



Ana Isabel Matos de Almeida

Licenciada em Biologia

**Produção de partículas semelhantes a
retrovírus como candidatas a vacina
para a Hepatite C**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Genética Molecular e Biomedicina

Orientadora: Doutora Ana Sofia Coroadinha, ITQB/IBET

Júri:

Presidente: Prof.^a Doutora Ilda Maria Barros dos Santos Gomes Sanches

Arguente: Prof.^a Doutora Isabel Maria Godinho de Sá Nogueira

Vogal: Doutora Ana Sofia Valente de Sousa Coroadinha



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Setembro 2012

Universidade Nova de Lisboa
Faculdade de Ciências e Tecnologia
Departamento de Ciências da Vida

**Produção de partículas semelhantes a
retrovírus como candidatas a vacina
para a Hepatite C**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Genética Molecular e Biomedicina

Orientadora: Doutora Ana Sofia Coroadinha, ITQB/IBET

Júri:

Presidente: Prof.^a Doutora Ilda Maria Barros dos Santos Gomes Sanches

Arguente: Prof.^a Doutora Isabel Maria Godinho de Sá Nogueira

Vogal: Doutora Ana Sofia Valente de Sousa Coroadinha

Ana Isabel Matos de Almeida

Setembro 2012

Produção de partículas semelhantes a retrovírus como candidatas a vacina para a Hepatite C

Copyright Ana Isabel Matos de Almeida, FCT/UNL, UNL

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Agradecimentos

Gostaria de agradecer a todas as pessoas que de algum modo contribuíram para a realização desta tese.

À Doutora Ana Coroadinha pela oportunidade de poder realizar a tese de mestrado sob a sua orientação na Unidade de Tecnologia de Células Animais, pela sua ajuda e disponibilidade constante.

À Doutora Paula Alves igualmente por poder realizar a tese de mestrado na Unidade de Tecnologia de Células Animais.

À Doutora Rute Castro e ao Hélio Tomás por todo o auxílio no trabalho laboratorial e na elaboração da presente tese, por todo o apoio e tempo despendido comigo, por todos os ensinamentos e conselhos.

À Filipa Rodrigues pela formação inicial que me permitiu dar os primeiros passos no TCA.

A todos os membros do TCA e em especial ao “grupo dos vírus” pela sua excelente boa disposição.

À minha colega Sónia Silva por ter partilhado as alegrias e frustrações do meu “primeiro ano de trabalho”.

A todos os meus amigos que embora oiçam muitas vezes “hoje não posso ficar para outro dia” continuam sempre a convidar-me.

À minha família em especial pais e irmãos pelo apoio incondicional de sempre.

A todos, muito Obrigada.

Resumo

O Vírus da Hepatite C (HCV) infeta mais de 170 milhões de pessoas em todo o mundo, sendo uma das principais causas de cancro do fígado. Como tal, é extremamente importante e desejável a criação de uma vacina. Recentemente têm vindo a ser desenvolvidas e comercializadas vacinas baseadas em partículas semelhantes a vírus (VLPs) capazes de estimular respostas humorais e celulares eficientes.

Os objetivos deste trabalho consistiram no melhoramento de linhas celulares produtoras de VLPs derivadas de retrovírus e no melhoramento da qualidade das partículas virais, com o intuito de produzir VLPs candidatas a vacina para a hepatite C.

Para tal, utilizaram-se duas metodologias. Um sistema de troca de *cassette* (RMCE), que é um sistema versátil e rápido para o desenvolvimento de linhas celulares, permitindo obter uma elevada expressão de um gene de interesse, tendo sido utilizado para expressar os epítomos do HCV. Testaram-se dois sistemas, um mediado pela enzima Cre e outro mediado pela enzima Flipase.

Para o melhoramento da qualidade das partículas utilizou-se a metodologia de silenciamento por RNAi para eliminar a incorporação da tetraspanina CD63, uma vez que a presença desta proteína nas VLPs poderá desencadear respostas imunológicas inespecíficas.

Verificou-se que o sistema de troca de *cassette* mediado pela enzima Cre não foi eficiente nas condições experimentais utilizadas, não tendo sido possível produzir VLPs pseudotipadas com os epítomos do HCV. No sistema mediado pela enzima Flipase a troca de *cassette* foi eficiente obtendo-se clones que expressam as proteínas E1 e E2, para a produção de VLPs pseudotipadas com o envelope do vírus HCV. Em relação ao silenciamento da tetraspanina CD63 apesar de serem testadas diversas condições, a percentagem de silenciamento obtida foi muito reduzida e instável, concluindo-se não ser possível realizar o silenciamento desta proteína através das sequências utilizadas.

Palavras chave: HCV, E1 e E2, rVLP, CD63, RMCE, vacinas

Abstract

The Hepatitis C Virus (HCV) infects more than 170 million people worldwide, being one of the major causes of liver cancer. Therefore, it is extremely desirable and important to develop a vaccine. New vaccines based on virus-like particles (VLPs) which present efficient stimulation of humoral and cellular immune responses have been recently developed and marketed.

The objectives of this study consisted on the improvement of cell lines producing VLPs derived from retroviruses and improvement of the quality of viral particles in order to produce VLPs as candidates for hepatitis C vaccine. To this end, we used two methods. A system for cassette exchanging (RMCE), which is a versatile and rapid method used for cell line development, that allows to obtain high expression of a gene of interest, was used to express HCV epitopes. Two systems were tested, one mediated by the Cre enzyme and another mediated by the Flipase enzyme.

To improve particles quality the RNAi method of silencing was used to eliminate incorporation of tetraspanin CD63, since this protein might trigger nonspecific immune responses, when present at the VLP surface.

It was found that the cassette exchanging system mediated by Cre was not efficient in the experimental used conditions, so it was not possible produce VLPs pseudotyped with HCV epitopes. In the system mediated by Flipase the cassette exchange was efficient yielding clones expressing E1 and E2 proteins, for the production of VLPs pseudotyped with the HCV envelope. Regarding the silencing of CD63 tetraspanin, despite the use of different strategies, the percentage of silencing obtained was very low, concluding that it was not possible to silence this protein through the sequences used.

Keywords: HCV, E1 e E2, rVLP, CD63, RMCE, vaccines

Índice geral

Agradecimentos	i
Resumo	iii
Abstract	v
Índice geral	vii
Índice de tabelas	xi
Índice de figuras	xiii
Abreviaturas	xv
1. Introdução	1
1.1 Vírus da Hepatite C.....	2
1.1.1. Estrutura do genoma do HCV	2
1.1.2. Ciclo de vida do HCV.....	3
1.2. Vacinas virais.....	4
1.2.1. Partículas semelhantes a vírus – VLPs	5
1.3. Retrovírus	7
1.3.1. Estrutura do genoma dos retrovírus	7
1.3.2. Ciclo de vida	9
1.4. Vetores retrovirais	11
1.4.1. Partículas semelhantes a retrovírus (rVLPs).....	13
1.5. Metodologias	15
1.5.1. Sistema de troca de <i>cassette</i> (RMCE)	15
1.5.1.1. Cre-RMCE	16
1.5.1.2. Flpe-RMCE	17
1.5.2. Mecanismo de RNA de interferência (RNAi)	18
1.6. Objetivos do trabalho	19
2. Materiais e métodos	21
2.1. Cultura manutenção e propagação de células animais	21
2.2. Determinação da concentração e viabilidade celular	21

I – Silenciamento da Tetraspanina CD63	22
2.3. Linhas celulares e meios de cultura	22
2.4. Transdução celular e seleção	22
2.5. Detecção de CD63	23
2.5.1. Western Blot	23
2.5.2. Citometria de fluxo	23
2.6. Isolamento de células silenciadas para a CD63	24
II – Construção de um sistema de troca de <i>cassette</i> para os epítomos do vírus da hepatite C.....	24
2.7. Linhas celulares e meios de cultura	24
2.8. Plasmídeos	24
2.9. Construção de plasmídeos	25
2.9.1 Amplificação de sequências (Insertos)	25
2.9.2. Purificação dos insertos e vetores	26
2.9.3. Desfosforilação e ligação	26
2.9.4. Produção de plasmídeos	27
2.10. Quantificação de ácidos nucleicos	27
2.11. Obtenção de clones com o sistema Cre-RMCE	27
2.11.1. Transfecção	27
2.11.1.1. Método do fosfato de cálcio	27
2.11.1.2. Método de eletroporação	28
2.11.2. Isolamento de clones	28
2.11.3. Citometria de fluxo	28
2.11.4. Southern Blot	29
2.11.4.1. Extração de DNA	29
2.11.4.2. Síntese da sonda	29
2.11.4.3. Transferência do DNA para a membrana	29
2.11.4.4. Hibridação e detecção da sonda	29
2.12. Troca de <i>cassette</i> (RMCE).....	30

2.13. Validação da troca de <i>cassette</i>	30
2.13.1. Detecção da expressão de LacZ	30
2.13.2. Western Blot.....	31
3. Resultados	33
3.1. I – Silenciamento da tetraspanina CD63	33
3.2. II – Construção de um sistema de troca de <i>cassette</i> para os epítomos do vírus da hepatite C	36
3.2.1. Construção do plasmídeo <i>tagging</i>	36
3.2.2. Transfecção por eletroporação	37
3.2.3. Transfecção por CaPO ₄	38
3.2.4. Isolamento de clones	39
3.2.5. Análise do número de cópias do plasmídeo pTagLoxP_eGFPZeo (<i>tagging</i>) inserido nas células	41
3.2.6. Troca de <i>cassette</i> mediada pela enzima Cre recombinase (Cre-RMCE).....	42
3.2.7. Troca de <i>cassette</i> mediada pela enzima Flipase (Flpe-RMCE)	43
3.2.8. Confirmação da eficiente troca de <i>cassette</i>	45
4. Discussão	47
4.1. I – Isolamento da tetraspanina CD63	47
4.2. II – Construção de um sistema de troca de <i>cassette</i> para os epítomos do vírus da hepatite C	48
4.3. Trabalho futuro	51
5. Bibliografia	53
Anexo I	59
Anexo II	60
Anexo III	61
Anexo IV	62
Anexo V	63
Anexo VI	64
Anexo VII	65

Índice de tabelas

Tabela 1.1 – Proteínas do HCV e a sua função.....	3
Tabela 1.2 – Produção de VLPs a partir de vírus de diferentes famílias.....	6
Tabela 1.3 – Classificação dos retrovírus	7
Tabela 2.1 – <i>Primers</i> utilizados para amplificação dos insertos e respectivas enzimas de restrição	26
Tabela 3.1 – Percentagem de células a expressar CD63 determinada por citometria de fluxo	34
Tabela 3.2 – Percentagem de silenciamento para as duas populações de células sujeitas a isolamento.....	36
Tabela 3.3 – Distribuição da intensidade de fluorescência derivada da expressão da eGFP: ≤ 10 , 10 e 100, ≥ 100 ; apresentada pelos diferentes clones	40

Índice de figuras

Fig.1.1 – Representação da organização do genoma do HCV e do processamento da poliproteína codificada por esse genoma.....	2
Fig. 1.2 – Ciclo de replicação do HCV	4
Fig. 1.3 – Representação esquemática de um retrovírus e do seu genoma	9
Fig. 1.4 – Ciclo de vida dos retrovírus	10
Fig. 1.5 – Vetores de terapia génica utilizados em ensaios clínicos	11
Fig. 1.6 – Representação esquemática da produção de retrovírus replicativamente competentes (RCR) e de retrovírus replicativamente defetivos (RDR).....	13
Fig. 1.7 – Representação esquemática da produção de uma rVLP	14
Fig. 1.8 – Local LoxP	16
Fig. 1.9 – Representação esquemática da recombinação entre locais Lox mutados	17
Fig. 1.10 – Representação esquemática do mecanismo de RNAi	19
Fig. 3.1 – Análise da expressão da CD63 nos extratos celulares por Western Blot	33
Fig. 3.2 – Percentagem de células fluorescentes detetadas por citometria de fluxo para as populações resultantes das condições 1, 2 e 3	35
Fig. 3.3 – Géis de agarose da construção do plasmídeo pTagLoxP_eGFPZeo	37
Fig. 3.4 – Eficiência da transfeção por eletroporação	37
Fig. 3.5 – Linhas de tendência da intensidade de fluorescência das células 293CeB11 e 293CeB22 resultantes da transfeção por eletroporação	38
Fig. 3.6 – Eficiência da transfeção por CaPO ₄	38
Fig. 3.7 – CaPO ₄ vs Eletroporação	39
Fig. 3.8 – Comparação da intensidade de fluorescência dos clones	40
Fig. 3.9 – Géis de agarose da construção do plasmídeo pSP72-dpuro	41
Fig. 3.10 – Géis de agarose da construção do plasmídeo pTarLoxP-E1E2.....	42
Fig. 3.11 – Esquema do sistema de troca de <i>cassette</i> mediado pela enzima Cre recombinase introduzido nas linhas celulares e 293CeB11 e 293CeB22	43
Fig. 3.12 – Géis de agarose da construção do plasmídeo pTAR-E1E2	44

Fig. 3.13 – Representação esquemática do sistema de troca de <i>cassette</i> mediado pela enzima Flipase	45
Fig. 3.14 – Observação da expressão de LacZ por microscopia ótica	45
Fig. 3.15 – Análise da expressão de LacZ e dos epítomos do HCV (E1 e E2) em extratos celulares por Western Blot.....	46

Abreviaturas

ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico, do inglês: <i>Deoxyribonucleic Acid</i>
FBS	Soro fetal bovino, do inglês: <i>Fetal Bovine Serum</i>
GFP	Proteína verde fluorescente, do inglês: <i>Green Fluorescent Protein</i>
HAV	Vírus da hepatite A, do inglês: <i>Hepatitis A virus</i>
HBV	Vírus da hepatite B, do inglês: <i>Hepatitis B virus</i>
HCV	Vírus da hepatite C, do inglês: <i>Hepatitis C Virus</i>
HEK	Rim embrionário humano, do inglês: <i>Human Embryonic Kidney</i>
HIV	Vírus da imunodeficiência humana, do inglês: <i>Human Immunodeficiency Virus</i>
IRES	Local interno de entrada do ribossoma, do inglês: <i>Internal Ribosomal Entry Site</i>
LTR	Longas repetições terminais, do Inglês: <i>Long Terminal Repeat</i>
MLV	Vírus da leucemia murina, do inglês: <i>Murine Leukemia Virus</i>
ORF	Grelha de leitura aberta, do inglês: <i>Open Reading Frame</i>
PBS	Local de ligação do <i>primer</i> , do inglês: <i>Primer Binding Site</i>
PCR	Reação de polimerização em cadeia, do inglês: <i>Polymerase Chain Reaction</i>
RdRp	RNA polimerase dependente de RNA, do inglês: <i>RNA dependente RNA polymerase</i>
RISC	Complexo de silenciamento induzido por RNA, do inglês: <i>RNA-induced silencing complex</i>
RMCE	Recombinação mediada por troca de <i>cassette</i> , do inglês: <i>recombinase-mediated cassette Exchange</i>
RNA	Ácido Ribonucleico, do inglês: <i>Ribonucleic Acid</i>
RNAi	RNA de interferência
RT	Transcriptase reversa, do inglês: <i>Reverse Transcriptase</i>
RTs	Locais alvo de recombinação, do inglês: <i>Recombination Target sites</i>
rVLP	Partícula semelhante a retrovírus, do inglês: <i>Retrovirus Like Particle</i>
shRNA	<i>short hairpin RNA</i>
siRNA	Pequeno RNA de interferência, do inglês: <i>small interfering RNA</i>
TAE	Tris- Acetato- EDTA
UTR	Região terminal não codificante, do inglês: <i>Untranslated Terminal Repeat</i>
VLP	Partícula semelhante a vírus, do inglês: <i>Virus Like Particle</i>

1. Introdução

O Vírus da Hepatite C (HCV) foi detetado pela primeira vez em 1970 em amostras de sangue (Feinstone et al., 1975), sendo a primeira sequência do vírus reportada em 1989 (Choo et al., 1989). Atualmente, segundo a organização mundial de saúde estima-se que este vírus infete mais de 170 milhões de pessoas em todo o mundo (3% da população mundial), com maior prevalência nos continentes africano e asiático (Yu e Chiang, 2010), afetando aproximadamente cinco vezes mais pessoas que o Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) (Tan et al., 2002). Esta prevalência da doença deve-se ao facto da infeção por este vírus ser de elevada persistência conduzindo a uma infeção crónica em 85% dos casos (Hoofnagle, 1997).

O HCV é um vírus que infeta o fígado sendo os hepatócitos o seu principal local de replicação, contudo existem evidências da presença do vírus em locais como o sistema nervoso central, os linfócitos do sangue periférico e as células epiteliais do intestino (Lindenbach e Rice, 2005). O HCV não mata as células que infecta, mas desencadeia uma resposta inflamatória (Hepatite) que rapidamente elimina o vírus ou que lentamente origina a destruição do fígado. A infeção por HCV representa uma das principais causas de cancro do fígado e é a indicação mais frequente para transplante hepático em adultos, nos países ocidentais (Willems et al., 2002). Atualmente, o tratamento aplicado aos pacientes com HCV consiste na administração de interferão α e ribavirina. A percentagem de pacientes curados com este tratamento é de 80% a 90% para os pacientes infetados com os genótipos 2 e 3 e de 40% a 50% para o genótipo 1, sendo esta terapia muito longa, tóxica e dispendiosa (Yu e Chiang, 2010).

Diversos fatores contribuem para a ausência de terapias eficientes para a Hepatite C, tais como a diversidade genética do HCV, o aparecimento de vírus resistentes a fármacos, a falta de sistemas de cultura capazes de reproduzir a infeção (apenas identificados recentemente) e a falta de modelos animais para estudar a replicação e patogenicidade do vírus (Tan et al., 2002). Como tal, a criação de uma vacina para o HCV que possua uma função tanto preventiva como terapêutica é de extrema importância. Atualmente não existe nenhuma vacina disponível, mas vários estudos estão a ser desenvolvidos nesse sentido. De facto, foi recentemente comunicado o primeiro ensaio clínico destinado a analisar a eficiência de uma vacina para o HCV (Barnes et al., 2012). Um dos maiores desafios no desenvolvimento de uma vacina para o HCV é o elevado grau de diversidade genética exibida pelo vírus, que se estima ser 10 vezes superior ao observado para o HIV. Esta diversidade deve-se à fraca capacidade de *proof reading* da polimerase. Com base no grau de similaridade genética o HCV é classificado em 6 genótipos que são depois subdivididos em subtipos (Simmonds et al., 2005; Simmonds et al., 1993).

1.1. Vírus da Hepatite C

1.1.1. Estrutura do genoma do HCV

O HCV é um vírus de RNA de cadeia positiva, membro do género *Hepacivirus* da família Flaviviridae. Possui como envelope uma bicamada lipídica com duas glicoproteínas, E1 e E2. O envelope rodeia a nucleocápside, que é composta por múltiplas cópias de uma pequena proteína denominada core (C) que contém o genoma do vírus (Tan, 2006). O genoma possui uma grelha de leitura aberta (ORF, do inglês: *Open Reading Frame*) flanqueada por regiões não codificantes (UTRs, do Inglês: *Untranslated Terminal Repeats*) 5' e 3' que desempenham um papel importante na transcrição e replicação do RNA. A poliproteína codificada pela grelha de leitura aberta é clivada em três proteínas estruturais (core, E1 e E2) e sete proteínas não estruturais (p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A e NS5B) (Tabela 1.1) (Tang e Grise, 2009). As proteínas estruturais são codificadas pela parte N-terminal da poliproteína e a restante porção codifica as proteínas não estruturais (Figura 1.1). A UTR5' localiza-se a montante da ORF e é a região mais conservada do genoma possuindo quatro domínios altamente estruturados (I, II, III e IV), sendo os domínios II, III e IV constituintes do local interno de entrada do ribossoma (IRES). O IRES tem a capacidade de formar um complexo de pré-iniciação onde se liga diretamente a subunidade ribossomal 40S, dando origem à tradução da poliproteína do HCV (Tan, 2006).

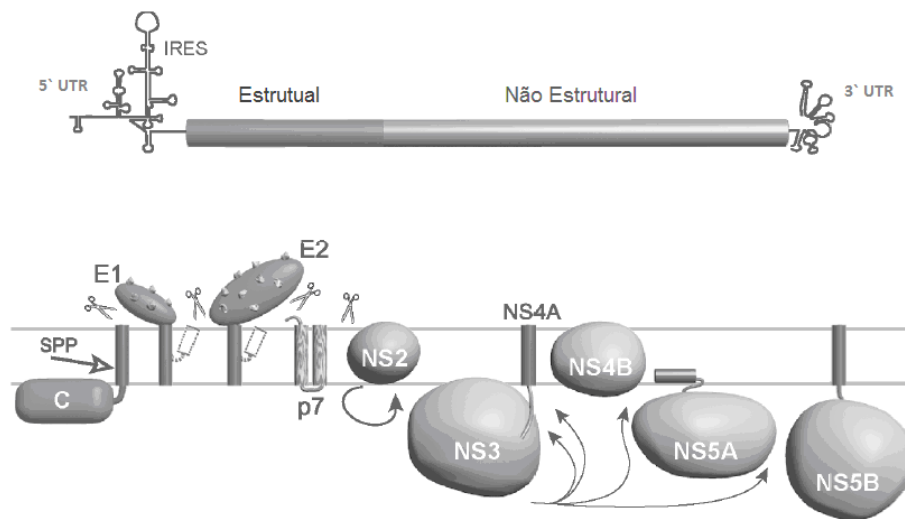


Figura 1.1. Representação da organização do genoma do HCV e do processamento da poliproteína codificada por esse genoma, adaptado de Tan (2006).

Tabela 1.1. Proteínas do HCV e a sua função, adaptado de Tan et al (2002) e Tan (2006).

Proteína	Função
Core (C)	Proteína de ligação ao DNA, forma a cápside viral.
E1	Glicoproteína de envelope
E2	Glicoproteína de envelope responsável pela ligação aos recetores celulares.
p7	Proteína integral de membrana. Funciona como um possível canal iónico de cálcio.
NS2	Juntamente com o domínio terminal da proteína NS3, forma uma metaloprotease (NS2-3 protease) que cliva o local entre as proteínas NS2 e NS3.
NS3	Proteína viral multifuncional. Componente da protease NS2-3 e da NS3-4A, esta é responsável pela clivagem da poliproteína entre os locais NS3-NS4A, NS4A-NS4B, NS4B-NS5A e NS5A-NS5B. Desempenha também funções de NTPase e de helicase.
NS4A	Cofator da protease NS3-4A.
NS4B	Responsável pela associação do complexo de replicação à membrana do retículo endoplasmático. Possíveis funções de inibição da síntese celular e indução da interleucina 8.
NS5A	Metaloproteína que desempenha um papel importante na replicação viral através da formação do complexo de replicação e na regulação das vias celulares.
NS5B	RNA polimerase dependente de RNA. Responsável pela síntese das cadeias positivas e negativas de RNA.

1.1.2. Ciclo de vida do HCV

O ciclo de vida do HCV é inteiramente citoplasmático não sendo necessária a entrada do RNA viral para o núcleo. O HCV liga-se aos recetores presentes na membrana celular desencadeando a endocitose do vírus. Posteriormente ocorre a fusão da membrana do vírus com a membrana celular, libertando-se assim a nucleocápside para o citoplasma da célula (Tan, 2006).

Os recetores que permitem a entrada do HCV nas células hospedeiras ainda não estão bem definidos. A proteína CD81, pertencente à superfamília das tetraspaninas, tem sido proposta como um recetor de ligação direta para a glicoproteína E2 (Tan, 2006). No entanto, não parece ser o único recetor para HCV, uma vez que a sua expressão em ratinhos não é suficiente para se observar infeção por HCV (Masciopinto et al., 2002). Verificou-se também que os vírus presentes em sangue de indivíduos infetados encontravam-se associados a lipoproteínas de baixa densidade (LDL). Como consequência, tem-se sugerido os recetores das LDL como recetores do HCV (Jones et al., 2000).

Outros estudos têm ainda referido os glicosaminoglicanos (GAGs) como prováveis recetores para o HCV (Barth et al., 2003).

Após a desencapsidação do vírus, o seu genoma é transcrito dando origem à poliproteína, que é posteriormente clivada por proteases do vírus e da célula hospedeira nas proteínas estruturais e não estruturais (Tan, 2006). A replicação viral ocorre no citoplasma, catalisada pela RNA polimerase dependente de RNA (RdRp) (Tan et al., 2002). Esta enzima é direcionada para a membrana do retículo endoplasmático (ER), onde ocorre a síntese de um RNA de cadeia negativa, utilizado como molde para a síntese do RNA de cadeia positiva. Este novo RNA de cadeia positiva forma o genoma do novo virião de HCV. Uma vez que as cadeias de sentido positivo e negativo são complementares, cada uma pode servir como molde para sintetizar a outra. A nova cadeia de RNA de sentido positivo é encapsidada com as proteínas estruturais, formando a nucleocápside. A “montagem” do novo virião de HCV é feita a partir de vesículas citoplasmáticas formadas por *budding* através de membranas intracelulares. Finalmente, os viriões são transportados através do complexo de Golgi para a membrana citoplasmática e libertados para o meio extracelular por exocitose (Tan et al., 2002).

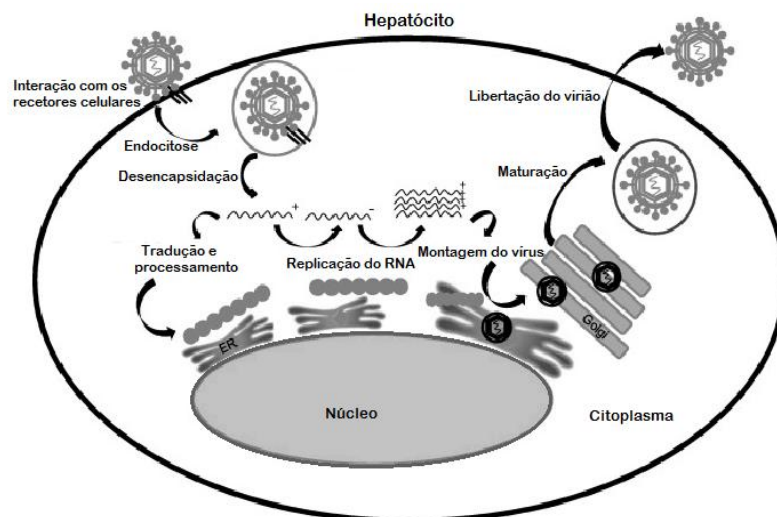


Figura 1.2. Ciclo de replicação do HCV, adaptado de Bouchard e Navas-Martin (2011).

1.2. Vacinas virais

A vacinação tem como princípio induzir uma resposta imune primária num indivíduo, de modo a que a infeção com o agente patogénico resulte numa rápida resposta imune secundária. A eliminação do agente patogénico, ou a inibição da sua replicação, está dependente da memória das células B e T, bem como da presença de anticorpos neutralizantes no soro. A infeção e replicação do vírus nas células hospedeiras origina a resposta imune celular e humoral (Tan, 2006).

A maioria das vacinas para doenças virais são baseadas em vírus atenuados ou inativados. Esta estratégia de desenvolvimento de vacinas virais não virulentas tem sido aplicada em vírus que crescem em cultura celular pois facilita a sua atenuação ou inativação. Os vírus vivos atenuados possuem reduzida virulência devido a sofrerem repetidas passagens durante o crescimento celular *in vitro*, selecionando-se mutantes com baixa replicação e que não causam doença no hospedeiro, mas originam uma resposta imune celular e humoral (Tan, 2006). No entanto, a probabilidade da ocorrência de uma inativação incompleta ou a reversão de um vírus atenuado para um estado mais virulento pode levar ao desenvolvimento de doença nos indivíduos vacinados. Este problema é particularmente relevante em vírus com elevado grau de recombinação genética, como é o caso de vírus com genomas segmentados. Neste caso, um indivíduo vacinado pode ser infetado com um vírus de um serotipo diferente e ocorrer recombinação levando à produção de uma nova variante de vírus. Em muitos casos uma alternativa às vacinas vivas são as vacinas recombinantes baseadas num único péptido ou proteína viral. Contudo, para alcançar o mesmo efeito protetor obtido com uma vacina atenuada ou inativada são necessárias mais doses com elevada concentração de antígeno, sendo por isso mais dispendiosas (Noad e Roy, 2003).

Encontram-se já disponíveis vacinas contra os outros principais agentes etiológicos de doença hepática. Para a hepatite A (HAV) está disponível uma vacina baseada em vírus atenuados e para o vírus da hepatite B (HBV), a proteína de envelope do HBV tem sido utilizada com sucesso para a proteção contra a infeção por este vírus. As vacinas contra HAV e HBV demonstram que é possível a criação de vacinas contra vírus hepáticos, no entanto a criação de uma vacina para o HCV é extremamente exigente uma vez que a sua replicação em cultura não é eficiente e o vírus possui um elevado grau de variabilidade genética (Tan, 2006).

1.2.1. Partículas semelhantes a vírus - VLPs

Recentemente têm surgido novas estratégias, baseadas em avanços na tecnologia viral recombinante, que levam ao aparecimento de vacinas mais seguras. Uma dessas estratégias é a produção de partículas semelhantes a vírus (VLPs) que se assemelham ao vírus nativo e que estimulam respostas humorais e celulares eficientes, tal como descrito para as VLPs do vírus do papiloma humano (Tan, 2006).

O facto de a expressão das proteínas da cápside de muitos vírus levar à formação espontânea de partículas que são estruturalmente semelhantes aos vírus promoveu o desenvolvimento de VLPs para diversas aplicações (Noad e Roy, 2003). Diferentes vírus têm sido utilizados para a produção de VLPs, não só para o desenvolvimento de potenciais vacinas, mas também como ferramenta para estudar a biologia de alguns vírus (Tabela 1.2).

Tabela 1.2. Produção de VLPs a partir de vírus de diferentes famílias, adaptado de Noad e Roy (2003).

Família	Vírus	Estrutura da cápside	
		Envelope	Proteínas principais
<i>Caliciviridae</i>	Norwalk, Hawaii, Grimsby, Burwash Landing, White River, Florida, doença hemorrágica do coelho, Hepatite E	Não	1
<i>Picornaviridae</i>	Polio	Não	4
<i>Flaviviridae</i>	Hepatite C	Sim, 2 proteínas	1
<i>Retroviridae</i>	HIV, SIV, FIV, BIV, visna, FeLV, BLV, Sarcoma de Rous	Sim, 2 proteínas	1
<i>Paramyxoviridae</i>	Doença de Newcastle	Sim, 2 proteínas	4
<i>Bunyaviridae</i>	Hantaan	Sim, 2 proteínas	1
<i>Orthomyxoviridae</i>	Influenza A	Sim, 2 proteínas	2
<i>Birnaviridae</i>	Infectious bursal disease	Não	3
<i>Reoviridae</i>	Bluetongue, rotavírus	Não	4
<i>Parvoviridae</i>	Parvovírus suíno, mink enteritis parvovirus, Parvovírus canino, B19, Adeno-associated	Não	1
<i>Circoviridae</i>	Chicken anaemia, circovírus suíno	Não	1
<i>Papillomaviridae</i>	Papilomavírus	Não	1
<i>Polyomaviridae</i>	SV40, JC	Não	1
<i>Hepadn aviridae</i>	Hepatite B	Sim, 3 proteínas	1

A utilização de VLPs em vacinação é extremamente eficiente uma vez que estas mimetizam a estrutura da partícula viral, sem conter material genético. Ou seja, as VLPs não possuem qualquer genoma do vírus, RNA ou DNA, mas possuem a distribuição nativa das proteínas virais da cápside, sem existir qualquer inconveniente de reversão ou recombinação.

Assim os antígenos apresentados pelas VLPs encontram-se numa conformação semelhante à original, desencadeando respostas imunes mais eficientes do que a apresentação dos antígenos isolados (Murata et al., 2003; Schirmbeck et al., 1996). As VLPs possuem a capacidade de estimular a resposta imune mediada pelas células B e têm igualmente demonstrado ser eficientes na estimulação da resposta proliferativa das células CD4 e dos linfócitos T citotóxicos (Noad e Roy, 2003).

Como já referido anteriormente, as vacinas mais eficazes utilizadas no passado eram formas atenuadas ou inativadas do agente patogénico. Nos últimos anos, os esforços têm sido direcionados no sentido do desenvolvimento de vacinas igualmente potentes, mas mais seguras. No entanto, as subunidades não infecciosas dos agentes patogénicos, tais como proteínas, péptidos ou açúcares são

pouco imunogénicos por si, tendo por isso de ser adicionados adjuvantes imuno-estimulantes (Lechner et al., 2002). Infelizmente, muitos destes adjuvantes causam efeitos colaterais consideráveis, tais como a toxicidade da inflamação, o que invalida a sua utilização em humanos (Moingeon et al., 2001; Singh e O'Hagan, 1999). As VLPs como vacinas são bem toleradas e seguras porque não são infecciosas e são imunogénicas sem necessitarem de um adjuvante. Ensaio clínicos, têm mostrado que as VLPs do vírus do papiloma humano são tão imunogénicas quando administradas intramuscularmente sem adjuvantes, como na combinação com alumínio ou MF59, indicando que os adjuvantes não são necessários para este tipo de vacinas (Harro et al, 2001). As vacinas comercializadas baseadas em VLPs têm sido bem-sucedidas, como é o caso das vacinas para o vírus da hepatite B e do papiloma humano, e o seu potencial está atualmente a ser explorado para combater outras doenças infecciosas e também o cancro (Ludwig e Wagner, 2007).

1.3. Retrovírus

Os vírus da família *Retroviridae* são vírus com envelope lipídico que possuem duas cópias lineares de RNA de 7-11 Kb (Carter e Saunders, 2007)

Baseado na sua estrutura genómica, os retrovírus podem ser classificados em simples e complexos (Tabela 1.3). Os dois grupos expressam os genes: *gag*, *pro*, *pol* e *env* que codificam para as proteínas da cápside, protease, transcriptase reversa e integrase, e proteínas do envelope, respetivamente. Os retrovírus complexos para além de todas estas proteínas também possuem genes que codificam para proteínas com funções acessórias (Hu e Pathak, 2000).

Tabela 1.3. Classificação dos retrovírus, adaptado de Carter e Saunders (2007).

Retrovírus simples		Retrovírus complexos	
Género	Exemplo	Género	Exemplo
<i>Alpharetrovirus</i>	Vírus do sarcoma de Rous	<i>Deltaretrovirus</i>	Vírus T-linfotrópico humano
<i>Betaretrovirus</i>	Vírus do tumor mamário de rato	<i>Epsilonretrovirus</i>	Vírus do sarcoma dérmico Walleye
<i>Gamaretrovirus</i>	Vírus da leucemia murina	<i>Lentivirus</i>	Vírus da imunodeficiência humana
	Vírus da leucemia felina	<i>Spumavirus</i>	<i>Chimpanzee foamy virus</i>

1.3.1. Estrutura do genoma dos retrovírus

Os retrovírus são vírus de RNA que transcrevem reversamente o seu genoma para DNA durante a sua replicação originando assim a unidade proviral. O DNA viral possui sequências redundantes nas extremidades do genoma, denominadas longas repetições terminais (LTRs, do inglês:

Long Terminal Repeats). Estas sequências podem ser divididas em três regiões, U3, R e U5. Na região U3 localizam-se os promotores e os *enhancers* virais. A região R é essencial para a transcrição reversa de todos os retrovírus, em alguns casos esta região contém também elementos importantes para a expressão dos genes, como é o caso da região R do MLV que possui um sinal de poliadenilação. A região U5 contém sequências que facilitam a iniciação da transcrição reversa. A jusante da região LTR 5' encontra-se o local de ligação do *primer* (PBS, do inglês: *Primer Binding Site*) que possui complementaridade com uma porção de um RNA de transferência (tRNA) celular que é empacotado juntamente com o RNA viral durante a “montagem” do vírus (Carter e Saunders, 2007; Hu e Pathak, 2000). O sinal de empacotamento (ψ) ou sinal de encapsidação (E) são sequências que interagem com as proteínas virais promovendo o empacotamento do RNA viral (Berkowitz et al., 1996). As regiões codificantes de todos os retrovírus possuem pelo menos três genes: *gag*, *pol* e *env* (Fig. 1.3). O gene *gag* codifica as poliproteínas Gag que compõem a cápside viral. Após a “montagem” da partícula viral a poliproteína *gag* é clivada em várias proteínas: matriz, cápside e a nucleocápside. O gene *pol* codifica a transcriptase reversa e a integrase. A transcriptase reversa copia o RNA viral para DNA, que é posteriormente integrado no genoma do hospedeiro através da integrase, formando o provírus. O gene *env*, que em todos os retrovírus é expresso a partir de um RNA sujeito a *splicing*, codifica a poliproteína do envelope que é clivada no domínio transmembranar (TM) e no domínio de superfície (SU). A sequência que codifica a protease viral (Pro) localiza-se entre os genes *gag* e *pol*, sendo maioritariamente expressa como parte da poliproteína *gag* ou como parte da poliproteína *gag-pol* (Hu e Pathak, 2000). A região entre o *env* e o 3' LTR é uma região rica em purinas denominada PPT (do inglês: *polypurine tract*) que é importante para a transcrição reversa. Em alguns vírus esta região possui também um elemento de transporte que permite o transporte de RNAs não sujeitos a *splicing* do núcleo para o citoplasma. Nas extremidades dos LTRs, existem pequenas regiões denominadas por locais de ligação (*att*, do inglês: *attachment sites*) que interagem com a integrase e são fundamentais para uma eficiente integração do DNA viral no genoma do hospedeiro (Hu e Pathak, 2000).

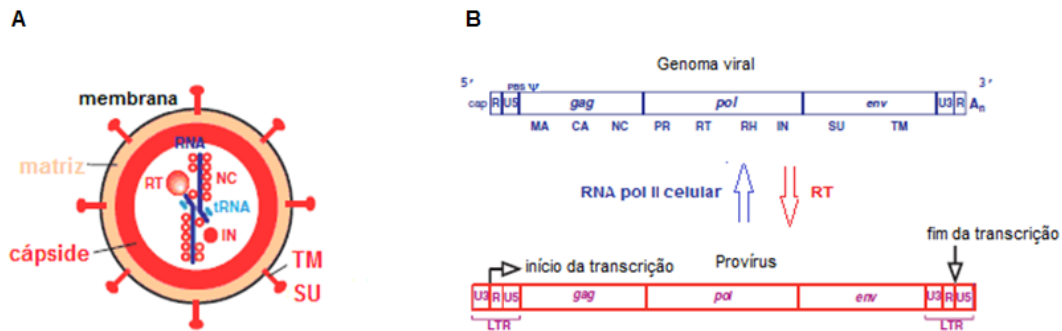


Figura 1.3. Representação esquemática de um retrovírus e do seu genoma. A) Estrutura de um retrovírus. B) Estrutura do genoma e produto dos genes. Genes: *gag* – proteínas da cápside viral, *pol* – polimerase, *env* – envelope. Proteínas: CA - cápside, IN - integrase, MA – matriz, NC - nucleocápside, PR - protease, RH – ribonuclease H, RT – transcriptase reversa, SU – glicoproteína de superfície, TM – glicoproteína transmembranar. Sequências não codificantes: PBS – local de ligação do *primer*, Ψ – sinal de encapsidação, R – sequência repetitiva, U3 – sequência única da extremidade 3' do genoma, U5 - sequência única da extremidade 5' do genoma. Adaptado de Carter e Saunders (2007).

1.3.2. Ciclo de vida

Os Retrovírus são vírus a RNA que se replicam através da integração de uma cópia de DNA, transcrita reversamente a partir do RNA viral, no genoma celular. A partícula viral possui duas cópias do RNA viral, cada uma possuindo a informação genética completa, necessária para a replicação do vírus (Hu e Pathak, 2000). A entrada do vírus na célula hospedeira é efetuada através da interação entre os locais de ligação do vírus, que se localizam nas proteínas de superfície e recetores da superfície da célula (Hu e Pathak, 2000; Carter e Saunders, 2007). Esta interação origina uma alteração conformacional na proteína transmembranar permitindo a fusão do vírus com a membrana celular (Verma e Weitzman, 2005). Após a entrada do vírus na célula, o seu RNA é reversamente transcrito para DNA de cadeia dupla (DNA proviral), através da transcriptase reversa. Para tal, a polimerase utiliza como *primer* o tRNA celular que se encontra ligado ao PBS para sintetizar a cadeia negativa do DNA. A cadeia positiva de DNA é sintetizada utilizando como *primer* a sequência PPT, esta sequência torna-se acessível à transcriptase reversa após a hidrólise do genoma a RNA a jusante dessa sequência. A RNase H é a enzima que catalisa a hidrólise do RNA em complexos RNA-DNA (Carter e Saunders, 2007). Após a síntese do DNA proviral, este é associado às proteínas virais, que incluem a nucleocápside, a transcriptase reversa e a integrase, formando um complexo de pré-integração (PIC, do inglês *pre-integration complex*) que é posteriormente transportado para o núcleo (Verma e Weitzman, 2005). Para a maioria dos retrovírus, a entrada no núcleo só é possível durante a mitose, ou seja, é necessária a desintegração da membrana nuclear induzida pela mitose para se dar a entrada do complexo de pré-integração no núcleo (Carter e Saunders, 2007). Existem contudo alguns retrovírus, tais como os lentivírus, que conseguem infectar células que não se encontram em divisão.

Após a entrada do PIC no núcleo, as cópias de DNA são posteriormente integradas no genoma da célula pela ação da integrase. Uma vez estando integrado no genoma do hospedeiro, o DNA torna-se parte permanente deste, sendo referido como provírus (Hu e Pathak, 2000) (Fig. 1.4).

A expressão dos genes virais, transcrição e tradução, é efetuada pela maquinaria celular. Os fatores de transcrição ligam-se à região promotora do LTR (U3) e a RNA polimerase II do hospedeiro transcreve o provírus em RNA, este em seguida é modificado e transportado para o citoplasma (Hu e Pathak, 2000; Carter e Saunders, 2007). O gene *env* é traduzido a partir do mRNA no retículo endoplasmático rugoso, onde se inicia a glicosilação. Posteriormente, as proteínas de envelope são transportadas para o golgi onde são clivadas nos domínios SU e TM. Estes domínios permanecem associados e são transportados para a membrana plasmática (Carter e Saunders, 2007).

As novas proteínas sintetizadas e o novo RNA viral são “montados” em conjunto na membrana plasmática para formar os novos vírus que saem por *budding* para o exterior da célula (Hu e Pathak, 2000). No novo virião formado, os precursores do *gag* e do *gag-pol* são sujeitos a processamento por proteases virais, resultando na maturação do virião (Verma e Weitzman, 2005).

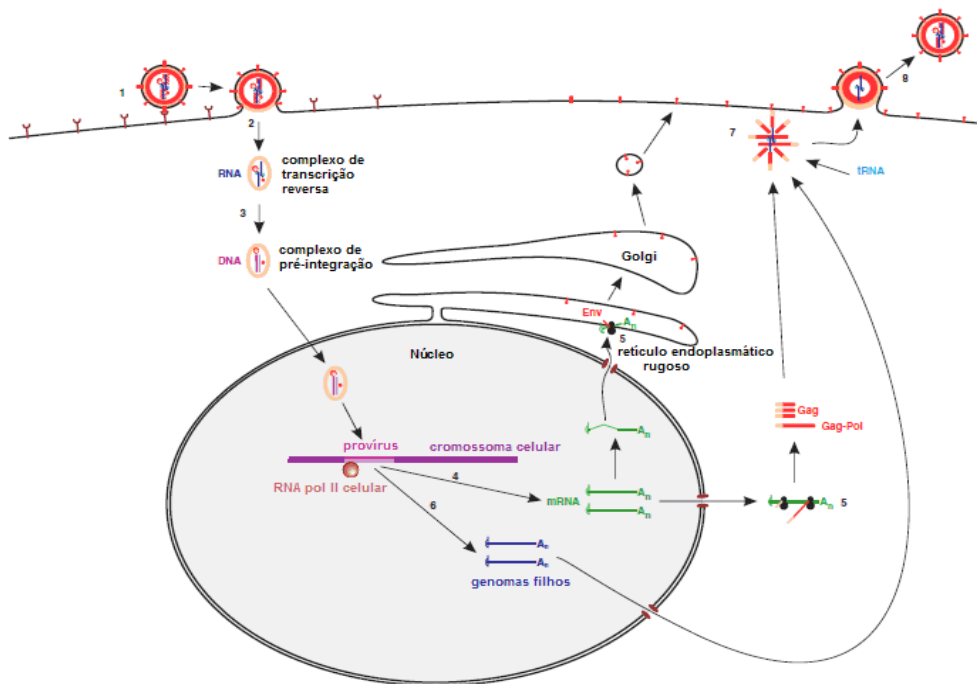


Figura 1.4. Ciclo de replicação de um retrovírus. 1) ligação do vírus à célula, 2) entrada do vírus na célula, 3) transcrição reversa do genoma viral, 4) transcrição do provírus, 5) tradução, 6) transcrição do genoma viral que vai ser encapsidado no virião, 7) “montagem” do virião, 8) saída do virião (*budding*). Adaptado de Carter e Saunders (2007)

1.4. Vetores retrovirais

Existe um vasto conhecimento acerca da biologia dos retrovírus, fruto de vários anos de investigação. Nas últimas décadas, têm sido desenvolvidos muitos estudos focados na aplicação de vetores retrovirais em terapia génica (Dalba et al., 2007). A terapia génica é uma forma de medicina molecular com grande potencial para a criação de novos tratamentos para um elevado número de doenças (Verma e Weitzman, 2005). Esta terapia inovadora recorre à introdução de uma sequência genética em células alvo, de modo a promover a cura de uma doença ou a diminuir a sua progressão (Verma e Weitzman, 2005). Para atingir este objetivo, são necessárias tecnologias que permitam uma eficiente transferência de genes para uma grande variedade de células. Existem vários métodos químicos e físicos para a introdução de material genético nas células animais, no entanto um dos métodos mais eficientes recorre à utilização de vetores virais. Entre os vários vetores virais disponíveis, os vetores retrovirais são dos mais utilizados (Figura 1.5) (Verma e Weitzman, 2005). Os primeiros vetores retrovirais para estudos de terapia génica começaram a ser desenvolvidos no início da década de 1980, no entanto cerca de uma década antes já era claro que os vírus possuíam características favoráveis à sua utilização em transferência génica (Goncalves, 2005). Contrariamente aos métodos de transfeção química que utilizam moléculas de DNA complexadas com outros compostos de modo a facilitar a sua introdução na célula, a transdução providenciada pelos vetores virais permite um maior controlo no número de cópias do transgene inserido no interior das células. Em particular, no caso dos vetores retrovirais, estes permitem a estável integração do transgene no genoma celular.

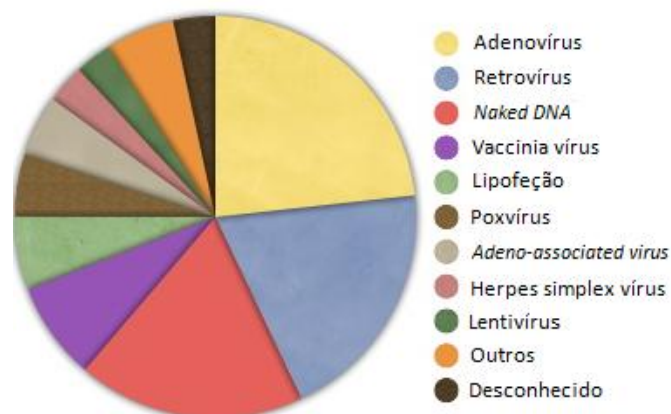


Figura 1.5: Vetores de terapia génica utilizados em ensaios clínicos. Adaptado de (<http://www.wiley.com/legacy/wileychi/genmed/clinical/>).

A utilização de vetores retrovirais para terapia génica implica a inserção do gene terapêutico (transgene) no genoma viral, de modo a que este possa ser introduzido nas células alvo. No entanto, a replicação do vírus na célula e a sua propagação às células vizinhas é geralmente indesejável, salvo em

alguns casos de terapias direcionadas para a eliminação de células cancerígenas. Diminuir o risco de replicação viral foi um dos principais objetivos dos cientistas que desenvolveram os primeiros vetores retrovirais. Para atingir este objetivo foi necessário eliminar a expressão de genes virais essenciais para a replicação viral, criando deste modo vetores retrovirais replicativamente defetivos (RDR, do inglês: *replication-defective retroviral vectors*), incapazes de se propagar célula a célula (Cepko et al., 1984; Stuhlmann et al., 1984).

Para diminuir a possibilidade do aparecimento de vetores retrovirais replicativamente competentes (RCR, do inglês: *replication-competent retroviral vectors*) através de eventos de recombinação, o genoma viral foi separado fisicamente em diferentes unidades de expressão.

O genoma dos vetores RDR consiste então no próprio genoma retroviral, em que as sequências codificantes das proteínas virais foram removidas, ficando disponíveis cerca de 8 Kb para um transgene de interesse, permanecendo apenas as sequências *cis-acting* a flanquear o transgene e que permitem a sua transcrição reversa, integração no genoma celular e expressão (Fig. 1.6) (Miller e Rosman, 1989; Verma e Weitzman, 2005; Carter e Saunders, 2007). Deste modo, para a produção dos vetores retrovirais é necessário a co-expressão dos restantes componentes virais essenciais à formação de partículas virais infecciosas. Assim foram desenvolvidas *packaging cell lines* que expressam proteínas estruturais e enzimas virais onde após a introdução da *cassette* com o transgene (genoma do vetor retroviral) originam vetores retrovirais infecciosos não replicativos. (Miller e Rosman, 1989; Verma e Weitzman, 2005). O desenvolvimento destas linhas celulares tem sofrido alterações, tendo-se originado várias gerações de *packaging cell lines*. Cada geração tem como objetivo a produção de vetores mais seguros em relação à geração anterior. A primeira geração de *packaging cell lines* foi estabelecida fornecendo as funções de empacotamento (*gag-pro-pol*) através de um genoma retroviral ao qual foi deletado o sinal de empacotamento, de modo a prevenir o seu empacotamento na partícula viral. Contudo, basta apenas um evento de recombinação homóloga para restabelecer a formação de vetores com capacidade replicativa (Cone e Mulligan, 1984). Na segunda geração de *packaging cell lines*, o LTR 3' e o local de iniciação da segunda cadeia foram substituídos pelo local de poliadenilação do SV40 (Miller e Buttimore, 1986). Na terceira geração desenvolveram-se *cassettes* de expressão que permitem a expressão de *gag-pol e env* de uma forma independente. Neste caso o aumento do número de *cassettes* de expressão com os componentes virais requer um aumento do número de recombinações entre as mesmas *cassettes* necessárias à produção de vetores replicativos (Palu et al., 2000).

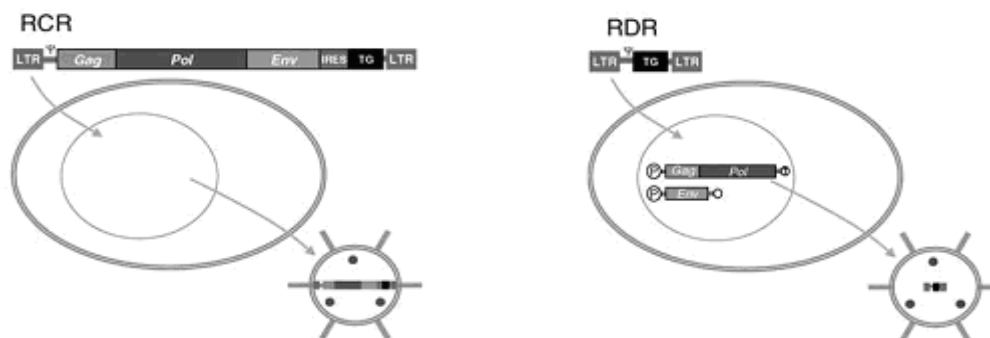


Fig. 1.6: Representação esquemática da produção de retrovírus replicativamente competentes (RCR) e de retrovírus replicativamente defetivos (RDR). A transfeção de células com genoma de vetores RCR resulta na libertação de partículas virais infecciosas e replicativamente competentes. Enquanto que, a transfeção de células com genoma de vetores RDR resulta na libertação de partículas virais infecciosas não replicativas que transportam apenas o transgene. Adaptado de Dalba et al (2007).

A separação dos componentes retrovirais em diferentes *cassettes* de expressão permitiu a produção de VLPs, onde as células produtoras apenas possuem os componentes *gag-pol* e *env*, possibilitando novas aplicações para além da terapia génica, nomeadamente a criação de vacinas baseadas em VLPs.

1.4.1. Partículas semelhantes a retrovírus (rVLPs)

A utilização de VLPs derivadas de retrovírus apresenta inúmeras vantagens, uma vez que estes vírus possuem um genoma bem estudado e portanto acessível à engenharia genética, uma imunogenicidade relativamente baixa comparada com outros vetores virais e a capacidade única de incorporar proteínas de envelope de uma vasta gama de vírus heterólogos, permitindo a apresentação de antígenos heterólogos e fornecendo um meio de reconhecimento e ligação a células específicas (Dalba et al., 2007).

Para a criação de rVLPs a utilização de retrovírus simples apresenta algumas vantagens em relação à utilização de retrovírus complexos, sendo por isso o MLV um dos vírus mais utilizado. A expressão celular da proteína Gag de MLV é suficiente para gerar partículas virais (Andrawiss et al., 2003) e a expressão adicional de uma proteína Env permite gerar partículas infecciosas sem capacidade de replicação uma vez que não possuem genoma viral (Sandrin et al., 2004).

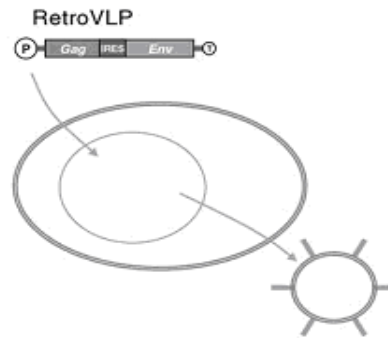


Figura 1.7. Representação esquemática da produção de uma rVLP. A transfecção celular com uma *cassette* de expressão contendo os genes estruturais gag e env permite a produção de partículas virais infecciosas, não replicativas e sem genoma. Adaptado de Dalba et al (2007).

A capacidade que os retrovírus possuem de integrar proteínas heterólogas nos seus envelopes lipídicos é denominada de *pseudotyping*. No desenvolvimento de vacinas o *pseudotyping* desempenha duas importantes funções: a de apresentar um determinado antígeno de interesse de forma ordenada e a de permitir ou aumentar a captura do vetor pelas células apresentadoras de antígenos (Dalba et al., 2007).

Uma grande variedade de proteínas tem sido incorporada com sucesso em partículas virais. Um dos casos para o qual existem muitos estudos e que apresenta relevância para este trabalho é a incorporação dos epítopos do HCV (E1 e E2). Vários estudos têm sido desenvolvidos com partículas virais pseudotipadas com o envelope do HCV. Estes estudos têm contribuído para a compreensão do mecanismo de infecção do vírus, como é o caso do trabalho descrito por Bartosch et al (2003), no qual através da utilização de partículas virais pseudotipadas foi demonstrada a possibilidade das proteínas LDLR e CD81 serem suficientes para mediar a entrada do vírus na célula hospedeira. As partículas virais pseudotipadas com o E1 e E2 são, não só, uma importante ferramenta na compreensão do mecanismo de infecção do HCV, como têm sido estudadas para possível aplicação como vacina. Um exemplo recente de estudos com esse objetivo é o de Garrone et al (2011) no qual é reportado que VLPs pseudotipadas com E1 e E2 induzem elevados títulos de anticorpos anti-E1 e anti-E2, bem como de anticorpos neutralizantes, em ratinho e em macaco. Outro exemplo é o estudo de Huret et al (2012), no qual é reportado que a imunização com DNA plasmídico que codifica rVLPs pseudotipadas com E1 e E2 (plasma rVLPs) induz uma forte resposta imunitária mediada por células T. Uma vez que os dados demonstram que as rVLPs pseudotipadas com E1 e E2 são eficientes na estimulação da resposta imune, pretende-se neste trabalho criar uma linha celular produtora de rVLPs pseudotipadas com as proteínas de envelope do HCV.

Durante a sua formação, os retrovírus incorporam, para além do envelope pseudotipado, proteínas das células onde são produzidos, uma vez que adquirem a sua membrana lipídica e como tal as suas proteínas. Um exemplo de uma proteína celular incorporada em VLPs de MLV é a CD63

(Segura et al., 2008). A CD63 é uma proteína pertencente à família das tetraspaninas, uma família de proteínas associadas à superfície de membrana. Esta proteína é ubiquamente expressa e localiza-se em endossomas e na superfície celular (Pols e Klumperman, 2009).

Existindo a possibilidade das proteínas celulares incorporadas pelas VLPs desencadear uma resposta imunológica indesejada, é importante e interessante avaliar a imunogenicidade das partículas virais na ausência destas proteínas. Um exemplo de um trabalho realizado com este objetivo foi o silenciamento da tetraspanina CD81 (Rodrigues et al., 2011), que é uma proteína igualmente incorporada em elevadas concentrações em rVLPs e que foi silenciada através da técnica de RNA de interferência (RNAi) nas células produtoras de rVLPs, de modo a impedir a incorporação desta nas partículas virais.

Como tal, neste trabalho pretende-se silenciar a proteína CD63, de modo a produzir rVLPs sem incorporação de CD63, recorrendo igualmente ao silenciamento por RNAi.

1.5. Metodologias

1.5.1. Sistemas de troca de *cassette* (RMCE)

Para realizar o *pseudotyping* das rVLPs é necessário proceder à inserção do gene *env* no genoma celular. As técnicas para a introdução de DNA em células de mamífero já estão bem estabelecidas. No entanto, a expressão dos genes transfetados é largamente influenciada pela natureza do local onde ocorreu a sua integração (Schucht et al., 2006). Como tal, é importante que a inserção do DNA transfetado no genoma ocorra num local que permita uma elevada expressão. Para tal, neste trabalho recorreu-se a um mecanismo de troca de *cassette* que permite selecionar um local de boa expressão e em seguida, por recombinação, inserir nesse local um gene de interesse. Adicionalmente, esta metodologia permite rapidamente expressar e estudar uma proteína de interesse

Na natureza existem sistemas de recombinação heteróloga que permitem a recombinação específica entre determinadas sequências. Alguns destes são hoje em dia utilizados como ferramentas em engenharia genética. Os mais utilizados em estudos com células de mamífero são o sistema Flp/FRT, existente na levedura *Saccharomyces cerevisiae* (O'Gorman et al., 1991), e o sistema Cre/loxP do bacteriófago P1 (Hoess et al., 1982). Em ambos, as enzimas Flipase e Cre recombinase reconhecem sequências específicas, FRT (do inglês, *flipase recombinase target sites*) e loxP, respetivamente. Estas enzimas promovem um processo de recombinação entre as respetivas sequências, genericamente designadas de RTs (do inglês, *recombination target sites*).

Os processos de recombinação específica referidos têm sido utilizados para introduzir *cassettes* de expressão em regiões pré-definidas do genoma celular. A reação de recombinação específica que implica a troca de uma *cassette* por outra é denominada por troca de *cassette* mediada

por recombinase, RMCE (do inglês, *recombinase-mediated cassette exchange*) e envolve dois passos. O primeiro, designado de “*tagging*”, consiste na introdução de uma *cassette* flanqueada por duas sequências RT heteroespecíficas incompatíveis no genoma celular. Este processo de integração no genoma celular ocorre de uma forma aleatória (Sauer, 2002). Posteriormente é efetuado o “*targeting*” que consiste na troca da *cassette* por outra flanqueada pelas mesmas sequências RT heteroespecíficas, sendo este processo mediado por uma recombinase (Wirth et al., 2007).

1.5.1.1. Cre-RMCE

O sistema de recombinação de locais específicos Cre-lox tem sido aplicado numa grande variedade de sistemas tendo-se tornado uma importante ferramenta na manipulação precisa do genoma (Langer et al., 2002; Sauer, 2002). A Cre recombinase é uma proteína do bacteriófago P1 que catalisa a recombinação recíproca de locais específicos de DNA denominados locais lox, sendo uma recombinase particularmente potente em eucariontes (Langer et al., 2002; Sauer, 2002). A forma canónica do local lox, loxP, é composta por 34 bp que se dividem em dois grupos de sequências repetidas inversas (braços palindrômicos) de 13 bp que são separadas por uma região assimétrica, região espaçadora de 8 bp (Fig.1.8).



Figura 1.8. Local Lox P, sendo as regiões palindrômicas representadas pelas setas e a região espaçadora entre as setas. Adaptado de Langer et al (2002).

Cada sequência invertida de 13 bp serve de local de ligação para a recombinase, enquanto a região espaçadora participa na troca durante a reação de recombinação. Uma vez que um evento de recombinação requer o emparelhamento dos locais lox entre as suas regiões espaçadoras, é a assimetria da região espaçadora que confere a direção à reação de recombinação. Análise de mutações dos locais loxP revelou duas classes de mutações que podem alterar a direção e a especificidade da recombinação. A primeira classe consiste em mutações dentro da região espaçadora. Para que o evento de recombinação seja eficiente é necessário que haja homologia entre as regiões espaçadoras (Langer et al., 2002). Locais lox em que a sua região espaçadora difira num único nucleótido possui uma dramática redução de eficiência de recombinação, mas continua a possuir a capacidade de recombinação com locais lox homólogos (Hoess et al., 1986) (Fig. 1.9A). A região espaçadora não confere apenas direção à reação de recombinação, confere igualmente especificidade uma vez que apenas permite a reação entre locais homólogos. A incapacidade de recombinação com locais lox que

não possuam homologia das regiões espaçadoras é denominada de incompatibilidade (Langer et al., 2002).

A segunda classe de mutações consiste em mutações nos braços palindrômicos, o que diminui a afinidade da recombinase para estes locais lox. A recombinação entre locais lox que possuem mutações nos braços palindrômicos, geram locais lox com braços sem mutação e locais lox duplamente mutados (Albert et al., 1995), devido à dupla mutação os locais lox deixam de ser reconhecidos pela recombinase. As mutações nos braços palindrômicos conferem unidirecionalidade à reação de recombinação (Fig. 9). Os locais lox que possuem os braços mutados têm sido utilizados como alvo para a integração de DNA plasmídico em plantas e em mamíferos (Albert et al., 1995; Araki et al, 1997).

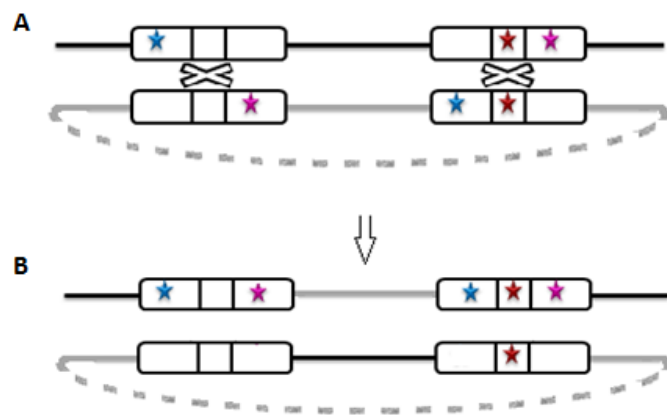


Figura 1.9. Representação esquemática da recombinação entre locais lox mutados. As mutações na região espaçadora são representadas por uma estrela vermelha e as mutações nos braços palindrômicos por estrelas azuis e rosas. Para que ocorra recombinação é necessário que haja homologia total entre as regiões espaçadoras. As regiões palindrômicas não necessitam de ser totalmente homólogas podendo ocorrer recombinação entre regiões mutadas e não mutadas (A). Esta recombinação origina locais lox duplamente mutados inibindo a posterior recombinação (B).

1.5.1.2. Flp-RMCE

Através do sistema de recombinação Flp/FRT é possível, igualmente ao descrito para a RMCE mediada pela enzima Cre, promover a recombinação entre locais FRT em cultura de células de mamífero (Schlake e Bode 1994).

Embora o sistema de recombinação Flp/FRT seja uma ferramenta importante que pode ser aplicada em diferentes organismos como a *Drosophila* (Parks et al., 2004; Theodosiou e Xu, 1998) e as plantas (Lloyd e Davis, 1994; Lyznik et al., 1996; Radhakrishnan e Srivastava, 2005), inicialmente a aplicação deste sistema em mamíferos era limitada pela sua baixa eficiência a 37°C. Para aumentar a eficiência da enzima acima dos 30°C foram introduzidas mutações pontuais obtendo-se a variante

Flpe. Esta variante possui quatro mutações pontuais e possui aproximadamente cinco vezes mais atividade em células de mamífero do que a enzima nativa (Turan et al., 2011).

Estes sistemas de RMCE foram utilizados neste trabalho para inserir os genes do envelope de HCV nas rVLPs.

1.5.2. Mecanismo de RNA de interferência (RNAi)

O RNA de interferência é um processo de silenciamento de sequências específicas de genes que ocorre a nível pós-transcricional. O RNAi é um mecanismo antigo e altamente conservado que tem como objetivo defender o genoma contra vírus e transposões. As moléculas efetoras do RNAi são pequenas (21-28 nucleótidos) e de cadeia dupla de RNA (dsRNA, do inglês: *double-stranded RNA*). Estes pequenos RNAs de interferência (siRNAs, do inglês: *small interfering RNAs*) são processados por uma ribonuclease denominada Dicer, sendo em seguida incorporados no complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC, do inglês: *RNA-induced silencing RNA*) (Sandy et al., 2005). Posteriormente, a proteína multifuncional Argonata 2 desemparelha as cadeias de siRNA e degrada a cadeia sense. O RISC ativo, que contém a cadeia antisense, seleciona e degrada o RNA mensageiro que é complementar a esta cadeia, inibindo deste modo a expressão da proteína (Fig. 1.10) (Whitehead et al., 2009).

Cadeias longas de dsRNA (500 bp ou mais) induzem um elevado e altamente específico silenciamento de genes em *C. elegans* e *D. melanogaster*. No entanto, em células de mamífero dsRNAs do mesmo tamanho ativam a via do interferão, uma via desencadeada normalmente pelo sistema imunitário como defesa contra infecções virais, resultando na inibição da síntese proteica (Leung e Whittaker, 2005; Sandy et al., 2005). Contudo, demonstrou-se que pequenos dsRNAs sintéticos (<30bp) desencadeiam o silenciamento de sequências específicas de genes sem ativar a via do interferão e que a expressão de pequenos siRNAs na forma de *short hairpin RNA* (shRNA), induz o silenciamento de genes alvo em células de mamífero (Mittal, 2004; Sandy et al., 2005).

Os shRNAs, ao contrário dos siRNAs, são sintetizados no núcleo pela RNA polimerase II ou III. O transcrito primário gerado pela polimerase possui uma estrutura em loop, que é processada por um complexo que possui uma RNase III denominada Drosha. Posteriormente, são transportados para o citoplasma onde são incorporados no RISC desencadeando o normal processo de silenciamento (Rao et al., 2009).

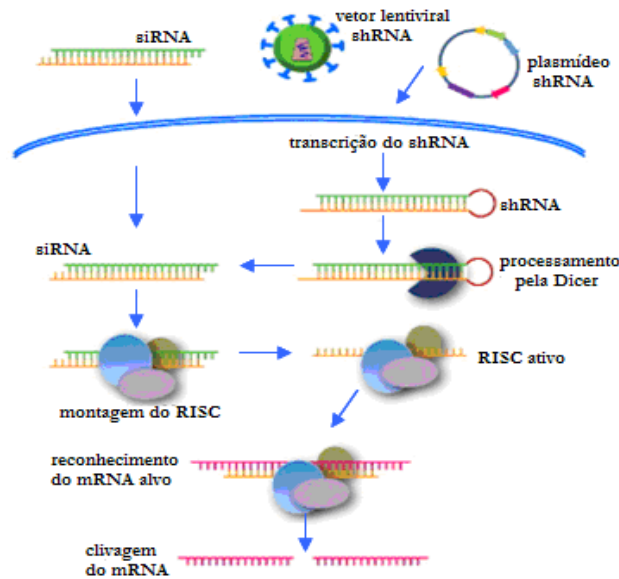


Figura 1.10. Representação esquemática do mecanismo de RNAi. Adaptado de Kim et al (2009)

A escolha da molécula alvo (siRNA ou shRNA) em experiências de RNAi em células de mamífero deve ter em consideração o tipo de células (facilidade de transfeção celular) e o tipo de silenciamento pretendido (transiente ou estável). Quando o objetivo é um silenciamento estável é mais apropriado a utilização de um shRNA expresso a partir de um plasmídeo ou em caso de células difíceis de transetar a partir de vetores baseados em lentivírus ou retrovírus (Sandy et al., 2005).

1.6. Objetivos deste trabalho:

I – Silenciamento da tetraspanina CD63 em células produtoras de rVLPs pela transdução com lentivírus que codificam shRNAs, através da técnica de RNAi. Uma vez que os retrovírus possuem a capacidade de incorporar proteínas do hospedeiro na sua membrana e que estas podem interferir na resposta imunológica é de todo o interesse avaliar o potencial imunológico das rVLPs com e sem a proteína CD63. Como tal, este silenciamento tem como objetivo produzir rVLPs que não possuam CD63 na sua membrana para uma posterior avaliação do seu potencial imunológico.

II – Desenvolvimento de uma linha celular produtora de rVLPs pseudotipadas com as glicoproteínas de envelope do vírus do HCV, através do sistema de recombinação de troca de *cassette* (RMCE), de modo a obter uma elevada expressão do gene dos epítomos do HCV e de modo a obter um sistema flexível em que rapidamente se pode modificar os epítomos do HCV que se pretendem estudar. Para tal tem-se como primeiro objetivo a obtenção de clones de elevada expressão e com cópia única do plasmídeo *tagging* para realizar posterior troca de *cassette*, obtendo-se deste modo rVLPs com envelope do vírus do HCV.

2. Materiais e métodos

2.1. Cultura, manutenção e propagação de células animais

As células utilizadas na realização deste trabalho armazenam-se congeladas a -85°C. O seu congelamento foi efetuado em CryoTubes™ de 1,5 ml (Nunc, Langensfeld, Alemanha), numa solução de FBS (do Inglês: *Fetal Bovine Serum*, Gibco, Paisley, Reino Unido) com 10% de DMSO (do inglês: *Dimethyl sulfoxide*; Sigma-Aldrich, Missouri, EUA).

Para proceder à cultura das células descongelaram-se as alíquotas em água a 37°C para um *T-Flask* (BD Falcon™, Erembodegem, Bélgica) com DMEM (do Inglês: *Dulbecco's Modified Eagle Medium*, Gibco) suplementado com 10% (v/v) de FBS (referido a partir deste ponto por meio de cultura) previamente aquecido a 37°C. Ao fim de 3 horas de incubação a 37°C com atmosfera húmida com 7% de CO₂ trocou-se o meio de cultura, uma vez que o DMSO é tóxico para as células à temperatura ambiente. Nas condições referidas, as células multiplicaram-se formando uma monocamada. Quando as células atingiram cerca de 90% da superfície do *T-Flask* (90% de confluência), o meio foi aspirado e a monocamada lavada com DPBS (do Inglês: *Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline*, Gibco) sem cloreto de magnésio e sem cloreto de cálcio. Em seguida, adicionou-se tripsina (Gibco) de modo a dissociar as células da superfície do *T-Flask*. Estando as células em suspensão foi adicionado meio de cultura para inibir a ação da tripsina e diluir as células. Dependendo da diluição desejada, utilizou-se um determinado volume da suspensão celular para inocular um novo *T-Flask* contendo meio de cultura. Quando as células atingiram os 90% de confluência, foram novamente diluídas.

Todos os procedimentos realizados com células animais foram efetuados em condições estéreis em câmaras de fluxo laminar Nuair (tipo II), utilizando material estéril descartável ou autoclavado por um período de 30 minutos à temperatura de 121°C e à pressão de 1,2 bar.

2.2. Determinação da concentração e viabilidade celular

A concentração e viabilidade celular foram determinadas através do método de exclusão do azul de tripano (Merck, Darmstadt, Alemanha), utilizando uma solução a 0,1% (v/v) em PBS. A contagem de células foi realizada por observação direta ao microscópio óptico de contraste de fase (Olympus, Tokyo, Japão), utilizando um hemocitómetro (Brand, Wertheim, Alemanha).

I – Silenciamento da tetraspanina CD63

2.3. Linhas celulares e meios de cultura

As células 293CeB25 são uma linha celular produtora de partículas semelhantes a retrovírus (rVLPs). Esta linha celular foi estabelecida a partir da linha celular 293 HEK (ATCC CRL-1573), através de transfeção estável do plasmídeo pCeB que leva à expressão de Gag-pol do vírus da leucemia murina (MLV, do Inglês: *Murine Leukemia Virus*), tal como descrito em Cosset et al. (1995).

As células 293CeB25siCD81 são células silenciadas para a tetraspanina CD81, estabelecidas a partir da linha celular 293CeB25, tal como descrito em Rodrigues et al. (2011). As duas linhas celulares foram cultivadas em monocamada aderente, a 37°C e atmosfera húmida com 7% de CO₂, utilizando meio de cultura. Para o caso das células 293CeB25siCD81, o meio de cultura foi suplementado com 1,5 µg/mL de Puomicina (InvivoGen, San Diego, Califórnia, EUA).

2.4. Transdução celular e seleção

Para o estabelecimento das populações silenciadas para a tetraspanina CD63, recorreu-se à metodologia do RNA de interferência. Para tal utilizaram-se vetores lentivirais que codificam um gene de resistência à neomicina (*neo*) e cinco sequências diferentes de *short hairpin* RNAs (shRNA) direcionados para o gene da CD63 humana e uma sequência de shRNA que não tem nenhum gene humano como alvo (controlo negativo de silenciamento). Os plasmídeos que codificam estes vetores foram adquiridos na Sigma-Aldrich (Mission® RNAi). As sequências de shRNA utilizadas provêm da biblioteca de shRNAs do consórcio de RNAi (TRC, do inglês: *The RNAi Consortium*, Broad Institute, Cambridge, EUA) e foram denominadas de TRC49 a TRC53 e TRCnt (Anexo I). Os diferentes lentivírus foram produzidos pela co-transfecção transiente de células HEK293T com os plasmídeos shRNA, psPAX2 e pMD2.G (repositório de plasmídeos Adgene). Estes últimos contêm as funções de empacotamento e de envelope, respetivamente.

A transdução foi realizada em placas de 6 poços (Nunc) com células 293CeB25 e 293CeB25siCD81 a uma concentração de 1×10^5 células/cm². 24 horas após a inoculação, substituiu-se o meio de cultura por 600 µl de sobrenadante lentiviral diluído em meio de cultura contendo 8,0 µg/mL de polibreno (Sigma-Aldrich).

Realizaram-se duas transduções distintas com lentivírus. Na primeira transdução as células foram infetadas separadamente com lentivírus que codificam cada sequência, sendo estes diluídos de modo a obter três multiplicidades de infeção (MOI, do inglês: *multiplicity of infection*) diferentes: 0,1; 0,5 e 1.

Na segunda transdução foram realizadas infecções em simultâneo com os lentivírus que codificam cada sequência, segundo três condições distintas. Condição 1, infecção com lentivírus que codificam as sequências TRC51, TRC52 e TRC53 sendo estes diluídos de modo a obter uma multiplicidade de infecção de 0,1. Condição 2, infecção com lentivírus que codificam as sequências TRC49, TRC50, TRC51 e TRC53 com uma MOI de 0,1. Condição 3, infecção com lentivírus que codificam as 5 sequências, sendo estes diluídos de modo a obter uma MOI de 0,5.

48 horas após a infecção, as células foram colocadas sob pressão seletiva em meio contendo 1mg/mL de G418 (InvivoGen), cuja resistência é conferida pelo gene *neo* presente nos plasmídeos que codificam os shRNAs. As células foram sujeitas a seleção durante 21 dias, substituindo-se o meio de cultura a cada 3 dias.

2.5. Detecção de CD63

2.5.1. Western Blot

A proteína CD63 foi detetada por Western Blot em extratos celulares após separação por electroforese em gel de poliacrilamida a 4-12% (m/v) (*NuPAGE® Novex® Bis-Tris Mini Gels*, Invitrogen, Paisley, Reino Unido) com tampão de corrida MOPS (*NuPAGE® MOPS SDS Running Buffer*, Invitrogen). Cada poço foi carregado com igual quantidade de proteína (26 µg/poço) e as amostras correram durante 60 minutos a uma voltagem constante de 150 V, tendo sido posteriormente transferidas, durante 100 minutos, para uma membrana de nitrocelulose (GE Healthcare, Little Chalfont, Reino Unido). As membranas foram incubadas com o anticorpo primário anti-CD63 (Millipore, Billerica, Massachusetts, EUA) diluído 1:1000, lavadas e incubadas posteriormente com o respetivo anticorpo secundário conjugado com a fosfatase alcalina (diluição 1:1000). A revelação foi efetuada com o reagente NBT/B-CIP (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA).

2.5.2. Citometria de fluxo

A citometria de fluxo foi utilizada para a deteção da proteína CD63 na membrana celular. Para tal incubaram-se as células (1×10^6 células) durante 30 minutos com anticorpo anti-CD63 diluído em PBS com 2% (v/v) de FBS, obtendo uma concentração final 0,02 µg/µL de anti-CD63. Posteriormente incubou-se igualmente durante 30 minutos com o anticorpo secundário Alexa Fluor (*Alexa Fluor® 488 goat anti-mouse IgG*, Invitrogen) que possui um marcador fluorescente. Em seguida as células foram analisadas no citómetro de fluxo *CyFlow-space* (Partec) de modo a determinar a percentagem de células fluorescentes, *i.e.* a percentagem de células que expressam a CD63 na sua superfície. Foram

adquiridos 10 mil eventos por amostra usando os parâmetros adequados, de modo a excluir células mortas, restos celulares e agregados.

2.6. Isolamento das células silenciadas para a CD63

Uma vez que as diferentes estratégias de silenciamento originaram populações celulares contendo, no melhor caso, apenas 30% de células silenciadas para a CD63, optou-se pelo isolamento destas. Para tal, procedeu-se a uma separação magnética utilizando as esferas *Dynabeads® sheep anti-Mouse IgG* (Invitrogen), de acordo com as instruções do fabricante. As células foram incubadas com o anticorpo anti-CD63 e em seguida foram incubadas com esferas magnéticas que possuem anticorpos IgG anti-mouse acoplados à superfície. Deste modo, as células que possuem CD63 ficam acopladas às esferas magnéticas e as células sem CD63 ficam em suspensão. Posteriormente, a mistura foi colocada sob um campo magnético forte (num íman), as células acopladas às esferas são atraídas pelo íman, permitindo assim recuperar a solução contendo as células silenciadas para a CD63.

II – Construção de um sistema de troca de *cassette* para os epítomos do vírus da hepatite C.

2.7. Linhas celulares e meios de cultura

As células 293#3 gp11 e 293#3 gp22 (denominadas a partir deste ponto de 293CeB11 e 293CeB22) derivam da linha celular 293 HEK, são produtoras de rVLPs de MLV e possuem um sistema de troca de *cassette* para o transgene mediado pela enzima recombinase Flipase, estabelecidas como descrito em Coroadinha *et al.* (2006).

2.8. Plasmídeos

O plasmídeo pTagLoxP_eGFPZeo (tagging) (Anexo III) possui uma *cassette* de expressão flanqueada por duas regiões loxP que irão permitir o funcionamento do sistema de recombinação de troca de *cassette* mediado pela enzima Cre recombinase. Este plasmídeo resulta da inserção da sequência GFPZeo, amplificada por PCR a partir do plasmídeo comercial pSELECT-GFPZeo-LacZ (InvivoGen), no plasmídeo pTagLoxP-mcs desenhado pela Doutora Ana Coroadinha e sintetizado pela GENEART (Alemanha) (Anexo II).

O plasmídeo pTarLoxP-mcs (Anexo IV) foi desenhado no âmbito deste trabalho e sintetizado pela GenScript (EUA). Este plasmídeo contém uma *cassette* de expressão flanqueada por regiões LoXP que irão permitir a troca de *cassette* com o plasmídeo pTagLoxP_eGFPZeo. Nesta *cassette* foi inserida a sequência do E1 e E2 (epítomos do vírus da hepatite C) amplificada a partir do plasmídeo

pEPX 145-71 (EPIXIS) (Anexo IV) originando o plasmídeo pTarLoxP-E1E2 (targeting) (AnexoV) utilizado para a troca de *cassette* mediada pela Cre recombinase (Anexo III). Para expressão da enzima Cre recombinase utilizou-se o plasmídeo pZeoCre (cedido por Dr. Eric Kramer, IGMM, Montpellier, França)

O plasmídeo pTAR_IRESmcs, construído no laboratório a partir do plasmídeo pIRESGALEO (Coroadinha et al., 2006) contém uma *cassette* de expressão flanqueada por regiões FRT que permitem a troca de *cassette* mediada pela enzima Flipase. Nesta *cassette* foi igualmente inserida a sequência dos epítomos do vírus da hepatite C amplificada a partir do plasmídeo pEPX 145-71 (EPIXIS), originando o plasmídeo pTAR-E1E2 que foi utilizado para realizar troca de *cassette* com a Flipase (Anexo VI). Para expressão da enzima Flipase utilizou-se o plasmídeo pSVFlpe (Coroadinha et al. 2006)

O plasmídeo pSP72-dpuro resulta da inserção da sequência da delta Puromicina (dpuro), amplificada a partir do plasmídeo pTagLoxP-mcs, no local múltiplo de clonagem do plasmídeo pSP72 que possui a sequência do promotor bacteriano T7 (Anexo VII).

2.9. Construção de plasmídeos

2.9.1. Amplificação de sequências (insertos)

As sequências foram amplificadas por PCR (*Polimerase Chain Reaction*) utilizando os *primers* representados na tabela 2.1. Os *primers forward* (FW) e *reverse* (RV) utilizados nestas reações possuem na extremidade 5` uma sequência reconhecida por uma enzima de restrição, estas sequências estão também presentes nos plasmídeos onde se pretende inserir as sequências amplificadas. As enzimas de restrição escolhidas efetuam apenas uma restrição no vetor e uma restrição nas extremidades das sequências amplificadas de modo a originarem apenas o produto pretendido. Cada *primer* possui uma sequência reconhecida por uma enzima de restrição diferente, permitindo assim assegurar a inserção da sequência amplificada na orientação correta.

As reações de amplificação foram realizadas com a DNA polimerase *Phusion* (Finnzymes, Finlândia), de acordo com as indicações do fabricante. Os *primers* utilizados para a amplificação foram sintetizados pela Sigma-Aldrich.

Tabela 2.1: *Primers* utilizados para amplificação dos insertos e respectivas enzimas de restrição.

Plasmídeos	Inserto	<i>Primers</i>	Enzimas de Restrição	Vetores	Plasmídeos obtidos
pSELECT-GFPZeo-LacZ	GFPZeo	FW 5'CTGAATGCGTAAAATA CAGCATAGCAAAACTT 3' RV 5'TAGATATCGCTCACAT GTTCTTAATTAACCTG 3'	EcoRV e BsmI	pTagLoxP-mcs	pTagLoxP_eGFPZeo
pEPX 145-71	E1E2	FW 5'TACCGCTTAAGTGACA TTGATTATTGACTAGCCCG3' RV 5'AGTAACGCATATGAGT GTGCTGGAATTCGCC 3'	AFLII e NdeI	pTAR_IRESmcs	pTAR-E1E2
pEPX 145-71	E1E2	FW 5'GGCTCTTAATTAACAT TACCGCCATGTTGACATTG3' RV 5'TAACGCCTAGGAGTG TGCTGGAATTGCC 3'	Pacl e AvrII	pTarLoxP-mcs	pTarLoxP-E1E2
pTagLoxP-mcs	dpuro	FW 5'CGTGAGTTGAATTCTC GTATAGCATACATTAT 3' RV 5'AAACGGATCCACAGAT GTAATGAAAATAAA 3'	BamHI e EcoRI	pSP72	pSP72-dpuro

2.9.2. Purificação dos insertos e vetores

Após a amplificação das sequências de interesse é necessário proceder à sua purificação. Para tal, em primeiro lugar, procedeu-se à separação do produto amplificado por PCR do plasmídeo que lhe deu origem, por eletroforese em gel de agarose.

O gel de agarose foi preparado a uma concentração de 0,7% (m/v) de agarose (*SeaKem® LE Agarose*, Lonza, Basel, Suíça) em TAE (Tris-Acetato-EDTA) 1x (40 mM Tris-Acetate, 1 mM EDTA) (Qiagen, Hilden, Alemanha).

Após a corrida das amostras no gel este foi incubado com uma solução de Gel Red (Biotium, California, EUA) que é um composto que se intercala no DNA permitindo a sua visualização quando exposto a luz UV. A sua visualização permite excisar do gel o pedaço de agarose com o produto de amplificação de peso molecular desejado. Após a excisão do pedaço de agarose este foi purificado através do *Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification kit* (GE Healthcare). De seguida, efetuaram-se as reações de restrição das sequências purificadas e dos vetores com as respetivas enzimas de restrição (Tabela 2.1). As reações de restrição ocorreram segundo as condições recomendadas pela NEB (New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, EUA). O produto das restrições foi novamente purificado com *Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification kit*.

2.9.3. Desfosforilação e Ligação

Após a restrição procedeu-se à desfosforilação de um dos componentes da ligação (vetor ou inserto) com a enzima *Antarctic Phosphatase* (NEB), durante 1 hora a 37°C. Esta enzima catalisa a

remoção do grupo fosfato no terminal 5', o que impede a re-ligação do fragmento desfosforilado. A desfosforilação foi efetuada no fragmento que possui o gene de resistência ao antibiótico de modo a evitar falsos positivos.

Após a desfosforilação os vetores e os insertos amplificados foram submetidos a uma reação de ligação promovida pela enzima *T4 DNA Ligase* (NEB), segundo as recomendações do fabricante.

2.9.4. Produção de plasmídeos

Para a obtenção dos plasmídeos anteriormente referidos, procedeu-se à transformação de bactérias competentes (*Library Efficiency DH5α Competent Cells*, Invitrogen) com mistura de ligação. Em seguida as bactérias foram plaqueadas em meio sólido LB (do Inglês: *Luria Bertani*, Fast-Media® Amp LB, InvivoGen) suplementado com o respetivo antibiótico e incubou-se a 37°C durante cerca de 16 horas. Após o aparecimento de colónias, estas foram inoculadas em 200 ml de meio líquido TB (do Inglês: *Terrific Broth*, Fast-Media® Amp TB, InvivoGen) igualmente com o respetivo antibiótico ficando a 37°C durante 16 horas, com uma agitação de 200 rpm. Quando a suspensão celular atingiu uma densidade óptica entre 4 e 8, as células foram recolhidas por centrifugação e o plasmídeo produzido foi extraído e purificado utilizando o sistema *Genopure Plasmid maxi kit* (Roche, Basel, Alemanha).

2.10. Quantificação de ácidos nucleicos

Neste trabalho a quantificação de DNA e RNA foi realizada por espectrofotometria no Nanodrop (*Nanodrop 2000C Spectrophotometer*, Thermo Scientific, EUA). A pureza destes foi analisada através das razões Abs_{260nm}/Abs_{280nm} que deve ser no mínimo 1,8 para o DNA e de 2,0 para o RNA e a razão Abs_{260nm}/Abs_{230nm} que deve estar compreendida entre 2,0 e 2,2 aproximadamente.

2.11. Obtenção de clones com o sistema Cre RMCE

2.11.1. Transfeção

2.11.1.1. Método do fosfato de cálcio

Inocularam-se placas de 6 poços com células 293CeB11 e 293CeB22 a uma concentração de 4×10^5 células/poço que foram colocadas a 37°C na incubadora com atmosfera húmida com 7% de CO₂. No dia seguinte adicionou-se às células 300 µl da solução de transfeção preparada segundo as recomendações do kit *Calcium Phosphate Transfection Kit* (Sigma-Aldrich), tendo-se utilizado duas

concentrações de DNA (pTagLoxP_eGFPZeo) diferentes: 1µg DNA/10⁶ células e 2µg DNA/10⁶ células. Após 24 horas trocou-se o meio por meio suplementado com 200 µg/mL de Zeocina (InvivoGen), sujeitando assim as células a pressão seletiva.

2.11.1.2. Método de eletroporação

Para a eletroporação utilizou-se 4x10⁶ células num volume de 100 µL. As células foram eletroporadas com duas concentrações de DNA (pTagLoxP_eGFPZeo): 0,5µg DNA/10⁶ células e 1µg DNA/10⁶ células. A eletroporação foi realizada utilizando o sistema *Neon Transfection System* (Invitrogen). As condições da eletroporação (voltagem, número e duração dos pulsos elétricos) utilizadas foram as recomendadas pelo fabricante para as células 293 em transfeções com um volume de 100 µl. As células eletroporadas foram inoculadas num *T-flask* de 25 cm² com meio de cultura. Após 24 horas trocou-se o meio por meio suplementado com 200 µg/mL de Zeocina, sujeitando assim as células a pressão seletiva.

2.11.2. Isolamento de clones

Para a obtenção de clones realizou-se um *limiting dilution* que consiste na diluição das células de modo a obter uma célula isolada por poço e assim garantir que a colónia de células observada posteriormente deriva desta única célula e que, como tal, são geneticamente iguais (clones). O *limiting dilution* foi realizado em placas de 96 poços (Nunc) às quais foram adicionados 100 µl de meio de cultura condicionado (meio de cultura recolhido das células 293 CeB11 e CeB22 a uma confluência de aproximadamente 50%, que possui fatores de crescimento libertados por estas células). De seguida inocularam-se os poços com 100 µl de suspensão celular a uma concentração de 7,5 células/ml em DMEM suplementado com 20% (v/v) de FBS e com 100 µg/ml de Zeocina (InvivoGen). Nos poços em que se verificou o aparecimento de uma única colónia, quando esta atingiu um tamanho considerável foi recolhida e inoculada num poço de uma placa de 24 poços (Nunc) com 1 ml de meio de cultura suplementado com 200 µg/ml de Zeocina. À medida que as células cresciam foram sendo recolhidas e inoculadas em placas de 6 poços. Uma vez atingida a confluência de 90% procedeu-se ao congelamento das células a -85°C.

2.11.3. Citometria de fluxo

Dado que o plasmídeo transfetado (pTagLoxP_eGFPZeo) leva à expressão de GFP (do inglês *Green Fluorescent Protein*), a eficiência de transfeção das populações sujeitas a transfeção por CaPO₄ e por eletroporação e a intensidade de fluorescência dos clones resultantes do *limiting dilution* foi

determinada pela análise das células no citômetro de fluxo CyFlow-space (Partec). Foram adquiridos 10 mil eventos por amostra usando os parâmetros adequados, de modo a excluir células mortas, restos celulares e agregados.

2.11.4. Southern Blot

2.11.4.1 Extração de DNA genômico

O DNA genômico foi extraído de cada clone a partir do kit *QIAamp DNA Blood Midi Kit* (Qiagen), de acordo com as instruções do fabricante.

2.11.4.2 Síntese da sonda

Para a síntese da sonda amplificou-se por PCR a sequência T7dpuro (promotor T7 fundido com a sequência delta Puromicina) a partir do plasmídeo pSP72-dpuro descrito anteriormente. A marcação da sonda foi realizada através do kit *DIG RNA Labeling Kit (SP6/T7)* (Roche), segundo as instruções do fabricante. Após marcação, a sonda foi purificada através do kit *NucAway™ Spin Columns* (Ambion, Carlsbad, Califórnia, EUA) e quantificada no Nanodrop.

2.11.4.3 Transferência do DNA para membrana

O DNA genômico de cada clone foi digerido durante a noite com a enzima de restrição Sac I (NEB), sendo a reação preparada de acordo com as indicações do fabricante. Após a restrição o DNA foi separado por eletroforese em gel a 0,7% (m/v) de agarose em TAE 1x.

Posteriormente, o gel foi sujeito a lavagens para desnaturar o DNA e quebrar os fragmentos de tamanho superior a 10Kb e em seguida procedeu-se à montagem do sistema de transferência de modo a transferir o DNA do gel para a membrana de nylon carregada positivamente (Hybond™ $_N^+$, GE-Healthcare). A transferência ocorreu durante 12 a 14 horas e o procedimento decorreu de acordo com o recomendado pelo protocolo *DNA Analysis by Southern Blotting* (Qiagen-Bench Guide, 2001).

2.11.4.4. Hibridação e detecção da sonda

Após a transferência do DNA para a membrana procedeu-se á sua fixação, colocando a membrana a 80°C durante 2 horas. Posteriormente, procedeu-se à hibridação da membrana com a sonda a uma concentração de 1,5 ng/mL de tampão de hibridação PerfectHyb™ (Sigma-Aldrich) durante 12 a 14 horas a 65°C. Terminada a hibridação realizaram-se lavagens de restringência de

modo a eliminar hibridações inespecíficas. Estas decorreram de acordo com as recomendações do boletim técnico do tampão de hibridação.

Por fim, para detetar a hibridação da sonda à membrana, incubou-se a membrana com anticorpo *Anti-Digoxigenin-AP* (Roche Applied Sciences) conjugado com a fosfatase alcalina e em seguida adicionou-se o reagente *CDP-Star Detection Reagent* (GE-Healthcare), que permite a deteção quimioluminescente da fosfatase alcalina presente no anticorpo. A deteção foi realizada em câmara escura com chapas Amersham Hyperfilm™ ECL (GE Healthcare) usando revelador e fixador usualmente utilizados para revelação de chapas de raio-X.

2.12. Troca de *cassette* (RMCE)

Selecionaram-se doze clones distintos para serem sujeitos a troca de *cassette*. Placas de 6 poços foram inoculadas com 5×10^5 células/poço. 24h após inoculação procedeu-se à transfeção pelo método do fosfato de cálcio utilizando o *Calcium Phosphate Transfection Kit*.

Para o sistema de troca de *cassette* mediado pela enzima Cre recombinase procedeu-se à co-transfeção com 4 µg de plasmídeo pTarLoxP-E1E2 e 12 µg de plasmídeo pZeoCre. Após 48h as células foram transferidas para placas de petri de 100 mm (BD Falcon™) e sujeitas a seleção com Puromicina à concentração de 1,5 µg/mL.

Para o sistema de troca de *cassette* mediado pela enzima Flipase procedeu-se à co-transfeção com 4 µg de plasmídeo pTAR-E1E2 e 12 µg de plasmídeo pSVFlpe. Após 48h as células foram transferidas para placas de petri de 100 mm e sujeitas a seleção com G418 à concentração de 1 mg/mL.

Após aproximadamente 15 dias de seleção as células sobreviventes cresceram em colónias isoladas procedendo-se à passagem destas para placa de 96 poços e em seguida amplificadas até se obter confluência suficiente para transfereir para um *T-flask* 25cm².

2.13. Validação da troca de *cassette*

2.13.1. Deteção da expressão de Lac Z

Para verificar se ocorreu uma eficiente troca de *cassette* procedeu-se à deteção da expressão de LacZ. Os clones foram fixados em placas de 96 poços e em seguida foi adicionado X-gal que é o substrato da enzima expressa pelo gene lacZ (β-galactosidade). Ao fim de 24h, as placas foram observadas ao microscópio óptico para detetar a presença de células azuis. O procedimento decorreu segundo o descrito em Sambrook e Russell (2001).

2.13.2. Western Blot

Igualmente para verificar se ocorreu uma eficiente troca de *cassette* procedeu-se à deteção das proteínas E1, E2 e β -galactosidade em extratos celulares dos clones resultantes da troca de *cassette*. Os extratos celulares foram preparados pela lise de 2×10^6 células com o reagente M-PER (*Mammalian Protein Extraction Reagent*) (Pierce, EUA).

Os extratos celulares foram separados por electroforese em gel de poliacrilamida a 4-12% (m/v) com tampão de corrida MOPS a 1X e transferidos para membrana de nitrocelulose, tal como descrito anteriormente para a deteção de CD63. A deteção das proteínas E1 e E2 foi realizada com anticorpos anti-E1 e anti-E2 (EPIXIS, França) e a deteção da β -galactosidade com o anticorpo anti- β -galactosidade (Molecular Probes, Invitrogen). Posteriormente incubaram-se as membranas com os respetivos anticorpos secundários conjugados com a fosfatase alcalina. Para revelar utilizou-se o reagente NBT/B-CIP.

3. Resultados

3.1. I – Silenciamento da tetraspanina CD63

Com o objetivo de estabelecer uma população de células produtoras de rVLPs que não possuam a proteína CD63 na sua membrana, procedeu-se ao silenciamento da expressão dessa proteína. O silenciamento foi efetuado na linha celular 293CeB25 que produz rVLPs de MLV e 293CeB25 siCD81 que produz igualmente rVLPs de MLV, mas sem a proteína CD81, uma vez que a sua expressão se encontra silenciada. Para realizar o silenciamento recorreu-se à metodologia de RNAi. Para tal, fez-se uma transdução com lentivírus que codificam diferentes sequências de short hairpin RNAs (shRNA) direcionados para o gene da CD63, obtendo-se diferentes populações silenciadas. Com o objetivo de verificar se o silenciamento foi eficiente analisou-se a expressão da CD63 em extratos celulares das populações, por Western Blot (Fig. 3.1), sendo esperado um arrastamento entre os 70 e os 30 KDa, devido aos diferentes níveis de glicosilação da proteína que dependem do tipo de célula e do seu estado de maturação. Verificou-se que a expressão de CD63 é semelhante em todas as populações, não diferindo do controlo negativo (nt), ao contrário do que seria esperado caso o silenciamento tivesse sido eficiente. As únicas populações que apresentam uma ligeira diminuição da expressão em relação ao controlo são a TRC51 e TRC53 (Fig. 3.1)

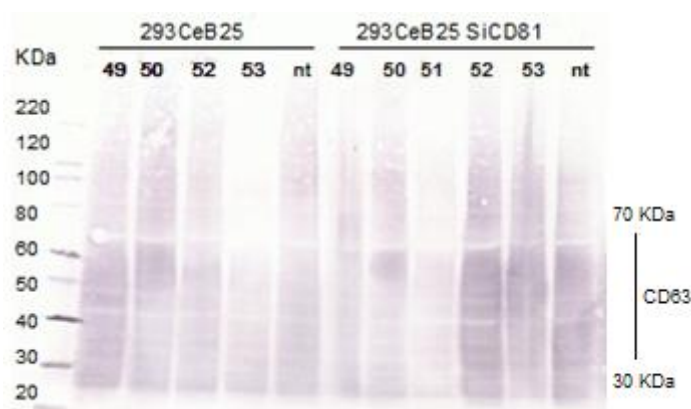


Figura 3.1. Análise da expressão da CD63 nos extratos celulares das células 292CeB25 e 293CeB25 siCD81, por Western Blot. nt – controlo negativo de silenciamento. 49, 50, 51, 52, 53: células infetadas com os lentivírus que codificam as sequências 49, 50, 51, 52, 53, respetivamente.

Uma vez que a técnica de Western Blot apenas permite realizar uma análise qualitativa da expressão de CD63, recorreu-se à citometria de fluxo para quantificar a percentagem de células silenciadas para a CD63 nas várias populações.

Os resultados obtidos por citometria de fluxo mostraram uma percentagem de silenciamento muito reduzida concordando com os resultados obtidos por Western Blot (Tabela 3.1). Todas as populações

de células apresentaram elevado número de células fluorescentes, ou seja um elevado número de células que possuem CD63 na sua membrana celular. A população que apresentou maior nível de silenciamento foi a população TRC51 (Tabela 3.1) com um silenciamento de aproximadamente 30%. Uma vez que esta foi a população que apresentou maior nível de silenciamento analisou-se a expressão da CD63 nas populações TRC51 resultantes das infecções com MOIs superiores. Contudo, os valores determinados para as MOIs 0.5 e 1, são de 33% e 35%, respectivamente, mostrando não haver diferença significativa na percentagem de silenciamento.

Tabela 3.1: Percentagem de células a expressar CD63 determinada por citometria de fluxo.

	População de células	% de células CD63 positivas
Controlos positivos	Sem anticorpo	0,1 ± 0,005
	Sem anticorpo anti-CD63	2,5 ± 0,4
Controlos negativos	293CeB25	93,6 ± 0,7
	293CeB25 siCD81	95,5 ± 2,1
293CeB25	Nt	94 ± 4,7
	TRC 49	91,9 ± 3,2
	TRC 50	91,6 ± 1,7
	TRC 51	65,6 ± 5,0
	TRC 52	96,2 ± 2,5
	TRC 53	95,2 ± 3,3
293CeB25 siCD81	Nt	94,7 ± 2,4
	TRC 49	89,5 ± 1,5
	TRC 50	94,4 ± 3,7
	TRC 51	69,1 ± 1,6
	TRC 52	94,5 ± 1,0
	TRC 53	94,4 ± 3,4

Com o objetivo de aumentar o silenciamento da CD63 realizou-se um novo ensaio de transdução em que se infetou, em simultâneo, com vários lentivírus, segundo três condições distintas (1, 2 e 3). Estas populações foram igualmente analisadas no citómetro de fluxo de modo a determinar a percentagem de silenciamento (Fig. 3.2).

Expressão de CD63

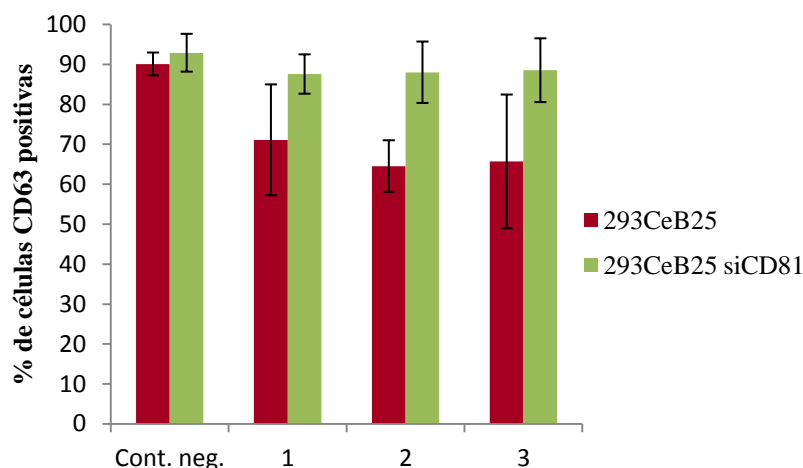


Figura 3.2: Percentagem de células fluorescentes detetadas por citometria de fluxo para as populações das condições 1, 2 e 3. Condição 1- infecção com lentivírus que codificam as sequências TRC51, TRC52 e TRC53. Condição 2 – infecção com lentivírus que codificam as sequências TRC49, TRC50, TRC51 e TRC53. Condição 3 – infecção com lentivírus que codificam as 5 sequências.

Como se observa no gráfico da Fig. 3.2 a percentagem de silenciamento mantém-se muito reduzida, sendo muito semelhante entre as três condições. Contudo, existe nas populações entre 4% e 24% de células que não expressam CD63. Deste modo, decidiu-se isolar essas células para obter uma população menos heterogénea. As células foram incubadas com o anticorpo anti-CD63 e em seguida com esferas magnéticas que possuem anticorpos IgG anti-mouse acoplados à superfície. As células que possuem CD63 ficam acopladas às esferas magnéticas que são posteriormente atraídas por um ímã e as células silenciadas para a CD63 ficam em suspensão permitindo a sua recuperação.

Este protocolo foi realizado para quatro populações: as populações TRC51 com e sem silenciamento da CD81 e para as populações da condição **3**, igualmente com e sem silenciamento da CD81. Para as populações em que se observou um maior aumento do silenciamento (293CeB25 TRC51 e 293CeB25 siCD81 **3**) repetiu-se novamente o protocolo para isolamento das células que não expressam CD63. Contudo, a percentagem de células silenciadas continuou a ser reduzido. Verificou-se também que o silenciamento da CD63 não era estável, uma vez que antes do primeiro isolamento as populações 293CeB25 siCD81 **3** e 293CeB25 TRC51 apresentavam 4,4% e 28,4% de silenciamento, respetivamente e após o segundo isolamento apresentavam 34% e 31,4%, respetivamente (Tabela 3.2).

Tabela 3.2: Percentagem de silenciamento para as duas populações de células sujeitas a isolamento

	% de Silenciamento da CD63		
	Antes do isolamento	1º isolamento	2º isolamento
293CeB25 siCD81 3	4,4 ± 8	39,06 ± 4	34,0 ± 14
293CeB25 TRC51	28,4 ± 5	79,42 ± 4	31,4 ± 19

3.2. II – Construção de um sistema de troca de *cassette* para os epítomos do vírus da hepatite C.

Com o objetivo de desenvolver um sistema rápido, versátil, e de elevada expressão para produzir rVLPs pseudotipadas com os epítomos do HCV (E1 e E2) construiu-se um sistema de troca de *cassette* mediado pela enzima Cre recombinase.

Em primeiro lugar, construiu-se um plasmídeo *tagging*, que será posteriormente integrado de forma aleatória no genoma. Este plasmídeo possui um gene repórter (GFP), que através da análise da intensidade da sua fluorescência permite selecionar locus cromossomais de elevada expressão em clones celulares que serão posteriormente sujeitos a troca de *cassette* para a expressão dos epítomos E1 e E2 de HCV.

3.2.1. Construção plasmídeo *tagging*

A construção do plasmídeo *tagging* (pTagLoxP_eGFPZeo) fez-se através da clonagem do gene da GFP fundido com a Zeocina (obtido a partir do plasmídeo pSELECT-GFPZeo-LacZ) no plasmídeo pTagLoxP-mcs. A amplificação da sequência GFPZeo realizada por PCR e a restrição do vetor foram corridas em gel de agarose de modo a confirmar que o produto obtido corresponde ao desejado (Figura 3.3). Para o inserto era esperado um fragmento de 2500 bp (poço 1), e para o vetor de 3295 bp (poço 2). Esta confirmação permitiu avançar para a reação de ligação seguida de transformação para produção do plasmídeo. A sua correta ligação foi verificada por restrição com a enzima BsrGI, sendo esperado dois fragmentos (5256 bp e 565 bp) que se podem observar no poço 5.

Uma vez confirmada a correta construção do plasmídeo procedeu-se à transfeção das células 293CeB11 e 293CeB22 por eletroporação e CaPO₄, com o plasmídeo *tagging*, de modo a verificar qual dos métodos é mais eficiente.

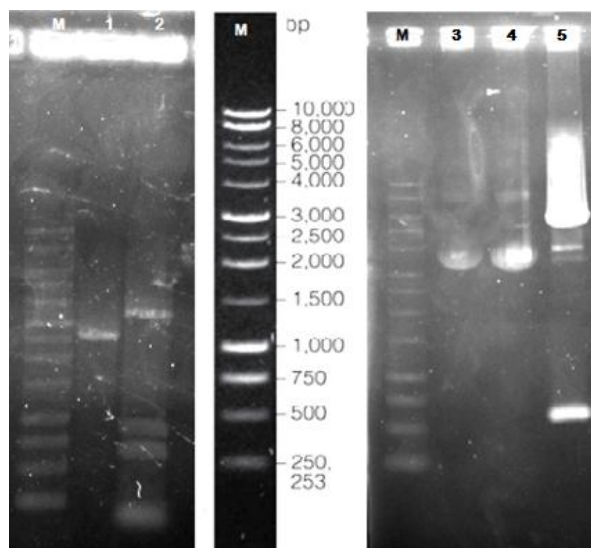


Figura 3.3. Géis de agarose (0,7% m/v) da construção do plasmídeo pTagLoxP_eGFPZeo . M – Marcador de peso molecular (DNA 1 Kb Ladder, Promega). 1 – Amplificação da sequência GFPZeo. 2 – Restrição do vetor pTagLoxP-mcs com EcoRV e BsmI. 3 e 4 – Plasmídeo pTagLoxP_eGFPZeo não digerido. 5 – Plasmídeo pTagLoxP_eGFPZeo digerido com BsrGI.

3.2.2. Transfeção por eletroporação

A transfeção por eletroporação foi realizada nas células 293CeB11 e 293CeB22 utilizando duas concentrações de pTagLoxP_eGFPZeo distintas (0,5 μ g DNA e 1 μ g DNA/10⁶ células). Como controlo positivo utilizou-se o plasmídeo pSELECT-GFPZeo-LacZ.

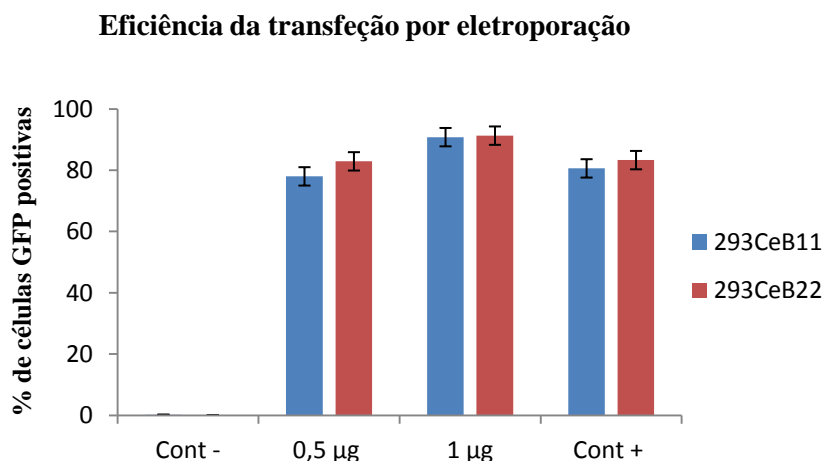


Figura 3.4. Eficiência de transfeção por eletroporação das células 293CeB11 e 293CeB22, para as duas concentrações de DNA plasmídico utilizadas (0,5 e 1 μ g de DNA/10⁶ células).

Para ambas as concentrações de DNA obteve-se uma elevada eficiência de transfeção, sendo esta ligeiramente superior quando se utilizou 1 μ g de DNA/10⁶ células, não se verificando diferenças significativas entre as duas linhas celulares (Fig. 3.4). Através da análise da intensidade de

fluorescência pode observar-se que as populações de células resultantes da transfeção com a concentração de 1 μg de DNA/ 10^6 células, além de possuírem uma eficiência de transfeção mais elevada apresentam igualmente uma intensidade de fluorescência mais elevada (Fig. 3.5).

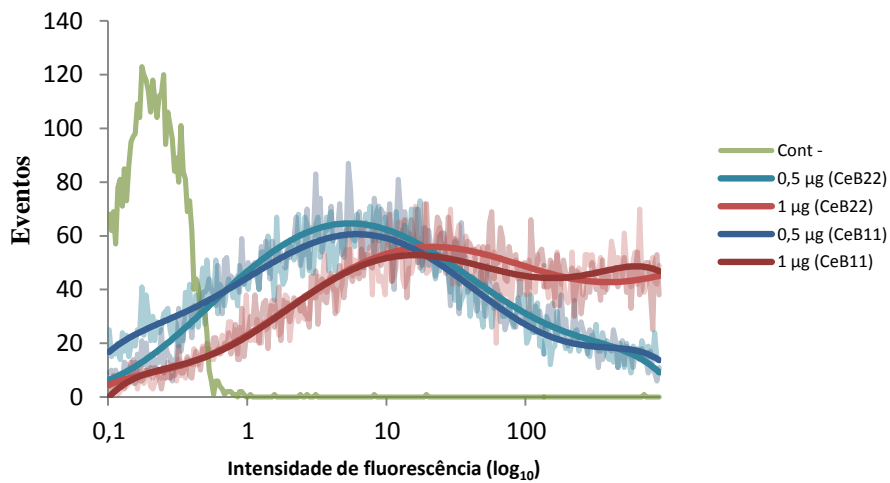


Figura 3.5. Linhas de tendência da intensidade de fluorescência das células 293CeB11 e 293CeB22 resultantes da transfeção por eletroporação para as duas concentrações de DNA plasmídico utilizadas (0,5 μg DNA 1 μg DNA/ 10^6 células).

3.2.3. Transfeção por CaPO_4

A transfeção por CaPO_4 foi realizada igualmente nas células 293CeB11 e 293CeB22, utilizando duas concentrações de pTagLoxP_eGFPZeo distintas (1 μg DNA e 2 μg DNA/ 10^6 células). Como controlo positivo utilizou-se igualmente o plasmídeo pSELECT-GFPZeo-LacZ.

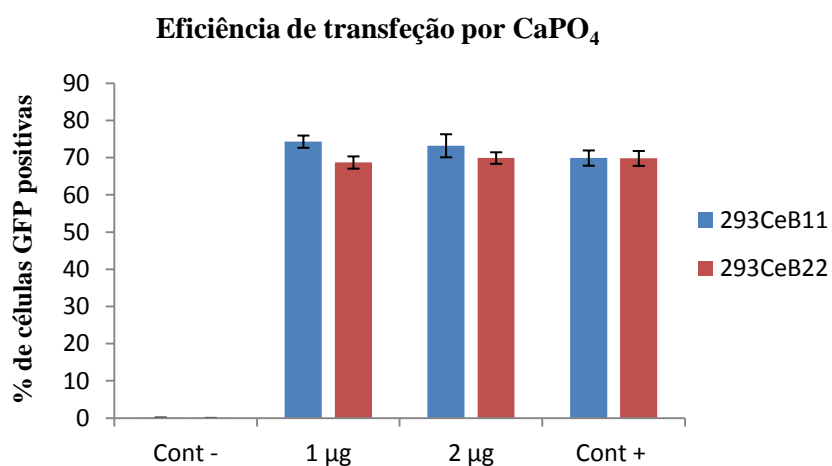


Figura 3.6. Eficiência de transfeção por CaPO_4 das células 293CeB11 e 293CeB22 para as duas concentrações de DNA plasmídico utilizadas (1 e 2 μg de DNA/ 10^6 células).

Analisando a figura 3.6 pode-se observar que a eficiência de transfeção foi muito semelhante para as duas linhas celulares, entre 70% e 74%, e para as duas concentrações de DNA, não se observando diferenças significativas. Comparando a intensidade de fluorescência das células resultantes dos dois métodos de transfeção, transfetadas com a mesma concentração de DNA ($1\mu\text{g}/10^6$ células), verifica-se que, embora a eficiência de transfeção tenha sido superior para o método de eletroporação, as células resultantes do método de CaPO_4 possuem maior intensidade de fluorescência, estes resultados são concordantes para as duas linhas celulares (Fig. 3.7).

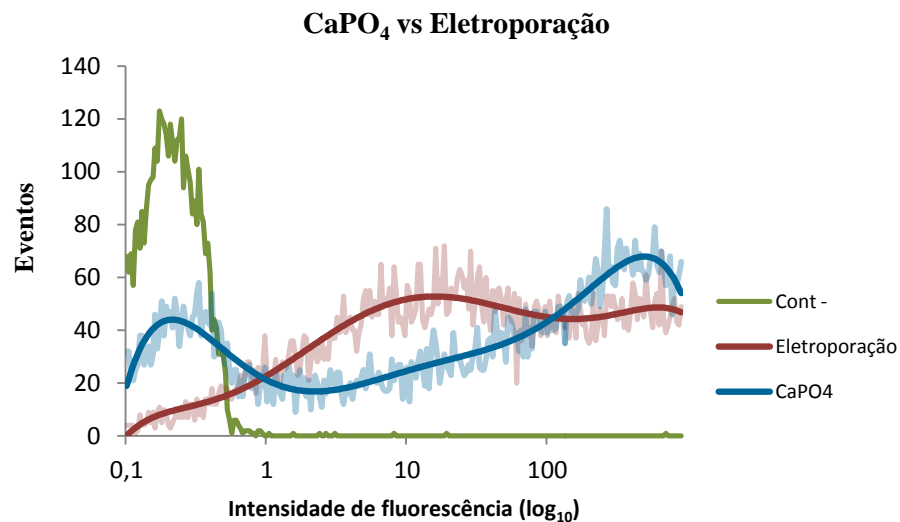


Figura 3.7. Intensidade de fluorescência das células 293CeB11 transfetados por CaPO_4 (azul) e por eletroporação (rosa) com uma concentração de DNA de $1\mu\text{g}/10^6$ células. Controlo negativo (verde).

3.2.4. Isolamento de clones

Após transfeção das células 293CeB11 e 293CeB22 com o plasmídeo pTagLoxP_eGFPZeo (*tagging*) e seleção das populações com Zeocina, realizou-se um *limiting dilution* de modo a obter células geneticamente iguais (clones). Obtendo-se um total de 30 clones para cada condição (8 condições, duas linhas celulares transfetadas por duas técnicas diferentes utilizando duas concentrações de DNA). A expressão do seu gene repórter (GFP) foi analisada no citómetro de fluxo (Fig. 3.8) e os clones foram agrupados de acordo com a sua intensidade de fluorescência em três grupos: grupos com intensidades máximas de fluorescência (\log_{10}) igual ou inferior a 10, entre 10 e 100 e superior ou igual a 100, (Tabela 3.3).

Comparação da intensidade de fluorescência dos clones

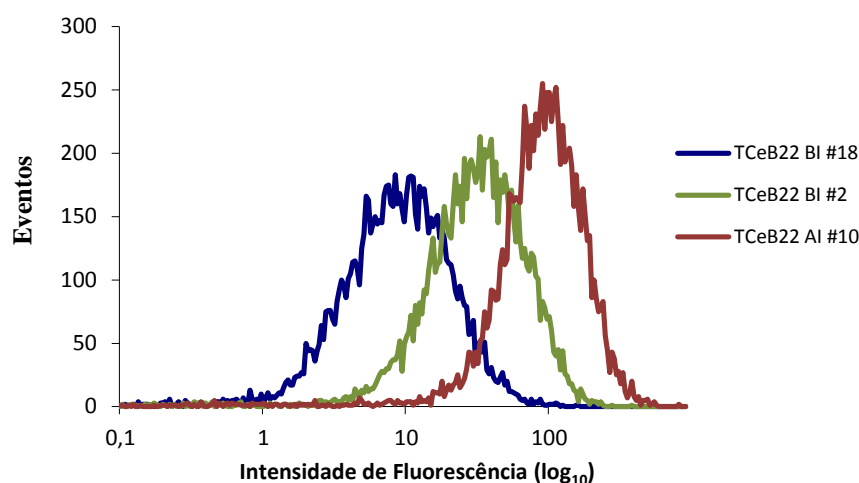


Figura 3.8. Gráfico comparativo da intensidade de fluorescência de três clones resultantes da transfeção por CaPO_4 , representativo de expressão baixa, intermédia e elevada da proteína repórter eGFP.

Ao agrupar os clones em três grupos de diferentes intensidades de fluorescência, verificou-se que o número de clones em cada grupo dependia do método de transfeção utilizado (Tabela 3.3). Para a transfeção por CaPO_4 a maioria dos clones situa-se nos grupos de intensidade de fluorescência superior ou igual a 10 e entre 10 e 100, enquanto que para a eletroporação a maioria dos clones situa-se nos grupos entre 10 e 100 e superior ou igual a 100. Este resultado contraria o observado na figura 3.7, onde a população de células resultantes da transfeção por CaPO_4 com $1 \mu\text{g}$ de DNA/ 10^6 células apresentava maior intensidade de fluorescência do que a respetiva população resultante da eletroporação. Não foram observadas diferenças significativas na distribuição dos clones pelos grupos em relação à concentração de DNA, em oposição ao verificado anteriormente, em que as populações resultantes da eletroporação com $1 \mu\text{g}$ de DNA possuíam maior intensidade de fluorescência (Fig. 3.5).

Tabela 3.3: Distribuição da intensidade de fluorescência derivada da expressão da eGFP: ≤ 10 , 10 e 100, ≥ 100 ; apresentada pelos diferentes clones

		Intensidade de fluorescência					
		≤ 10		10 – 100		≥ 100	
		Nº de clones		Nº de clones		Nº de clones	
CaPO_4	1 μg DNA	15	10	18	9	8	5
	2 μg DNA		5		8		3
Eletroporação	0,5 μg DNA	6	3	20	9	20	10
	1 μg DNA		3		11		10

3.2.5. Análise do número de cópias do plasmídeo pTagLoxP_eGFPZeo (*tagging*) inserido nas células

A análise dos clones no citômetro de fluxo permitiu-nos determinar quais os clones que possuem maior intensidade de fluorescência, no entanto uma vez que pode ocorrer a integração de mais do que uma cópia do plasmídeo no DNA genômico, não é possível determinar se a elevada intensidade de fluorescência de um clone se deve à presença de uma cópia do plasmídeo com elevada expressão, ou se se deve à expressão de várias cópias deste. Uma vez que o objetivo é obter clones com uma única cópia que possua elevada expressão, pois estes permitem-nos após a troca obter uma elevada expressão do gene de interesse, realizou-se a técnica de Southern Blot. Esta técnica permite detetar o número de cópias da *cassette* inserida no genoma de cada clone através da utilização de uma sonda específica para a *cassette*. Para sintetizar a sonda foi construído o plasmídeo pSP72-dpuro. Uma vez que a enzima utilizada para a sua síntese foi a enzima T7 que reconhece o promotor bacteriano T7, foi construído o plasmídeo com a sequência dpuro a jusante do promotor T7. A construção do plasmídeo pSP72-dpuro fez-se através da amplificação do gene dpuro a partir do plasmídeo pTagLoxP-mcs seguido da sua inserção no plasmídeo pSP72.

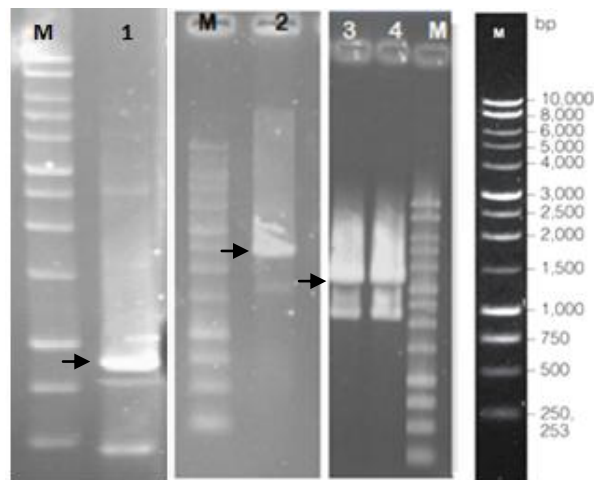


Figura 3.9. Géis de agarose (0,7% m/v) da construção do plasmídeo pSP72-dpuro.

M – Marcador de peso molecular. (DNA 1 Kb Ladder, Promega) 1 – Amplificação do gene dpuro. 2 – Restrição do vetor pTagLoxP-mcs com BamHI e EcoRI. 3 e 4 – Plasmídeo pSP72-dpuro digerido com Age I.

A amplificação do inserto dpuro realizada por PCR e a restrição do vetor foram corridas em gel de agarose de modo a confirmar que o produto obtido corresponde ao desejado (Fig. 3.9). Para o inserto era esperado um fragmento de 603 bp (poço 1), e para o vetor de 2559 bp (poço 2). Uma vez confirmada a obtenção dos fragmentos de tamanho desejado, realizou-se a reação de ligação seguida de transformação para produção do plasmídeo. A sua correta ligação foi verificada por restrição com a enzima Age I, sendo esperado um fragmento de (3177 bp) que se pode observar nos poços 3 e 4.

Após a construção do plasmídeo e a síntese da sonda realizou-se o protocolo de Southern, contudo não foram visíveis bandas. Procedeu-se á alteração de diversos parâmetros com o objetivo de otimizar o protocolo, no entanto não foram detetadas bandas, com exceção do controlo positivo (plasmídeo pSP72-dpuro), no qual se detetou duas bandas.

3.2.6. Troca de *cassette* mediada pela enzima Cre recombinase (Cre – RMCE)

Após várias tentativas não foi possível determinar o número de cópias da *cassette tagging* por Southern Blot. No entanto, avançou-se para a realização da troca de *cassette*. Uma vez que os clones possuem o gene repórter da GFP, se estes possuírem apenas uma cópia e ocorrer troca de *cassette*, estes perderão o gene. Se possuírem várias cópias a probabilidade de ocorrer uma eficiente troca em todas elas é muito reduzida, pelo que continuarão a apresentar fluorescência. Deste modo procedeu-se à construção do plasmídeo *targeting*, para posterior troca de *cassette*. A construção do plasmídeo *targeting* (pTarLoxP-E1E2) fez-se através da amplificação do gene E1E2 a partir do plasmídeo pEPX 145-71 seguido da sua inserção no plasmídeo pTarLoxP-mcs.

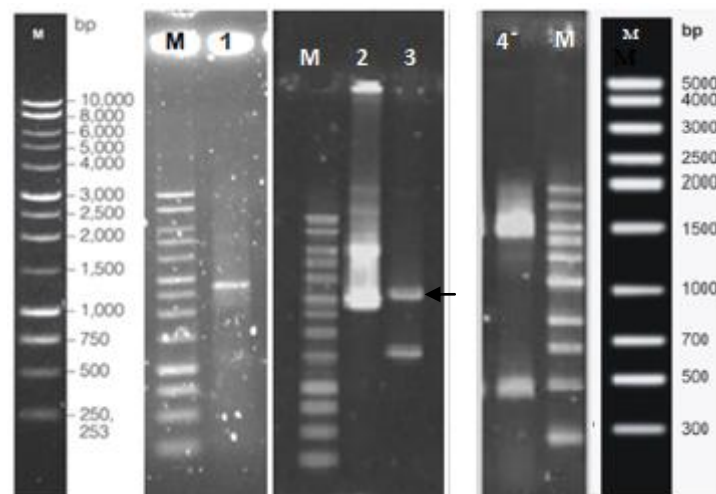


Figura 3.10. Géis de agarose (0,7 m/v) para construção do plasmídeo pTarLoxP-E1E2.

M – Marcador de peso molecular. (DNA 1 Kb Ladder, Promega 1) – Amplificação dos genes E1E2. 2 – Plasmídeo pTarLoxP-mcs não digerido. 3 – Restrição do vetor pTarLoxP-mcs com PacI e AvrII. 4 – Plasmídeo pTarLoxP-E1E2 digerido com Sal I.

De modo a confirmar o tamanho do produto de amplificação dos genes E1E2 e da restrição do vetor correu-se um gel de agarose, sendo esperado para o inserto um fragmento de 2724 bp (poço 1), e para o vetor de 3284 bp (poço 3), (figura 3.10). Após esta confirmação procedeu-se à ligação e transformação, confirmando-se o plasmídeo obtido por restrição com a enzima Sal I (5050 bp e 902 bp) (poço 4).

Uma vez obtido o *targeting*, realizou-se uma co-transfecção com o plasmídeo que possui o gene que codifica a enzima Cre recombinase de modo a se efetuar a troca de *cassette*. Este protocolo foi

realizado em 12 clones, 6 resultantes de cada método de transfecção sendo dois de cada grupo de intensidade de fluorescência. Antes de se realizar a troca de *cassette* os clones possuíam como marca de resistência a Zeocina que foi utilizada para seleção das células após transfecção com o plasmídeo *tagging*. Após a troca de *cassette*, se esta for eficiente os clones perdem o gene GFPZeo, perdendo a fluorescência e a resistência à zeocina. Os clones passam a ser selecionados através da marca de resistência Puromicina, pois a *cassette targeting* possui um ATG (codão de iniciação da tradução) que permite restaurar a expressão do gene *dpuro* (gene da Puromicina sem codão de iniciação) presente na *cassette tagging* (Fig. 3.11).

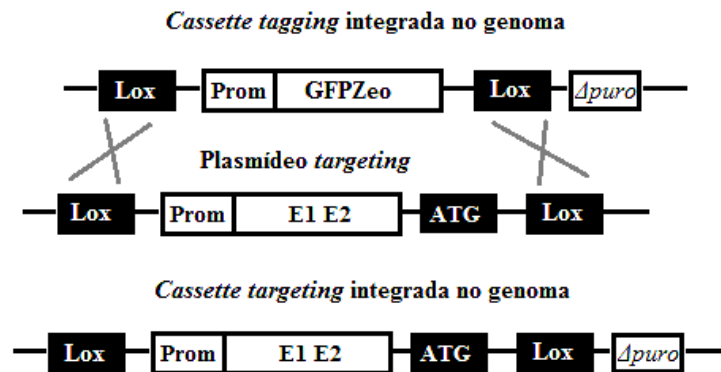


Figura 3.11. Esquema do sistema de troca de *cassette* mediado pela enzima Cre recombinase introduzido nas linhas celulares 293CeB11 e 293CeB22.

48 horas após se realizar a co-transfecção com o plasmídeo *targeting* e com o plasmídeo que codifica a Cre recombinase, pelo método do CaPO_4 , as células foram transferidas para placas de 100 mm e sujeitas a pressão seletiva com Puromicina. Passados 15 dias verificou-se que a troca de *cassette* não foi eficiente uma vez que nenhuma célula sobreviveu na presença do antibiótico.

3.2.7. Troca de *cassette* mediada pela enzima Flipase (Flpe – RMCE)

Em conjunto com a construção do plasmídeo *targeting* para a troca de *cassette* pela enzima Cre recombinase construiu-se igualmente um outro plasmídeo *targeting* para troca com a *cassette* já presente e caracterizada nas linhas celulares 293CeB11 e 293ceB22 e que, como tal, já se sabe que possui apenas uma cópia da *cassette* integrada no genoma (Coroadinha et al., 2006). Neste sistema a troca de *cassette* é mediada pela enzima Flipase.

A construção do plasmídeo *targeting* (pTAR-E1E2) fez-se através da amplificação do gene E1E2 a partir do plasmídeo pEPX 145-71 seguido da sua inserção no plasmídeo pTAR_IRESmcs.

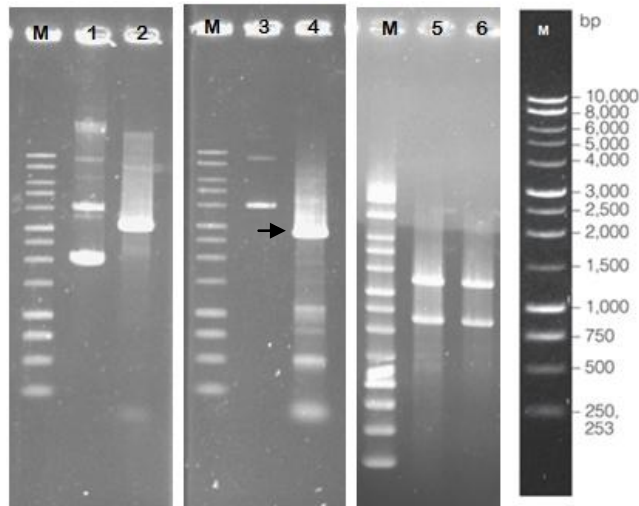


Figura 3.12. Géis de agarose (0,7% m/v) da construção do plasmídeo pTAR-E1E2.

M – Marcador de peso molecular. (DNA 1 Kb Ladder, Promega) 1 – Plasmídeo pEPX 145-71 não digerido. 2 – Amplificação do inserto E1E2. 3 – Plasmídeo pTAR_IRESmcs não digerido. 4 – Restrição do vetor pTAR_IRESmcs com AFLII e NdeI. 5 e 6 – Plasmídeo pTAR-E1E2 digerido com EcoRV.

A confirmação do tamanho do produto de amplificação dos genes E1E2 e da restrição do vetor foi realizada através de corrida em gel de agarose, sendo esperado para o inserto um fragmento de 2710 bp (poço 2), e para o vetor de 3150 bp (poço 4), (Fig. 3.12). Após esta confirmação realizou-se a reação de ligação seguida de transformação, confirmando-se por restrição com a enzima EcoRV (3512 bp e 2281bp) (poço 5 e 6) o plasmídeo obtido.

Uma vez obtido o plasmídeo *targeting*, este foi co-transfetado com o plasmídeo que possui o gene que codifica a Flipase, de modo a se efetuar a troca de *cassette*. Este protocolo foi realizado nos mesmos 12 clones selecionados para realizar a troca com a Cre recombinase, referida anteriormente.

Antes de se realizar a troca de *cassette* os clones possuíam como gene repórter o LacZ. Este codifica uma proteína (β -galactosidase) que degrada o substrato X-gal conferindo cor azul às células, permitindo assim a sua detecção. Esta *cassette* possui duas marcas de resistência, uma marca de seleção positiva (*hyg*) que confere resistência à Higromicina e uma marca de seleção negativa (*tk*) que promove a morte celular na presença de Ganciclovir. Após a troca de *cassette*, se esta for eficiente, os clones perdem o gene LacZ, perdendo a capacidade de degradar o X-gal e passam a ser selecionados através da resistência à neomicina, pois a *cassette targeting* possui o ATG que permite restabelecer a expressão do gene *neo* (gene da neomicina sem códon de iniciação da tradução) presente na *cassette tagging* (Fig. 3.13).

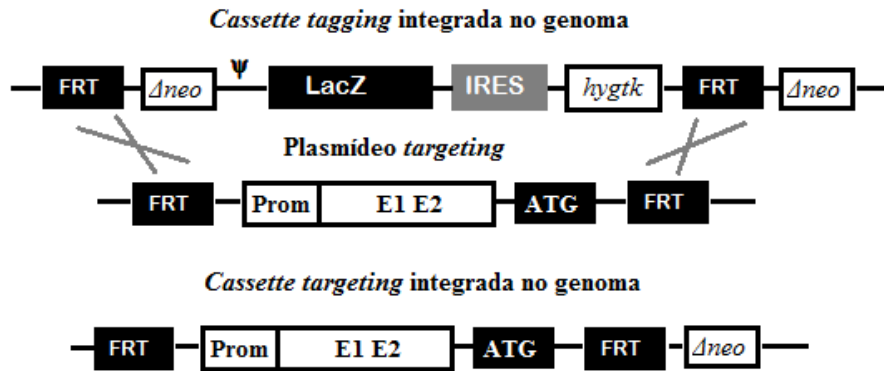


Figura 3.13. Representação esquemática do sistema de troca de *cassette* mediado pela enzima Flipase.

48 horas após a co-transfecção com o plasmídeo *targeting* e com o plasmídeo que codifica a Flipase, pelo método do CaPO_4 , as células foram transferidas para placas de 100 mm e sujeitas a pressão seletiva com G418. Passados 15 dias verificou-se que a maioria das células morreram tendo crescido colónias isoladas que foram posteriormente passadas para placa de 96 poços e em seguida amplificadas até se obter confluência suficiente para um *T-flask 25cm²*, tendo sido obtido um total de 11 clones.

3.2.8. Confirmação da eficiente troca de *cassette*

Com o objetivo de verificar se os clones obtidos que efetuaram uma troca de *cassette* eficiente, analisou-se a expressão de LacZ. As células foram fixadas em placas de 96 poços e em seguida foi adicionado X-gal. Verificou-se que os clones não apresentavam cor azul (Fig. 3.14B), ao contrário do controlo negativo (clone não sujeito a troca de *cassette*) que apresentava todas as células azuis (Fig. 3.14A).

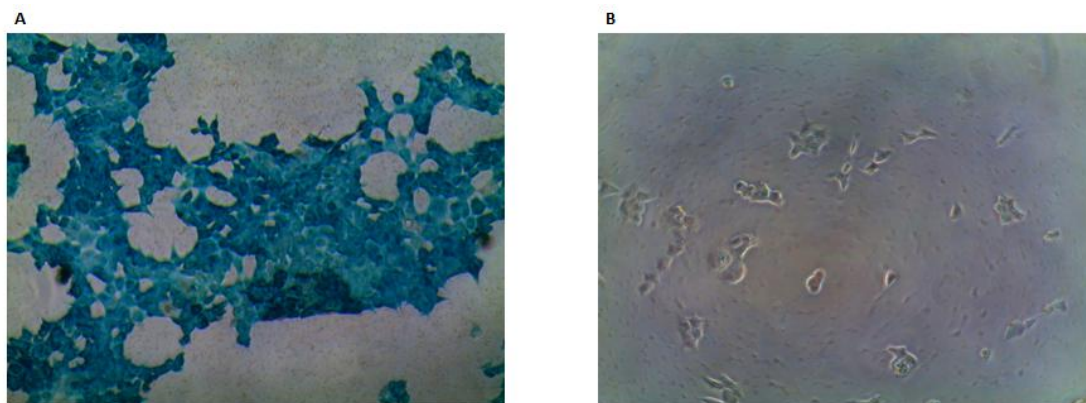


Figura 3.14. Observação da expressão de LacZ por microscopia óptica. A – clone não sujeito a troca de *cassette* (controlo negativo). B – clone sujeito a troca de *cassette*.

Com o mesmo objetivo de confirmar se a troca de *cassette* foi eficiente e o locus cromossomal expressa os genes do envelope do vírus HCV, realizou-se um Western Blot com extratos celulares de quatro clones e incubou-se com anticorpos anti- β -galactosidase, anti-E1 e anti-E2. A análise do Western Blot revelou que os clones já não expressam β -galactosidase passando a expressar E1 e E2 (Fig. 3.15).

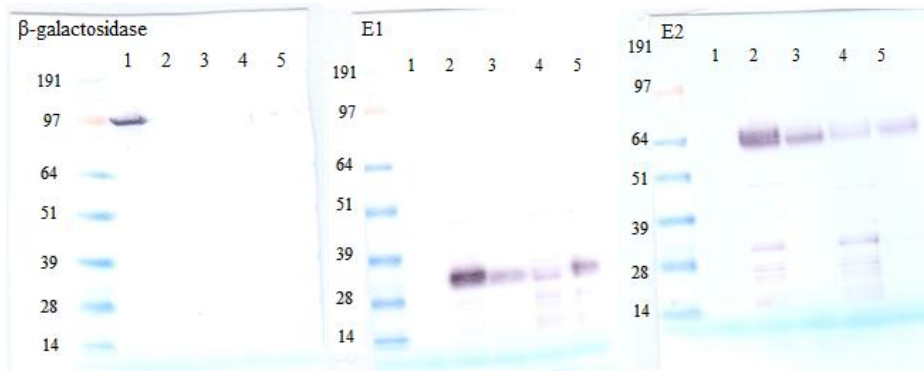


Figura 3.15. Análise da expressão da β -galactosidase e dos epítomos do HCV (E1 e E2) em extratos celulares por Western Blot. 1 – clone #6 sem troca de *cassette* (controlo negativo). 2, 3, 4 – clones resultantes do clone #6 após troca de *cassette*. 5 – clone resultante do clone #15 após troca de *cassette*.

4. Discussão dos resultados

4.1. I – Silenciamento da tetraspanina CD63

A utilização de VLPs como vacinas tem como vantagem aproveitar a sua capacidade de apresentar de forma ordenada antígenos para desencadear uma resposta imune contra um alvo específico. Contudo, a incorporação de proteínas celulares nas VLPs pode direcionar a resposta imune para alvos inespecíficos, principalmente se forem produzidas numa linha celular proveniente de um organismo diferente daquele onde irão ser administradas. Uma vez que os ensaios pré-clínicos são frequentemente realizados em ratinhos e as VLPs, neste trabalho, são produzidas em células humanas, a presença de proteínas celulares pode influenciar a resposta imune contra o alvo de interesse. Deste modo, investiu-se no silenciamento da CD63 nas células produtoras de VLPs com o intuito de avaliar o efeito da incorporação desta proteína no perfil imunológico das VLPs.

Existem já alguns trabalhos publicados em que se procedeu com sucesso ao silenciamento da tetraspanina CD63, através da tecnologia do RNAi (Jung et al., 2006; Kallquist et al., 2008; Petersen et al., 2011), tendo um desses trabalhos sido realizado na mesma linha celular utilizada neste estudo (HEK293) (Codina et al., 2005). No entanto, neste trabalho o silenciamento foi muito pouco eficiente e instável. O principal motivo que se pensa estar na origem deste reduzido nível de silenciamento é a possibilidade das células com baixo nível de silenciamento apresentarem vantagens de crescimento em relação às células silenciadas. A proteína CD63 participa em vários processos celulares como a ativação celular, a adesão e a diferenciação (Pols e Klumperman, 2009) ou seja, as células silenciadas são afetadas pela perda das funções da proteína CD63 o que permite às células com reduzida percentagem de silenciamento prevalecer e crescer mais rapidamente do que as células silenciadas, diminuindo assim a percentagem destas. Outro fator que pode ter contribuído para o baixo nível de silenciamento é a ativação da via do interferão. Considera-se que dsRNAs com menos de 30 bp (como descrito na introdução) induzem o silenciamento de sequências específicas sem ativar a via do interferão (Sandy et al., 2005). No entanto, apesar de ser geralmente aceite que os siRNAs são demasiado pequenos para induzir a expressão do interferão, Bridge et al (2003) mostrou que um número substancial de shRNAs pode desencadear esta via. Outros estudos têm demonstrado que sequências de 21 bp (tamanho das sequências utilizadas neste trabalho) podem ativar a via do interferão (Fish e Kruithof, 2004). Fish et al sugerem um limite de 21 bp abaixo do qual a via do interferão não é ativada e o silenciamento é mantido. Comparando as sequências utilizadas neste trabalho com as sequências descritas nos estudos em que se realizou silenciamento da CD63 (referidos acima), verificou-se que várias das sequências descritas apresentavam elevada semelhança com as utilizadas neste estudo, nomeadamente com a TRC51 e TRC53. No entanto, todas as sequências utilizadas com sucesso no silenciamento da CD63 possuíam menos de 21 bp (19 bp).

Alguns autores propõem como forma de evitar a indução da via do interferão a utilização de baixos títulos de infecção (Bridge et al., 2003; Fish e Kruithof, 2004; Shan 2010). Neste trabalho a MOI utilizada com mais frequência foi a de 0.1, ou seja, utilizou-se um título viral de 0.1 vírus por célula, para que as células não possuíssem uma elevada carga viral que pudesse afetar a sua viabilidade. No entanto, o título viral foi calculado de forma aproximada, uma vez que os plasmídeos que codificam os shRNAs não possuem nenhum marcador que permita calcular o título viral de forma mais precisa. O facto da maioria das células sobreviver à pressão seletiva após transdução, indica que o título viral utilizado foi superior ao teórico. Como tal, o título viral utilizado pode ter sido suficientemente elevado para induzir a via do interferão e uma vez que se verifica que as sequências de 21 bp são reconhecidas por esta via, este pode ter contribuído para a reduzida percentagem de silenciamento obtida.

Observou-se ainda uma elevada instabilidade na percentagem de silenciamento da CD63 ao longo das passagens celulares. Esta variabilidade poderá ser reflexo do facto da polimerase III, enzima responsável pela transcrição dos shRNAs, ser uma enzima dependente do ciclo celular e estar associada aos mecanismos de crescimento celular (Dumay-Odelot et al., 2010).

Tendo em conta os resultados obtidos concluiu-se que não é possível proceder ao silenciamento da tetraspanina CD63 através das cinco sequências de shRNA utilizadas.

4.2. II – Construção de um sistema de troca de *cassette* para os epítomos do vírus da hepatite C.

Um dos objetivos deste trabalho foi construir uma linha celular que possua uma expressão elevada e estável das glicoproteínas de envelope do HCV. No entanto, as técnicas clássicas de transfeção utilizadas para a inserção de genes em células de mamífero envolvem procedimentos morosos para identificar clones que possuam uma expressão elevada e estável do gene de interesse. Este obstáculo pode ser ultrapassado através da técnica de troca de *cassette* (RMCE). Esta técnica permite substituir de forma eficiente uma *cassette* previamente integrada no genoma, que é flanqueada por dois locais recombinantes hetero-específicos, por uma segunda *cassette* com um desenho análogo (Bode et al 2000).

Este trabalho começou pela construção do plasmídeo *tagging* (pTagLoxP_eGFPZeo), que foi posteriormente transfetado nas linhas celulares 293CeB11 e 293CeB22 pelo método de eletroporação e CaPO₄. Através do gene repórter GFP presente no plasmídeo *tagging*, foi possível determinar a eficiência de transfeção dos dois métodos. Verificou-se que a eficiência de transfeção foi mais elevada para a eletroporação. No entanto, ao comparar a intensidade de fluorescência das populações resultantes dos dois métodos de transfeção, utilizando a mesma concentração de DNA, verificou-se que o método do CaPO₄ originou uma população com maior intensidade de fluorescência. O método

de eletroporação é geralmente aceite como sendo um método mais eficiente do que o método do CaPO_4 (Chu et al., 1987), como tal era espectável uma maior eficiência de transfeção para este método. A obtenção de uma maior intensidade de fluorescência na população de células transfetadas pelo método do CaPO_4 pode ser explicado pelo facto deste método se basear na formação de complexos de CaPO_4 e DNA que entram na célula por endocitose, enquanto que a eletroporação se baseia na abertura de poros na membrana por onde entra o DNA que se encontra diluído na suspensão celular. Como consequência, a transfeção por CaPO_4 poderá promover a entrada de um elevado número de cópias do plasmídeo devido à formação dos complexos ao invés da eletroporação

Após a transfeção das duas linhas celulares, o plasmídeo *tagging* integrou-se aleatoriamente no genoma celular, e como tal foi necessário proceder à seleção das células que possuíam as duas características importantes para a troca de *cassette*: a presença de uma única cópia da *cassette* e uma elevada expressão dessa cópia única. Para tal, realizou-se um *limiting dilution* de modo a obter clones para que se possa seleccionar quais os que possuem as características pretendidas. Utilizou-se o citómetro de fluxo para analisar a expressão de GFP nos vários clones, tendo-se verificado que estes podiam ser agrupados em três grupos consoante a sua intensidade de fluorescência. Quando se procedeu à separação dos clones resultantes dos dois métodos de transfeção pelos grupos de diferentes intensidades de fluorescência, observou-se que a maioria dos clones resultantes da eletroporação apresentava fluorescência de intensidade intermédia e alta, enquanto que os resultantes do método do CaPO_4 se distribuíam maioritariamente pelos grupos de intensidade de fluorescência baixa e intermédia. Esta observação contraria o resultado obtido após a transfeção, em que se verificou que a população resultante do método do CaPO_4 possuía maior intensidade de fluorescência. Estes resultados aparentemente contraditórios podem dever-se ao facto de a análise da eficiência de transfeção ter sido realizada 24 horas após a transfeção, onde a maioria da expressão observada provém de plasmídeos que ainda não se integraram no genoma. Uma vez que o método do CaPO_4 é mais propício à entrada de um elevado número de cópias de DNA plasmídico, é previsível que as populações obtidas com este método possuam maior expressão episomal que as populações resultantes da eletroporação. Quando se analisou a intensidade de fluorescência dos clones, analisou-se a expressão constitutiva da GFP, ou seja, a expressão dos plasmídeos que se integraram no genoma da célula. Como tal, estes resultados sugerem que, embora a transfeção por CaPO_4 permita a entrada de um maior número de plasmídeos na célula, esta não se traduz necessariamente numa maior integração de cópias no genoma. Estas observações estão de acordo com o trabalho descrito em 1987 por Chen et al em que se verificou que uma elevada eficiência de transfeção não se traduziu num maior número de cópias integradas no genoma (Chen e Okayama, 1987).

Como já referido atrás, os clones resultantes da transfeção por eletroporação apresentavam elevada intensidade de fluorescência. No entanto, não foi possível no âmbito desta tese determinar se a elevada intensidade de fluorescência de um clone se deve à presença de uma cópia do plasmídeo, com elevada

expressão, ou se se deve à expressão de várias cópias deste. Para realizar a troca de *cassette* é necessário selecionar um clone que possua apenas uma cópia do plasmídeo *tagging* de modo a evitar reações imprevisíveis e rearranjos genómicos (Qiao et al., 2009). Para proceder à deteção do número de cópias realizou-se um Southern Blot. Esta técnica permite a deteção do número de cópias da *cassette* presente no genoma através da utilização de uma sonda específica para a *cassette*. A sonda utilizada neste trabalho era específica para o gene *neo* presente na *cassette tagging*. Apesar de se terem testado diversas condições, não foi possível determinar o número de cópias do plasmídeo integradas no genoma, uma vez que não se conseguiu detetar a sonda no genoma dos clones. Apenas foi possível detetar duas bandas no controlo positivo, plasmídeo de onde foi produzida a sonda digerido com uma enzima que lineariza o plasmídeo. Estas duas bandas poderão corresponder a plasmídeo digerido e não digerido, indicando que a sonda está funcional. Deste modo, a causa para a fraca deteção de bandas poderá ser a ineficiente transferência do DNA do gel para a membrana. Uma vez que, no final da transferência, após incubação com *Gel Red*, é possível observar uma grande quantidade de DNA no gel.

Embora não tenha sido possível determinar o número de cópias do plasmídeo *tagging* presentes nos clones, procedeu-se à troca de *cassette*. Para tal, construiu-se um plasmídeo *targeting* (pTarLoxP-E1E2) que possui o gene que codifica as glicoproteínas de envelope do HCV e possui o codão de iniciação da tradução que permitirá a expressão do gene de resistência *dpuro* presente nas células. Esta marca de resistência foi utilizada para selecionar as células após se ter realizado a co-transfecção por CaPO_4 do plasmídeo *targeting* e do plasmídeo que codifica a enzima Cre recombinase. No entanto, após 15 dias de seleção nenhuma célula sobreviveu o que pode significar que não ocorreu troca de *cassette*. Em simultâneo construiu-se outro plasmídeo *targeting* para troca com a *cassette* já presente e caracterizada nas linhas celulares 293CeB11 e 293ceB22 e que, como tal, já se sabe que possui apenas uma cópia integrada no genoma. Procedeu-se à co-transfecção com o plasmídeo pTAR-E1E2 e com o plasmídeo que codifica a enzima Flipase, a transfecção ocorreu através do mesmo método e segundo as mesmas condições da troca de *cassette* anterior. Após a transfecção, a seleção foi efetuada através da marca de resistência neomicina, sendo a sua expressão restabelecida pelo codão ATG presente no plasmídeo *targeting*. A troca de *cassette* foi eficiente em algumas células tendo-se obtido 11 clones. O facto de a troca de *cassette* ter sido eficiente em apenas uma das *cassettes* pode ser reflexo da *cassette* mediada pela Flipase já se encontrar caracterizada, estando já descritas quais as condições necessárias para uma eficiente troca de *cassette* (Coroadinha et al., 2006). Por outro lado, o protocolo para realizar a troca mediada pela enzima Cre recombinase ainda não se encontra otimizado para a linha celular utilizada. Para que as enzimas Cre e Flipase sejam eficientes é necessária utilizar uma elevada concentração dos plasmídeos que codificam as enzimas, o que no caso da enzima Cre desencadeia atividade endonucleolítica e, por conseguinte, toxicidade celular (Turan et al., 2011), podendo ser esta uma das razões da ineficiente troca de *cassette*.

Após a troca de *cassette* mediada pela Flipase procedeu-se à análise de alguns dos clones obtidos de modo a confirmar se ocorreu troca. Para tal, procedeu-se à deteção da expressão do gene LacZ, inicialmente através incubação com X-gal, substrato da β -galactosidase (enzima codificada pelo lacZ), que ao ser degradado confere cor azul às células, e em seguida por Western Blot através da incubação com anticorpo anti- β -galactosidase. Em ambos os casos verificou-se a ausência da expressão de LacZ após a troca de *cassette*. Contudo, este resultado pode ser simplesmente devido à excisão da *cassette tagging*, pois a presença da enzima (Flipase) promove igualmente a excisão e a troca de *cassette* (Turan et al 2011). Sendo assim, realizou-se Western Blot com anticorpos anti-E1 e anti-E2 de modo a detetar a expressão dos epítomos do HCV. A sua deteção e a resistência das células ao G418 sugerem que ocorreu uma eficiente troca de *cassette*.

4.3. Trabalho Futuro

Futuramente como continuação deste trabalho pretende-se determinar o número de cópias de pTagLoxP_eGFPZeo integradas no genoma das células e otimizar as condições de troca de *cassette* para o sistema Cre-Lox.

Após determinado o número de cópias de pTagLoxP_eGFPZeo e otimizadas as condições de troca pretende-se realizar um novo ensaio de troca de *cassette* mediado pela enzima Cre de modo a produzir rVLPs e comprovar a expressão de E1 e E2 nestas.

É igualmente pretendido comparar os dois sistemas de troca e a expressão nos dois locus cromossomais, da *cassette* para a troca com a Flipase e com a Cre.

Por fim, uma vez obtidas as rVLPs pseudotipadas com os epítomos do HCV, pretende-se avaliar o seu perfil imunológico de modo a determinar o seu potencial como possível vacina.

5. Bibliografia

- Albert, H., Dale, E.C., Lee, E. e Ow, D.W. 1995. Site-specific integration of DNA into wild-type and mutant lox sites placed in the plant genome. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 7: 649-59
- Andrawiss, M., Takeuchi, Y., Hewlett, L. e Collins, M. 2003. Murine leukemia virus particle assembly quantitated by fluorescence microscopy: role of Gag-Gag interactions and membrane association. *Journal of virology* 77: 11651-60
- Araki, K., Araki, M. e Yamamura, K. 1997. Targeted integration of DNA using mutant lox sites in embryonic stem cells. *Nucleic acids research* 25: 868-72
- Barnes, E., Folgori, A., Capone, S., Swadling, L., Aston, S., et al. 2012. Novel adenovirus-based vaccines induce broad and sustained T cell responses to HCV in man. *Science translational medicine* 4: 115ra1
- Bartosch, B., Dubuisson, J. e Cosse, F.L. 2003. Infectious hepatitis C virus pseudo-particles containing functional E1-E2 envelope protein complexes. *The Journal of experimental medicine* 197: 633-42
- Berkowitz, R., Fisher, J. e Goff, SP. 1996. RNA packaging. *Current topics in microbiology and immunology* 214: 177-218
- Bode, J., Schlake, T., Iber, M., Schubeler, D., Seibler, J., et al. 2000. The transgeneticist's toolbox: novel methods for the targeted modification of eukaryotic genomes. *Biological chemistry* 381: 801-13
- Bouchard, M.J. e Navas-Martin, S. 2011. Hepatitis B and C virus hepatocarcinogenesis: lessons learned and future challenges. *Cancer letters* 305: 123-43
- Bridge, A.J., Pebernard, S., Ducraux, A., Nicoulaz, A.L. e Iggo, R. 2003. Induction of an interferon response by RNAi vectors in mammalian cells. *Nature genetics* 34: 263-4
- Carter, J.B. e Saunders, V.A. 2007. *Virology: Principles and Applications*. Liverpool John Moores University, UK
- Cepko, C.L., Roberts, B.E. e Mulligan, R.C. 1984. Construction and applications of a highly transmissible murine retrovirus shuttle vector. *Cell* 37: 1053-62
- Chen, C. e Okayama, H. 1987. High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA. *Molecular and cellular biology* 7: 2745-52
- Choo, Q.L., Kuo, G., Weiner, A.J., Overby, L.R., Bradley, D.W. e Houghton, M. 1989. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 244: 359-62
- Chu, G., Hayakawa, H. e Berg, P. 1987. Electroporation for the efficient transfection of mammalian cells with DNA. *Nucleic acids research* 15: 1311-26
- Codina, J., Li, J., Dubose, T.D., Jr. 2005. CD63 interacts with the carboxy terminus of the colonic H⁺-K⁺-ATPase to decrease [corrected] plasma membrane localization and 86Rb⁺ uptake. *American journal of physiology. Cell physiology* 288: C1279-86

- Cone, R.D. e Mulligan, R.C. 1984. High-efficiency gene transfer into mammalian cells: generation of helper-free recombinant retrovirus with broad mammalian host range. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 81: 6349-53
- Coroadinha, A.S., Schucht, R., Gama-Norton, L., Wirth, D., Hauser, H. e Carrondo, M.J. 2006. The use of recombinase mediated cassette exchange in retroviral vector producer cell lines: predictability and efficiency by transgene exchange. *Journal of biotechnology* 124: 457-68
- Cosset, F.L., Takeuchi, Y., Battini, J.L., Weiss, R.A. e Collins, M.K. 1995. High-titer packaging cells producing recombinant retroviruses resistant to human serum. *Journal of virology* 69: 7430-6
- Dalba, C., Bellier, B., Kasahara, N. e Klatzmann, D. 2007. Replication-competent vectors and empty virus-like particles: new retroviral vector designs for cancer gene therapy or vaccines. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 15: 457-66
- Dumay-Odelot, H., Durrieu-Gaillard, S., Da Silva, D., Roeder, R.G. e Teichmann, M. 2010. Cell growth- and differentiation-dependent regulation of RNA polymerase III transcription. *Cell Cycle* 9: 3687-99
- Feinstone, S.M., Kapikian, A.Z., Purcell, R.H., Alter, H.J. e Holland P.V. 1975. Transfusion-associated hepatitis not due to viral hepatitis type A or B. *The New England journal of medicine* 292: 767-70
- Fish, R.J. e Kruithof, E.K. 2004. Short-term cytotoxic effects and long-term instability of RNAi delivered using lentiviral vectors. *BMC molecular biology* 5: 9
- Garrone, P., Fluckiger, A.C., Mangeot, P.E., Gauthier, E., Dupeyrot-Lacas, P., et al. 2011. A prime-boost strategy using virus-like particles pseudotyped for HCV proteins triggers broadly neutralizing antibodies in macaques. *Science translational medicine* 3: 94ra71
- Gene Therapy clinical Trials Worldwide, provided by the Journal of Gene Medicine, Versão 12 Setembro 2012, (<http://www.wiley.com/legacy/wileychi/genmed/clinical>)
- Goncalves, M.A., 2005. A concise peer into the background, initial thoughts and practices of human gene therapy. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 27: 506-17
- Harro, C.D., Pang, Y.Y., Roden, R.B., Hildesheim, A., Wang, Z., et al. 2001. Safety and immunogenicity trial in adult volunteers of a human papillomavirus 16 L1 virus-like particle vaccine. *Journal of the National Cancer Institute* 93: 284-92
- Hoess, R.H., Wierzbicki, A. e Abremski K. 1986. The role of the loxP spacer region in P1 site-specific recombination. *Nucleic acids research* 14: 2287-300
- Hoess, R.H., Ziese, M. e Sternberg N. 1982. P1 site-specific recombination: nucleotide sequence of the recombining sites. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 79: 3398-402
- Hoofnagle, J.H. 1997. Hepatitis C: the clinical spectrum of disease. *Hepatology* 26: 15S-20S

- Hu, W.S. e Pathak VK. 2000. Design of retroviral vectors and helper cells for gene therapy. *Pharmacological reviews* 52: 493-511
- Huret, C., Desjardins, D., Miyalou, M., Levacher, B., Amadouji, Zin M., et al. 2012. Recombinant retrovirus-derived virus-like particle-based vaccines induce hepatitis C virus-specific cellular and neutralizing immune responses in mice. *Vaccine*
- Jones, I.M., Chan-Fook, C., Jiang, W.R. e Clarke, B.E. 2000. Receptors for hepatitis C virus. *Journal of virology* 74: 10860-1
- Jung, K.K., Liu, X.W., Chirco, R., Fridman, R. e Kim, H.R. 2006. Identification of CD63 as a tissue inhibitor of metalloproteinase-1 interacting cell surface protein. *The EMBO journal* 25: 3934-42
- Kallquist, L., Hansson, M., Persson, A.M., Janssen, H., Calafat, J., et al. 2008. The tetraspanin CD63 is involved in granule targeting of neutrophil elastase. *Blood* 112: 3444-54
- Kim, S.S., Garg, H., Joshi, A. e Manjunath, N. 2009. Strategies for targeted nonviral delivery of siRNAs in vivo. *Trends in molecular medicine* 15: 491-500
- Langer, S.J., Ghafoori, A.P., Byrd, M. e Leinwand, L. 2002. A genetic screen identifies novel non-compatible loxP sites. *Nucleic acids research* 30: 3067-77
- Lechner, F., Jegerlehner, A., Tissot, A.C., Maurer, P., Sebbel, P., et al. 2002. Virus-like particles as a modular system for novel vaccines. *Intervirology* 45: 212-7
- Leung, R.K. e Whittaker, P.A. 2005. RNA interference: from gene silencing to gene-specific therapeutics. *Pharmacology & therapeutics* 107: 222-39
- Lindenbach, B.D. e Rice, C.M. 2005. Unravelling hepatitis C virus replication from genome to function. *Nature* 436: 933-8
- Lloyd, A.M. e Davis, R.W. 1994. Functional expression of the yeast FLP/FRT site-specific recombination system in *Nicotiana tabacum*. *Molecular & general genetics : MGG* 242: 653-7
- Ludwig, C. e Wagner, R. 2007. Virus-like particles-universal molecular toolboxes. *Current opinion in biotechnology* 18: 537-45
- Lyznik, L.A., Rao, K.V. e Hodges, T.K. 1996. FLP-mediated recombination of FRT sites in the maize genome. *Nucleic acids research* 24: 3784-9
- Masciopinto, F., Freer, G., Burgio, V.L., Levy, S., Galli-Stampino, L., et al. 2002. Expression of human CD81 in transgenic mice does not confer susceptibility to hepatitis C virus infection. *Virology* 304: 187-96
- Miller, A.D. e Buttimore, C. 1986. Redesign of retrovirus packaging cell lines to avoid recombination leading to helper virus production. *Molecular and cellular biology* 6: 2895-902
- Miller, A.D. e Rosman, G.J. 1989. Improved retroviral vectors for gene transfer and expression. *BioTechniques* 7: 980-2, 84-6, 89-90

- Mittal, V. 2004. Improving the efficiency of RNA interference in mammals. *Nature reviews. Genetics* 5: 355-65
- Moingeon, P., Haensler, J. e Lindberg, A. 2001. Towards the rational design of Th1 adjuvants. *Vaccine* 19: 4363-72
- Murata, K., Lechmann, M., Qiao, M., Gunji, T., Alter, H.J. e Liang, T.J. 2003. Immunization with hepatitis C virus-like particles protects mice from recombinant hepatitis C virus-vaccinia infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100: 6753-8
- Noad, R. e Roy, P. 2003. Virus-like particles as immunogens. *Trends in microbiology* 11: 438-44
- O'Gorman, S. Fox, D.T. e Wahl, G.M. 1991. Recombinase-mediated gene activation and site-specific integration in mammalian cells. *Science* 251: 1351-5
- Palu, G., Parolin, C., Takeuchi, Y. e Pizzato, M. 2000. Progress with retroviral gene vectors. *Reviews in medical virology* 10: 185-202
- Parks, A.L., Cook, K.R., Belvin, M., Dompe, N.A., Fawcett, R., et al. 2004. Systematic generation of high-resolution deletion coverage of the *Drosophila melanogaster* genome. *Nature genetics* 36: 288-92
- Petersen, S.H., Odintsova, E., Haigh, T.A., Rickinson, A.B., Taylor, G.S. e Berditchevski, F. 2011. The role of tetraspanin CD63 in antigen presentation via MHC class II. *European journal of immunology* 41: 2556-61
- Pols, M.S. e Klumperman, J. 2009. Trafficking and function of the tetraspanin CD63. *Experimental cell research* 315: 1584-92
- Qiao, J., Oumard, A., Wegloehner, W. e Bode, J. 2009. Novel tag-and-exchange (RMCE) strategies generate master cell clones with predictable and stable transgene expression properties. *Journal of molecular biology* 390: 579-94
- Radhakrishnan, P., Srivastava V. 2005. Utility of the FLP-FRT recombination system for genetic manipulation of rice. *Plant cell reports* 23: 721-6
- Rodrigues, A.F., Guerreiro, M.R., Santiago, V.M., Dalba, C., Klatzmann, D., et al. 2011. Down-regulation of CD81 in human cells producing retroviral based particles: Tailoring vector composition. *Biotechnology and bioengineering* 108: 2623-33
- Sandrin, V., Muriaux, D., Darlix, J.L. e Cosset, F.L. 2004. Intracellular trafficking of Gag and Env proteins and their interactions modulate pseudotyping of retroviruses. *Journal of virology* 78: 7153-64
- Sandy, P., Ventura, A. e Jacks, T. 2005. Mammalian RNAi: a practical guide. *BioTechniques* 39: 215-24
- Sauer, B. 2002. Cre/lox: one more step in the taming of the genome. *Endocrine* 19: 221-8

- Schirmbeck, R., Bohm, W. e Reimann, J. 1996. Virus-like particles induce MHC class I-restricted T-cell responses. Lessons learned from the hepatitis B small surface antigen. *Intervirology* 39: 111-9
- Schlake, T. e Bode, J. 1994. Use of mutated FLP recognition target (FRT) sites for the exchange of expression cassettes at defined chromosomal loci. *Biochemistry* 33: 12746-51
- Schucht, R., Coroadinha, A.S., Zanta-Boussif, M.A., Verhoeyen, E., Carrondo, M.J., et al. 2006. A new generation of retroviral producer cells: predictable and stable virus production by FLP-mediated site-specific integration of retroviral vectors. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 14: 285-92
- Segura, M.M., Garnier, A, Di Falco, M.R., Whissell, G., Meneses-Acosta, A., et al. 2008. Identification of host proteins associated with retroviral vector particles by proteomic analysis of highly purified vector preparations. *Journal of virology* 82: 1107-17
- Shan, G. 2010. RNA interference as a gene knockdown technique. *The international journal of biochemistry & cell biology* 42: 1243-51
- Simmonds, P., Bukh, J., Combet, C., Deleage, G., Enomoto, N., et al. 2005. Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology* 42: 962-73
- Simmonds, P., Holmes, E.C., Cha, T.A., Chan, S.W., McOmish, F., et al. 1993. Classification of hepatitis C virus into six major genotypes and a series of subtypes by phylogenetic analysis of the NS-5 region. *The Journal of general virology* 74 (Pt 11): 2391-9
- Singh, M. e O'Hagan, D. 1999. Advances in vaccine adjuvants. *Nature biotechnology* 17: 1075-81
- Stuhlmann, H., Cone, R., Mulligan, R.C. e Jaenisch, R. 1984. Introduction of a selectable gene into different animal tissue by a retrovirus recombinant vector. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 81: 7151-5
- Tan, S.L., Pause, A., Shi, Y. e Sonenberg, N. 2002. Hepatitis C therapeutics: current status and emerging strategies. *Nature reviews. Drug discovery* 1: 867-81
- Tan, S.L. 2006. Hepatitis C Viruses: Genomes and Molecular Biology. Horizon Bioscience. Norfolk (UK)
- Tang, H. e Grise, H. 2009. Cellular and molecular biology of HCV infection and hepatitis. *Clin Sci (Lond)* 117: 49-65
- Theodosiou, N.A. e Xu, T. 1998. Use of FLP/FRT system to study Drosophila development. *Methods* 14: 355-65
- Turan, S., Galla, M., Ernst, E., Qiao, J., Voelkel, C., et al. 2011. Recombinase-mediated cassette exchange (RMCE): traditional concepts and current challenges. *Journal of molecular biology* 407: 193-221
- Verma, I.M. e Weitzman, M.D. 2005. Gene therapy: twenty-first century medicine. *Annual review of biochemistry* 74: 711-38

- Whitehead, K.A., Langer, R. e Anderson, D.G. 2009. Knocking down barriers: advances in siRNA delivery. *Nature reviews. Drug discovery* 8: 129-38
- Willems, M., Metselaar, H.J., Tilanus, H.W., Schalm, S.W. e de Man, R.A. 2002. Liver transplantation and hepatitis C. *Transplant international : official journal of the European Society for Organ Transplantation* 15: 61-72
- Wirth, D., Gama-Norton, L., Riemer, P., Sandhu, U., Schucht, R. e Hauser, H. 2007. Road to precision: recombinase-based targeting technologies for genome engineering. *Current opinion in biotechnology* 18: 411-9
- Yu, C.I. e Chiang, B.L. 2010. A new insight into hepatitis C vaccine development. *Journal of biomedicine & biotechnology* 2010: 548280

Anexo I

Sequência do cDNA da proteína humana CD63 (variante 1)

Referência da sequência no NCBI: NM_001780.4

```
CAGCTGTTACCGCGTCACATGAGGGAGGCCGGCGGCCACTCGGCCGGGGAGGGGACCGTGGCTGGAGCCC
GGGGCGGGGCCGCGCGGCAGGCCGGGGCGGGAGCCGGGGGGCGCAGCTAGAGAGCCCCGGAGCCGCGGCCG
GAGAGGAACGCGCAGCCAGCCTTGGGAAGCCCAGGCCCGGCAGCCATGGCGGTGGAAGGAGGAATGAAAT
GTGTGAAGTTCTTGCTCTACGTCCCTCCTGCTGGCCTTTTGCGCCTGTGCAGTGGGACTGATTGCCGTGGG
TGTCGGGGCACAGCTTGTCTGAGTCAGACCATAATCCAGGGGGCTACCCCTGGCTCTCTGTTGCCAGTG
GTCATCATCGCAGTGGGTGTCTTCCCTCCTCCTGGTGGCTTTTGTGGGCTGCTGCGGGGCCTGCAAGGAGA
ACTATTGTCTTA TGATCACGTTTGCCATCTTTCTGTCTCTTATCATGTTGGTGGAGGTGGCCGCAGCCAT
TGCTGGCTATGTGTTTAGAGAT AAGGTGATGTGCAGAGTTTAATAACAACCTCCGGCAGCAGATGGAGAAT
TACCCGAAAAACAACCCACACTGCTTCGATCCTGGACAGGATGCAGGCAGATTTTAAGTGTGTGGGGCTG
CTAACTACACAGATTGGGAGAAAAATCCCTTCCATGTCGAAGAACCGAGTCCCCGACTCCTGCTGCATTAA
TGTTACTGTGGGCTGTGGGATTAATTTCAACGAGAA GGCGATCCATAAGGAGGGCTGTGTGGAGAAGATT
GGGGGCTGGCTGAGGAAAAATGTGCTGGTGGTAGCTGCAGCAGCCCTTGGAAATTGCTTTTGTGCGAGGTTT
TGGAATTGTCTTTGCCTGCTGCCTCGTGAAGAGTATCAGAA GTGGCTACGAGGTGATGTAGGGGTCTGG
TCTCCTCAGCCTCCTCATCTGGGGGAGTGGAATAGTATCCTCCAGGTTTTTCAATTAAACGGATTATTTT
TTCAGACCGAAAAGAGATGGTCTGAGTTTGTCTTAGAAAAA
```

Sequência do cDNA da proteína humana CD63 (variante 2)

Referência da sequência no NCBI: NM_001040034.1

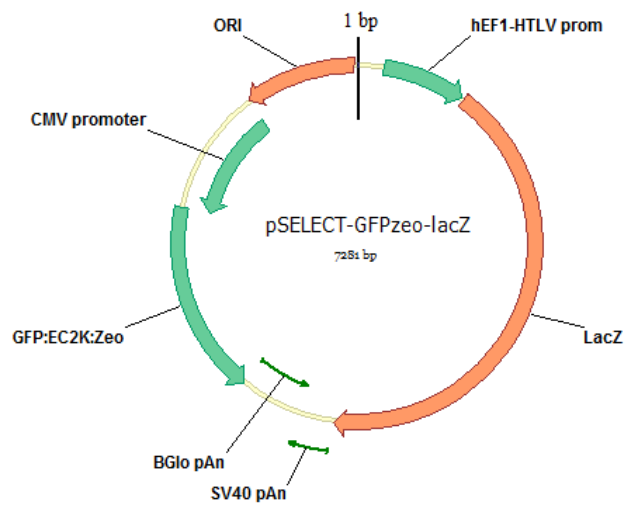
```
CAGCTGTTACCGCGTCACATGAGGGAGGCCGGCGGCCACTCGGCCGGGGAGGGGACCGTGGCTGGAGCCC
GGGGCGGGGCCGCGCGGCAGGCCGGGGCGGGAGCCGGGGGGCGCAGCTAGAGAGCCCCGGAGCCGCGGCCG
GAGAGGAACGCGCAGCCAGCCTTGGGAAGCCCAGGCCCGGCAGCCATGGCGGTGGAAGGAGGAATGAAAT
GTGTGAAGTTCTTGCTCTACGTCCCTCCTGCTGGCCTTTTGCGCCTGTGCAGTGGGACTGATTGCCGTGGG
TGTCGGGGCACAGCTTGTCTGAGTCAGACCATAATCCAGGGGGCTACCCCTGGCTCTCTGTTGCCAGTG
GTCATCATCGCAGTGGGTGTCTTCCCTCCTCCTGGTGGCTTTTGTGGGCTGCTGCGGGGCCTGCAAGGAGA
ACTATTGTCTTA TGATCACGTTTGCCATCTTTCTGTCTCTTATCATGTTGGTGGAGGTGGCCGCAGCCAT
TGCTGGCTATGTGTTTAGAGAT AAGGTGATGTGCAGAGTTTAATAACAACCTCCGGCAGCAGATGGAGAAT
TACCCGAAAAACAACCCACACTGCTTCGATCCTGGACAGGATGCAGGCAGATTTTAAGTGTGTGGGGCTG
CTAACTACACAGATTGGGAGAAAAATCCCTTCCATGTCGAAGAACCGAGTCCCCGACTCCTGCTGCATTAA
TGTTACTGTGGGCTGTGGGATTAATTTCAACGAGAA GGCGATCCATAAGGAGGGCTGTGTGGAGAAGATT
GGGGGCTGGCTGAGGAAAAATGTGCTGGTGGTAGCTGCAGCAGCCCTTGGAAATTGCTTTTGTTTGGGAA
TTGTCTTTGCCTGCTGCCTCGTGAAGAGTATCAGAA GTGGCTACGAGGTGATGTAGGGGTCTGGTCTCCT
CAGCCTCCTCATCTGGGGGAGTGGAATAGTATCCTCCAGGTTTTTCAATTAAACGGATTATTTTTCAGA
CCGAAAAGAGATGGTCTGAGTTTGTCTTAGAAAAA
```

Sequências alvo utilizadas para o silenciamento da proteína CD63.

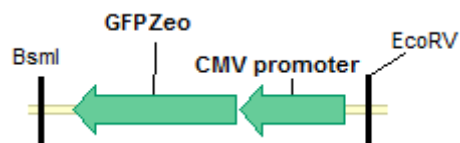
Nome	Sequência alvo
TRCN0000007849 (TRC49)	GCTGGCTATGTGTTTAGAGAT
TRCN0000007850 (TRC50)	GCCTCGTGAAGAGTATCAGAA
TRCN0000007851 (TRC51)	GCAAGGAGAACTATTGTCTTA
TRCN0000007852 (TRC52)	GCAGATGGAGAATTACCCGAA
TRCN0000007853 (TRC53)	TGGGATTAATTTCAACGAGAA

Anexo II

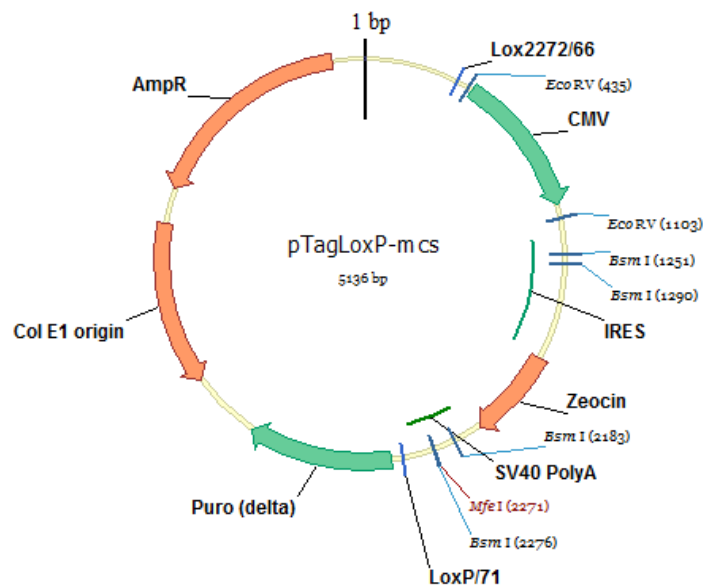
Plasmídeo pSELECT-GFPZeo-LacZ



Sequência amplificada do plasmídeo pSELECT-GFPZeo-LacZ com indicação das enzimas de restrição inseridas por PCR (inserto GFPZeo).

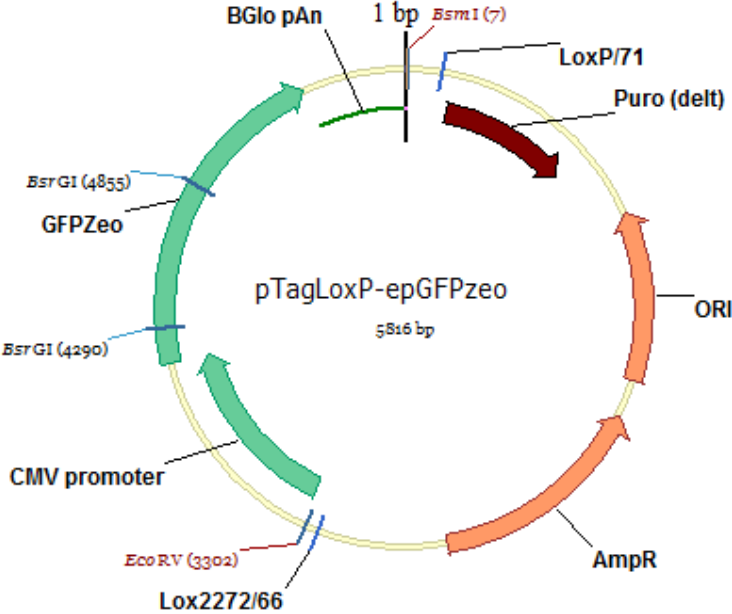


Plasmídeo pTagLoxP-mcs (vetor)



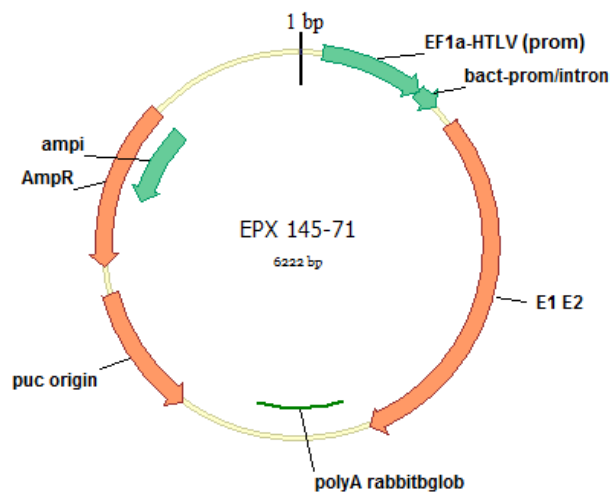
Anexo III

Plasmídeo pTagLoxP-epGFPZeo (Tagging)

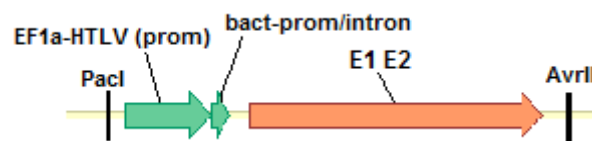


Anexo IV

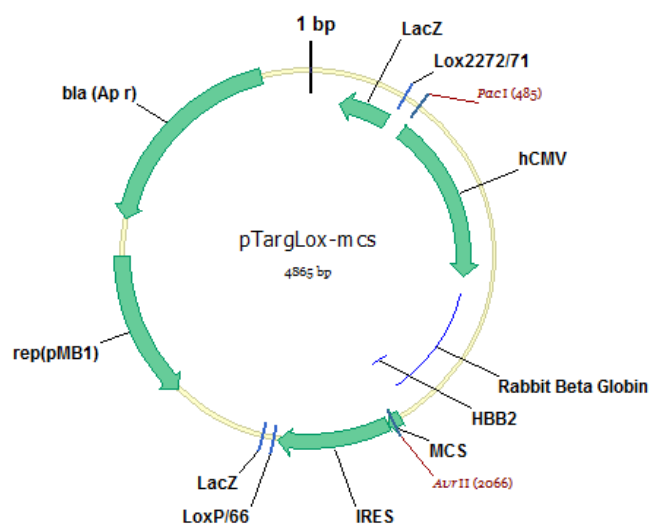
Plasmídeo pEPX 145-71



Sequência amplificada do plasmídeo pEPX 145-71 com indicação das enzimas de restrição inseridas por PCR (inserto E1E2).

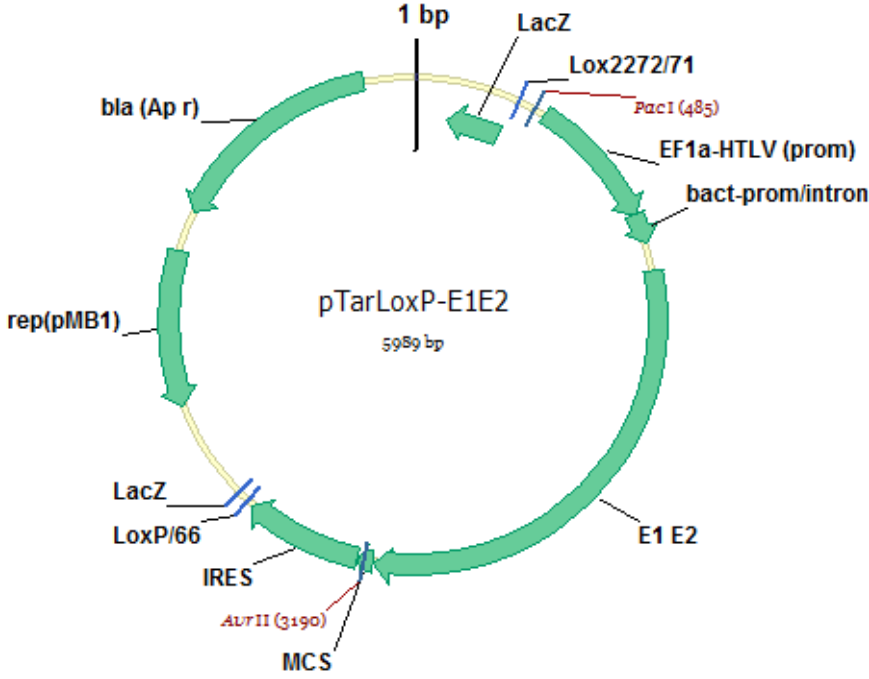


Plasmídeo pTarLoxP-mcs (vetor)



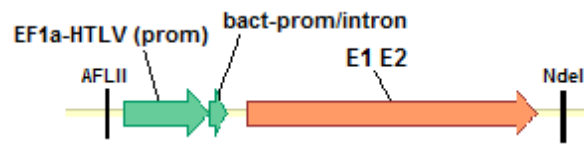
Anexo V

Plasmídeo pTarLoxP-E1E2 (Targeting)

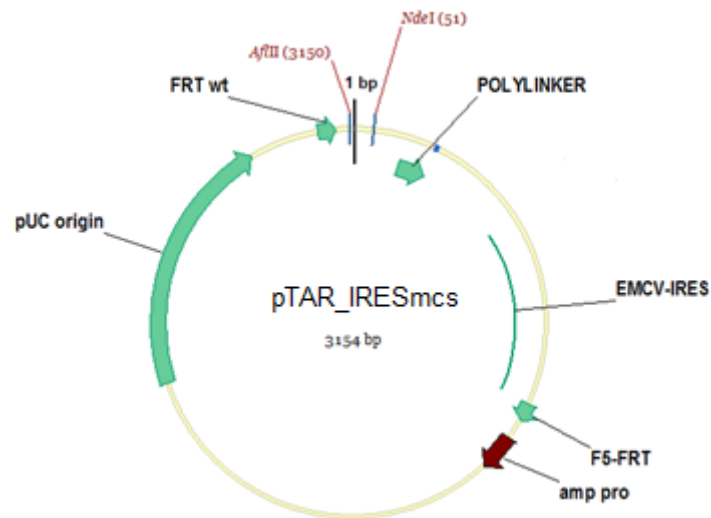


Anexo VI

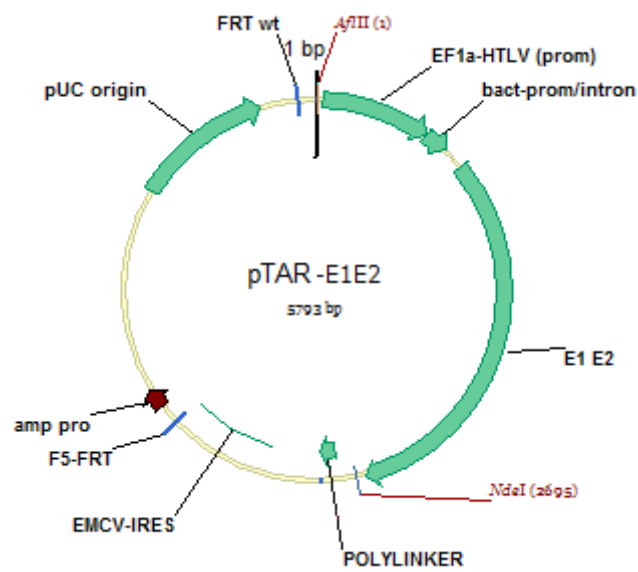
Sequência amplificada do plasmídeo pEPX 145-71 com indicação das enzimas de restrição inseridas por PCR (inserto E1E2).



Plasmídeo pTAR_IRESmcs (vetor)



Plasmídeo pTAR-E1E2 (Targeting)

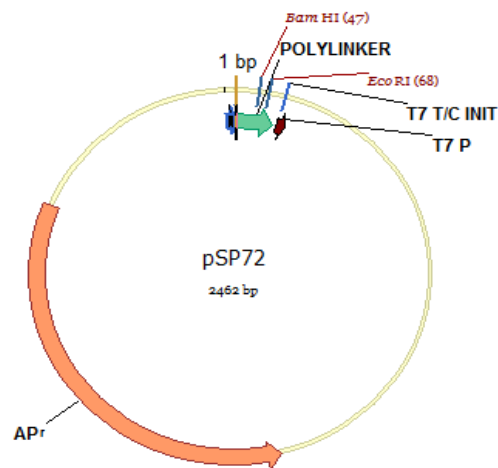


Anexo VII

Sequência amplificada do plasmídeo pTagLoxP-epGFPZeo com indicação das enzimas de restrição inseridas por PCR (inserto dpuro).



Plasmídeo pSP72 (vetor)



Plasmídeo pSP72-dpuro

