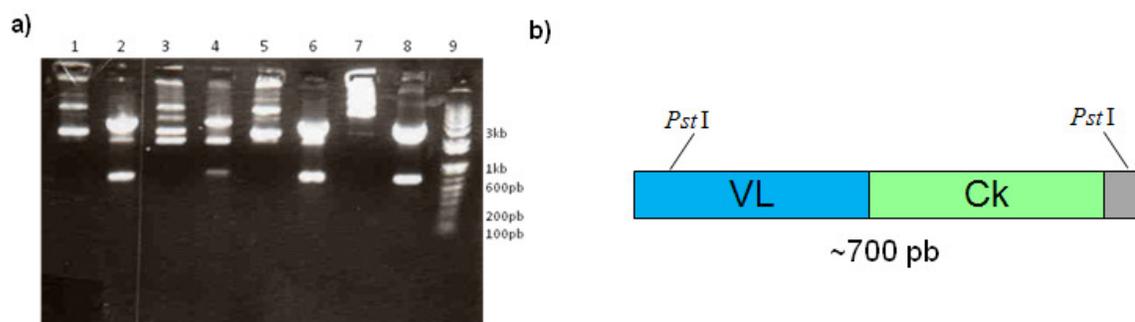


Figura 26 – Clonagem da cadeia V_L no vetor pIg16 (com C_k). Amostras ímpares, DNA intacto, pares, DNA clivado com *Pst* I. Amostras: 1 e 2, clone 1 de 5B8, 3 e 4, clone 2 de 5B8; 5 e 6, clone 1 de 5H7, 7 e 8, clone 2 de 5H7; 9, Marcador de Massa Molecular 1 kb Plus (Invitrogen).

Confirmadas as clonagens dos segmentos gênicos das cadeias V_L 's no vetor pIg16 scFvck, foi possível clonar essas cadeias juntas no vetor pPIgLe Fab. Essa clonagem foi realizada por meio da digestão com *Bgl* II e *EcoR* I. Dessa forma as cadeias V_L e C_k do vetor pPIgLe Fab foram substituídos pelas cadeias V_L e C_k (com histag) anti-HIV dos Fabs 5H7 e 5B8. Essa clonagem foi facilmente obtida e confirmada pela digestão com *Pst* I. Os clones positivos liberaram um fragmento com o tamanho aproximado de 1 kb, os clones negativos apenas linearizaram (Figura 27). O vetor resultante dessa clonagem foi denominado de pPIgLe Fab $V_L + C_k$.

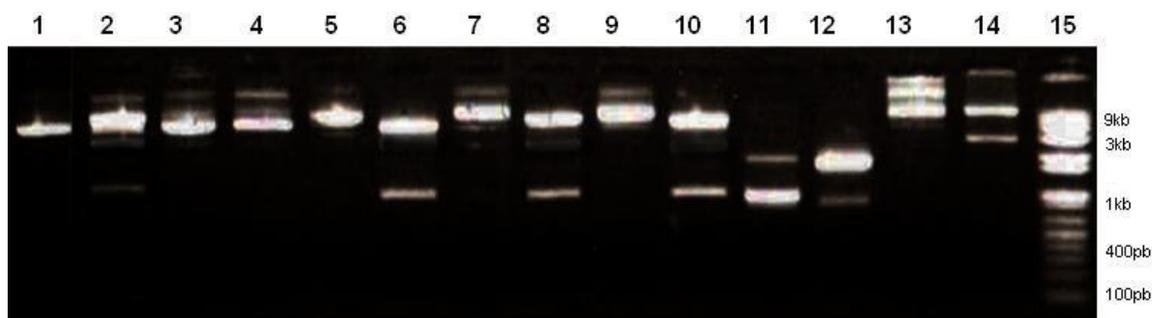


Figura 27 – Clonagem dos segmentos gênicos V_L e C_κ no vetor pPIgLe Fab. Amostras ímpares DNA intacto e pares digeridos com *Pst* I. Amostras 1 ao 6 pPIgLe Fab 5H7 e amostras 7 ao 14 pPIgLe Fab 5B8. Amostra 15, Marcador de Massa Molecular 1 kb Plus (Invitrogen).

b. Subclonagem do segmento gênico codificador da cadeia V_H : na tentativa de clonar os três segmentos gênicos codificadores da cadeia variável pesada (V_H), descobriu-se que essa clonagem não seria possível por meio da digestão pelas enzimas de restrição *Xma* I e *Xba* I. Foram utilizadas DNA plasmidial diferentes de pPIgLe Fab para a realização de digestões com *Xma* I e *Xba* I. O perfil da digestão com *Xma* I se igualava ao DNA intacto e linearizava com *Xba* I. Por meio do sequenciamento foi observado que houve uma deleção de uma guanina do sítio de *Xma* I (Figura 28).

A clonagem dos fragmentos correspondentes as cadeias variáveis pesadas só foi possível por meio de digestão com as enzimas de restrição *Sac* I e *Xba* I. O sítio de restrição para *Sac* I ficava ao lado do sítio de *Xma* I, possibilitando assim a clonagem do segmento gênico codificador da cadeia V_H sem alterar a fase de leitura do DNA e conseqüentemente a sequência de aminoácidos. Porém, ainda havia um outro impedimento para esta clonagem no vetor pPIgLe Fab, a presença de um sítio de *Sac* I dentro do segmento gênico de C_κ . Esse problema foi resolvido com a construção de um vetor Intermediário. Todas essas clonagens foram divididas em etapas que serão descritas a seguir.

Primeiro, foi necessário o desenho de oligonucleotídeo para amplificar a sequência gênica codificadora da cadeia V_H dos três Fabs anti-HIV inserindo sítio de *Sac* I na extremidade 5' (Tabela 8). O iniciador da extremidade 3' inserindo sítio de *Xba* I foi o mesmo utilizado anteriormente para a amplificação das cadeias V_H com sítio de *Xma* I e *Xba* I. O desenho do oligonucleotídeo inserindo sítio de *Sac* I na extremidade 5' do domínio V_H foi inicialmente utilizado para possibilitar a clonagem da cadeia V_H do Fab 5B8, uma vez que esse fragmento possui internamente um sítio para *Xma* I. Posteriormente, foram também utilizados para a re-amplificação dos outros fragmentos de V_H , uma vez que foi detectada a impossibilidade da clonagem por meio de *Xma* I.

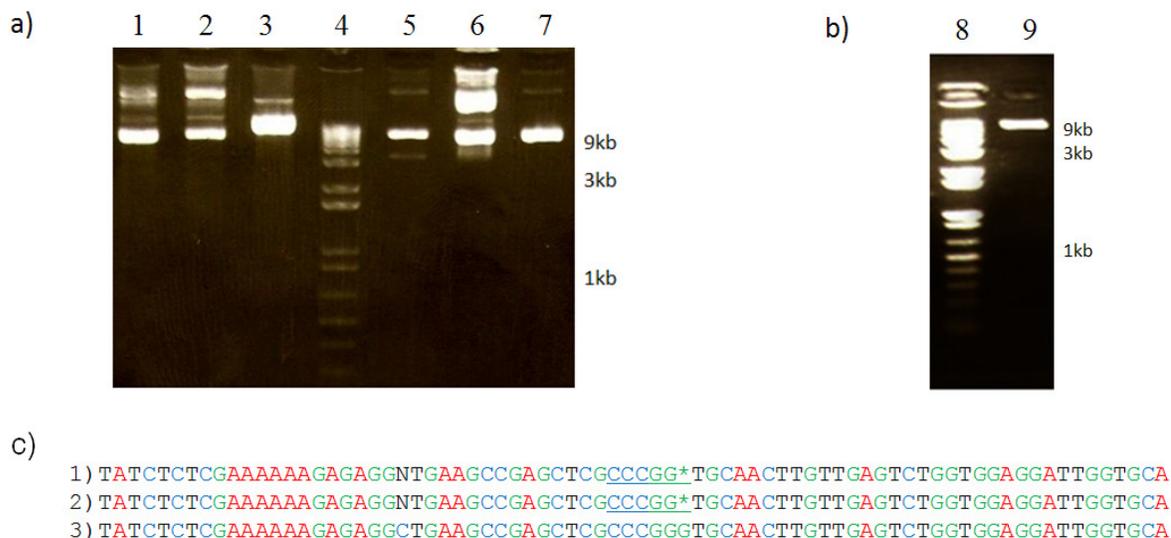


Figura 28 – Deleção da base nitrogenada Guanina do sítio de *Xma* I do vetor pPIgLe Fab. Em a, DNA plasmidial de pPIgLe Fab intactos e digeridos com *Xma* I e *Xba* I. Amostras 1 e 5 contendo DNA plasmidial intacto, 2 e 6 digeridos com *Xma* I e 3 e 7 digeridos com *Xba* I, Em b, DNA plasmidial de pPIgLe sc Fv. Amostra 2, DNA plasmidial de pPIgLe scFv clivado com *Xma* I. Amostras 4 (a) e 1 (b), Marcador de Massa Molecular 1 kb Plus (Invitrogen). Em c, alinhamento de três sequências de diferentes plasmídios demonstrando a deleção da guanina. Foi comparado o DNA do vetor pPIgLe Fab de 5B8 (1), 5H7 (2), e pPIgLe scFv (3). (*) corresponde ao nucleotídeo deletado (no caso, a guanina) conforme a comparação com o DNA controle do vetor pPIgLe scFv que possui o sítio de *Xma* I preservado.

Os iniciadores amplificaram corretamente os segmentos gênicos de V_H . Esses segmentos obtidos por PCR foram clonados no vetor pGEM-T Easy e os clones positivos para esta clonagem foram sequenciados. Os clones que apresentaram a sequência correta de V_H foram utilizados posteriormente.

Tabela 8 - Iniciadores utilizados para amplificação do segmento gênico codificador de V_H para inserção de sítio de *Sac* I

Iniciador	Tipo	Sequência
P6	5'	5' GAAGACAGCTCGAGGGCAGCCACAGT 3'
P11	3'	5' AACCAGCCATGGAGCTCGTGCACTG 3'

Para a construção do vetor Intermediário foram necessárias digestões com as enzimas de restrição *Nsi* I e *Xho* I dos vetores pGEM-T Easy (que continha o segmento gênico de C_K) e

pPIgLe Fab. O inserto de pPIgLe Fab de aproximadamente 1,5 kb foi posteriormente ligado no vetor pGemTEasy (sem o segmento gênico de C_{κ}) como demonstrado na Figura 29.

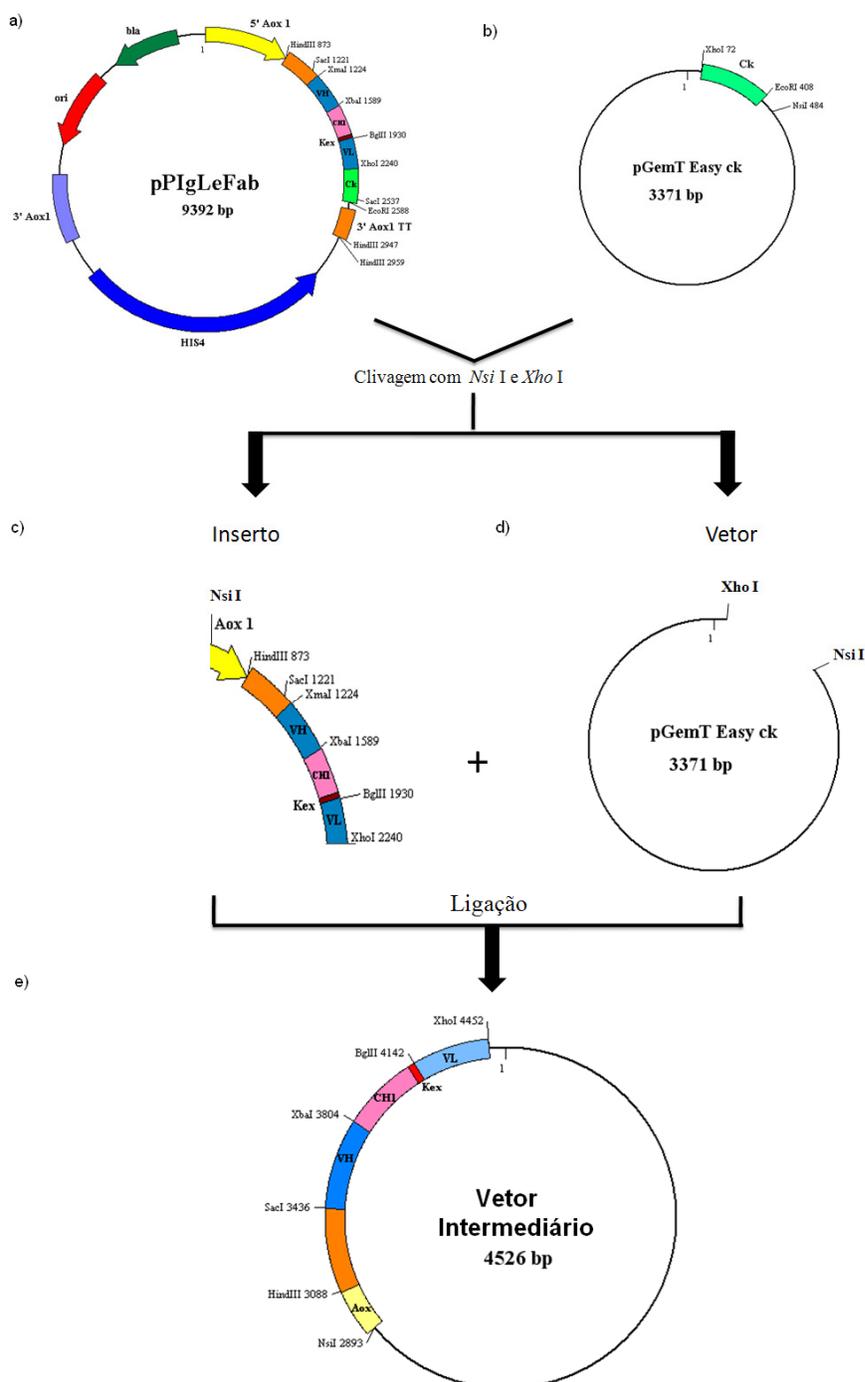


Figura 29 – Obtenção do vetor Intermediário. Os vetores pPIgLe Fab (a) e pGemTEasy - C_{κ} (b) foram clivados com as enzimas de restrição *Nsi* I e *Xho* I. O inserto de pPIgLe Fab de aproximadamente 1,5 kb (c) e o vetor de pGemTEasy de 3kb (d) foram ligados resultando no vetor Intermediário.

Para confirmar o sucesso dessa clonagem o vetor resultante foi digerido com *Apa* I. O sítio de restrição para *Apa* I é encontrado no segmento gênico de C_{H1} e também no vetor pGEM-T Easy. Logo, os clones positivos para essa clonagem liberariam um fragmento de aproximadamente 700 pb, e os negativos apenas linearizariam (Figura 30).

Após a obtenção do vetor Intermediário, os segmentos gênicos de V_H foram então sub-clonados nesse vetor. Essa clonagem foi realizada por meio de digestões com as enzimas *Sac* I e *Xba* I do vetor Intermediário e dos vetores pGEM-T Easy contendo as cadeias V_H (com *Sac* I). As clonagens foram verificadas com enzimas que digeriam especificamente o segmento gênico de cada V_H .

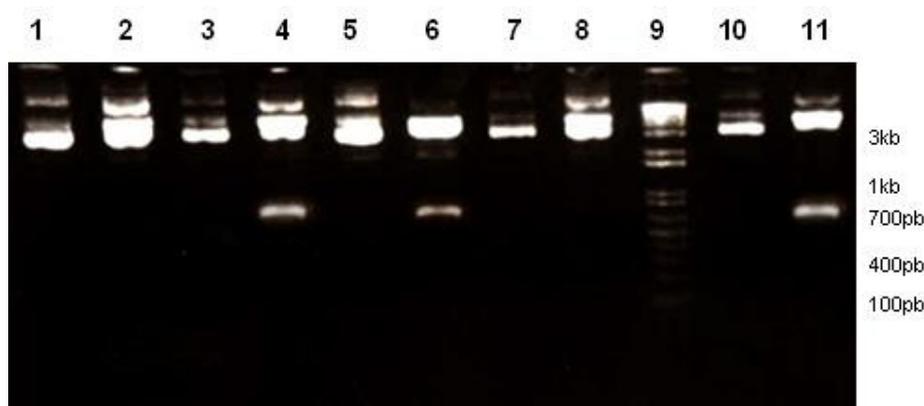


Figura 30 – Obtenção do vetor Intermediário. Amostras ímpares, DNA plasmidial intacto, amostras pares, os mesmos plasmídios digeridos com *Apa* I (exceto amostras 10 e 11, intacto e digerido respectivamente). Amostra 9, Marcador de Massa Molecular 1 kb Plus (Invitrogen).

Depois de obtidas as clonagens dos V_H dos Fabs no vetor Intermediário, esses V_H foram transferidos para o vetor pPIgLe Fab que já continham as cadeias V_L e C_k do 5B8 e 5H7. Essa clonagem foi realizada por meio de digestão de ambos os vetores (pPIgLe Fab e vetor Intermediário) com as enzimas *Nsi* I e *Bgl* II. Os insertos de DNA de aproximadamente 1,4 kb do vetor Intermediário contendo V_H de 5B8 e outro contendo V_H de 5H7 foram então clonados no vetor pPIgLe Fab com seus respectivos V_L e C_k . Após a obtenção dessa clonagem, o vetor pPIgLe contendo o Fab completo de 5B8 e 5H7 estavam prontos para a transformação de *P. pastoris*.

Para a finalização do vetor pPIgLe Fab de 4C1, restou a clonagem do segmento gênico V_L no vetor Intermediário contendo V_H de 4C1, e posteriormente a transferência do cassete inteiro de 4C1 para o vetor de expressão, contendo o segmento gênico de C_k . Para a clonagem do

segmento de V_L , o vetor pGemTEasy contendo V_L de 4C1 e o vetor Intermediário contendo V_H de 4C1 foram digeridos com *Bgl* II e *Xho* I. O inserto de DNA de V_L foi clonado no vetor Intermediário. Os clones positivos para esta clonagem foram confirmados por meio da digestão com *Psi* I, que liberaram dois fragmentos de DNA, de aproximadamente 760 e 940 pb. O vetor original sem a clonagem libera apenas um segmento gênico de aproximadamente 2,8 kb (Figura 31).

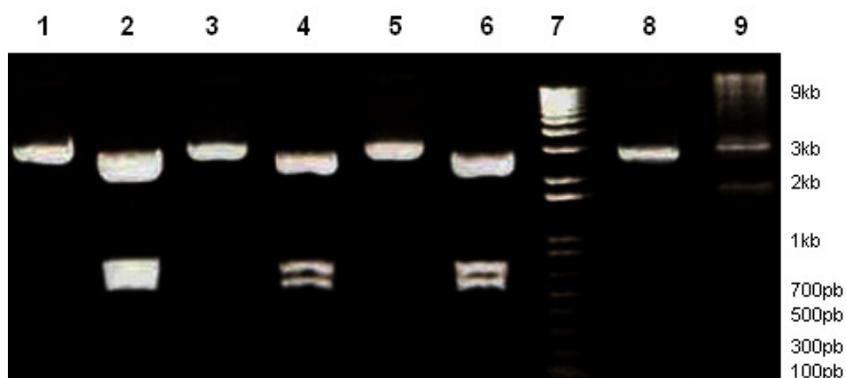


Figura 31 – Clonagem do segmento gênico da cadeia V_L de 4C1. Amostras ímpares, DNA plasmidial intacto, amostras pares, os mesmos plasmídios digeridos com *Psi* I. Amostras 8 e 9, vetor Intermediário original, intacto e digerido com *Psi* I respectivamente. Amostra 7, Marcador de Massa Molecular 1 kb Plus (Invitrogen).

Depois de confirmado o sucesso da clonagem do segmento gênico da cadeia V_L do Fab 4C1 no vetor Intermediário contendo o V_H de 4C1, o cassete inteiro foi transferido para o vetor pPIgLe Fab contendo o segmento gênico de C_κ com a histag. Para isso, foi utilizado o vetor pPIgLe Fab contendo o Fab completo do 5B8 e o vetor Intermediário de 4C1. Esses vetores foram digeridos com as enzimas *Nsi* I e *Xho* I. O inserto contendo os segmentos gênicos de 4C1 foi clonado no vetor pPIgLe Fab. Após obtida essa clonagem, o vetor de pPIgLe Fab 4C1 estava pronto para ser utilizado para a expressão do Fab anti-HIV 4C1 em *P. pastoris*.

4. Expressão em *P. pastoris*

Depois da obtenção dos Fabs anti-HIV completos no vetor pPIgLe Fab, foi realizado o sequenciamento das regiões codificadoras dos três Fabs. Os iniciadores utilizados para esse fim, anelavam na região Aox 5' e 3' do vetor e nos segmentos de C_{H1} e C_κ do Fab conforme esquematizado na Figura 32:



Figura 32 – Anelamento dos iniciadores utilizados para sequenciamento do Fab. Os oligonucleotídeos Aox 5' e Aox 3' (sequências listadas na Tabela 3 de Materiais e Métodos) anelavam externamente ao Fab. Os iniciadores CH1 e C_κ anelavam na região mais interna. Esses iniciadores juntos garantiram um sequenciamento de maior abrangência do Fab.

O sequenciamento foi realizado no equipamento MegaBACE 500 plus (Molecular Dynamics[®]) e as sequências foram analisadas no BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*), www.ncbi.nlm.nih.gov/blast e no programa BioEdit. Foram obtidas sequências completas do Fab e região da sequência líder do Fab 5B8, e sequência parcial do Fab 5H7 conforme Tabela 9. A sequência do Fab 4C1 não foi obtida. A região da sequência líder do Fab 5B8 possuía um códon de parada. A existência desse códon impossibilita a expressão desse Fab em *P. pastoris* uma vez que a maquinaria de tradução pararia nessa sequência. Contudo, esse códon de parada não deve existir por dois motivos: o primeiro, é que foi obtida a expressão desse Fab conforme demonstrado no *Western Blot* e; segundo, a análise dessa região demonstrou ser de baixa qualidade, podendo ser na verdade apenas um erro no sequenciamento.

O processamento do pró-peptídeo do fator alfa é de extrema importância para a secreção da proteína heteróloga. Esse processamento ocorre de duas formas: primeiro, a clivagem da sequência sinal pelo produto do gene *KEX2*, ocorre entre os aminoácidos Arginina e Glutamato (EKR*EAEA, onde * é o sítio de clivagem), posteriormente a essa clivagem o produto do gene *STE13* cliva as repetições de Glutamato e Alanina (EAEA). Dessa forma, a proteína pode então ser secretada para o sobrenadante.

Tabela 9 – Sequência de aminoácidos deduzida correspondente ao pré-propeptídeo do fator alfa, sítio de reconhecimento da Kex e Ste13p e os Fabs de 5B8, e 5H7.

Sequência do Fator alfa (α)			
5B8	MRCPSIFTAV*FAASSALAAPVNTTTEDETAQIPAEAVIGYSLEGLDFDVAVLPFNSSTNNGLLFINTTIASIAAKEEGVSLE		
5H7	ND		
Sítio de reconhecimento da Kex e Ste13p			
5B8	KREAEA		
5H7	ND		
FR(H1)	CDR(H1)	FR(H2)	
5B8	ELVQLLESGGLVQPGGSLRLSCAA	SGFTFSSYEMN	WVRQAPGKGLEWVS
5H7	ELVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS	GFTFSGSGLH	WVRQASGKGLEWVGR
CDR(H2)	FR(H3)	CDR(H3)	
5B8	YISSSGSTIYYADSVKG	RFTISRDNAKNSVYLQLNSLRAEDTAVYYCAR	EMWGPEY
5H7	IKTKANNYATAYAVS	VKGRFTISRDDSKNTAYLQLNSLKTEDTAVYYCAT	RGDFTSGWHY
FR(H4)			
5B8	WGPGLVTVSSA		
5H7	WGQGLVTVSR		
CH1			
5B8	SRASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKR		
5H7	SRASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKR		
Sítio de KEX	FR(L1)	CDR(L1)	
5B8	VEPKSCDKRMDKRAPD	LLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRAS	HSVSRAYLA
5H7	VEPKSCDKRMDKRAPD	LLVMTQSPPLSLPVTLLGQPASISC	RSSQSLVHSDGNVYLS
FR(L2)	CDR(L2)	FR(L3)	
5B8	WYQQKPGQAPRLLIY	GTSSRAT	GIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYC
5H7	WFQQRPGQSPRLLIY	KVSNRAS	GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC
CDR(L3)	FR(L4)		
5B8	QQYGGSPW	FGQGTKVELK	
5H7	MQGSHYPPWT	FGQGRVEIK	
Cκ			
5B8	RTVAALEPSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSLPVTKSFNRGEC HHHHHH *		
5H7	RTVAALEPSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSLPVTKSFNRGEC HHHHHH *		

FR = Framework

CDR=Regiões Determinantes de Complementariedade

Kex=sequência reconhecida pela Kex

H=cadeia variável pesada

L=cadeia variável leve CH1= cadeia constante pesada 1

C κ = cadeia constante leve do tipo κ

ND = Sequência não determinada

(*) Codon de parada

Depois de obtidas as clonagens e realizado o sequenciamento, 10 μ g de DNA dos vetores contendo os Fabs anti-HIV (5B8, 4C1 e 5H7) foram digeridos com a enzima de restrição *Sal I*. A linhagem escolhida para a transformação do DNA e expressão das proteínas heterólogas foi a

linhagem GS115. Essa linhagem é defectiva para o gene da histinol desidrogenase (*his4*), permitindo a seleção dos transformantes baseado na habilidade de crescer em meio deficiente em histidina. Esta linhagem contém uma cópia funcional do gene da álcool oxidase 1 (AOX1) responsável por aproximadamente 85% da utilização do metanol pela ação da enzima álcool oxidase (Daly e Hearn, 2005).

As colônias que cresceram em meio mínimo deficiente em histidina, obtidas na transformação, foram repicadas em placas contendo meio mínimo com glicerol ou metanol. Após 48 horas as colônias crescidas em meio contendo metanol foram transferidas para membrana de nitrocelulose para a fixação das proteínas recombinantes secretadas. Posteriormente foi feita a imunodeteccção das colônias (do tipo *Colony Blot*). Em todas as tentativas dessa imunodeteccção, observou-se um baixo nível de expressão de proteínas recombinantes. Isso pode ser devido ao baixo número de cópias integradas no genoma da *P. pastoris*, já que esse número afeta o nível de expressão da proteína de interesse. Porém, o evento de integração de múltiplas cópias ocorre numa taxa muito baixa, de 1-10% (Daly e Hearn, 2005).

Embora os clones produtores das proteínas recombinantes obtidos apresentassem baixo nível de expressão de acordo com a deteccção por *Colony Blot*, alguns clones foram selecionados para a indução de *P. pastoris* em frasco. Para a cinética de indução, o Fab de 5B8 foi escolhido, e cinco frascos de 1L contendo 200 mL de meio de indução com metanol 1%, EDTA e PMSF na concentração final de 1mM, foram incubados a 30°C até 120 horas. A cada 24 horas coletava-se 100 mL, e adicionava-se mais 1% de metanol nos meios restantes, juntamente com o inibidor de protease PMSF na concentração final de 1mM. Após cada coleta, os sobrenadantes eram filtrados e conservados a 4°C. As proteínas foram detectadas utilizando membrana de nitrocelulose em ensaio de imunodeteccção (do tipo *Dot Blot*) (Figura 33).

Posteriormente as amostras foram analisadas por SDS-PAGE. Para isso, 1mL do sobrenadante de cada tempo foi precipitado com TCA. Após a migração, as proteínas do gel foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose. Depois do bloqueio, procedeu-se a incubação com o anticorpo primário, secundário e revelação com NBT/BCIP. Observou-se que o melhor tempo de indução foi a partir de 72 horas (Figura 34). O tempo de 48 horas de indução foi o que apresentou menor quantidade de proteína. Isso pode ter sido ocasionado por algum problema no momento da aplicação do gel ou na precipitação com TCA, uma vez que esse mesmo tempo foi evidenciado por meio de *Dot Blot*.

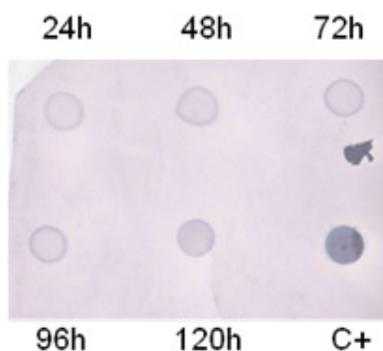


Figura 33 – Imunodeteção (do tipo *Dot Blot*) das proteínas produzidas nos diferentes tempos de indução de *P. pastoris*. Fab 5B8. Tempos de 24, 48, 72, 96 e 120 horas. Controle positivo, sobrenadante de expressão de *P. pastoris* do Fab anti-Z-DNA (Burtet, 2006). Procederam-se o bloqueio e a revelação utilizando-se anti-C κ humano feito em cabra como anticorpo primário e anti-IgG de cabra feito em coelho conjugado a fosfatase alcalina (AP) como secundário (Item 13 do tópico Métodos).

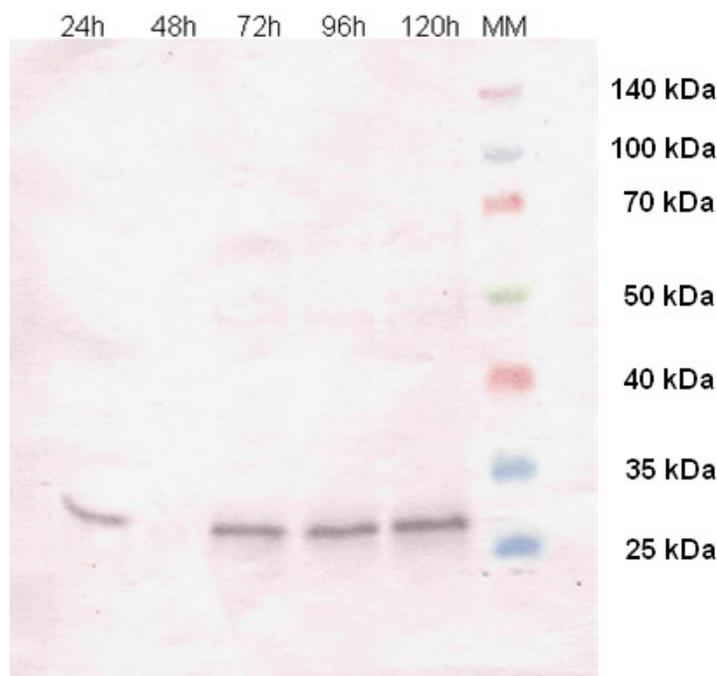


Figura 34 – Análise por SDS-PAGE da expressão do Fab em *P. pastoris*. Os tempos de indução estão representados para cada poço. Após o bloqueio a revelação foi realizada de acordo com o item 17 do tópico Métodos. O marcador utilizado foi o marcador Fermentas Spectra™ Multicolor.

O tempo escolhido para a repetição da indução do Fab de 5B8 e a indução das colônias produtoras dos Fabs de 4C1 e 5H7 foi o de 72 horas. Contudo, após utilizar os mesmos parâmetros da primeira indução, não se obteve um bom nível de expressão para nenhum dos três Fabs. No primeiro momento, associou-se a problemática do nível baixo de expressão a

metodologia de transformação. Com isso, outras metodologias para a transformação de *P. pastoris* foram testadas. Como se intencionava a obtenção de clones com múltiplas cópias integradas, métodos adicionais para melhorar a eficiência da transformação por eletroporação foram considerados. O número de cópias integradas do cassete de expressão pode afetar a quantidade da proteína expressa. Por exemplo, o aumento do número de integração do cassete de expressão de 1 para 14 cópias do fragmento da proteína C da toxina do tétano aumentou o nível de expressão da proteína em 6 vezes (Clare *et al.*, 1991). Similarmente, Sreekrishna e colaboradores (1989), obtiveram um aumento de 200x dos níveis de expressão da proteína do fator de necrose tumoral (TNF- α) com a integração de 20 cópias.

Wu e Letchworth (2004) demonstraram que o tratamento prévio de *P. pastoris* com acetato de lítio e ditioneitol (DTT) aumentava a eficiência de transformação por eletroporação em 150 vezes. Baseando-se nessas informações um novo método de transformação foi adaptado. O número de transformantes obtidos com esse novo protocolo foi maior do que o obtido com o protocolo do Manual do Kit de expressão em *Pichia*, Invitrogen, 2002. Contudo, não se obteve melhora no nível de expressão quando se fazia detecção por *Colony Blot* ou quando a produção era feita em frascos.

Diversos fatores estão relacionados com o sucesso da produção da proteína recombinante de interesse em *P. pastoris*. Dentre eles, a escolha da linhagem de *P. pastoris*, a escolha do vetor de expressão e promotores, procedimentos de transformação e integração do vetor no genoma da *P. pastoris*, técnicas empregadas para obter-se a integração de múltiplas cópias e tamanho da molécula de interesse.

Um fator muito importante que influencia no nível de expressão em *P. pastoris* é presença dos chamados códons preferenciais. *Esses códons têm sido identificados como um fator simples, porém importante para a expressão de genes nos procariotos. A razão para isto é porque códons preferenciais se correlaciona com a abundância dos respectivos tRNAs disponíveis dentro da célula. Esta relação serve para otimizar o sistema de tradução e para balancear a concentração dos códons com a concentração dos isoceptores de de tRNA* (Gustafsson *et al.*, 2004).

É possível fazer a predição do quanto um determinado gene será bem sucedido quando for expresso em determinado sistema de expressão, baseando-se na presença de códons preferenciais e raros. Existem diversas ferramentas em bioinformática disponíveis para a realização dessa predição baseado na sequência gênica codificadora da proteína heteróloga. Baseando-se nisso, as sequências dos três Fabs obtidos foram analisadas no *European Molecular Biology Open Software Suite (EMBOSS)*, *sítio que disponibiliza várias ferramentas de*

bioinformática para diversos tipos de análises. Essa ferramenta foi utilizada para definir um índice de adaptação de códon (Codon Adaptation Index - CAI). Esse índice é uma simples e efetiva medida do códon preferencial e é usado para inferir o nível de expressão do gene heterólogo.

Para realizar a análise do codon usage dos Fabs anti-HIV, foi utilizado a sequência completa dos Fabs juntamente com a sequência do Fab anti-zDNA conhecido como Z22. Esse Fab foi produzido em altos níveis por Burtet e colaboradores (2007) em *P. pastoris* e foi considerado um bom padrão para comparação, uma vez que esse Fab foi montado no vetor pPIg Fab, o vetor precursor do vetor utilizado para a expressão dos Fabs anti-HIV.

O índice gerado pela análise de CAI deve variar de 0 a 1, representando do pior ao melhor nível de expressão respectivamente. A análise obtida está representada Figura 35:

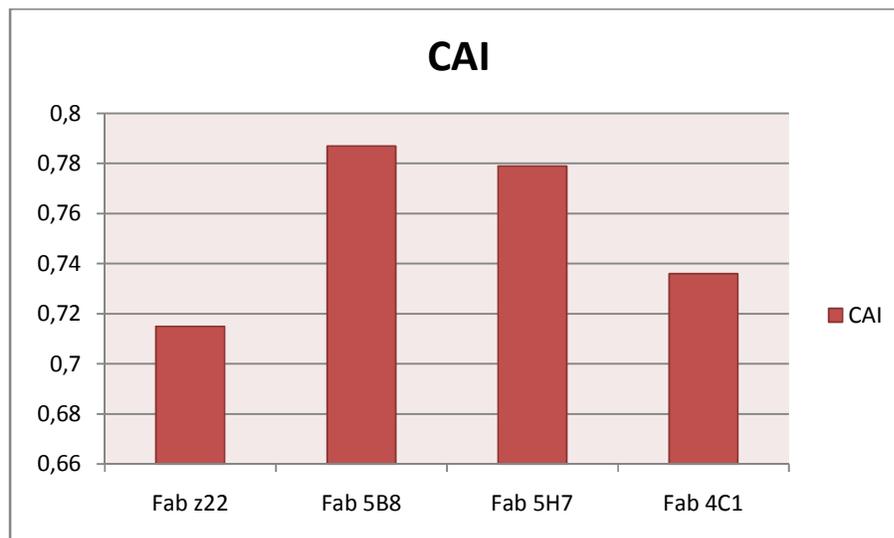


Figura 35 – Índice de Adaptação do Codon. Esse índice foi gerado pela ferramenta CAI disponível no software EMBOSS (<http://embossgui.sourceforge.net>) por meio da sequência dos quatro Fabs. O índice varia de 0 a 1.

De acordo com as análises do índice de adaptação de códon, a expressão da proteína heteróloga deveria apresentar bons níveis, maiores ainda que os níveis apresentado pelo Fab anti-zDNA Z22. Isso na prática não foi obtido. A ocorrência de baixos níveis da proteína recombinante (Fab) demonstra que deverão ser realizados ajustes na metodologia empregada, com a finalidade de otimizar o rendimento na obtenção das proteínas recombinantes.

Conclusões e Perspectivas

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Com este trabalho, foi obtido um vetor de expressão para a levedura metilotrófica *P. pastoris*. Também foram obtidas as clonagens dos Fabs anti-HIV nesse vetor de expressão pPIgLe Fab. Foi obtido também a expressão do Fab de 5B8.

De acordo com o sequenciamento e análise do CAI dos Fabs clonados é possível a obtenção de níveis satisfatórios da proteína recombinante por meio da expressão em *P. pastoris*. Para obtenção de volumes maiores de sobrenadante contendo os Fabs anti-HIV propõe-se a utilização de bioreator para a fermentação desses Fabs. Sugere-se a utilização dos parâmetros determinados no trabalho de Burtet *et al.* (2006) para o processo fermentativo (em biorreator) dos Fabs obtidos.

A obtenção desses Fabs tanto em sobrenadante quanto na sua forma purificada é de extrema importância para a realização da caracterização dessas proteínas. Deverão ser realizados ensaios de ligação desses Fabs ao peptídeo da gp41 para delinear o grau de afinidade de cada um deles. Os Fabs que obtiverem uma boa ligação ao peptídeo deverão ser submetidos a ensaios de neutralização.

Também é proposta a clonagem dos Fabs 4B6 e 4G1 no vetor de expressão em *P. pastoris* e sua posterior expressão, purificação e caracterização.

Referências Bibliográficas

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS A.; LICHTMAN A. E POBER J.** (2005). **Cellular and Molecular Immunology**. (5. ed.) W. B. Saunders Company.
- ALBUQUERQUE, F. C.** **Isolamento de Fragmentos de Anticorpos Humanos anti-Peptídeos Derivados da Proteína gp41 de HIV-1 a Partir de Uma Biblioteca de Fab Apresentada na Superfície de Fagos Filamentosos**. 2005. Brasília. Dissertação de Mestrado em Biologia Molecular. Universidade de Brasília, Conselho
- ANDRADE, E.V.; ALBUQUERQUE, F.C.; MORAES, L.M.P.; BRIGIDO, M.M.; SANTOS-SILVA, M.A.** (2000) Single-Chain Fv with Fc fragment of the Human IgG1 Tag: Construction, *P. pastoris* Expression and Antigen Binding Characterization. *J. Biochem.* 128: 891-895.
- ANDRADE, E. V.; FREITAS, S. M.; VENTURA, M. M.; MARANHÃO, A. Q. e BRÍGIDO, M. M.** (2005) Thermodynamic basis for antibody binding to Z-DNA: Comparison of a monoclonal antibody and its recombinant derivatives. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1726:293-301.
- ANDRIS- WIDHOPF, J., STEINBERGER, P., FÜLLER, R., RADER, C. AND BARBAS III, C.F.** (2000). Generation of antibodies libraries: PCR amplification and assembly of light- and heavy-chain coding region. *Em Phage display – a laboratory manual*. 1ª Edição. CSHL Press, Cold Spring Harbor, NY, USA, pp 9.1 – 9.113
- BARBOSA, C.D.** **Obtenção de anticorpos anti-osteossarcoma por meio de biblioteca de Fab apresentados na superfície de fagos filamentosos**. Brasília, 2004. Dissertação de mestrado em Biologia Molecular. Universidade de Brasília

- BERGER, E.A, MURPHY, P.M., FARBER, J.M** (1999). Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: Roles in Viral Entry, Tropism, and Disease. *Annual Review of Immunology*. 17: 657-700
- BEVAN A, et al.** (1998) Quantitative assessment of enzyme specificity in vivo: P2 recognition by Kex2 protease defined in a genetic system. *Proc Natl Acad Sci* 95(18):10384-9
- BRIGIDO, M. M., MARANHÃO, A. Q.** (2002) Bibliotecas Combinatórias em Phagos. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, **26**: 44-51.
- BURTET, R.T.** **Caracterização de um Fragmento Recombinante Fab anti-Z-DNA produzido em *P. pastoris*.** 2006. Brasília. Dissertação de Mestrado em Patologia Molecular. Universidade de Brasília.
- BURTET RT, SANTOS-SILVA MA, BUSS GA, MORAES LM, MARANHÃO AQ, BRIGIDO MM.** (2007). Production of a recombinant Fab in *P. pastoris* from a monocistronic expression vector. *J Biochem*.
- BURTON, D.R, PYATI, J., KODURI, R., SHARP, S.J., THORNTON, G.B., PARREN, P.W, SAWYER, L.S, HENDRY, R.M, DUNLOP, N, NARA, P.L, et al.** (1997) Efficient neutralization of primary isolates of HIV-1 by a recombinant human monoclonal antibody. *Science* 266:1024 - 1027
- CEREGHINO, L. J., AND CREGG, J. M.** (2000) Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *P. pastoris*. *FEMS Microbiol. Rev.* 24:45-66
- CHAN, D. C., FASS, D., BERGER, J.M., KIM, P.S.** (1997). Core structure of gp41 from the HIV Envelope Glycoprotein. *Cell*, 89:263-273.
- CHOI, G.H, LEE, D.H, MIN, W.K, CHO, Y.J, KWEON, D.H.** (2004) Cloning, expression, and characterization of single-chain variable fragment antibody against mycotoxin deoxynivalenol in recombinant *Escherichia coli* *Protein expression and purification*. 35:84-92

- CLARE, J.J, RAYMENT, F.B, BALLANTINE, S.P, SREEKRISHNA, K, ROMANOS, M.A.** (1991) High-level expression of tetanus toxin fragment C in *P. pastoris* strains containing multiple tandem integrations of the gene. *BioTechnology* 9:455–460.
- CLERECI, M, BARASSI, C, DEVITO, C., PASTORI, C., PICONI, S., TRABATTONI, D., LONGHI, R., HINKULA, J., BROLINDEN, K. AND LOPALCO, L.** (2002). Serum IgA of HIV-exposed uninfected individuals inhibit HIV through recognition of a region within the alpha-helix of gp41. *AIDS* 16:1731-41.
- COSIMI A. B., BURTON R. C., COLVIN R. B., GOLDSTEIN G., DELMONICO F. L., et al.** (1981). Treatment of acute renal allograft rejection with OKT3 monoclonal antibody. *Transplantation*. 32: 535-539.
- CREGG, J.M., MADDEN, K. R., BARRINGER, K.J., THILL, G.P. AND STILLMAN, C.A.** (1989) Functional characterization of the two alcohol oxidase genes from the yeast *P. pastoris*. *Mol. Cell Biol.* 9:1316-1323.
- CUNHA, A. E.; CLEMENTE, J. J.; GOMES, R.; PINTO, F.; THOMAZ, M.; MIRANDA, S.; PINTO, R. MOOSMAYER, D.; DONNER, P. e CARRONDO, M. J.** (2004) Methanol induction optimization for scFv antibody fragment production in *P. pastoris*. *Biotechnol Bioeng.* 86:458-67.
- DANTAS-BARBOSA, C. BRIGIDO, M.M., MARANHÃO, A.M.** (2005) Construction of a human Fab phage display library from antibody repertoires of osteosarcoma patients. *Genet. Mol. Res.* 4: 126 – 140
- DALY, R. E. e HEARN, M. T. W.** (2005) Expression of heterologous proteins in *P. pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production. *J. Mol. Recognit.* 18: 119–138.
- FENG Y.; BRODER C.C.; KENNEDY P.E.; BERGER E.A.** (1996) HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor., *Science*, 272, 872-877.

- FREYRE, F.M., VÁZQUEZ, J.E, AYALA, M., CANAÁN-HADEN, L., BELL, H., RODRÍGUEZ, I., GONZÁLEZ, A., CINTADO, A., GAVILONDO, J.V.** (2000) Very high expression of an anti-carcinoembryonic antigen single chain Fv antibody fragment in the yeast *P. pastoris*. *Journal of Biotechnology*. 76: 157-163
- GANDHI, R.T. E WALKER, B.D.** (2002) Immunologic control of HIV-1. *Annu Rev Med* **53**: 149-72.
- GOLDSBY R.A, KINDT T. J. E., OSBORNE B. A.** (2000) **Goldsby Immunology**. 4^a ed. W. H. Freeman and Company.
- GROUP. M. T. S.** (1985) A randomized clinical trial of OKT3 monoclonal antibody for acute rejection of cadaveric renal transplants. Ortho Multicenter Transplant Study Group. *N Engl J Med*. 313: 337-342.
- GUSTAFSSON, C., GOVINDARAJAN, S., MINSHULL, J.**(2004). Codon bias and heterologous protein expression. *Trends in Biotechnology*. 22:346-353
- HAYDEN, M.S.** et al. (1997) **Antibody engineering**. *Current Opinion in Immunology*, 9:201-212.
- HOLL, V., PERESSIN, M., SCHMIDT, S., DECOVILLE, T., ZOLLA-PAZNER, S., AUBERTIN A.M, MOOG, C.** (2006) Efficient inhibition of HIV-1 replication in human immature monocyte-derived dendritic cells by purified anti-HIV-1 IgG without induction of maturation. 107:4466-4474.
- HOOGENBOOM, HR, LUTGERINK, JT, PELSERS, MMAL, ROUSCH, MJMM, COOTE, J, VAN NEER, N, DE BRÜME, A, VAN NIEUWENHOVEN, FA, GLATZ, JFC & ARENDS, JW.** (1999). Selection-dominant and nonaccessible epitopes on cell-surface receptors revealed by cell-panning with a large phage antibody library. *Eur. J. Biochem*. **260**:774-84.
- KUBY J.** (2002) *Immunology*. W. H. Freeman and Company, USA, 5rd ed.

- LEE, S. J., GARZA, L., YAO, J., NOTKINS, A. L., e ZHOU, P.** A nonneutralizing anti-HIV-1 antibody turns into a neutralizing antibody when expressed on the surface of HIV-1-susceptible cells: A new way to fight HIV1. *Journal of Immunology*. 173:4618-4626. 2004.
- LU, M., KIM, P.S.** (1997) A trimeric structural subdomain of the HIV-1 transmembrane glycoprotein. *J Biomol Struct Dyn*. 15(3):465-71.
- Manual do Kit de Expressão de proteínas recombinantes em *P. pastoris*.** Invitrogen® .
Número do Catálogo: K1710-01, Versão 3.0.
- MARANHÃO, A.; BRÍGIDO M.** (2001) Anticorpos humanizados: Humanização de anticorpos de interesse clínico. *Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento*. 23:38-43.
- MARANHÃO, A. Q.; BRIGIDO, M. M.** (2002) Anticorpos Humanizados. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, 23: 38-43.
- MARINUS, M.G. AND MORRIS, N.R.** (1973) *J. Bacteriol.* 114, 1143–1150.
- MAYNARD J, GEORGIU G.** (2000) Antibody engineering. *Annu Rev Biomed Eng*. 2:339-76.
- MCCAFFREY, R.A, SAUNDERS, C., HENSEL, M., STAMATATOS, L.** (2004) N-Linked Glycosylation of the V3 Loop and the Immunologically Silent Face of gp120 Protects Human Immunodeficiency Virus Type 1 SF162 from Neutralization by Anti-gp120 and Anti-gp41 Antibodies. *Journal of Virology*, 78:3279-3295
- MUSTER, T., F. STEINDL, M. PURTSCHER, A. TRKOLA, A. KLIMA, G. HIMMLER, F. RU"KER, AND H. KATINGER.** (1993). A conserved neutralizing epitope on gp41 of human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* 67:6642–6647.
- PARK, E. J., GORNY, M. K., ZOLLA-PAZNER, S., QUINNAN JR, G.V.** A global neutralization resistance phenotype of human immunodeficiency virus type 1 is determined by distinct mechanisms mediating enhanced infectivity and conformational change of the envelope complex. *Journal of Virology*. 74(9):4183-4191. 2000.

- PAUL, W. E.** (2003) **Fundamental Immunology.**, 5th edition, Lippincott Williams & Wilkins Publishers.
- PEÇANHA, E. P., ANTUNES, O. A. C., TANURI, A.** Estratégias farmacológicas para terapia anti-Aids. *Quim. Nova*, 25(6B):1108-1116, 2002.
- ROITT, IVAN M.** (1987) **Imunologia - Essential immunology** 4^a ed., Atheneu, 1987, Rio de Janeiro..
- SAMBROOK R.; FRITSCH E. Maniatis T.** (1989) **Molecular Cloning: A Laboratory Manual.** Second edition. *Cold Spring Harbor Laboratory Press.*
- SATTENTAU, Q. J., AND J. P. MOORE.** (1995). Human immunodeficiency virus type 1 neutralization is determined by epitope exposure on the gp120 oligomer. *J. Exp. Med.* **182**:185–196.
- SCANLAN, C.N, PANTOPHLET, R., WORMALD, M.R, OLLMANN, SAPHIRE, E, STANFIELD, R., WILSON, I.A, KATINGER, H, DWEK, R.A, RUDD, P.M, BURTON, D.R.**(2002) The broadly neutralizing anti-human immunodeficiency virus type 1 antibody 2G12 recognizes a cluster of alpha1-->2 mannose residues on the outer face of gp120. *J Virol* **76**: 7306-7321
- SCHEID, J.F., MOUQUET, H., FELDHAHN, N., SEAMAN, M.S., VELINZON, K., PIETZSCH, J., et al.** (2009) Broad diversity of neutralizing antibodies isolated from memory B cells in HIV-infected individuals. *Nature*. 458:636:640.
- SCOTT J.K. AND BARBAS C.F.** (2001) Phage-display vectors. In: *Phage display. A laboratory Manual.* Barbas C.F., Burton D.R., Scott J.K. e Silverman G.J. (Eds). Cold Spring Habor Laboratory Press, New York, NY.
- SILVA, H.M., VIEIRA, P.M.; COSTA, P.L., PIMENTEL, B.M.; MORO, A.M., KALIL, J.E.; MARANHÃO, A.Q.; COELHO V., BRIGIDO, M.M.** (2009) Novel humanized anti-

CD3 antibodies induce a predominantly immunoregulatory profile in human peripheral blood mononuclear cells. *Immunol. Lett. No prelo*

SREEKRISHNA K, NELLES L, POTENZ R, CRUZE J, MAZZAFERRO P, FISH W, FUKU M, HOLDEN K, PHELPS D. (1989) High-level expression purification and characterization of recombinant human tumor necrosis factor synthesized in the methylotrophic yeast *Pichia-pastoris*. *Biochemistry* 28:4117–4125.

TORRES, F.; MORAES L. Proteínas recombinantes produzidas em leveduras. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*. 12:20-22; 2000.

VAZ, N. M. e FARIA, A. M. C. (1993) **Guia Incompleto de Imunologia (Imunologia como se o organismo importasse)**. Belo Horizonte: Coopmed,.

VEAZEY, RS.; SHATTOCK, RJ; POPE, M; KIRIJAN, C; JONES, J; HU, Q.; , T; MARX, PA; KLASSE, PJ; BURTON DR AND MOORE, JP. (2003) Prevention of vírus transmission to macaque monkeys by vaginally applied monoclonal antibody to HIV gp 120. *Nature Medicine* 9:343-346.

ZHOU, T., XU, L, DEY, B, HESSELL, A.J, RYK, D.V., XIANG, S.H et. al. (2007). Structural definition of a conserved neutralization epitope on HIV-1 gp120. *Nature*. 445:732-737.

ZOLLA-PAZNER S. (2004) Identifying epitopes of HIV-1 that induce protective antibodies. *Nat Rev Immunol*. 4(3): 199-210.

WILLEY, S., AASA-CHAPMAN, M.M.I. (2008). Humoral immunity to HIV-1: neutralization and antibody effector functions. *Trends in Microbiology*. 16:596-604.

WEISS R, CLAPHAM P, CHEINGSONG-POPOV R, et al. (1985) Neutralization of human T-lymphotropic virus type III by sera of AIDS and AIDS-risk patients. *Nature* 1985; 316: 69-72.

WU, S., LETCHWORTH, G. J. (2004). High efficiency transformation by electroporation of *P. pastoris* pretreated with lithium acetate and dithiothreitol. *BioTechniques* 36:152-154

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](#)