

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR**

**Criação de uma série de lentivetores para
transferência gênica estável e regulada**

**José Eduardo Vargas
Orientador: Guido Lenz**

**Porto Alegre
2009**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR**

**Criação de uma série de lentivetores para
transferência gênica estável e regulada**

José Eduardo Vargas

**Dissertação submetida ao programa de
Pós-Graduação em Biologia Celular e
Molecular da Universidade Federal do
Rio Grande do Sul como requisito para
a obtenção do grau de Mestre.**

Orientador: Guido Lenz

Porto Alegre

Dezembro, 2008

INSTITUIÇÕES

Esse trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Sinalização e Plasticidade Celular (Departamento de Biofísica/Centro de Biotecnologia/UFRGS), no Laboratório de Inmunogenética (Departamento da Genética, Instituto de Biociencias/UFRGS), no Laboratório de Cardiologia Molecular e Celular (Instituto Universitário de Cardiologia IC/FUC).

FONTE FINANCIADORA

O presente trabalho foi financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

Dedico este trabalho a minha família, que sempre esteve presente quando precisei, me auxiliando nas dificuldades e partilhando das alegrias conquistadas.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Dr. Guido Lenz, pelos valiosos ensinamentos que vou aproveitar durante minha carreira acadêmica. Por sempre acreditar na minha capacidade me incentivando e permitindo que eu desenvolvesse este trabalho.

Ao Dr. Andrés Delgado Cañedo, por me ensinar tudo sobre clonagem, pelas palavras de conforto sempre convincentes quando necessárias, sua inestimável amizade e pelo grande exemplo científico e pessoal.

Ao Dr. José Artur Bogo Chies, que possibilitou a realização desse trabalho permitindo-nos utilizar as instalações e reagentes do Laboratório de Imunogenética sempre que precisamos.

Aos doutorandos Tiago Dalberto e Pedro Chasgastelle, pelo enorme auxílio experimental e compreensão.

À banca, pela disponibilidade e paciência.

À minha namorada, Fabiana, pessoa incrível, pelo seu imprescindível carinho, grande amizade e paciência, não seria o mesmo sem ti. E sua família, pessoas maravilhosas.

Aos amigos com que moro. Em especial ao Diego, grande pessoa.

Aos amigos do Laboratório de Cardiologia Molecular e Celular, Lucinara, Melissa, Tiago e em especial à Sandra, que fizeram de nosso laboratório um lugar agradável e prazeroso para trabalhar.

Aos amigos do Laboratório de Imunogenética.

Aos amigos do Laboratório 107 em especial à doutoranda Patricia Luciana Lopez da Costa pela amizade e palavras de conforto.

À minha família, pelo auxílio em momentos cruciais e pela compreensão necessária para com um mestrando. Por estarem presentes e me ressaltarem o que é verdadeiramente importante na vida e por não compreenderem todo meu trabalho, mas me apoiarem plenamente. Minha mãe, pelos conselhos valiosos, meu pai e minha avó, pelo seu apoio. Minha irmã, pelo auxílio incondicional e meu irmão, por simplesmente dizer o correto no momento indicado.

A todos que contribuíram de alguma forma para esse trabalho e não foram aqui citados, meus sinceros agradecimentos.

A todos os pesquisadores que contribuíram para os conhecimentos utilizados nesta dissertação.

ÍNDICE

Instituições e Fontes Financiadoras	3
Página Dedicatória	4
Página de agradecimentos	5
Índice	7
Abreviaturas	8
I Resumo	9
II <i>Abstract</i>	10
I Introdução	11
1.1 Noções básicas de transferência e terapia génica	11
1.2 Os Lentivetores	13
1.3 Produção de vetores virais para terapia génica	16
1.4 Sistemas de controel da expressão génica usados em vetores de transferência génica	19
1.5 Genes repórteres fluorescentes	22
1.6 Sistema de expressão de RNAm bicistrônicos	22
2 Objetivos	25
2.1 Objetivos Gerais	25
2.2 Objetivos Específicos	25
3 Apresentação artigo científico	27
3.1 Artigo científico	28
4 Discussão	52
5 Dificultades Metodológicas e soluções	56
7 Perspectivas	57
6 Bibliografía	58
7 Anexo	65
7.1 Modificações de protocolos	65
7.2 Mapas de plasmídeos intermediários	71
7.3 Sequenciamentos	75
8. Curriculum Vitae	77

LISTA DE ABREVIATURAS

AmpR : *Ampiciline Resistance*.

CMV: *Citomegalovirus promoter*.

EGFP : *enhanced Green Fluorescent Protein*.

DsRed ou RED: *Discosome Red Fluorescent Protein*.

GFP: *Green Fluorescent Protein*.

IRES: *Internal Ribosome Entry Site*.

LTR: *Long Terminal Repeats*.

mRNA ou RNAm : RNA mensageiro.

ORF: *Open Reading Frame*.

PCR: *Polymerase Chain Reaction*.

pLR: Plasmídeos lentivirais com expressão do transgene por RSV.

Psi (Ψ): Sinal de empacotamento.

RNA: *Ribonucleic Acid*.

RSV: *Rous Sarcoma Virus promoter*.

Tet: tetracilina.

tetO2: Operador do transposon 10. TetR: Proteína repressora ao unir-se com tetraciclina

TRE: *tetracycline response element*.

U6: Promotor da RNA polimerase tipo III

WRE: *Wound-responsive cis-Element*

I. RESUMO

A transferência gênica baseada em retrovírus permite o carregamento e integração de um material genético exógeno ao genoma de uma célula alvo, o que permite a expressão estável do transgene tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Até o momento não existiam lentivetores que permitam a clonagem de diferentes genes sob promotores de expressão gênica regulada por tetraciclina e também a análise de expressão através do IRES - sistema repórter. No presente trabalho, foi criada uma série de lentivetores contendo plasticidade estrutural para permitir a clonagem de diferentes genes, sítios únicos de clivagem para clonagem de diferentes promotores, elemento TRE para regular a expressão do transgene com tetraciclina ou doxíciclina e o sítio IRES expressando duas proteínas repórteres: GFP ou DsRed. A série de vetores produzidos, denominados pLR1, pLR2 e pLR3 possui o promotor RSV antecedido pelo elemento TRE e um sítio de clonagens múltiplas. Além disso, o pLR2 possui o sistema IRES-GFP e o pLR3 o sistema IRES-DsRed para geração de mRNA bicistrônico. A eficiência funcional de cada um dos elementos utilizados nas estruturas de cada um dos plasmídeos os transforma numa boa ferramenta biotecnológica para transferência gênica estável.

II. **ABSTRACT**

Gene transfer based upon lentiviral vectors allows the integration of exogenous genes into the genome of a target cell, turning these vectors into a powerful tool that allows stable expression of transgenes in mammalian cells both *in vitro* as well as *in vivo*. Currently, no plasmids for lentivirus are available that allow cloning of different genes to be regulated for different promoters or regulated by tetracycline and, also, that permit the analysis of the expression through a IRES – reporter gene system. In this work, we have generated a series of lentiviral vectors containing: a malleable structure to allow the cloning of different target genes in a multicloning site (mcs); unique sites to exchange promoters; TRE element to regulate the transgene expression with molecules such as tetracycline or doxycycline, and internal ribosome entry site followed by one of two reporter genes: GFP or DsRed. The series of vectors were named pLR1, pLR2 and pLR3. This vector serie has the RSV promoter flanked by a TRE element and a multicloning site. Also, the pLR2 plasmid has the IRES-GFP sequence after the mcs while pLR3 has IRES-DsRed for the generation of a bicistronic mRNA. The functional efficiency of each element used in the different plasmid structures transforms the plasmid serie into a powerful biotechnology tool for stable gene transfer.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Terapia gênica viral e não-viral

Terapia gênica pode ser definida como o procedimento que envolve a administração de material genético exógeno em células-alvo com o intuito de tratar doenças (Schmitz *et al.*, 2005). A transferência gênica pode ser realizada *ex vivo*, quando se dá em células extraídas do paciente, para serem manipuladas e então reintegradas ao organismo original, ou *in vivo*, quando a transferência gênica é realizada por administração direta do gene terapêutico ao paciente (Dani, 1999; Nardi *et al.*, 2002).

Geralmente, a transferência gênica é realizada com a utilização de um vetor (do latim *vector* – aquele que entrega). O vetor ideal deve apresentar características básicas como a capacidade de acomodar qualquer transgene, baixas imunogenicidade e citotoxicidade, expressão estável, direcionamento para tipos específicos de células ou tecidos, baixo custo, fácil produção e manipulação e ainda, capacidade de regulação da expressão do transgene no tempo e/ou na quantidade requerida do seu produto (Nardi *et al.*, 2002, Uddin *et al.*, 2007). Entretanto, na prática dispomos apenas de sistemas representando aproximações deste vetor ideal, com diferentes vantagens e desvantagens.

Os sistemas de entrega gênica podem ser enquadrados em três categorias: métodos químicos, físicos e biológicos. Os métodos químicos abrangem o uso de lipossomas, dendrímeros e outros complexos que, em sua maioria, possuem natureza catiônica que permite a formação de um complexo com o DNA,

negativamente carregado (Frézard F., 2001; Aneed., 2004). As vantagens destes complexos são a diminuição da força de repulsão entre o DNA e o domínio extracelular das proteínas presentes na membrana, que também apresentam carga total negativa, e a proteção que estes compostos oferecem ao DNA contra a degradação por parte das nucleases (Nardi *et al.*, 2002; Ruozi *et al.*, 2003). Vetores lipossomais aniônicos baseados em envelopes retrovirais (AVEs) podem ser utilizados para expressão de transgene em diversas linhagens celulares (Mady *et al.*, 2004).

Entre os métodos químicos de transferência gênica, o método de precipitação de DNA com fosfato de cálcio é eficiente *in vitro* (Yang *et al.*, 2008), sendo de muito utilizado na produção de vírus recombinantes para utilização em terapia gênica (Nardi *et al.*, 2002). Porém, este método é pouco viável *in vivo* devido a sua baixa eficiência (Kuroda *et al.*, 2005).

Os métodos físicos baseiam-se principalmente em sistemas de entrada de plasmídeos nas células-alvo, com ênfase em processos principalmente mecânicos. São exemplos a microinjeção direta, a eletroporação e a biobalística. O dilema envolvendo essas abordagens é a quantidade de células que podem ser atingidas e a toxicidade (Dani S.U., 1999), sendo estes bastante utilizados nas metodologias de vacinas de DNA e produção de organismos transgênicos.

Por último, os métodos biológicos incluem os vetores de origem viral. As partículas virais, por natureza, são agentes infecciosos capazes de expressar sua informação genética nas células infectadas (Palù *et al.*, 1999). O ciclo vital de um vírus é dividido em duas etapas: a infecção, representando o momento de

introdução do genoma viral na célula hospedeira, e a sua replicação. Para ambas as fases são necessários grupos de genes cuja expressão é regulada temporalmente, sendo os genes de função regulatória os primeiros a serem expressos, seguidos pelos genes estruturais. A terapia gênica viral sustenta-se na produção de vírus recombinantes, sem capacidade replicativa, a partir do fornecimento das seqüências gênicas necessárias para a produção do vetor viral, juntamente com seqüências contendo o transgene (Delenda *et al.*, 2006).

1.2 Os lentivetores

A família *Retroviridae* é caracterizada por apresentar RNA de polaridade positiva como material genético, e por converter este genoma de RNA em DNA através da transcriptase reversa. São três as subfamílias: *Oncovirinae*, *Lentivirinae* e *Spumavirinae*. Os oncovírus são bastante utilizados em terapia gênica, especialmente o Vírus da Leucemia Murina (MLV). Entretanto, estes vírus não são capazes de infectar células quiescentes, como é o caso de neurônios ou células tronco hematopoiéticas. Assim, os lentivírus passaram a ser intensamente pesquisados com tal finalidade (Miller, 1990; Miller, 1992; Culver & Blaese, 1994; Palù *et al.*, 1999; Buchsacher & Woong-Staal, 2000).

Em função de suas características biológicas e dos anos de intenso estudo dedicados a sua epidemiologia. (Parolin *et al.*, 1994; Naldini, 1998) o representante mais conhecido dos lentivírus é o Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), cuja utilização como vetor de terapia gênica em humanos ainda não foi liberada. As restrições usualmente feitas sustentam-se nos seguintes aspectos: a integração sítio-inespecífica (Cornetta *et al.*, 1991), a possibilidade de

recombinação homóloga com seqüências retrovirais endógenas (Chong *et al.*, 1998) e a possibilidade de recombinação com o vírus selvagem. Evidências experimentais suportando e contrariando tais argumentos já foram apresentadas (Pagès & Bru, 2004), permanecendo como fator proibitivo de seu emprego em nível clínico a questão da grave patologia a ele associada, pelo menos até o momento em que todas as questões de biosegurança estejam resolvidas.

Todos os retrovírus apresentam duas seqüências terminais repetidas LTR vírus. Tais seqüências contêm os elementos regulatórios da expressão gênica e da integração viral. Duas ORFs denominadas de *gag* e *pol* fornecem os elementos estruturais e enzimáticos, respectivamente, necessários para o vírus. Além destas, o gene *env* é comum a todos retrovirus completando o número mínimo de três ORFs (Figura 1), como no caso do vírus da leucemia murina.

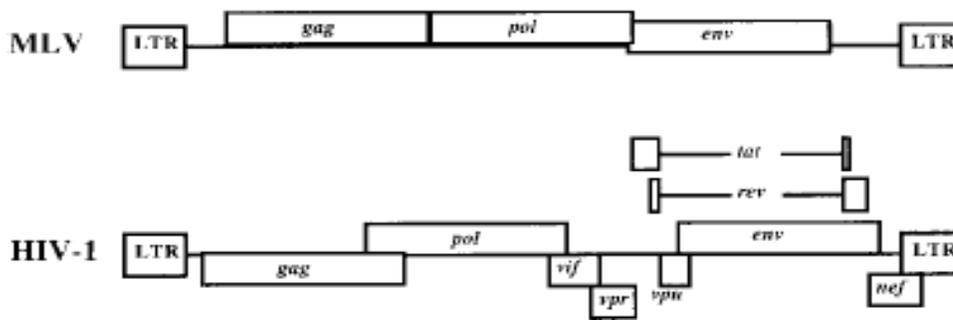


Figura 1 - **Esquema representativo da organização do genoma dos retrovírus.** Representação do Vírus da Leucemia Murina (MLV), considerado de organização simples, e do Vírus da Imunodeficiência Humana do tipo 1 (HIV-1), considerado extremamente complexo em função do grande número de genes ditos acessórios. (Modificado de Buchschacher & Woong-Staal, 2000).

O ciclo replicativo dos vírus é iniciado com a interação entre os receptores celulares localizados na membrana plasmática e as glicoproteínas do envelope

viral. Ocorre adsorção do envelope com a membrana celular e liberação do capsídeo viral no citoplasma celular. O RNA viral é retrotranscrito em DNA e transportado para o núcleo. A integração do provírus no genoma do hospedeiro permite que o mesmo seja replicado junto com o DNA hospedeiro e que seja passado para a progênie celular. A partir daí, novos vírus podem ser produzidos e liberados das células (Klarmann *et al.*, 2003). No caso de vetores virais para transferência gênica, a ausência de genes estruturais e/ou regulatórios no vetor transferido para as células caracteriza a infecção “de ciclo único”, ou seja, sem a produção de novas partículas, o que normalmente é denominado transdução viral.

A integração do genoma viral no genoma hospedeiro depende da capacidade do provírus de penetrar no núcleo da célula. Para a maioria dos retrovírus isto é possível somente durante a divisão celular, quando ocorre desorganização da carioteca. Os lentivírus, contudo, apresentam mecanismo de transporte ativo do seu provírus através dos poros da carioteca (Bukrinsky & Haffar, 1999), o que ocorre devido à presença de seqüências de localização nuclear e pela formação de complexos protéicos de transporte dependentes de genes acessórios, como o *vpr* no HIV (Vodicka *et al.*, 1998). Esta é uma das vantagens dos lentivírus frente aos oncovírus, quando o objetivo é infectar células quiescentes.

As vantagens acima expostas justificam o constante desenvolvimento de lentivetores para realizar transferência gênica, sendo que os vetores baseados em HIV-1 têm sido considerados uma grande ferramenta, que ainda deve sofrer ajustes para poder ser empregada em nível clínico. Os vetores chamados de auto-

inativantes possuem os LTR inativados (TATA box deletado), com isto o inserto não terá promotor para a transcrição completa, somente para a transcrição do gene de interesse., sendo considerados mais seguros em função da incapacidade de produção de novas partículas a partir da célula transduzida, além de apresentarem reduzido risco de oncogênese por inserção e de produção de novas variantes virais (Naldini *et al.*, 1996 a e b). O desenvolvimento de sistemas auto-inativantes baseados em HIV continua a receber importantes contribuições experimentais, especialmente no que se refere ao melhoramento das construções e da segurança em tais sistemas (Cui *et al.*, 1999; Iwakuma *et al.*, 1999; Lois *et al.*, 2002; Zaiss *et al.*, 2002).

1.3 Produção de vetores virais para terapia gênica

Os vírus dependem da célula hospedeira para sintetizar suas proteínas utilizadas na replicação. A estrutura básica viral compreende uma parte central (núcleo), constituída por material genético e por proteínas associadas, e uma parte de revestimento, composta por subunidades protéicas (protômeros) delimitando o capsídeo. Preenchendo este espaço, há uma matriz também de origem protéica. Alguns vírus apresentam um componente adicional denominado envelope viral.

O capsídeo fornece proteção contra a desnaturação química ou a degradação enzimática do ácido nucléico, possuindo também os ligantes protéicos para os receptores celulares que determinam o tropismo da partícula viral. O envelope é um fragmento de membrana lipoprotéica que pode ser modificado pela substituição parcial e/ou adição de proteínas vírus-específicas.

Em geral, o envelope é adquirido durante o brotamento da partícula. Este fenômeno pode ocorrer tanto na membrana nuclear como na membrana celular, e também pode ser dependente de vacúolos. Em vírus envelopados, as proteínas ligantes para os receptores celulares estão presentes nesta estrutura, o que determina o fenômeno de adsorção envelope-célula e assim o tropismo do vírus (Lanciotti E.K., 2001).

Para produzir vetores virais é necessário fornecer todos os elementos mencionados anteriormente através de um sistema de entrega gênica. A transfecção de plasmídeos, codificando os diferentes componentes dos vírus é realizada sobre uma monocamada de células aderentes denominadas células empacotadoras (Pear *et al.*, 1993; Soneoka *et al.*, 1995). Nestas células, os plasmídeos de empacotamento e de envelope têm seus genes transcritos e traduzidos para produzir as proteínas estruturais e as enzimas necessárias durante a formação dos vírus (Figura 2).

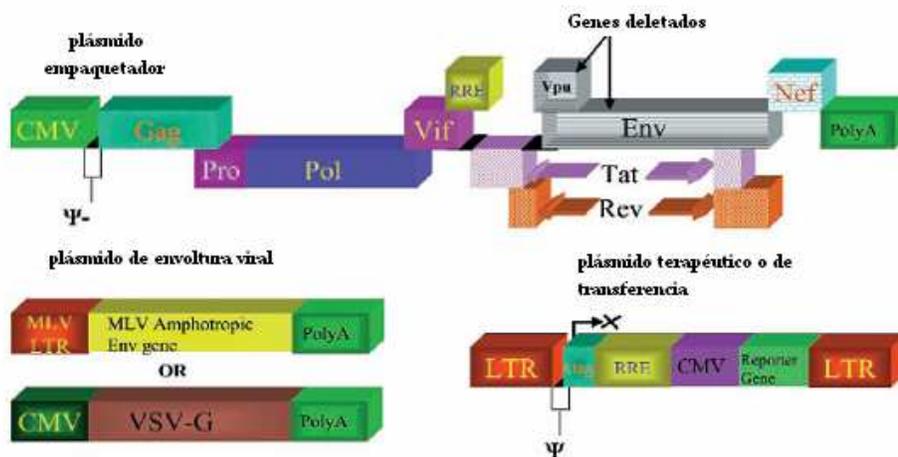


Figura 2– Produção de vírus recombinantes para terapia gênica. O genoma viral é alterado geneticamente de forma que o sinal psi (Ψ) esteja presente somente no

plasmídeo terapêutico. Os três plasmídeos são co-precipitados sobre as células de empacotamento, de onde os vírus recombinantes são coletados. (Modificado de Daly & Chernajovsky,. 2000).

As seqüências regulatórias são separadas das seqüências estruturais em plasmídeo distintos e sem o sinal psi (Ψ), de modo que o vírus recombinante obtido seja defectivo para tais seqüências. Seu material genético, portanto, será basicamente composto pelo transgene (gene terapêutico), seus elementos regulatórios e as seqüências virais relacionadas aos eventos de retrotranscrição e integração (Kay *et al.*, 2001, Delenda *et al.*, 2006). É importante enfatizar que somente o plasmídeo com o transgene contém a seqüência psi de empacotamento. A grande relevância deste sistema de produção de vírus recombinantes, sustentado na utilização de diferentes plasmídeos é a segurança. Quanto mais separadas estas seqüências estiverem, em termos de plasmídeos individuais, mais eventos de recombinação serão necessários para reuni-las outra vez e empacotá-la na partícula viral, o que reduz a possibilidade de restauração do tipo selvagem ou o surgimento de novas variantes virais com a capacidade de replicação (Daly & Chernajovsky,. 2000; Delenda *et al.*, 2006).

1.4 Sistemas de controle da expressão gênica utilizados em vetores de transferência gênica

A habilidade para realizar o controle da expressão de um transgene, no tempo e no espaço, tanto em células cultivadas como em organismos transgênicos,

é uma valiosa ferramenta para o estudo funcional dos genes, como foi demonstrado por Kenny et al., 2002.

Entre os sistemas reversíveis de regulação da expressão gênica, os métodos comumente utilizados são baseados em lactose ou tetraciclina que pertencem originalmente ao sistema de regulação da expressão dos genes bacterianos (operon lacZ) (Hu & Davidson., 1987) e DNA móvel (Transposon 10) (Bertrand et al., 1983) respectivamente.

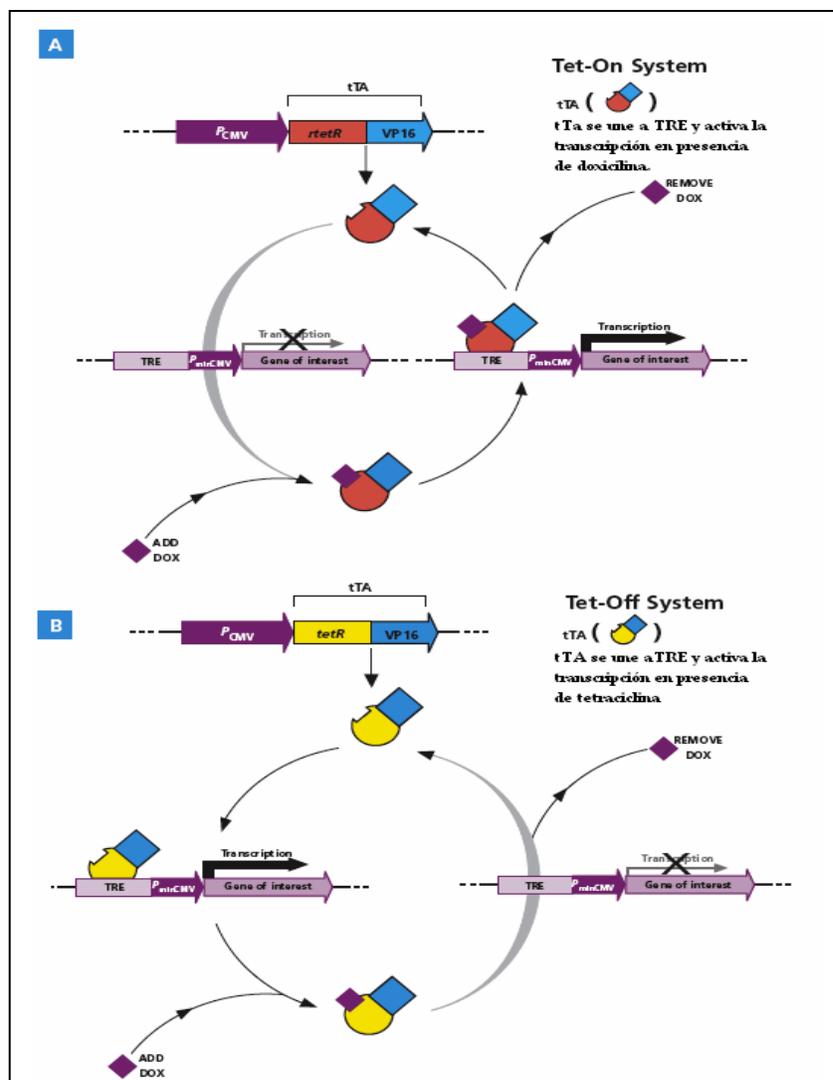


Figura 3- A. O sistema de tet-on: tTA se une à tetraciclina ou doxiciclina e ativa a transcrição. B. O sistema tet-off: o ativador da transcrição tet (Tta) é uma fusão do represor tet (TetR), ao domínio ativador de VP16 do vírus do *herpes simplex* (AD), permitindo assim, a transcrição do transgene (Laboratório Clontech, 1996).

Funcionalmente, uma proteína repressora designada TetR atua como um repressor transcricional regulando a expressão gênica diante da diminuição ou aumento da concentração citoplasmática da droga tetraciclina ou o seu análogo doxiciclina. Isto se deve ao fato de que as moléculas de tetraciclina podem atuar como reguladores positivos ou negativos desta expressão. A partir destas propriedades, foram gerados comercialmente vários plasmídeos nos quais a proteína TetR pode atuar como regulador positivo ou negativo quando é fusionada a domínios específicos da proteína VP6 (Laboratório Clontech, 1996) (Figura 3).

O mecanismo de interação entre TetR e o seu operador tetO ocorre entre o motivo do TetR (hélice-alça-hélice), e 19 pares de bases do operador tipo selvagem tetO (Berens *et al.*, 2003). Além do motivo selvagem, também existem variantes que contêm mudanças de bases nas posições 4 (tetO-4c) e 6 (tetO-6C) do mesmo operador. A seqüência inteira de tetO₂ é palindrômica com um ponto de inflexão na base 10 do mesmo. Os centros palindrômicos de dois operadores adjacentes estão separados em geral por 41 pares de bases. Muitos sistemas retrovirais utilizam o operador selvagem para regular a expressão de algum transgene particular. Foi demonstrado que a presença de somente um operador já é suficiente para regular, embora que parcialmente, a expressão do transgene, precisando-se de pelo menos dois operadores para que a regulação seja quase completa (Berens *et al.*, 2003).

Este sistema apresenta uma vantagem substancial com respeito a outros sistemas com a mesma abordagem, já que foi demonstrado que a administração sistêmica de doxiciclina em camundongos não possui efeitos adversos, o que permite uma administração segura de diferentes concentrações com o objetivo de regular a expressão do transgene de interesse (Goverdhana *et al.*, 2005).

A utilização de promotores fortes como CMV e o RSV garante a expressão do transgene no constructo, colocando a seqüência TRE à montante dos mesmos, pode-se temporalmente expressar um transgene quando necessário. Isto define uma valiosa ferramenta de interesse no momento de escolher sistemas virais com expressão gênica regulada.

1.5 Genes repórteres fluorescentes

Os genes repórteres fluorescentes são amplamente utilizados, já que, através do sinal fluorescente, sua expressão pode ser observada e quantificada nas células vivas. O gene repórter, DsRed, codifica uma proteína de 28 Kd denominada DsRed que, quando excitada a um comprimento de onda de 558nm, emite fluorescência vermelha de 583 nm (Vaquero *et al.*, 2005).

A proteína GFP emite fluorescência verde sob excitação e foi clonada a partir do cnidário *Aequorea victoria*. Em sua estrutura, a proteína verde fluorescente (23 kDa), possui um cromóforo situado em uma conformação cilíndrica central, limitada por 11 cadeias beta e uma hélice alfa central. A proteína GFP selvagem possui dois picos de excitação, um maior a 395 nm e um menor a 475 nm. Seu pico de emissão é de 509 nm, localizado na zona verde de espectro visível (Vaquero *et al.*, 2005).

1.6 Sistema de expressão de mRNA bicistrônicos

Muitas vezes, o uso de um gene repórter está acoplado à expressão de algum gene que se pretende estudar, permitindo identificar a célula que expressa esse transgene através da co-expressão do gene repórter.

Este processo pode ser realizados de várias formas. Porém, o sistema mais confiável é aquele no qual é gerado um mRNA bicistrônico contendo o gene de interesse e um gene repórter regulado por um único promotor. Este tipo de abordagem experimental pode ser realizado mediante a utilização de um sítio interno de entrada dos ribossomos denominado IRES (do inglês: *internal ribosomal entry site*) que é flanqueado pelos dois genes.

Originalmente, as seqüências IRES foram encontradas em muitos mensageiros virais (8,9), mas posteriormente foi demonstrado que também fazem parte do sistema de regulação gênica em células eucarióticas (10-12), sendo sua estrutura o requerimento básico para a iniciação interna da tradução *in vitro* (13).

Pesquisas feitas há 15 anos permitiram compreender os mecanismos que envolvem a atividade das seqüências IRES. A teoria mais aceita para o funcionamento do IRES aponta para uma estrutura tridimensional secundária do mRNA, que seria reconhecida pelos ribossomos e prenderia o mRNA apesar da existência de um códon de terminação na fase de leitura, com isto permitindo a leitura da segunda ORF (Figura 4) (Martin *et al.*, 2006).

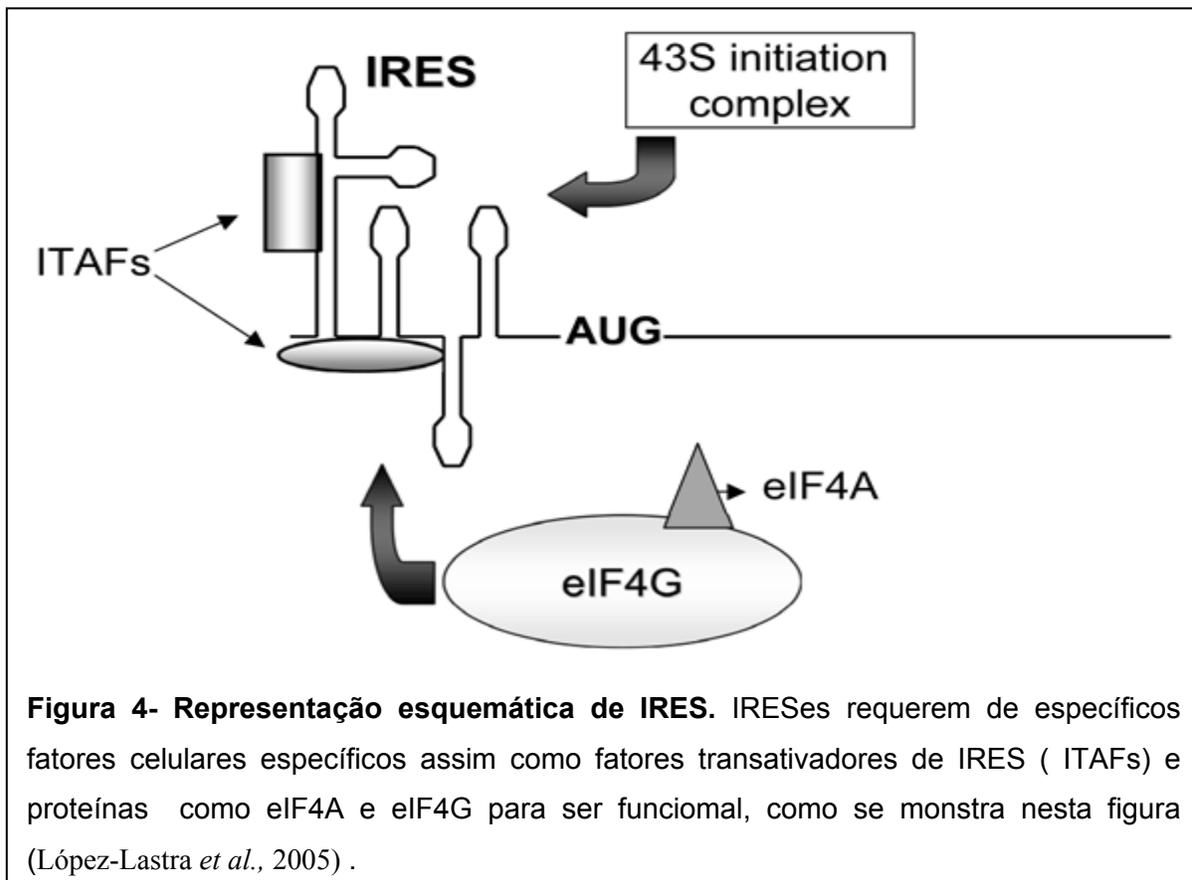


Figura 4- Representação esquemática de IRES. IRESes requerem de específicos fatores celulares específicos assim como fatores transativadores de IRES (ITAFs) e proteínas como eIF4A e eIF4G para ser funcional, como se mostra nesta figura (López-Lastra *et al.*, 2005) .

O mecanismo mais aceito é aquele que propõe que o IRES atua como uma estrutura independente que consegue dar início à tradução dos mRNAs eucarióticos. Isto se deve ao fato de que, por complementaridade, a subunidade ribossômica menor se une à seqüência IRES. Depois, através da união de fatores de tradução se inicia o recrutamento da subunidade ribossômica maior, iniciando assim a tradução. Deste modo, é assegurada outra fase de leitura do mRNA e o uso da seqüência IRES se transforma numa estratégia formidável para produzir construtos bi ou multi-cistrônicos. (Van Eden *et al.*, 2004).

2. OBJETIVOS

2.1 *Objetivos gerais*

Embora o uso clínico imediato de lentivetores seja restrito, seu uso como ferramenta para realizar transferência gênica em estudos de ciência básica é amplo. Contudo, a falta de lentivetores comerciais com uma estrutura plástica dificulta os trabalhos que pretendem usar esta ferramenta como eixo da pesquisa.

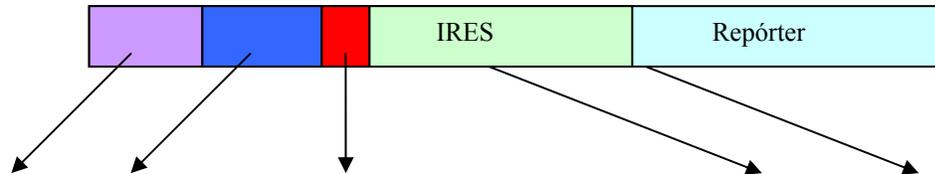
Desta forma, o presente trabalho tem por objetivo geral produzir uma série de vetores lentivirais que reúnam as seguintes características:

1. Geração de mRNAs bicistrônicos que permitam comprovar, ao mesmo tempo, a eficiência da transfecção assim como de expressão gênica do transgene, através da utilização de genes repórteres: 1. DsRed (proteína fluorescente vermelha) e 2. GFP (proteína fluorescente verde)
2. Utilização de um promotor de expressão eficiente, RSV, com a possibilidade de regular a expressão do transgene com moléculas como tetraciclina/doxiciclina.

2.2 *Objetivos Específicos*

1. Construir e confirmar os plasmídeos lentivirais descritos na Tabela 1;
2. Analisar funcionalmente cada um dos componentes do cassete de expressão; através de ensaios de transfecção transiente;

3. Testar os plasmídeos criados quanto a sua utilização em ensaio de transferência gênica estável.



Nome	Regul.	Promotor	Enzimas do MCS	Repórter
pLR1		RSV	NheI, BmtI, NotI, XhoI, SfiI, BamHI, XmaI, SmaI	
pLR2	TRE	RSV	NheI, BmtI, NotI, XhoI, SfiI, BamHI, XmaI, SmaI	IRES EGFP
pLR3	TRE	RSV	NheI, BmtI, NotI, XhoI, SfiI, BamHI, XmaI, SmaI	IRES DsRed

Tabela 1. Resumo das características dos vetores finais a serem produzidos durante o presente trabalho.

Manuscrito (em fase de redação) formatado segundo regras para ser submetido à revista **BMC Biotechnology**.

Creation of a lentivector series for stable transfection of bicistronic genes regulated by doxycycline

José Eduardo Vargas^{1,2}, Patrícia Luciana da Costa Lopez¹, Tiago Dalberto Pires³,
Melissa Camassola⁴, Guido Lenz¹, Andrés Delgado-Cañedo²

¹ *Laboratório de Sinalização e Plasticidade Celular. Instituto de Biofísica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), 91501-970 Porto Alegre, RS, Brasil.*

² *Laboratório de Biologia Molecular e Celular, Fundação Universitária de Cardiologia, 90620-000, Porto Alegre, RS, Brasil.*

³ *Laboratório de Imunogenética, Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), 91501-970 Porto Alegre, RS, Brasil.*

⁴ *Centro de Pesquisas em Células-tronco e Terapia Gênica. 92425-900, Canoas, RS, Brasil.*

Email: José Eduardo Vargas – josevargas@yahoo.com.ar; Guido Lenz – lenz@ufrgs.br; Patricia Luciana da Costa Lopez -patilu17@yahoo.com.br, Tiago Dalberto Pires - tiagodalberto@hotmail.com, Melissa Camassola - camassola@yahoo.com.br, Andrés Delgado-Cañedo - andres@unipama.edu.br

Abstract

Background: Gene transfer based on lentiviral vectors allows the integration of exogenous genes into the genome of a target cell, turning these vectors into a powerful biotechnological tool that allows stable expression of transgenes in mammalian cells both *in vitro* as well as *in vivo*. Currently, there are no lentivectors available that allow cloning of different genes under the regulation of tetracycline and, also, that permit the analysis of the expression through an IRES – reporter gene system.

Results: In this work, we generated a series of lentiviral vectors containing: a malleable structure to allow the cloning of different target genes in a multicloning site (mcs); unique sites to exchange promoters; a TRE element to regulate the transgene expression with molecules such as tetracycline or doxycycline, and an internal ribosome entry site (IRES) followed by one of two reporter genes: GFP or DsRed. This series was named pLR1, pLR2 and pLR3. The main features are a RSV promoter flanked by a TRE element and a multicloning site. Also, the pLR2 plasmid has IRES-GFP sequence after the mcs, while pLR3 has IRES-DsRed for the generation of a bicistronic mRNA. Transfection experiments showed good efficiency with a strong fluorescence of the reporter genes. On the other side, cloning of another reporter gene upstream of the IRES sequence showed that this sequence is functional producing both fluorescence proteins.

Conclusion: We engineered a new lentivector series with a plastic structure that makes this plasmid series into a powerful biotechnological tool for stable gene transfer.

Background

Gene transfer vectors based on retroviruses, including oncogenic retroviruses and lentiviruses, provide effective means for the delivery, integration, and expression of exogenous genes in mammalian cells; converting these vectors into a powerful biotechnological tool that allows stable transgene expression of genes both *in vitro* as well as *in vivo* cells (1,2). In contrast to oncogenic retroviruses which are dependent on transduction of mitotic cells (3), lentiviruses are independent of cell division to complete their replicative cycle (4). Therefore, they provide attractive gene delivery vehicles in the context of quiescent cells and are widely used as gene delivery vectors (3,5,6).

Lentivirus vectors include vectors based on viruses that cause immunodeficiencies, such as human immunodeficiency virus (HIV), simian immunodeficiency virus (SIV), feline immunodeficiency virus (FIV), and equine infectious anemia virus (EIAV). They are also promising for long-term gene expression *in vivo*, mainly in cells with low mitotic activity or that are not efficiently transduced by other vectors, such as neurons (7), hematopoietic system (8), retina (9), muscle and liver (10,11), lung (11-13), pancreatic islets (14), cochlea and corneal tissue (15).

The viral genome consists of two long terminal repeats (LTR) in the proviruses ends (integrative viral form) and contains regulatory elements for the viral integration and gene expression (16). Two ORFs (open reading frames) called *gag* and *pol*, provide the structural and enzymatic elements necessary to assembly a

functional virus. Besides these, the *env* gene is common in all retroviruses completing the minimum number of three ORFs.

In order to produce retroviral vectors, all the above elements are required. To accomplish the delivery of different plasmids, coding for different elements of the virus, is made by co-transfection in the packaging cells of plasmids containing *gag*, *pol* and *env*, besides the plasmid containing the transgene, which is the only containing a packaging signal (Ψ). This gives rise to an inactive lentiviral vector containing only mRNA of the transgene, but without *gag*, *pol* and *env* (17-21). Development of systems based on self-inactivant HIV continues to receive significant experimental contributions, especially in regard to improvement of genetic constructs and security in such systems (22,23-25).

Presently, many lentivectors are available; however, they use strong viral promoters to ensure the expression of the transgene of interest, but without the possibility to regulate the desired expression level. At the same time, the need to produce viral systems that code two or more proteins under regulation of the same promoter, in a tetracycline-controlled manner, continues to be a strategic necessity when construct for multicistronic expression are needed (26).

IRES (Internal Ribosome Entry Site) elements are sequences on which ribosomes are associated through the recognition of a particular RNA secondary structure (27) and are used as a useful tool to coordinate protein translation of multicistronic mRNA. Initially, IRES elements were studied in viruses where they coordinate the host cell translation machinery towards processing of viral transcripts but

later they have been also associated with translation of vital cellular proteins during development or compromising physiological situations (27, 28, 29).

Regulation by tetracycline or doxycycline has a substantial advantage over other systems with other approaches, as was demonstrated in several studies where systemic administration of doxycycline in experimental animals does not produce deleterious effects (30, 31).

Functionally, a repressive protein designated TetR (tetracycline regulated repressor) binds a TRE (tetracycline-responsive element) element near the promoter and acts as a repressor regulating the gene expression at transcriptional level in a tetracycline concentration dependent manner (32).

In this work, we created a series of lentivector containing: structural plasticity to allow the cloning of several genes of interest in a multicloning site (mcs); unique cleavage sites to interchange different promoters; a TRE element to regulate the transgene expression with tetracycline or doxycycline, and an IRES sequence for the generation of bicistronic mRNA that allows, at the same time, the evaluation of the transfection efficiency and indirectly quantify the transgene expression through the use of reporter genes such as GFP or DsRed.

Methods

PCR

To construct the vectors of the series, sequences of interest were amplified by PCR using different plasmids as template and primers containing cleavage sites

to facilitate the cloning strategies. Primers used to amplify each sequence of interest are showed in table 1.

All the PCR reactions were done using 200 μ M dNTP, 2 μ M MgCl₂, 1X PCR buffer, 10 pmol of each primer and 1Unit of Taq Platinum (Invitrogen, USA). For PCR were used 35 cycles, 95°C for denaturing (4 minutes in initial denaturation and 1 minute during the cycling), 60°C during 40 seconds for annealing and 72°C for extension (the times used to amplify each fragment are showed in table 1), final extension at 72°C for 15 minutes was used to facilitate the cloning of the PCR products.

The PCR products were cloned using the commercial TOPO TA cloning system following the manufacturer's recommendations (Invitrogen, USA).

<i>Primer</i>	<i>Sequence</i>	<i>Product size</i>	<i>PCR template</i>	<i>Extension time</i>
IRES-GFP (F)	TGAATTCCGAGAGATCCGTGGC	1331	pIRES-GFP	2 minutes
IRES-GFP (R)	TCCCACATGTTACTTGTACAGCTCG			
IRES-DsRed (F)	TAACCCGGGTGAATTCCGCC	1280	pTrKRAB-IRES _{DSRED}	2 minutes
IRES-DsRed (R)	GCCACATGTTACAGGAACAGGTGGTGG			
TRE (F)	TTTCTAGAGCTCGACTTTCAC _{TTTTCTC}	380	pRETRO-ON	1 minute
TRE (R)	TTTGGGCCCTTTCGTCTTCGAG			

Table 1: Primers used to amplify the fragments IRES-GFP, IRES-DsRed and TRE cloned in pCR2.1 TOPO. They showed the sequences of each one, the product size, template used and the time used in the extension stage during the PCR.

Cloning strategies

Double cleavages were made using compatible buffers to the two enzymes, obtained from the tables of compatibility indicated by manufacturers. Temperatures were chosen for each enzymes used.

All ligations were performed at 15°C for 12 hours using one unit of bacteriophage T4 DNA ligase (Invitrogen) in the buffer supplied with the enzyme in a final volume of 20 ul.

The products of different ligations were used to transform, by thermal shock, *Epicurian coli* lineage XL1 blue treated according to Sambrook & Russel (2001) (33). After transformation, the bacterias were plated in LB-Agar medium plus ampicillin (50ug/ml) for the selection of transformants.

The colonies obtained were inoculated in liquid LB medium with the same ampicillin concentration used in solid medium. Plasmid extraction was made by alkaline lysis (33) and was analyzed through cleavage with restriction enzymes and sequencing.

The constructs confirmed by cleave and sequencing were purified in large quantities using commercial columns according the protocol of the manufacturers. The planning to create all plasmids in this work, was permit with help of the pro-

gram pDRAW32.1.1.88 (<http://www.acaclone.com>). The results of sequencing were displayed and analyzed through the software BioEdit 7.0.5.3, (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>).

Cell Transfection

HEK 293T cells were grown in DMEN (Invitrogen) supplemented with 10%FCS (Cultilab, Brazil). Cells were seeded at 70 % confluence in 24 well plates ($3-5 \times 10^5$ cells) and transfected, after 24 hours of culture, using 2 μ l of lipofectamine 2000 (Invitrogen) and 0,8 μ g of the different expression vectors. Cells were analyzed between 48, 72 and 96 h post-transfection by fluorescence microscopy and flow cytometry.

Production and titration of lentiviral vectors

Lentiviral vectors were produced in the packaging cell lineage HEK 293T, as described in (34) with some modifications. For viral packaging, the following plasmids were used: transferring and packaging plasmids pMDLg / p.RRE, plasmid pRSV.rev encoding the reverse transcriptase and pVSV-G plasmid to pseudotype the recombinant virus with the G protein of VSV virus. Culture medium was changed 16 h after the transfection. Supernatants were collected every 24 hours for 3 days, filtered in filters with pores of 0.45 μ m (Millipore) and frozen at -80°C until use. The title of viral vectors produced was determined through use of serial dilutions of viral preparations to transduce 1×10^5 cells HEK293T cells in presence

of 8 µg/ml of polibrene (Sigma, USA) for 12 hours. 24, 48 and 72 hours after transduction, the transduction frequency and fluorescence intensity of the reporter genes were analysed by fluorescence microscopy and flow cytometry.

Fluorescence analysis

Transfected and transduced cells were analyzed by fluorescence microscopy and flow cytometry to study the functionality of the different structures cloned into the lentivector serie. The gene expression pattern of GFP and DsRed was analyzed initially by fluorescence microscopy on a AxioVert 40 CFL inverted microscope (Zeiss, Germany) equipped with filters 09 and 20 (FT 510; BP 450/90; LP 520 and FT 560; BP 546/12; BP 575-640, respectively). Microphotographs were obtained using a camera AxioCam MRC (Zeiss).

The intensity of fluorescence and transduction percentage of cells were analyzed in a FACS Calibur cytometer (Becton Dickinson, USA), using FL-1PMT to detect the GFP protein and FL-2 PMT to detect the DsRed protein. 10,000 events were collected. Off-line analysis were perform by WinMDI 2.9 software (<http://facs.scripps.edu/software.html>).

Results

Development the lentiviral vector series with different expression cassettes

To develop the lentiviral vector series we used commercial plasmid pCR3.1 (Invitrogen), pREP9 (Invitrogen), pUC18 (Amersham Pharmacia) pIRES-GFP (Stratagene) and pRETRO-ON (Clontech) along with the plasmids, pTtrKRAB-IRES_{DsRED} and pLL3.7, generously give by Dr. Didier Trono (EPA, Lausanne, Switzerland) and Dr. Luc van Parijs, (MIT, Cambridge, MA, USA), respectively.

Lentiviral plasmids according to his promoter RSV (Ross sarcoma virus) were named pLR and listed since 1 to 3 and were constructed following the cloning strategy.

First, the DNA fragments containing the sequence TRE, IRES-GFP and IRES-DsRED were amplified by PCR using plasmids pRETRO-ON, pIRES-GFP and pTTR-KRAB-DsRed as template, respectively. The PCR products were cloned in the plasmid pCR2.1 of the system TOPO TA cloning system and they were named pCR2.1-TRE, pCR2.1-IRES-GFP and pCR2.1-IRES-DsRed.

Next, the fragment located between the restriction sites for Apal and EcoRI of pLL3.7 was replaced by the multicloning site (MCS) of pUC18, located between the restriction sites of EcoRI and Apal. This plasmid was named pLL-mcs18. The presence of a unique cloning site for EcoRI in pLLmcs18 was used for cloning of IRES-RED or IRES-GFP sequences, obtained from pCR2.1-IRES-DsRED and pCR2.1-IRES-GFP plasmids and the new lentiviral plasmids were named pLLmcs18-IRES-RED and pLLmcs18-IRES-GFP, respectively.

Then, TRE sequence from pCR2.1-TRE was obtained using the Apal and Xbal enzymes and cloned into the plasmid pLLmcs18 obtaining the lentiviral plasmid named pLLmcs18-TRE .

To created the first lentiviral plasmid expression of the serie that we named pLR1', pLR2' and pLR3', the fragment located between of the cleavage sites for Xbal and BamHI enzymes of pLL-mcs18, pLLmcs18-IRES-GFP and pLLmcs18-IRES-DsRed were cleaved with BamHI and Xbal replacing them by the fragment located in pREP9 between the same enzymes. This fragment contains the RSV promoter and a mcs.

The sequence TRE was cloned in each plasmid of the serie cleaving the plasmid pLLmcs-TRE with enzymes Xbal and SpeI and cloned in the different set of the serie pLR cleaves with the same enzymes, defining the new lentiviral series. pLR lentiviral plasmid maps of the finalized series are shown in the Figure 1.

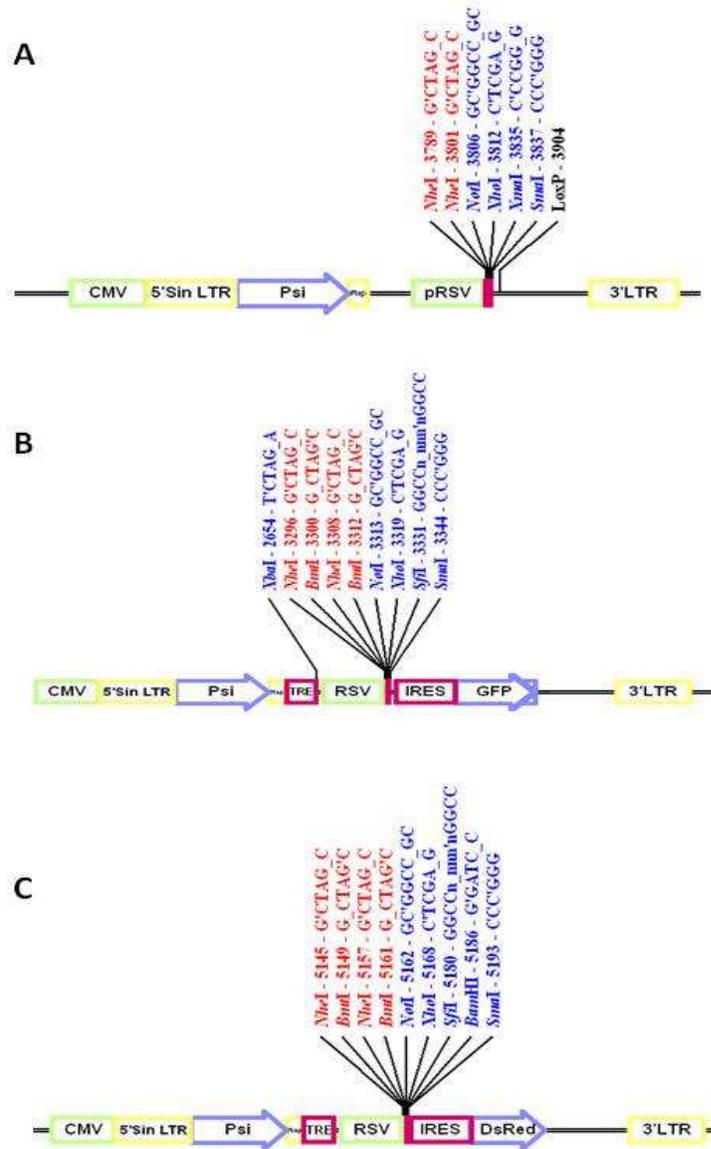


Figure 1 – Diagram depicting the expression cassette of the three plasmids of the pLR serie. a- Expression cassette of pLR1 lentivector, b- expression cassette of the pLR2 lentivector and c- expression cassette of the pLR3 lentivector.

Molecular testing to confirm the plasmid structures

To determine the correct cloning of the sequences in the different lentiviral plasmids of the pLR serie, we used different restriction enzymes. The pLR1 plasmid was confirmed using KpnI or KpnI+BamHI endonucleases and pLR2 and pLR3 plasmids were confirmed by cleavage with ApaI, HindIII or PvuII endonucleases. The band patterns of each enzymatic cleavage are shown in the Figure 2.

After confirmation by restriction cleavage, three clones of each plasmid were confirmed by sequencing (data not shown) and all the plasmids presented the expected sequences.

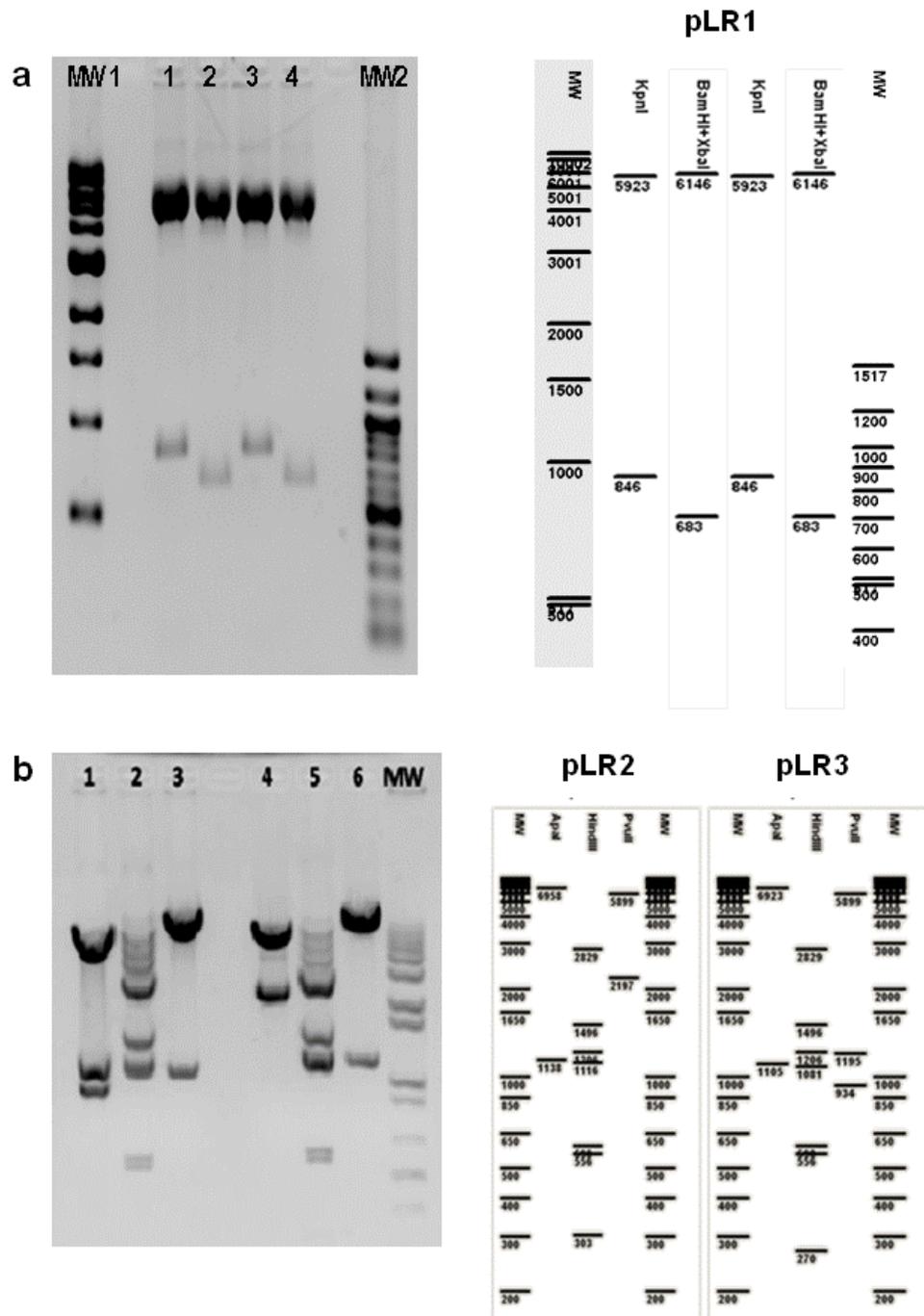


Figure 2 - Observed and expected plasmid cleavage patterns after the cleavage with different endonucleases. a- Pattern of two pLR1 clones cleaved with the endonucleases KpnI (lanes 1 and 3) or the double cleavage with KpnI and BamHI endonucleases (lanes 2 and 4). Two molecular weights were used: NEB 1000pb DNA Ladder (left marker) and

NEB 100pb DNA Ladder (right marker). b- cleavage pattern of the pLR2 and pLR3 plasmids cleaved with the endonucleases PvuII, HindIII or ApaI. Lanes 1, 2 and 3; pLR2 cleaved with enzymes PvuII, HindIII or ApaI, respectively. Lanes 4, 5 and 6; pLR3 cleaved with enzymes PvuII, HindIII and ApaI, respectively. MW - molecular weight. Invitrogen 1Kb plus DNA ladder.

Transient transfection assay

To confirm the functionality of the cloned sequences we analyzed the gene reporter expression produced by pLR2 and pLR3 through transfection of HEK293 cells. Both plasmids induced the expression of the expected fluorescent protein (Figure 3A and 3B).

To test the functionality of the IRES sequence of the pLR2 and pLR3 plasmid, the gene that encodes the fluorescent protein DsRed of the plasmid pTA-DsRed, available in our laboratory, was cleaved with BlnI enzyme and cloned into plasmid pLR2 cleaved with enzyme NheI. Similarly, the gene that encodes the enhanced green fluorescent protein (EGFP) was obtained from pEGFP-N1 plasmid cleaved with NheI and NotI endonucleases and cloned into plasmid pLR3 cleaved with the same enzymes. Both cloning strategies showed optimal IRES activity of the fluorescent proteins cloned upstream and downstream of the sequence (Figure 3C and 3D).

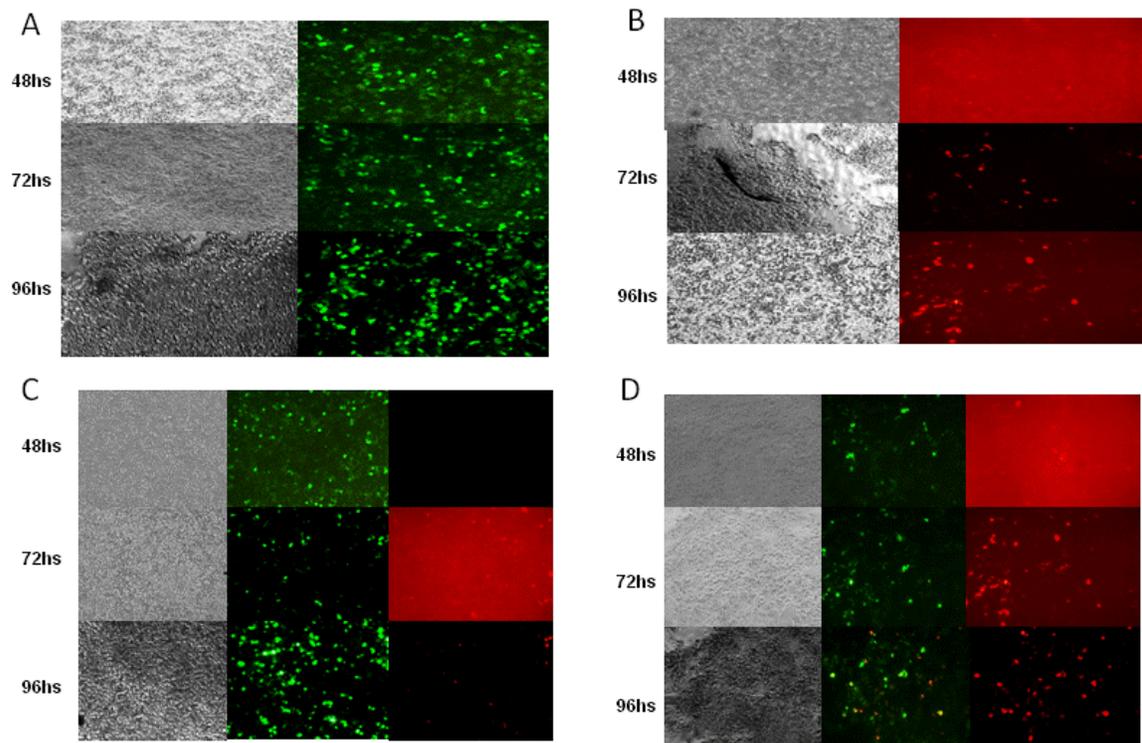


Figure 3-Fotomicrographies of HEK293 cell line transfected with pLR2 plasmid (A) and pLR3 plasmid (B), pLR2-DsRed plasmid (C) and pLR3-GFP plasmids (D). Expression of fluorescent proteins was analysed 48, 72 and 96 hs after transfection.

Polylinker plasticity

The pLR serie construction produced a serie of lentivectors with a multi cloning site, ten endonucleases sites in pLR1 plasmid and nine for pLR2 and pLR3, which allows the cloning of a wide range of DNA fragments. Altogether, the unique site for XbaI between the TRE sequence and the promoter give the possibility of exchange the promoter.

Discussion

Lentivectors are important biotechnological tools due to their natural ability to transduce many kinds of cells in a stable manner, including quiescent cells state. We have developed the pLR series considering four important points: strong and exchangeable promoters, genetic expression regulated by tetracycline, IRES activity followed by reporter genes and unique cleavage sites strategically located.

Viral promoters have been successfully used for transgene expression. We selected the Rous sarcoma virus (RSV) promoter, since it has strong activities in many types of cells (35, 36, 37). In our constructs, RSV induced high reporter gene expression of genes located both upstream as well as downstream of the IRES sequence.

The IRES sequence chosen in this work was the type II IRES of Encephalomyocarditis virus (EMCV). This IRES sequence initiates translation efficiently in reticulocyte lysates and many cell types in the absence of other cell proteins, and is relatively insensitive to fluctuations in salt concentration (38), turning it into a good biotechnological sequence election of many reserchers. In pLR2 and pLR3 the incorporation of this IRES sequence showed a high fluorescent protein level and independence of the cap-dependent translation.

We also report here the development and validation of the pLR series for maximizing the efficiency and versatility of IRES-based vectors. Many studies pointed to the involvement of secondary structures in the recognition of functional ribosome entry sites, as well as the importance of the distance between polypyrimidine tract and the actual initiating AUG (39). It was also demonstrated

that the ECMV IRES is dependent on initiation codon of the reporter gene, cloned downstream the IRES, suggesting that are not completely independent modules (39). We showed that pLR vectors series produced differential expression mediated IRES with a powerful expression of the reporter gene cloning downstream of the IRES. Transfection experiments also validated the mcs, as a fluorescent protein cloned upstream of the IRES was readily expressed (see Figure 3).

We selected EGFP and DsRed2 as gene reporters for our constructs. The first one is expressed in a wide range of mammalian cells with strong fluorescent and has become a versatile tool for monitoring mammalian expression (40). The second, is a variant of tetrameric red fluorescent protein (DsRed), modified with six point mutations. These mutations improve the solubility of DsRed2 by reducing its tendency to form aggregates decreasing the time from transfection to detection. DsRed2 retains the benefits typical of red fluorescent proteins, such as a high signal-to-noise ratio and distinct spectral properties for use in multicolor labeling experiments (41). The results obtained in this work contribute to the broad range of work that supports the use of these reporter genes and validate them into the pLR series.

The vectors shown in Figure 1 represent only prototypes of this series of regulated and bicistronic lentivectors. Using a similar cloning strategy, we intend to develop additional vectors to improve the power and efficiency of the pL vectors exchanging the promoter for other strong and ubiquitous expression promoters such as cytomegalovirus (CMV) promoter, simian virus (SV40) promoter and cellular polypeptide chain elongation factor 1 alpha (EF1) promoter. Also, the manipulation

of the multi cloning site could be changed to permit the cloning of different insert using the TA or Gateway technology.

The pLR vectors serie will be made freely available for the scientific community upon request and further informations are available at our site: <http://www.ufrgs.br/labsinal/pLRs.htm>

Conclusion

We have constructed a versatile lentiviral vector series that can be used for cloning a wide number of transgenes to be regulated with tetracycline for selective expression of the transgene. Besides, the created plasmid series permit the detection of the expression of the transgene by using fluorescent proteins expressed in tandem by the use of an IRES sequence. Moreover, using alternative cloning strategy, this plastic vector serie can be used in several other approaches, transforming the pLR lentiviral plasmid serie into powerfull biotechnological tools for stable gene transfer.

Authors' contributions

JEV and ADC conceived and designed the experiments and the vector constructs. GL assisted during development of the experimental design. All vectors were constructed by JV. Cell culture analyses were performed by JV and TD, viral production were carried by JV, TD, MC and PL and molecular analyses were carried out by JV, AC and GL mentored JV in construction work and data analysis. JV drafted the manuscript along with AC and GL completed the manuscript preparation. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgments

This work was made possible by funding from the Rio Grande do Sul State Research Foundation (FAPERGS) and the National Council for Research and Development (CNPq).

We also thank Ms. Pedro Chagastelles for help with FACS analyses.

Availability:

Plasmid information is available at the web page of our lab: <http://www.ufrgs.br/labsinal/pLRs.htm> and plasmids are available upon request.

References

1. Naldini, L., Blomer, U., Gage, F. H., Trono, D., and Verma, I. M. **Efficient transfer, integration, and sustained long-term expression of the transgene in adult rat brains injected with a lentiviral vector.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1996, **93**: 11382-11388
2. Verma, I. M., and Somia, N. **Gene therapy - promises, problems and prospects.** *Nature* 1997, **389**: 239-242
3. Miller, D. G., Adam, M. A., and Miller, A. D. **Gene transfer by retrovirus vectors occurs only in cells that are actively replicating at the time of infection.** *Molecular and cellular biology*, 1990, **10**: 4239-4242
4. Lewis, P. F., and Emerman, M. **Passage through mitosis is required for oncoretroviruses but not for the human immunodeficiency virus.** *Journal of Virology*, 1994, **68**: 510-516
5. Palu, G., Bonaguro, R., and Marcello, A. **In pursuit of new developments for gene therapy of human diseases.** *Journal of biotechnology*, 1999, **68**: 1-13
6. Buchschacher, G. L., Jr., and Wong-Staal, F. **Development of lentiviral vectors for gene therapy for human diseases.** *Blood*, 2000, **95**: 2499-2504
7. Blomer, U., Naldini, L., Kafri, T., Trono, D., Verma, I. M., and Gage, F. H. **Highly efficient and sustained gene transfer in adult neurons with a lentivirus vector.** *Journal of Virology*, 1997, **71**: 6641-6649
8. Barde, I., Zanta-Boussif, M. A., Paisant, S., Leboeuf, M., Rameau, P., Delenda, C., and Danos, O. **Efficient control of gene expression in the hematopoietic system using a single Tet-on inducible lentiviral vector.** *Molecular Therapy*, 2006, **13**: 382-390
9. Miyoshi, H., Takahashi, M., Gage, F. H., and Verma, I. M. **Stable and efficient gene transfer into the retina using an HIV-based lentiviral vector.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1997, **94**: 10319-10323
10. Kafri, T., Blomer, U., Peterson, D. A., Gage, F. H., and Verma, I. M. **Sustained expression of genes delivered directly into liver and muscle by lentiviral vectors.** *Nature genetics*, 1997, **17**: 314-317
11. Park, F., Ohashi, K., Chiu, W., Naldini, L., and Kay, M. A. **Efficient lentiviral transduction of liver requires cell cycling in vivo.** *Nature genetics*, 2000, **24**: 49-52
12. Goldman, M. J., Lee, P. S., Yang, J. S., and Wilson, J. M. **Lentiviral vectors for gene therapy of cystic fibrosis.** *Human gene therapy*, 1997, **8**: 2261-2268
13. Johnson, L. G., Olsen, J. C., Naldini, L., and Boucher, R. C. **Pseudotyped human lentiviral vector-mediated gene transfer to airway epithelia in vivo.** *Gene therapy*, 2000, **7**: 568-574

14. Gallichan, W. S., Kafri, T., Krahl, T., Verma, I. M., and Sarvetnick, N. **Lentivirus-mediated transduction of islet grafts with interleukin 4 results in sustained gene expression and protection from insulinitis.** *Human gene therapy*, 1998, **9**: 2717-2726
15. Han, J. J., Mhatre, A. N., Wareing, M., Pettis, R., Gao, W. Q., Zufferey, R. N., Trono, D., and Lalwani, A. K. **Transgene expression in the guinea pig cochlea mediated by a lentivirus-derived gene transfer vector.** *Human gene therapy*, 1999, **10**: 1867-1873
16. Bordor, J and Svoboda, J. **The LTR, v-src, LTR Provirus Generated in the Mammalian Genome by src mRNA Reverse Transcription and Integration.** *Journal of Virology*, 1989, **63**: 1015-1018
17. Blomer, U., Naldini, L., Verma, I. M., Trono, D., and Gage, F. H. **Applications of gene therapy to the CNS.** *Human Molecular Genetics*, 1996, **5**: 1397-1404
18. Dull, T., Zufferey, R., Kelly, M., Mandel, R. J., Nguyen, M., Trono, D., and Naldini, L. **A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system.** *Journal of Virology*, 1998, **72**: 8463-8471
19. Pear, W. S., Nolan, G. P., Scott, M. L., and Baltimore, D. **Production of high-titer helper-free retroviruses by transient transfection.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1993, **90**: 8392-8396
20. Reiser, J., Harmison, G., Kluepfel-Stahl, S., Brady, R. O., Karlsson, S., and Schubert, M. **Transduction of nondividing cells using pseudotyped defective high-titer HIV type 1 particles.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1996, **93**: 15266-15271
21. Soneoka, Y., Cannon, P. M., Ramsdale, E. E., Griffiths, J. C., Romano, G., Kingsman, S. M., and Kingsman, A. J. **A transient three-plasmid expression system for the production of high titer retroviral vectors.** *Nucleic acids research*, 1995, **23**: 628-633
22. Naldini, L., Blomer, U., Gallay, P., Ory, D., Mulligan, R., Gage, F. H., Verma, I. M., and Trono, D. **In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector.** *Science*, 1996, **272**: 263-267
23. Iwakuma, T., Cui, Y., and Chang, L. J. **Self-inactivating lentiviral vectors with U3 and U5 modifications.** *Virology*, 1999, **261**: 120-132
24. Lois, C., Hong, E. J., Pease, S., Brown, E. J., and Baltimore, D. **Germline transmission and tissue-specific expression of transgenes delivered by lentiviral vectors.** *Science*, 2002, **295**: 868-872
25. Zaiss, A. K., Son, S., and Chang, L. J. **RNA 3' readthrough of oncoretrovirus and lentivirus: implications for vector safety and efficacy.** *Journal of Virology*, 2002, **76**: 7209-7219
26. Fux, C., and Fussenegger, M. **Toward higher order control modalities in mammalian cells-independent adjustment of two different gene activities.** *Biotechnology Progress* 2003, **19**: 109-120
27. Hellen, C. U., and Sarnow, P. **Internal ribosome entry sites in eukaryotic mRNA molecules.** *Genes Development*, 2001, **15**: 1593-1612

28. Gan, W., and Rhoads, R. E. **Internal initiation of translation directed by the 5'-untranslated region of the mRNA for eIF4G, a factor involved in the picornavirus-induced switch from cap-dependent to internal initiation.** *The Journal of biological chemistry* , 1996, **271**: 623-626
29. Vagner, S., Gensac, M. C., Maret, A., Bayard, F., Amalric, F., Prats, H., and Prats, A. C. **Alternative translation of human fibroblast growth factor 2 mRNA occurs by internal entry of ribosomes.** *Molecular and cellular biology*, 1995, **15**: 35-44
30. Folliot, S., Briot, D., Conrath, H., Provost, N., Cherel, Y., Moullier, P., and Rolling, F. **Sustained tetracycline-regulated transgene expression in vivo in rat retinal ganglion cells using a single type 2 adeno-associated viral vector.** *The journal of gene medicine* 2003,**5**: 493-501
31. Kuhnel, F., Fritsch, C., Krause, S., Mundt, B., Wirth, T., Paul, Y., Malek, N. P., Zender, L., Manns, M. P., and Kubicka, S. **Doxycycline regulation in a single retroviral vector by an autoregulatory loop facilitates controlled gene expression in liver cells.** *Nucleic acids research*, 2004, **32**: 1-4.
32. Rose, S. D., and MacDonald, R. J. **Integration of tetracycline regulation into a cell-specific transcriptional enhancer.** *The Journal of biological chemistry*, 1997, **272**: 4735-4739
33. Sambrook J, Russell DW: *Molecular Cloning: A laboratory manual* Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
34. Zufferey, R., Nagy, D., Mandel, R. J., Naldini, L., and Trono, D. **Multiply attenuated lentiviral vector achieves efficient gene delivery in vivo.** *Nature Biotechnology*, 1997, **15**: 871-875.
35. Lee, A. H., Y. S. Suh, J. H. Sung, S. H. Yang, and Y. C. Sung. **Comparison of various expression plasmids for the induction of immune response by DNAimmunization.** *Mol. Cell* ,1997,**7**:495–501.
36. Meyrelles, S. S., R. V. Sharma, C. A. Whiteis, B. L. Davidson, and M. W. Chapleau.. **Adenovirus-mediated gene transfer to cultured nodose sensory neurons.** *Brain Res. Mol. Brain Res*, 1997 **51**:33–41
37. Teramoto, S., T. Matsuse, E. Ohga, T. Nagase, Y. Fukuchi, and Y. Ouchi. **Kinetics of adenovirus-mediated gene transfer to human lung fibroblasts.***Life Sci.* 1997, **61**:891–897.
38. Borman, A.M., Le Mercier, P , Girard, M and Kean, K.M. **Comparison of picornaviral IRES-driven internal initiation of translation in cultured cells of different origins,** *Nucleic Acids Research*, 1997, **5**: **925–932**.
39. Martin, Olivier Albagli, Marie Christine Poggi, Kim E. Boulukos and Philippe Pognonec. **Development of a new bicistronic retroviral vector with strong IRES activity.** *BMC Biotechnology*, 2006, **6**: 1-9.
40. **DsRed2 Fluorescent Protein.**
http://www.clontech.com/products/detail.asp?tabno=2&product_id=157257
41. **Enhanced Green Fluorescent Protein.**
<http://www.biovision.com/updated/egfp.html>

3. DISCUSSÃO

Por estes motivos, a necessidade do desenvolvimento de ferramentas biotecnológicas para transferência gênica estável levou à geração da série lentiviral pLR. Consideraram-se quatro aspectos essenciais para desenvolver as ferramentas apresentadas nesse trabalho: promotores fortes, expressão gênica regulada, atividade IRES associada a bons marcadores celulares e sítios únicos de clivagem localizados em pontos estratégicos dos vetores.

Numerosos promotores virais são utilizados com sucesso em construtos gênicos assegurando a expressão do transgene. Nossa seleção baseou-se no promotor RSV, que é amplamente utilizado em diversos tipos e linhagens celulares, tanto em construtos adenovirais como lentivirais (Lee *et al.*, 1997; Meyrelles *et al.*, 1997; Teramoto *et al.*, 1997).

Quantidades elevadas do produto do transgene no citoplasma podem produzir efeitos celulares não desejados e por esse motivo a possibilidade de regular a expressão do transgene é sumamente importante, quando possível. Neste aspecto, a série de vetores gerados possui a seqüência TRE. A seqüência usada na série pLR possui 7 operadores para ligação da proteína repressora TetR, regulando a expressão do transgene de forma positiva ou negativa, como foi revisado por Berens *et al.*, 2003. Porém, a funcionalidade desta seqüência só poderá ser avaliada na forma viral (ver seção “DIFICULDADES E PERSPECTIVAS”). Contudo, a integridade de sua seqüência (ver seção ANEXO)

demonstrada por seqüenciamento nos fornece uma grande expectativa quanto à possibilidade de garantir a regulação da expressão do transgene de interesse.

A seqüência IRES, escolhida para a série pLR, pertence à família do vírus causador de encefalomiocarditis (EMCV), e é classificada no tipo II dentro da família de sequências IRES. Estes IRES iniciam eficientemente a transdução em diversos tipos celulares de forma cap-independente e são insensíveis a variações nas concentrações salinas (Borman, *et al* 1997), convertendo esta seqüência numa útil ferramenta biotecnológica na hora de desenvolver construtos gênicos. Isto é claramente demonstrado na figura 3, onde se observou expressão de proteínas fluorescentes em pLR2-DsRed and pLR3-EGFP.

Foi demonstrado o desenvolvimento e validação da série pLR para analisar a eficiência e versatilidade de nossos vetores baseados em IRES. Estudos demonstraram o desenvolvimento de estruturas secundárias que participam do reconhecimento das subunidades ribossômicas permitindo o recrutamento das mesmas, além da importância da distância entre a cauda de polipirimidinas e o códon de iniciação do gene clonado a jusante da seqüência IRES (Martin, *et al* 2006). Por tais motivos, a seqüência clonada após IRES e o próprio IRES não são módulos completamente independentes, apresentando redução na expressão do gene clonado a jusante do IRES em diversos construtos gênicos (Martin, *et al* 2006). Porém, os vetores da série pLR produzem uma expressão diferencial, com forte expressão, do gene repórter localizado a jusante da seqüência IRES, numa forma dependente do tempo.

Entre os diferentes genes reporter disponíveis, nós selecionamos as proteínas fluorescentes EGFP e DsRed para serem usadas nos nossos constructos. A primeira é uma proteína verde expressa em diversos tipos celulares e, desde a sua clonagem, se converteu em uma ferramenta versátil para o monitoramento de expressão gênica em mamíferos (Laboratório Biovision-web site). A segunda proteína usada, DsRed, é uma variante da proteína DsRed selvagem. A variante usada, também conhecida como DsRed2, possui seis mutações pontuais em relação à forma selvagem. Estas mutações diminuem o tempo entre transfecção e detecção vermelha, retendo os benefícios das típicas proteínas fluorescentes (Laboratório Clontech –web site).

Os vetores mostrados na Figura 1 representam somente protótipos da série lentiviral de expressão reguladas e bicistônicas, encontrando-se disponíveis e atualmente já foram usados para trabalhos de pesquisa do nosso grupo no qual permitiram a expressão estável de uma enzima em Hek293T (Camassola, M., 2008). Usando estratégias similares de clonagem, nós pretendemos desenvolver vetores adicionais para aumentar a eficiência e poder dos vetores da série pL. Assim, os vetores da Figura 1 que possuem expressão regulada por RSV, poderão ter os seus promotores trocados por outros promotores fortes e de expressão ubíqua como, por exemplo, o promotor CMV ou o promotor do gene EF1, além da possibilidade de usar promotores tecido-específicos, segundo a necessidade de cada pesquisa realizada. Ao mesmo tempo, o msc poderá ser modificado para permitir a clonagem de transgenes a partir do uso de tecnologia como os sistemas TA ou Gateway que permitem a clonagem de diferentes

mo os sistemas TA ou Gateway que permitem a clonagem de diferentes insertos sem a necessidade de clivagem com enzimas de restrição.

As séries pLR vetores estão livremente disponíveis para a comunidade científica, declarando nenhum tipo de interesse comercial.

4. DIFICULDADES METODOLÓGICAS VIVENCIADAS DURANTE O TRABALHO E SOLUÇÕES ENCONTRADAS

Um dos principais inconvenientes que demorou a obtenção dos resultados finais (testes de regulação gênica por doxicilina e produção viral) foi a dificuldade que apresentaram algumas seqüências para serem clonadas, levando ao desenvolvimento de estratégias alternativas por programas de bioinformática e análise crítica dos kits comerciais que nos levou a produzir modificações protocolares com o intuito de aumentar o rendimento e funcionalidade das clonagens (relação) produção viral foram realizadas três tentativas, uma com fosfato de cálcio e duas com Superfect (Qiagen) nos laboratórios envolvidos.

Atualmente, consegue-se em trabalhos independente a este apresentado (considerando como controle o lentivector pLL3.7 –Lentilox, que foi o *backbone* a partir do qual se desenvolveu a série lentiviral aqui apresentada) baixa produção viral e rendimentos de 10 ao 20% de células HeK293 transduzidas, como máximo. Nós estamos desenvolvendo e analisando protocolos baseados em lipofectamina 2000, adaptados para nossas construções, com o intuito de aumentar a produção e eficiência de células transduzidas para nossos constructos, atingindo as eficiências já obtidas anteriormente em outros trabalhos do nosso grupo, entre 50 e 99%.

5. PERSPECTIVAS

Com o objetivo de conseguir dados finais para submeter este trabalho para publicação, pretende-se realizar os seguintes procedimentos:

- 1- Produção de vírus
 - 1.1. Titulação viral por diluições seriadas e citometria de fluxo.
 - 1.2. Transdução dos vetores da série em uma linhagem de células HEK293 que expressa estavelmente o regulador tTRA (HEK293T recombinante).
A linhagem está disponível no nosso laboratório, e possibilitará testar a regulação mediada por doxicilina dos construtos aqui gerados, em concentrações graduais do antibiótico;
- 2- Realizar estudo comparativo por citometria de fluxo da expressão de proteínas fluorescentes mediada por IRES da série pLR, na forma de plasmídeo com respeito a forma viral.
- 3- Demonstrar a possibilidade e funcionalidade da troca de promotores para regulação do nível máximo de expressão do transgene ou a sua expressão célula-específica.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

ANNED, E.A. Overview of current delivery systems in cancer gene therapy. *Journal of Controlled Release* 94(1): 1-14, 2004.

BARDE, I.; ZANTA-BOUSSIF, M. A.; PAISANT, S.; LEBOEUF, M.; RAMEAU, P.; DELEND, C.; & DANOS, O. Efficient control of gene expression in the hematopoietic system using a single Tet-on inducible lentiviral vector. *Molecular Therapy*, 13: 382-390, 2006.

BERENS, C & HILLEN W. Gene regulation by tetracycline. Constraints of resistance regulation in bacteria shape TetR for application in eukaryotes. *European Journal of Biochemistry*, 270: 3109-3121, 2003

BERTRAND, KP.; POSTLE, K.; WRAY, L.V JR & REZNIKOFF, W.S. Overlapping divergent promoters control expression of Tn10 tetracycline resistance. *Gene*, 2: 149-56, 1983.

BLOMER, U.; NALDINI, L.; VERMA, I. M.; TRONO, D.; & GAGE, F. H. Applications of gene therapy to the CNS. *Human Molecular Genetics*, 5: 1397-1404, 1996.

BLOMER, U.; NALDINI, L.; KAFRI, T.; TRONO, D.; VERMA, I. M & GAGE, F. H. Highly efficient and sustained gene transfer in adult neurons with a lentivirus vector. *Journal of Virology*, 71: 6641-6649, 1997.

BORDOR, J & SVOBODA, J. The LTR, v-src, LTR Provirus Generated in the Mammalian Genome by src mRNA Reverse Transcription and Integration. *Journal of Virology*, 63: 1015-1018, 1989.

BORMAN A.M.; LE MERCIER.; GIRARD & KEAN K.M. Comparison of picornaviral IRES-driven internal initiation of translation in cultured cells of different origins. *Nucleic Acids Research*, 5: 925-932, 1997.

BUCHSCHACHER, G.L & WONG-STAL, F. Development of lentiviral vectors for gene therapy for human diseases. *Blood*, 95: 2499-2504, 2000.

BUKRINSKY, M. I & HAFFAR O. K. HIV-1 nuclear import: in search of a leader. *Frontiers in bioscience*, 4: 772-781, 1999.

CAMASSOLA, M. Modelo murino da mucopolissacaridose tipo I (MPS I): desenvolvimento de vetores virais e estudo de parâmetros fisiopatológicos. Tese de doutorado, Universidade Federal de Rio Grande do Sul, 2008.

CHONG, H.; STARKEY, W & VILE R.G. A replication-competent retrovirus arising from a split-function packaging cell line was generated by recombination events between the vector, one of the packaging constructs and endogenous retroviral sequences. *The Journal of Virology*, 72: 2663-2670, 1998.

CORNETTA, K.; MORGAN, R. A & ANDERSON W.F. Safety issues related to retroviral-mediated gene transfer in humans. *Human Gene Therapy*, 2: 5-14, 1991.

CULVER, K. W & BLAESE, R. M. Gene therapy for cancer. *Trends in Genetics' Journal*, 10: 174-178, 1994.

DALY, G & CHERNAJOVSKY, Y. Recent developments in retroviral-mediated gene transduction. *Molecular Therapy Journal*, 2: 425-434, 2000.

DANI, S.U. The challenge of vector development in gene therapy. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 32:133-145, 1999.

DELENDIA, C. Lentiviral vectors: Optimizarion of packaging, transduction and gene expression. *Journal of Gene Medicine*, 6: 125-138, 2004.

DsRed2 Fluorescent Protein.

http://www.clontech.com/products/detail.asp?tabno=2&product_id=157257

DULL, T.; ZUFFEREY, R.; KELLY, M.; MANDEL, R. J.; NGUYEN, M.; TRONO, D & NALDINI, L. A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system. *Journal of Virology*, 72: 8463-8471, 1998.

Enhanced Green Fluorescent Protein.

<http://www.biovision.com/updated/egfp.html>

FOLLIOT, S.; BRIOT, D.; CONRATH, H.; PROVOST, N.; CHEREL, Y.; MOULLIER, P & ROLLING, F. Sustained tetracycline-regulated transgene expression in vivo in rat retinal ganglion cells using a single type 2 adeno-associated viral vector. *The journal of gene medicine* ,5: 493-501, 2003.

FRÉZARD, F. Liposomes: from biophysics to the design of peptide vaccines. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 32: 181-189, 2001.

FUX, C & FUSSENEGGER, M. Toward higher order control modalities in mammalian cells-independent adjustment of two different gene activities. *Biotechnology Progress*, 19: 109-120, 2003.

GALLICHAN, W. S.; KAFRI, T.; KRAHL, T.; VERMA, I. M & SARVETNICK, N. Lentivirus-mediated transduction of islet grafts with interleukin 4 results in sustained gene expression and protection from insulinitis. *Human gene therapy*, 9: 2717-2726, 1998.

GAN, W & RHOADS, R. E. Internal initiation of translation directed by the 5' untranslated region of the mRNA for eIF4G, a factor involved in the picornavirus-induced switch from cap-dependent to internal initiation. *The Journal of biological chemistry*, 271: 623-626, 1996.

GOLDMAN, M. J.; LEE, P. S.; YANG, J. S & WILSON, J. M. Lentiviral vectors for gene therapy of cystic fibrosis. *Human gene therapy*, 8: 2261-2268, 1997.

GOVERDHANA, S.; PUNTEL, M.; XIONG, X.; ZIRGER, J. M.; BARCIA, C.; CURTIN J, K.; SOFFER, E. V.; MONDKAR, S.; KING, G, D.; HU, J.; SCIASCIA, S. A.; CANDOLFI, M.; GREENGOLD, D.S.; LOWENSTEIN, P.R & CASTRO, M. Regulatable Gene Expression Systems for Gene Therapy Applications: Progress and Future Challenges. *The American Society of Gene Therapy*, 12(2): 188-211, 2005.

HAN, J. J.; MHATRE, A. N.; WAREING, M.; PETTIS, R.; GAO, W. Q.; ZUFFEREY, R. N., TRONO, D & LALWANI, A. K. Transgene expression in the guinea pig cochlea mediated by a lentivirus-derived gene transfer vector. *Human gene therapy*, 10: 1867-1873, 1999.

HELLEN, C. U & SARNOW, P. Internal ribosome entry sites in eukaryotic mRNA molecules. *Genes Development*, 15: 1593-1612, 2001.

HOFMANN, A.; NOLAN, G. P & BLAU H. M. Rapid retroviral delivery of tetracycline-inducible genes in a single autoregulatory cassette. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93: 5185-90, 1996.

HU, M.C & DAVIDSON, N. The inducible lac operator-repressor system is functional in mammalian cells. *Cell*, 48: 555-66, 1997.

IWAKUMA, T.; CUI, Y & CHANG, L.J. Self-inactivating lentiviral vectors with U3 and U5 modifications. *Virology*, 261: 120-132, 1999.

JACOB, F & MONOD J. Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *Journal of Molecular Biology*. 3: 318-56, 1961.

JOHNSON, L. G.; OLSEN, J. C.; NALDINI, L & BOUCHER, R. C. Pseudotyped human lentiviral vector-mediated gene transfer to airway epithelia in vivo. *Gene therapy*, 7: 568-574, 2000.

KAFRI, T.; BLOMER, U.; PETERSON, D. A.; GAGE, F. H & VERMA, I. M. Sustained expression of genes delivered directly into liver and muscle by lentiviral vectors. *Nature genetics*, 17: 314-317, 1997.

KAY, M.A.; GLORIOSO, J.C & NALDINI, L. Viral vectors for gene therapy: the art of turning infectious agents into vehicles of therapeutics. *Nature Medicine*, 7: 33-40, 2001.

KENNY, A. P.; ENVER, T & ASHWORTH, A. Retroviral vectors for establishing tetracycline-regulated gene expression in an otherwise recalcitrant cell line. *BMC Molecular Biology*, 13: 1471-2199, 2002.

KLARMANN, G.J.; CHEN, X.; NORTH, T. W & PRESTON, B. D. Incorporation of uracil into minus strand DNA affects the specificity of plus strand synthesis initiation during lentiviral reverse transcription. *Journal of Biological Chemistry*, 278: 7902-7909, 2003.

KUHNEL, F.; FRITSCH, C.; KRAUSE, S.; MUNDT, B.; WIRTH, T.; PAUL, Y.; MALEK, N. P.; ZENDER, L.; MANNS, M. P & KUBICKA, S. Doxycycline regulation in a single retroviral vector by an autoregulatory loop facilitates controlled gene expression in liver cells. *Nucleic Acids Research*, 32: 1-4, 2004.

KURODA, S.; KONDO, H .; OHYA, K & KASUGAI, S. A new technique with calcium phosphate precipitate enhances efficiency of in vivo plasmid DNA gene transfer. *Journal of pharmacological sciences*, 97: 227-233 , 2005.

Laboratorio Clontech. Tet Expression Systems & Cell Lines. *CLONTECHniques* 11: 2-5, 1996.

LANCIOTTI, E.K. *Microbiologia Clínica*. 2ed. Casa Editrice Ambrosiana, Itália, 421pp, 2001.

LEE, A. H.; SUH, Y. S.; SUNG, J. H.; YANG, S. H & SUNG, Y. C. Comparison of various expression plasmids for the induction of immune response by DNA immunization. *Molecular Cell journal*, 7 :495-501, 1997.

LEWIS, P. F & EMERMAN, M. Passage through mitosis is required for oncoretroviruses but not for the human immunodeficiency virus. *Journal of Virology*, 68: 510-516, 1994.

LOIS, C.; HONG, E.J.; PEASE, S.; BROWN E.J & BALTIMORE, D. Germline transmission and tissue specific expression of transgenes delivered by lentiviral vectors. *Science*, 295: 868-872, 2002.

LÓPEZ-LASTRA, M; RIVAS, A & BARRÍA, I.M. Protein synthesis in eukaryotes: The growing biological relevance of cap-independent translation initiation. *Biological Research* 38: 121-146, 2005.

MADY, M. M.; GHANNAM, M. M.; KHALIL, W.A.; REPP, R.; MARKUS, M.; RASCHER, W.; MULLER, R & FAHR, A. Efficient gene delivery with serum into human cancer cells using targeted anionic liposomes. *Journal of Drug Targeting*. 12(1): 11-18, 2004.

L, P.; ALBAGLI, O.; POGGI, M. C.; BOULUKOS, K.E & POGNONEC, P. Development a new bicistronic retroviral vector with strong IRES activity. *BMC Biotechnology* 6 (4) : 1-9 , 2006.

MEYRELLES, S. S.; SHARMA, R. V.; WHITEIS, C. A, DAVIDSON, B. L. & CHAPLEAU, M. W. Adenovirus-mediated gene transfer to cultured no dose sensory neurons. *Molecular Brain Research*, 51:33–41, 1997.

MILLER, A.D. Retrovirus packaging cells. *Human Gene Therapy*, 1: 5-14, 1990.

MILLER, A.D. Human gene therapy comes of age. *Nature*, 357: 455-460, 1992.

MIYOSHI, H.; TAKAHASHI, M.; GAGE, F. H & VERMA, I. M. Stable and efficient gene transfer into the retina using an HIV-based lentiviral vector. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94: 10319-10323, 1997.

NALDINI, L.; BLÖMER, U.; GAGE, F.H.; TRONO, D & VERMA, I.M. Efficient transfer, integration, and sustained long-term expression of the transgene in adult rat brains injected with a lentiviral vector. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93: 11382-11388, 1996a

NALDINI, L.; BLÖMER, U.; GALLAY, P.; ORY, D.; MULLIGAN, R.; GAGE, F.H.; VERMA, I. M & TRONO D. *In vivo* gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science*, 272: 263-267, 1996b.

NALDINI, L. Lentiviruses as gene transfer agents for delivery to non-dividing cells. *Current Opinion in Biotechnology*, 9: 457-463, 1998.

NARDI, N.B.; TEIXEIRA, L.K & SILVA, E.F. Terapia gênica. *Ciência & Saúde Coletiva*, 7: 109- 116, 2002.

PAGÉS, J.C & BRU, T. Toolbox for retrovectorologists. *Journal of Gene Medicine*, 6: S67-S82, 2004.

PALÙ, G.; BONAGURO, R.; MARCELLO, A. In pursuit of new developments for gene therapy of human diseases. *Journal of Biotechnology*, 68: 1-13, 1999.

PARK, F.; OHASHI, K.; CHIU, W.; NALDINI, L & KAY, M. A. Efficient lentiviral transduction of liver requires cell cycling in vivo. *Nature genetics*, 24: 49-52, 2000.

PAROLIN, C.; DORFMAN, T.; PALÙ, G.; GOTTLINGER, H & SODROSKI J. Analysis in human immunodeficiency virus type 1 vectors of cis-acting sequences that affect gene transfer into human lymphocytes. *Journal of Virology*, 68: 3888-3895, 1994.

PEAR, W. S.; NOLAN, G. P.; SCOTT, M. L & BALTIMORE, D. Production of high-titer helper-free retroviruses by transient transfection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90: 8392-8396, 1993.

REISER, J.; HARMISON, G.; KLUEPFEL-STAHN, S.; BRADY, R. O.; KARLSSON, S & SCHUBERT, M. Transduction of nondividing cells using pseudotyped defective high-titer HIV type 1 particles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93: 15266-15271, 1996.

ROSE, S. D & MACDONALD, R. J. Integration of tetracycline regulation into a cell-specific transcriptional enhancer. *The Journal of biological chemistry*, 272: 4735-4739, 1997.

RUOZI, B.; FORNI, F.; BATTINI, R & VANDELLI, M. A. Cationic liposomes for gene transfection. *Journal of Drug Targeting*. 11(7): 407-414, 2003.

SAMBROOK, J.; FRISCH, E & MANIATIS, T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, NY, 1989.

SCHMITZ, V.; QIAN, C.; RUIZ, J.; SANGRO, B.; MELERO, I.; MAZZOLINI, G.; NARVAIZA, I & PRIETO, J. Gene therapy for liver diseases: recent strategies for treatment of viral hepatitis and liver malignancies. *Journal of Controlled Release*. 99(2): 313, 2004.

SONEOKA, Y.; CANNON, P. M.; RAMSDALE, E. E.; GRIFFITHS, J. C.; ROMANO, G.; KINGSMAN, S. M & KINGSMAN, A. J. A transient three-plasmid expression system for the production of high titer retroviral vectors. *Nucleic Acids Research*, 23(4):628-633, 1995.

TERAMOTO, S. T.; MATSUSE, E.; OHGA, T.; NAGASE, Y.; FUKUCHI, & OUCHI, Y. Kinetics of adenovirus-mediated gene transfer to human lung fibroblasts. *Life Sciences*, 61: 891-897, 1997.

UDDIN, S.N. Cationic lipids used in non-viral gene delivery systems. *Biotechnology and Molecular Biology Review*. 2 (3): 058-067, 2007.

VAGNER, S.; GENSAC, M. C.; MARET, A.; BAYARD, F.; AMALRIC, F.; PRATS, H & PRATS, A. C. Alternative translation of human fibroblast growth factor 2 mRNA occurs by internal entry of ribosomes. *Molecular and cellular biology*, 15: 35-44, 1995.

VAN EDEN, M.E.; BYRD, M.P.; SHERRILL, K.W & LLOYD, R.E. Demonstrating internal ribosome entry sites in eukaryotic mRNAs using stringent RNA test procedures. *RNA*, 10:720-30, 2004.

VAQUERO, C.F.; DOMINGO, B.; PICAZO, F.; PÉREZ, J.M.; TANQUE, P & LLOPIS, J. Análisis de la dinámica celular con proteínas fluorescentes. *Biojournal*, 1: 1-15, 2005.

VERMA, I. M & SOMIA, N. Gene therapy - promises, problems and prospects. *Nature*, 389: 239-242, 1997.

VODICKA, M.A.; KOEPP, D.M.; SILVER, P.A.; EMERMAN, M. HIV-1 Vpr interacts with the nuclear transport pathway to promote macrophage infection. *Genes & Development*, 12: 175-185, 1998.

YANG, X.; WALBOOMERS, X.F.; VAN DEN DOLDER, J.; YANG, F.; BIAN, Z.; FAN, M & JANSEN J, A. Non-viral bone morphogenetic protein 2 transfection of rat dental pulp stem cells using calcium phosphate nanoparticles as carriers. *Tissue Engineering, Part A*. 14(1):71-81, 2008.

ZAISS, A.K.; SON, S & CHANG, L.J. RNA 3' readthrough of oncoretrovirus and lentivirus: implications for vector safety and efficacy. *Journal of Virology*, 76: 7209-7219, 2002.

ZUFFEREY, R.; NAGY, D.; MANDEL, R. J.; NALDINI, L & TRONO, D. Multiply attenuated lentiviral vector achieves efficient gene delivery in vivo. *Nature Biotechnology*, 15: 871-875, 1997.

7. ANEXO

7.1 MODIFICAÇÕES DE PROTOCOLOS

Isolamento de DNA plasmídial

A extração de plasmídeos se realizou por lise alcalina segundo Sambrook *et al.*, 1989. Os protocolos de purificação do DNA plasmidial podem se separar em relação á quantidade e pela pureza do plasmídeo que se obtém. A utilização de colunas de mini-preparações (Invitrogen) se obteve, em geral, pouca quantidade (aproximadamente de 10µg) mas com boa pureza.

Para quantidades maiores da mesma pureza de plasmídeo foram utilizadas colunas de midi e maxi-preparações (Invitrogen), após a confirmação do constructo.

No presente trabalho, a extração de plasmídeos se realizou por mini-preparações através do kit comercial “ Pure Link Quick plasmid miniprep kit” que produz lise das células bacterianas com SDS (dodecilsulfato sódico), um detergente catiônico. O lisado é aplicado posteriormente em uma coluna membranosa de sílica que se une seletivamente ao DNA. As possíveis contaminações são removidas com tampões de lavado, para finalmente eluir o plasmídeo com tampão TE em um tubo de reação de 1,5 ml.

- Reagentes:

- Tampão de resuspensão (**R3**; 5 mM tris-HCl, pH 8,0; 10mM EDTA).
- Rnasa A (20mg/ml em tampón de resuspensión **R3**).
- Tampão de lise (**L7**; 200mM NaOH, 1% p/v SDS).
- Tampão de precipitação (**N4**).
- Tampão de lavado (**W9**).
- Tampão de lavado (**W10**).
- Tampão TE (10 mM Tris-HCl, pH 8.0; 0,1 mM EDTA).
- Colunas de sílica.
- Tubos coletores.

Nota: todos os reagentes, colunas e tubos de reação fazem parte do kit utilizado.

-Procedimento

- Utilizaram-se células bacterianas *E.coli* pertencentes ao linhagem XL1, transformadas com o plasmídeo de interesse.
- Seleciona-se uma colônia e coloca-se a mesma a crescer em 5 ml de meio LB líquido com antibiótico da seleção, durante toda noite a 37°C.
- A ressuspensão bacteriana em meio LB líquido é centrifugada a 1700g durante 5 minutos e o sobrenadante é descartado.
- Procede-se a resuspensão do *pellet* em 250 µL de tampão de resuspensão R3 com RNasa A.

- Adiciona-se 250 μ L de tampão de lise L7 e mistura-se suavemente invertendo o tubo de reação durante 4 ou 5 vezes (não utilizar *vortex*) e se deixa em repouso por não mais de 5 minutos.

- Adiciona-se 350 μ L do tampão de precipitação (N4). Mistura-se por inversão até se obter uma solução homogênea..

- Centrifuga-se a mistura a 12000g por 10 minutos para clarificar o lisado. Há uma separação de duas fases, uma clara e outra branca de aspecto mucoso.

- Extrai-se com cuidado a fase clara que contem os plasmídeos e se coloca em uma coluna de sílica associada a um tubo de reação.

- Centrifuga-se a 12000g. O líquido que passou pela coluna é descartado.

- Como passo opcional, pode se adicionar 500 μ L de tampão de lavado (W10) com etanol a coluna. Incuba-se por 1 minuto à temperatura ambiente e centrifuga-se a 12000g. Novamente, o líquido que passou através da coluna é descartado.

- Adiciona-se 700 μ L de tampão de lavado (W9) com etanol á coluna.

- Centrifuga-se a coluna em 12000g. Descarta-se o líquido restante do tubo de reação.

- Centrifuga-se a coluna a 12000g novamente (mas sem a adição de nenhuma solução) para remover todo o resíduo do tampão W9 .

- Descarta-se o tubo de precipitado e coloca-se a coluna em um tubo de reação de 1,5 ml novo.

Nota: É importante esclarecer que a velocidade de centrifugação apresentada no protocolo do fabricante não é suficiente para eliminar o volume de álcool residual presente em W9. Isto levou a ter problemas no momento de fazer corrida em gel de agarose, já que a alteração na densidade da solução de DNA faz que esta solução escape do gel dificultando a migração no mesmo. Simultaneamente, a presença do álcool na solução também altera as clivagens dos plasmídeos purificados.

Para solucionar este inconveniente, realizaram-se duas alterações no protocolo. A primeira consistiu em aumentar a aceleração para precipitar o álcool na sua totalidade (centrifugação a 15000g por 2 minutos).

A segunda, consistiu em aumentar a temperatura da solução, fazendo que o álcool se evaporasse (Isto pode ser realizado deixando os plasmídeos na estufa a 50°C durante 30 minutos com a tampa do tubo aberta).

As duas metodologias deram resultados favoráveis e aplicadas sucessivamente, diminuíram o álcool na solução quase na sua totalidade.

-Adiciona-se 75 µL de tampão TE, previamente esquentado a 65-70°C (facilita a eluição dos plasmídeos de 1 a 30 kb mas é obrigatório para eluir DNA com mais de 30kb).

-Incuba-se a coluna por 2 minutos a temperatura ambiente.

-Centrifuga-se a 12000g por 2 minutos.

-Recupera-se os plasmídeos purificados em um tubo de reação e descarta-se a coluna.

Purificação de bandas de DNA

As bandas obtidas depois de eletroforese em gel de agarose foram purificadas com um kit de purificação “GFX PCR DNA and GEL Band purification Kit” (GE, healthcare). Este kit utiliza agentes caotrópicos para liçar proteínas, dissolver agarose, e permitir a união da dupla fita de DNA (de 100 pb a 48 kb) em uma matriz de fibra de vidro. Assim, o DNA é “capturado” e as proteínas e contaminantes são lavados. Posteriormente, o DNA purificado é eluído em uma solução de baixa força iônica (TE, Tris-HCl ou água) para ser finalmente recuperado por centrifugação.

- Procedimento

- Corta-se a banda do gel com a ajuda de algum instrumento afiado.
- Pesa-se a banda (neste sistema o peso máximo do gel que pode ser processado pelo protocolo é de 300 mg).
- Em um tubo de reação, se mistura-se o fragmento cortado com o tampão de captura em uma relação de 1mg:1 μ g e se esquentam a mistura a 60°C, até que o gel se tenha dissolvido completamente (5-15 min).
- Durante a incubação, prepara-se uma das colunas GFX colocando em um tubo coletor.

- Depois que a agarose foi completamente dissolvida, transfere-se a amostra a uma coluna de GFX. Incuba-se à temperatura ambiente por um minuto.

-Centrifuga-se em uma microcentrífuga ao máximo de velocidade (mais de 12000g) por 30 segundos.

-Descarta-se o líquido precipitado do tubo coletor.

-Adiciona-se 500 μ L de tampão de lavado e procede-se a centrifugação com máxima velocidade por 30 segundos.

-Descarta-se o coletor e transfere-se a coluna GFX a um tubo de reação de 1,5 ml estéril.

-Coloca-se 50 μ L de tampão de eluição (10mM Tris-HCl, pH8.0, TE pH 8.0 ou água ultrapura) diretamente na fibra de matriz de vidro da coluna de GFX.

- Incuba-se a amostra a temperatura ambiente por 1 minuto.

- Centrifuga-se a máxima velocidade por 1 minuto para recuperar o DNA purificado.

Nota: Para eluições de 50 μ L, o volume da amostra recuperada é entre 40 e 50, quando no protocolo original se obtém um 100 por cento de recuperação. O volume mínimo de tampão de eluição que pode ser usado é 20 μ l sendo que a perda continua sendo entre 5 y e 7 μ l. Utilizou-se um volume intermediário de 30 μ l para se obter um 80 por cento de DNA de banda, com as perdas anteriores.

Este procedimento foi amplamente utilizado para obter do gel produtos de PCR ou clivagens que foram usados posteriormente para as diferentes reações de clonagem.

7.2 PLASMÍDEOS INTERMEDIÁRIOS

Durante o desenvolvimento do presente trabalho foram obtidos plasmídeos intermediários, sendo devidamente testados, com a finalidade de obter as construções gênicas finais da série pLR. As seqüências de interesse destes plasmídeos intermediários estão apresentadas abaixo.



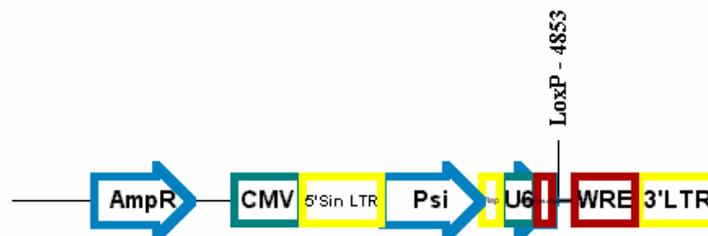
pCR2.1-TRE
4239 bp



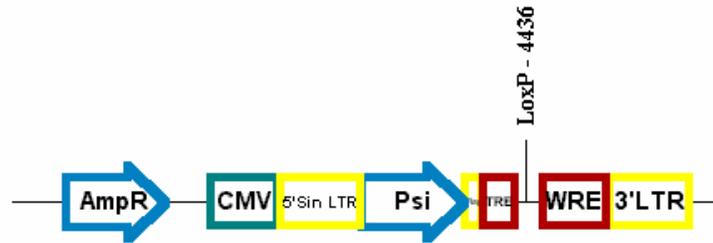
pCR2.1-IRES-GFP
5266 bp



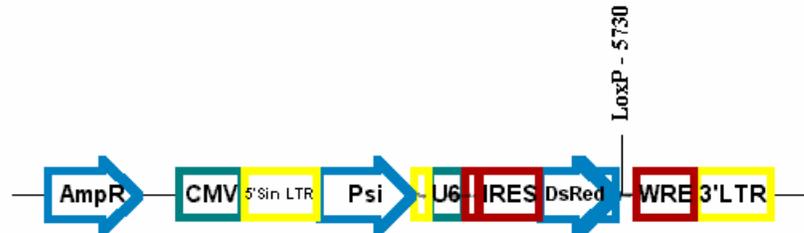
pCR2.1-IRES-DsRed
5215 bp



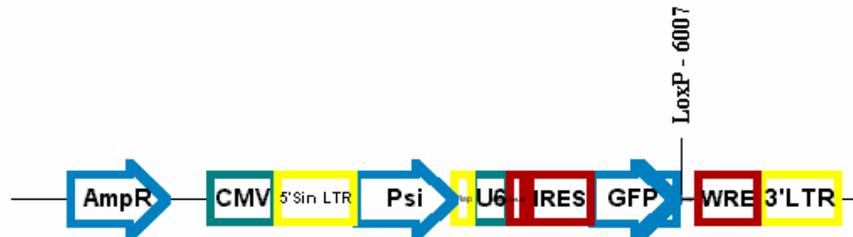
pLL-mcs18
6296 bp



nl Imc18 TRF



PLLmcs IRES-DsRed
7574 bp



pLL-mcs IRES-GFP
7649 bp



pLR2'
7887 bp



pLR3'
7810 bp

De maneira representativa fez-se uma clivagem geral dos plasmídeos anteriores, verificando a presença das seqüências de interesse. Assim, realizou-se a clivagem de pCR2.1 TER, pCR2.1 IRES-GFP e pCR2.1 IRES-REd com EcoRI. Da mesma maneira, pLmcs-18, pLmcs IRES-RED e pLmcs IRES-GFP foram clivados com KpnI e pLR3' e pLR2' com XbaI e SpeI, juntas.

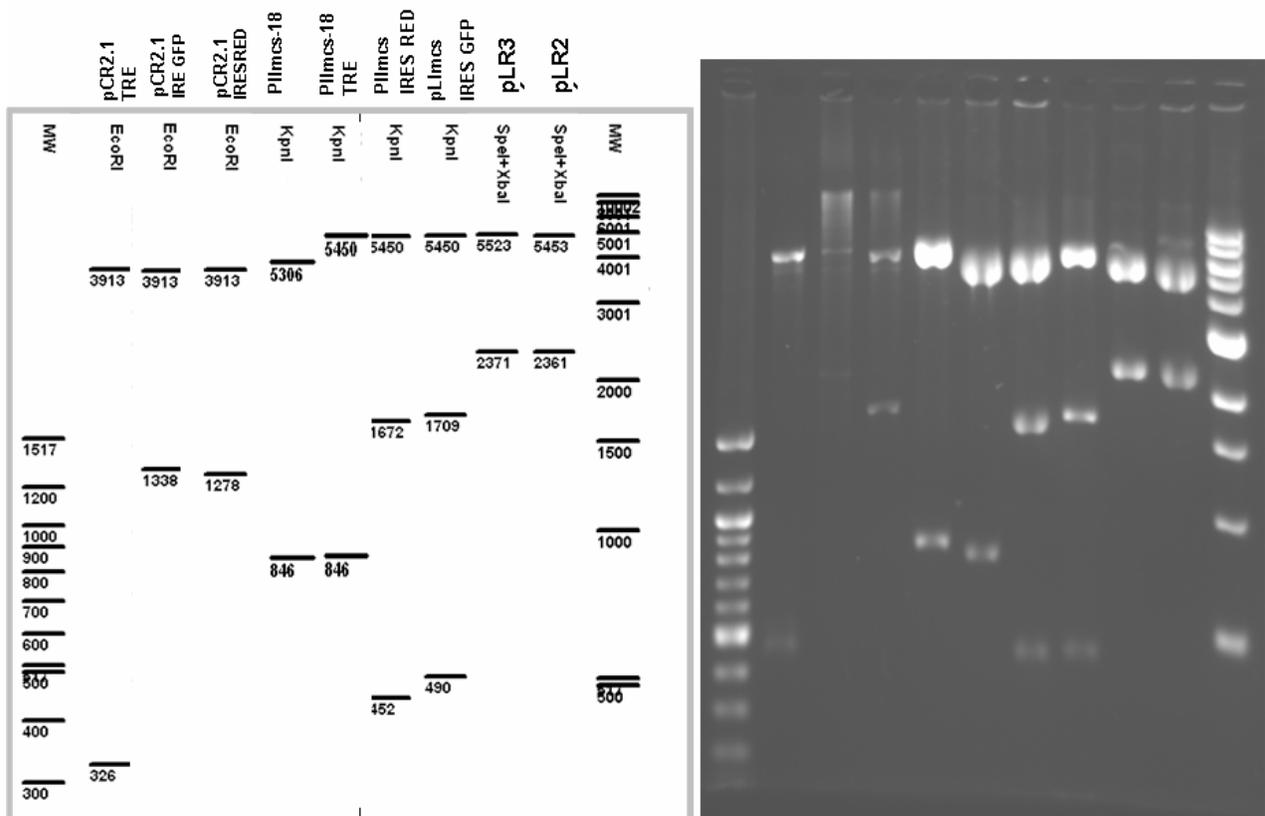


Figura 6 – Padrão de clivagem observado e esperado dos plasmídeos intermediários. Utilizou-se dois marcadores de peso molecular:: *NEB 1000pb DNA Ladder* (marcador esquerdo) e *NEB 100pb DNA Ladder* (marcador direito). MW - *molecular weight*.

7.3 SEQÜENCIAMENTO

Foram utilizados para iniciar a estratégia de clonagem os plasmídeos pCR2.1 TRE, pCR2.1 IRES-GFP e pCR2.1 IRES-DsRed para tais fins, foram seqüenciados utilizando os *primers* M13 direto e M13 reverso, não apresentando mutações nas seqüências de interesse.

8. CURRICULUM VITÆ RESUMIDO

JOSÉ EDUARDO VARGAS

DADOS PESSOAIS

Nome: José Eduardo Vargas

Local : Córdoba, CB, Argentina

Data de nascimento: 16/02/1983

Endereço profissional: Av. Bento Gonçalves, 9500, 91501-970, Porto Alegre, Brasil.

Telefone profissional:+ 55 51 33087620

E-mail: joseduvargas@yahoo.com.ar

FORMAÇÃO

2007 – Mestrado em Biologia Celular e Molecular, no programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Em andamento.

2001-2006 Licenciatura em Genética, Universidad Nacional de Misiones, Argentina.

ESTÁGIOS

Estágio: Estágio de iniciação científica

Período: Maio de 2006 a janeiro de 2008.

Instituição: Laboratório de Biologia Celular e Molecular em Cardiologia.

Orientador: Dr. Andrés Delgado Cañedo.

PRÊMIOS E DISTINÇÕES

2008 Melhor apresentação da Sessão, Instituto Universitário de cardiologia (IC/FUC)

EXPERIÊNCIA PROFISSIONAL OU DIDÁTICA ANTERIOR

2005-2006 Auxiliar docente de segunda. Nível graduação, Licenciatura em Genética, Misiones, Argentina. Disciplina: Química biológica.

RESUMOS E TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS

VARGAS, J. E . Criação de uma série de lentivetores estáveis para estudo de doenças genéticas. *XX Congresso Brasileiro de Genética Médica, Gramado, RS* 2008,.
