

## **Projeto de Pesquisa**

**Desenvolvimento de uma plataforma lentiviral para silenciamento gênico induzível que apresenta alta flexibilidade de intercâmbio de cassetes de RNAi**

**Abril - 2011**

**Orientador**

**Marcio Chaim Bajgelman, PhD**

## Resumo

A tecnologia de interferência por RNA (RNAi) tem sido largamente utilizada em estudos de função gênica e protocolos de terapia gênica. Os algoritmos disponíveis atualmente permitem gerar moléculas de RNAi com alta especificidade e eficiência para reduzir a expressão de um gene alvo. O RNAi pode ser sintetizado quimicamente e introduzido na célula alvo para obter-se um silenciamento transitório, ou pode ser gerado na célula alvo por meio de um vetor, obtendo-se um silenciamento mais duradouro dependendo-se das características do vetor utilizado. Vetores baseados em retrovírus podem ser utilizados para transferir cassetes de RNAi para células alvo. Estes vetores se caracterizam por integrar-se no genoma da célula hospedeira, possibilitando a propagação do RNAi para a progênie celular. Neste projeto, pretendemos desenvolver uma plataforma de silenciamento gênico induzível, baseada em vetores retrovirais, que apresentem alta plasticidade para intercâmbio de cassetes de RNAi.

O desenvolvimento deste projeto abordará tópicos de biologia molecular, biotecnologia e microbiologia entre outros. O Aluno receberá treinamento de técnicas de clonagem, cultivo bacteriano, purificação de DNA plasmidial, cultura celular, transfecção, produção de retrovírus recombinantes e biossegurança.

## 1. Introdução e Justificativa para o desenvolvimento do projeto

O silenciamento de um gene de interesse permite estudar-se sua função e importância fenotípica, ou mesmo reduzir-se a sua expressão para níveis fisiológicos possibilitando-se a correção de uma patologia. O silenciamento gênico pode ser obtido pela utilização de RNA de interferência (RNAi), que é uma poderosa ferramenta em desenvolvimento há cerca de 10 anos.

Estudos realizados por Fire e Mello (Fire et al., 1998), utilizando-se o nematódeo *C.elegans*, demonstraram a possibilidade de reduzir a expressão de um gene de interesse utilizando-se moléculas de RNA dupla fita, em que uma das fitas apresenta seqüência complementar ao RNA mensageiro do gene alvo. Inicialmente, utilizaram-se extensas seqüências de RNA dupla fita, que comprovaram a factibilidade de silenciamento gênico em *C. elegans*, contudo esta tecnologia não apresentou bons resultados em células de organismos mais complexos, em que extensas seqüências de RNAi podem causar efeitos inespecíficos e ativação de resposta imune. Trabalhos posteriores, demonstraram que o tamanho da seqüência de RNAi pode ser reduzida para um dúplex de 21 pares de base, obtendo-se um silenciamento gênico consistente e específico em células de mamíferos (Elbashir et al., 2001).

O mecanismo de RNA de interferência envolve a formação de um complexo denominado RISC (complexo de silenciamento induzido por RNA) no qual ocorre o pareamento da seqüência do RNA mensageiro e a fita de RNA complementar do siRNA (denominada fita guia). A enzima Argonata catalisa a degradação do RNA mensageiro, mediando o silenciamento gênico.

A molécula de siRNA pode ser gerada por síntese química, utilizando-se métodos de transfecção como eletroporação ou associação à complexos lipofílicos para introdução em células alvo. Estes procedimentos podem apresentar alta eficiência in vitro, entretanto existem células que podem ser refratárias aos procedimentos de transfecção. Além disso, é interessante observar

que as metodologias que empregam a transfecção de moléculas de siRNA têm um efeito transitório associado à persistência e atividade da molécula de siRNA introduzidas na célula alvo.

O RNAi também pode ser veiculado por meio de um vetor de expressão (Paddison et al., 2002; Sui et al., 2002; Taxman et al., 2006). Para isso, a sequência complementar ao mRNA do gene alvo deve ser codificada a comando de um promotor de RNA polimerase III, gerando uma estrutura em forma de grampo de cabelo, denominada *hairpin*, com tamanho de cerca de 100 nucleotídeos. Esta estrutura é reconhecida pela enzima nuclear drosha, que processa o pré-shRNA (Small hairpin RNA). O pré-shRNA é exportado ao citoplasma e processado pela, pela enzima dicer gerando siRNA, de cerca de 21 pares de base, em que a fita guia complexará com a sequência complementar no mRNA que é clivado pela enzima argonata, desencadeando o silenciamento gênico. Dessa forma, as moléculas de siRNA podem ser geradas no meio intracelular, codificadas num vetor, possibilitando-se controlar sua taxa de transcrição (utilizando-se promotores induzíveis) e sua persistência na célula alvo (marcadores de seleção).

Além disso , o cassete de expressão do RNAi também pode ser introduzido num vetor viral, como adenovírus, adeno-associado ou retrovírus , aproveitando-se das características de tropismo e estabilidade relativa a estes vetores (Rubinson et al., 2003; Tomar, Matta, and Chaudhary, 2003).

Vetores lentivirais pertencem a família do retrovírus e se caracterizam por possibilitar a transdução a longo termo de células quiescentes ou em divisão (Naldini et al., 1996; Strauss et al., 2006). O lentivírus também tem sido utilizados para a geração de animais transgênicos transferindo-se cassetes de expressão para genes de interesse (Bressan et al., 2011; Ikawa et al., 2003),ou mesmo para promover o silenciamento gênico *vivo* (Tiscornia et al., 2003)e em animais transgênicos (Singer et al., 2006; Tiscornia et al., 2003).

A proposta deste projeto, consiste em desenvolver uma plataforma de shRNA em vetores lentivirais, que apresente uma alta plasticidade permitindo-se intercambiar diferentes cassetes de shRNA que poderão ser inseridos em vetores lentivirais por simples recombinação in vitro. Os vetores do sistema apresentarão um promotor quimérico induzível pelo antibiótico tetraciclina, de forma que a expressão do shRNA pode ser inibida na ausência do antibiótico, em células que possuam o componente repressor (tetR) do sistema (Gossen and Bujard, 1992; Yao et al., 1998). Na ausência de tetraciclina tetR liga-se ao promotor quimérico inibindo a transcrição. Na presença de tetraciclina, o antibiótico impede a ligação de tetR ao promotor, possibilitando-se a transcrição do RNA de interesse. Além disso, o vetor contendo o promotor quimérico também pode ser utilizado para expressar o shRNA de forma constitutiva, em células que não apresentem o componente inibitório tetR, na ausência de antibiótico.

O orientador deste projeto tem grande experiência com a manipulação, modificação e produção de vetores virais recombinantes derivados de retrovírus murino, lenvírus, adenovírus e adeno-associado (Bajgelman, Costanzi-Strauss, and Strauss, 2003; Bajgelman and Strauss, 2008; Merkel et al., 2010; Strauss and Costanzi-Strauss, 2004; Strauss et al., 2006), além de colaboração em projetos envolvendo o desenvolvimento de animais transgênicos (Bressan et al., 2011; Milazzotto et al., 2010) e experiência com RNAi (pós-doutorado na Universidade de Miami, Laboratório do Dr. Eli Gilboa).

O bom desempenho deste projeto somará novos recursos ao laboratório de vetores de transferência gênica que está sendo implantado, neste momento, no LNBio.

## **2. Objetivos e desenho experimental**

O alvo deste projeto consiste em estabelecer uma plataforma de shRNA baseada em vetores lentivirais que apresentem alta plasticidade de intercâmbio de cassetes de expressão. A expressão do shRNA pode ser induzida pela adição de antibiótico (tetraciclina) que se liga e inativa a proteína tetR, quando presente na célula alvo. A expressão do shRNA ocorrerá de forma constitutiva em células que não possuam ao inibidor tetR, independentemente da utilização de tetraciclina.

### **2.1 Construção de vetores plasmidiais**

Nesta etapa construiremos os vetores componentes do sistema, utilizando ferramentas de biologia molecular como enzimas de restrição, enzimas de modificação, técnicas de PCR entre outros, para clonar genes e promotores de interesse em vetores plasmidiais. O orientador já tem um acervo de vetores contendo a maioria dos cassetes necessários para as construções, incluindo o promotor induzível por tetraciclina e o cassete que codifica a proteína inibitória, vetores de sub-clonagem e vetores para gerar o lentivírus recombinante.

A plataforma para intercâmbio de shRNA é baseado na utilização do sistema Gateway, comercializado pela Invitrogen-EUA, que possibilita recombinação *in vitro*. Neste sistema, o cassete de interesse é inserido no vetor denominado pEntry, de forma a situar-se entre sítios de recombinação à montante e jusante. A seguir, o cassete inserido no vetor pEntry pode ser recombinado a um vetor mais complexo contendo os sítios de recombinação homóloga, denominado pDestiny. Assim, uma vez construído o vetor Lentiviral que possui os sítios de destino (pDestiny), podemos recombiná-lo com diferentes vetores pEntry para gerar as construções finais. O sistema também permite flexibilidade de recombinar os vetores pEntry com outros sistemas

virais que sejam modificados para funcionar com o sistema gateway. Inicialmente construiremos os seguintes vetores:

- pEntry-U6shGFP : apresentará o cassete do shRNA contra o gene repórter GFP (green fluorescent protein) a comando do promotor U6 induzível por tetraciclina ( o cassete já está inserido em outro vetor do acervo do orientador).

- pEntry-U6shLuc: apresentará o cassete do shRNA contra o gene repórter Luc (luciferase) a comando do promotor U6 induzível por tetraciclina ( o cassete já está inserido em outro vetor do acervo do orientador).

-pLenti-dest: vetor destino que contém os sítios de recombinação no esqueleto do plasmídio de transferência lentiviral FG12, que apresenta o gene repórter gfp, permitindo-se identificar as células que são transfectadas com a construção. Este vetor permite gerar a partícula lentiviral recombinante contendo o cassete de shRNA e o cassete de expressão do repórter GFP. O vetor FG12 está em fase de aquisição e poderá ser substituído por outro vetor, disponível em nosso acervo, caso necessário.

- pLenti-tetR-neo: o vetor apresentará o gene da proteína inibitória tetR à montante do cassete ires neomicina. Dessa forma, o vetor bicistrônico permitirá gerar partículas virais para viabilizar a seleção de linhagens celulares contendo a proteína inibitória tetR. O cassete CMV-tetR já está subclonado no acervo do orientador.

Após a construção, todos os vetores serão verificados por mapa de restrição, podendo-se seqüenciar alguns fragmentos.

## **2.2 Testes funcionais dos vetores construídos**

Todos os vetores do sistema poderão ser testados por meio de transfeção em cultura de células. Os vetores que codificam shRNA serão co-transfectados com os respectivos vetores alvo para mensurar a eficiência de silenciamento. Por exemplo, o vetor pEntry-U6shGFP poderá ser co-transfectado com um vetor de expressão do GFP para avaliar o efeito de RNAi. O vetor pEntry-shLuc pode ser usado como controle, pois não deve afetar a expressão de GFP. Num segundo momento, poderemos incluir o vetor LV-tetR-neo na co-transfecção, na presença e ausência de tetraciclina para verificar o silenciamento induzível por antibiótico.

## **2.3 Recombinação de pEntry e pLenti-dest.**

Efetuiremos a recombinação dos vetores pEntry-U6shGFP e pEntry-U6shLuc com o pLenti-dest, para gerar as construções finais utilizadas para produção de vírus. Estes plasmídios também poderão ser verificados por meio de ensaios transitórios, em co-transfecção com repórteres, conforme item 2.2.

## **2.4 Produção de preparações virais**

As preparações virais do pLenti-shGFP-Ires-GFP, pLenti-shLUC-IresGFP e pLenti-tetR-Neo serão produzidas de forma transitória e tituladas, conforme protocolos descritos em Bajgelman et al, 2003; Strauss et al, 2006.

## **2.5 Estabelecimento da linhagem 3t3-tetR-neo**

A linhagem NIH-3t3 será transduzida com a preparação viral Lenti-tetR-neo e selecionada com o antibiótico G418 (Gibco-EUA). O G418 é um análogo da neomicina, sendo que as células transduzidas com o vírus serão resistentes ao antibiótico. As células selecionadas poderão ser clonadas buscando uma população que espresse o gene tetR de forma eficiente e homogênea.

## **2.5 Ensaios com o vetor induzível Lenti-shGFP-IresGFP**

O vetor Lenti-shGFP-IresGFP codifica dois distintos cassetes de expressão, sendo o primeiro um cassete de shRNA induzível contra o repórter GFP. O segundo cassete de expressão codifica o gene repórter GFP a comando de um promotor constitutivo. Dessa forma, caso o vetor seja utilizado para transduzir a linhagem 3t3-tetR, a proteína repressora tetR ligar-se-á ao promotor induzível U6 do cassete de shRNA, inibindo shGFP e possibilitando a expressão de GFP. A expressão de GFP poderá ser inibida pela adição de tetraciclina ao meio de cultura. A tetraciclina liga-se à proteína repressora tetR, permitindo a expressão do shRNA contra o gene GFP. O vetor Lenti-shLuc-IresGFP poderá ser utilizado como controle, visto que a adição ou carenciamento de tetraciclina não deverá afetar a expressão do gene repórter.

### 3. Conclusão

Neste projeto planejamos construir uma nova plataforma de vetores para silenciamento gênico induzível por antibiótico. Os vetores apresentam um promotor quimérico que viabiliza o controle da expressão do cassete de RNAi em linhagens que apresentem a proteína repressora tetR. O vetor ainda apresenta a versatilidade de funcionar de forma constitutiva em linhagens que não expressem tetR. Outra vantagem da plataforma consiste em utilizar o sistema gateway para facilitar o intercâmbio de cassetes de RNAi. Dessa forma, também poderemos transferir cassetes de RNAi para diferentes vetores de nosso laboratório, dependendo-se da aplicação desejada. Tendo em vista que nosso grupo está inserido no Laboratório de desenvolvimento de transgênicos, os vetores desenvolvidos terão larga aplicabilidade. A exemplo de aplicações futuras, o setor de transgênicos poderá gerar animais que expressem tetR, animais que expressem shGFP-IresGFP, efetuar cruzamentos para gerar o duplo *Knockin*, obtendo-se o animal tetR/shGFP-IresGFP. Assim, considerando-se a alta meia vida do GFP, que simularia uma proteína de alta estabilidade, poderíamos adicionar tetraciclina na água de animais para padronizar a curva inibitória do RNAi in vivo, em função da indução pelo antibiótico. Além disso, estes animais também podem ser utilizados como animais controle para experimentos com outros cassetes de RNAi visando genes endógenos.

Assim, o desenvolvimento deste projeto, beneficiará o grupo de desenvolvimento de vetores de transferência gênica e RNAi e proverá ao aluno um treinamento de excelência em técnicas de biologia molecular, DNA recombinante e cultura celular, além de possibilitar a interação com o setor de produção de transgênicos.

#### 4. Referências Bibliográficas

- Bajgelman, M. C., Costanzi-Strauss, E., and Strauss, B. E. (2003). Exploration of critical parameters for transient retrovirus production. *J Biotechnol* **103**(2), 97-106.
- Bajgelman, M. C., and Strauss, B. E. (2008). Development of an adenoviral vector with robust expression driven by p53. *Virology* **371**(1), 8-13.
- Bressan, F. F., Dos Santos Miranda, M., Perecin, F., De Bem, T. H., Pereira, F. T., Russo-Carbolante, E. M., Alves, D., Strauss, B., Bajgelman, M., Krieger, J. E., Binelli, M., and Meirelles, F. V. (2011). Improved production of genetically modified fetuses with homogeneous transgene expression after transgene integration site analysis and recloning in cattle. *Cell Reprogram* **13**(1), 29-36.
- Elbashir, S. M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K., and Tuschl, T. (2001). Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* **411**(6836), 494-8.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E., and Mello, C. C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391**(6669), 806-11.
- Gossen, M., and Bujard, H. (1992). Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(12), 5547-51.
- Ikawa, M., Tanaka, N., Kao, W. W., and Verma, I. M. (2003). Generation of transgenic mice using lentiviral vectors: a novel preclinical assessment of lentiviral vectors for gene therapy. *Mol Ther* **8**(4), 666-73.
- Merkel, C. A., da Silva Soares, R. B., de Carvalho, A. C., Zanatta, D. B., Bajgelman, M. C., Fratini, P., Costanzi-Strauss, E., and Strauss, B. E. (2010). Activation of endogenous p53 by combined p19Arf gene transfer and nutlin-3 drug treatment modalities in the murine cell lines B16 and C6. *BMC Cancer* **10**, 316.
- Milazzotto, M. P., Goissis, M. D., Feitosa, W. B., Martins, L. F., Strauss, B. E., Bajgelman, M. C., Assumpcao, M. E., and Visintin, J. A. (2010). Myostatin gene knockdown through lentiviral-mediated delivery of shRNA for in vitro production of transgenic bovine embryos. *Zygote*, 1-6.
- Naldini, L., Blomer, U., Gage, F. H., Trono, D., and Verma, I. M. (1996). Efficient transfer, integration, and sustained long-term expression of the transgene in adult rat brains injected with a lentiviral vector. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(21), 11382-8.
- Paddison, P. J., Caudy, A. A., Bernstein, E., Hannon, G. J., and Conklin, D. S. (2002). Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells. *Genes Dev* **16**(8), 948-58.
- Rubinson, D. A., Dillon, C. P., Kwiatkowski, A. V., Sievers, C., Yang, L., Kopinja, J., Rooney, D. L., Zhang, M., Ihrig, M. M., McManus, M. T., Gertler, F. B., Scott, M. L., and Van Parijs, L. (2003). A lentivirus-based system to functionally silence genes in primary mammalian cells, stem cells and transgenic mice by RNA interference. *Nat Genet* **33**(3), 401-6.
- Singer, O., Tiscornia, G., Ikawa, M., and Verma, I. M. (2006). Rapid generation of knockdown transgenic mice by silencing lentiviral vectors. *Nat Protoc* **1**(1), 286-92.
- Strauss, B. E., and Costanzi-Strauss, E. (2004). pCLPG: a p53-driven retroviral system. *Virology* **321**(2), 165-72.
- Strauss, B. E., Patricio, J. R., de Carvalho, A. C., and Bajgelman, M. C. (2006). A lentiviral vector with expression controlled by E2F-1: a potential tool for the study and treatment of proliferative diseases. *Biochem Biophys Res Commun* **348**(4), 1411-8.

- Sui, G., Soohoo, C., Affar el, B., Gay, F., Shi, Y., Forrester, W. C., and Shi, Y. (2002). A DNA vector-based RNAi technology to suppress gene expression in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(8), 5515-20.
- Taxman, D. J., Livingstone, L. R., Zhang, J., Conti, B. J., Iocca, H. A., Williams, K. L., Lich, J. D., Ting, J. P., and Reed, W. (2006). Criteria for effective design, construction, and gene knockdown by shRNA vectors. *BMC Biotechnol* **6**, 7.
- Tiscornia, G., Singer, O., Ikawa, M., and Verma, I. M. (2003). A general method for gene knockdown in mice by using lentiviral vectors expressing small interfering RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(4), 1844-8.
- Tomar, R. S., Matta, H., and Chaudhary, P. M. (2003). Use of adeno-associated viral vector for delivery of small interfering RNA. *Oncogene* **22**(36), 5712-5.
- Yao, F., Svensjo, T., Winkler, T., Lu, M., Eriksson, C., and Eriksson, E. (1998). Tetracycline repressor, tetR, rather than the tetR-mammalian cell transcription factor fusion derivatives, regulates inducible gene expression in mammalian cells. *Hum Gene Ther* **9**(13), 1939-50.