

Expressão do fator de crescimento semelhante à insulina-1 de camundongo (mIGF-1) em células HEK293 utilizando diferentes vetores de expressão

Valentina Andreatta Dutton e Cibele Nunes Peroni
Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN

INTRODUÇÃO

Um possível tratamento para deficiência de hormônio de crescimento seria a terapia gênica, que visa tratar e prevenir doenças, por meio da adição ou substituição de genes ou mudando seu padrão de expressão [1]. O fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1) é o principal efector do hormônio de crescimento (GH) e neste projeto foi realizada a construção de um vetor de expressão, contendo a região poli-A do gene de IGF-1 de camundongo (mIGF-1), com intuito de aumentar a eficiência de expressão do mRNA [2] e, conseqüentemente da proteína de interesse *in vitro* (células HEK293) e *in vivo* (camundongos anões).

OBJETIVO

Este trabalho teve como objetivo principal a construção de um vetor de expressão contendo a sequência de cDNA do gene mIGF-1 e sua região *downstream* (pUC-UBI-mIGF-1+3'), e determinar os níveis de expressão desta proteína em células HEK293 utilizando este vetor e de mais dois vetores: pcDNA3.4-mIGF-1 e pUC-UBI-mIGF-1.

METODOLOGIA

Para a obtenção da sequência *downstream* para a construção do plasmídeo pUC-UBI-mIGF-1+3' foi necessário encontrar o sinal de

poliadenilação. As sequências regulatórias associadas a esse sinal são essenciais para seu reconhecimento e para o processamento do pré-mRNA. Dessa maneira, foi selecionada a sequência *downstream* a ser inserida no vetor pUC-UBI-mIGF-1.

Os plasmídeos pUC-UBI-mIGF-1 e pcDNA3.4-Downstream (que continha a sequência *downstream* de interesse) foram digeridos com as enzimas EcoRI e NdeI e submetidos à eletroforese em gel de agarose e os fragmentos foram purificados. Os fragmentos do vetor e do inserto foram unidos utilizando a enzima T4 Ligase. O resultado da reação de ligase foi submetido a sequenciamento de Sanger.

Em seguida, os três vetores foram amplificados e está sendo realizada transfecção em células HEK293 aderidas.

RESULTADOS

Após a digestão dos vetores pUC-UBI-mIGF-1 e pcDNA3.4-Downstream com as enzimas EcoRI e NdeI foram obtidas 2 bandas de interesse, uma correspondente ao vetor (~ 6000 bp) e uma relativa ao inserto (~150 bp) (**Figura 1**). O resultado final da reação de ligase corresponde ao vetor pUC-UBI-mIGF-1+3' (**Figura 2**), que apresenta a sequência *downstream* contendo o sinal de poliA e seus elementos regulatórios. O sequenciamento confirmou que a

construção foi bem sucedida para dar prosseguimento às próximas etapas do projeto (**Figura 3**).

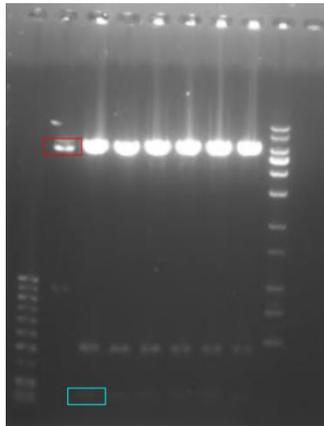


Figura 1 - Gel de agarose resultante da digestão dos plasmídeos pUC-UBI-miGF-1 e pcDNA3.4-Downstream com as enzimas de restrição EcoRI e NdeI, destacadas as bandas do vetor (~ 6000 bp, em vermelho) e do inserto (149 bp, em azul)

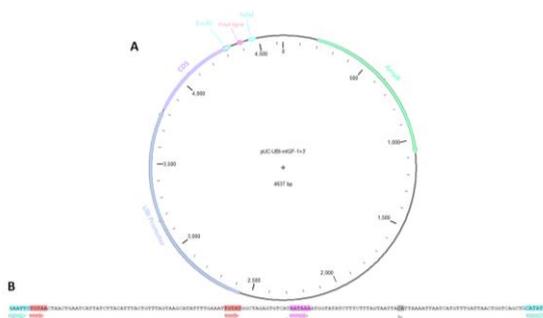


Figura 2 (direita) - A: vetor de expressão gênica pUC-UBI-miGF-1+3'; B: sequência downstream inserida entre os sítios de restrição para EcoRI e NdeI

```

10      20      30      40      50
ACACCCACGCA TCCCTTAATT CAGGCCTCCG GTCCTCGTGA GCCCTGATGG
60      70      80      90     100
CTGAGATCTC CAATAATTTA GAAAAGGAG GCTGCCGGTG AGGAAAGATT
110     120     130     140     150
GCTTGGCCCT CTTTAAAGG GGGGGAGCC CGCCATTGTT CGGATATCGC
160     170     180     190     200
TTTTGGGAT CCCGAAGCC TCCCAAGCCC TACTAAGAAA GTGGTCATAG
210     220     230     240     250
TTTTGAATAT TCCTCTGGCT TTGGCTTCGT CCTACCCGCT CTPCATCCCG
260     270     280     290     300
TCTGGGCAAC AAATCGGTTT GAACCACTCA CCGCCTTAC CCTCTCTTT
310     320     330     340     350
CATGG

```

Figura 3 - Sequenciamento de Sanger da CDS do gene de miGF-1 e da sequência downstream presentes no vetor pUC-UBI-miGF-1+3', resultado da reação de ligase

CONCLUSÕES

A partir da digestão dos plasmídeos, foram obtidos os fragmentos esperados relativos ao vetor e ao inserto. Após a reação de ligase, o sequenciamento confirmou a construção do vetor pUC-UBI-miGF-1+3'. Esses resultados permitirão a realização de um ensaio *in vitro* utilizando células HEK293 para confirmar a capacidade de expressão dos vetores e, posteriormente, um bioensaio em camundongos anões *lit/lit* para comparar as eficiências de expressão de cada um dos três vetores.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] Van Gaal, E.V.B. et al. Plasmid engineering for controlled and sustained gene expression for nonviral gene therapy. **Pharm. Res.**, v. 23, p. 1053-1074, 2006.

[2] Proudfoot, N.J. Ending the message: poly(A) signals then and now. **Genes Dev.**, v. 25, p. 1770-1782, 2011.

APOIO FINANCEIRO AO PROJETO

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)