



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE
SANTANA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**



ALINE MACHADO THOMAZ

**EXPRESSÃO DO RECEPTOR DE VITAMINA D
RECOMBINANTE: UM IMPORTANTE ALVO BIOLÓGICO**

Feira de Santana, BA
2013

ALINE MACHADO THOMAZ

**EXPRESSÃO DO RECEPTOR DE VITAMINA D
RECOMBINANTE: UM IMPORTANTE ALVO BIOLÓGICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, da Universidade Estadual de Feira de Santana, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof^a. Dra. Milena Botelho Pereira Soares
Co-orientador: Dra. Rejane Hughes Carvalho

Feira de Santana, BA
2013

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todas as pessoas que me apoiaram durante o mestrado e contribuíram para um período de muito aprendizado e dedicação, especialmente:

- a Deus, que sempre me iluminou e me deu forças em todos os momentos da minha vida;
- aos meus pais, pelo amor incondicional, companheirismo e apoio de sempre;
- aos meus irmãos, Hugo e Diogo, por estarem do meu lado, me incentivando e me enchendo de beijos;
- à Dra. Milena Botelho Pereira Soares, pela orientação e por ter me recebido no CBTC;
- ao Dr. Geraldo Gileno, por gentilmente proporcionar a realização de experimentos no LPBI e por todo acompanhamento e ensino neste período;
- a Cris, Bárbara, Lívia e Jéssica, colegas do LPBI que me ajudaram nos experimentos;
- a Silvana da Paz, da Plataforma Tecnológica de Sequenciamento de DNA – CPqGM/Fiocruz – RPT01B;
- aos colegas do CBTC, pelo convívio diário, em especial, a Rejane Hughes e Adriano Alcântara, pela incansável ajuda no desenvolvimento do trabalho;
- às amigas Gabi, Sissi, Carlinha, Lilian, Helena e Cris. Obrigada, meninas! Pela ajuda de sempre, por me ouvir e pela paciência;
- a Tanira e Alice, pelo incentivo, força e pela especial atenção, ainda que distante;
- ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia/UEFS, principalmente a Helton, por ser sempre solícito e prestativo ao resolver questões relacionadas à pós-graduação;
- à CAPES, pelo apoio financeiro;
- a todos que colaboraram direta ou indiretamente para esse trabalho; e
- a Marcel Mutim, por ter enfrentado todos os obstáculos comigo, sempre do meu lado, me incentivando e apoiando. Muito obrigada pelo companheirismo, atenção, dedicação, abdicção e paciência. Sem palavras para demonstrar o quanto você foi importante nessa fase da minha vida! Conseguimos, amor! “Juntos conseguiremos tudo!”

Obrigada!

“Descobrir o verdadeiro sentido das coisas
É querer saber demais
Querer saber demais”

O Teatro Mágico – Sonho de uma flauta

RESUMO

O receptor de vitamina D (VDR) é um fator de transcrição gênica citoplasmático e, quando ativado pelo seu ligante, transloca-se para o núcleo e interage com regiões promotoras no DNA com a qual apresenta afinidade, atuando como fator modulador da transcrição gênica e assim produzindo múltiplos efeitos biológicos. Suas principais atividades são a regulação e a manutenção dos níveis plasmáticos de cálcio e fósforo, e apresenta atividades imunomoduladoras, como a supressão da ativação de células T, formação de padrões de secreção de citocinas, a modulação da proliferação e interferência na apoptose. Sendo assim, esse receptor representa um importante alvo de drogas que pode contribuir na descoberta de novos fármacos com ação imunomoduladora. O presente trabalho teve, como objetivo, produzir o VDR recombinante na forma solúvel para a realização de futuros ensaios de triagem de potenciais drogas com ação imunomoduladora e estudos de interação droga-receptor. Para isso, foi utilizado, inicialmente, o sistema de expressão em *Escherichia coli*, utilizando o plasmídeo HS_VDR_EC1-PQE T7, porém só foi possível obter a proteína na fração insolúvel, mesmo variando a temperatura, o tempo de indução e a concentração de IPTG. Na tentativa de obter o VDR solúvel, foi utilizado um sistema de expressão eucariótico em células de inseto, utilizando como vetor o baculovírus. Foi construído um vetor pFASTBacHT_VDR, o qual teve a sequência desta proteína clonada a partir do pCMX.VDR. A partir daí, foi possível obter bacmídeos recombinantes, utilizados na transfecção de células de inseto, gerando baculovírus recombinantes, para, então, seguir com a expressão do VDR.

Palavras-chave: Receptor de vitamina D. Proteína recombinante. *Escherichia coli*. Baculovírus.

ABSTRACT

The vitamin D receptor (VDR) is a cytoplasmic transcription factor and when activated by its ligand, translocates to the nucleus and interacts with DNA in the promoter regions with which has affinity, acting as a modulator of gene transcription and thereby producing multiple biological effects. Its main activities are the regulation and maintenance of plasma levels of calcium and phosphorus, as well as presenting immunomodulatory activities, such as the suppression of T cell activation, formation of secretion patterns of cytokines, modulation of proliferation and interference in the apoptosis. So this receptor is an important target for drugs that can help in the discovery of new immunomodulators. The present work had the objective to produce the recombinant vitamin D receptor in its soluble form for conducting future assays of drug screening of potential immunomodulators and drug-receptor interaction studies. For this, we used initially *Escherichia coli* expression system transformed with the plasmid HS_VDR_EC1-PQE T7, but it was only possible to obtain the protein in the insoluble fraction, even varying the temperature, time of induction and IPTG concentration. In an attempt to obtain soluble VDR, we used a eukaryotic expression system in insect cells using the baculovirus as a vector. It was built a vector, pFASTBacHT_VDR, which had the sequence of this protein cloned from pCMX.VDR. From there, it was possible to obtain recombinant bacmids used in transfection of insect cells, generating recombinant baculovirus, to then proceed with the expression of VDR.

Keywords: Vitamin D receptor. Recombinant protein. *Escherichia coli*. Baculovirus.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Classificação dos receptores nucleares.....	18
Figura 2 - Representação esquemática dos Receptores Nucleares:.....	18
Figura 3 - Esquema de ativação transcricional pelos receptores nucleares.....	19
Figura 4 - Modelo de vias de sinalização celulares relacionadas à ação do calcitriol através do VDR.....	22
Figura 5 - Estrutura do Receptor de Vitamina D (VDR).....	23
Figura 6 - Construção de uma molécula de DNA híbrida a partir de fragmentos de diferentes organismos obtidos com o uso de enzima de restrição.....	27
Figura 7 - Principais passos para a obtenção do baculovírus recombinante, a partir de um vetor de transferência (VT), com origem de replicação bacteriana (ori), marcador de resistência à antibiótico (Ab), promotor (P) e múltiplo sítio de clonagem (MSC).....	32
Figura 8 - Plasmídeo HS_VDR_EC1-pQE-T7 (QIAGEN). Vetor de expressão para a produção do VDR recombinante em E.coli.....	35
Figura 9 - Elementos do plasmídeo pFASTBacHT A.....	36
Figura 10 - Desenho experimental da transformação bacteriana.....	41
Figura 11 - Metodologia do sistema de expressão.....	42
Figura 12 - Sistema Bac-to-Bac de expressão.....	46
Figura 13 - Eletroforese em gel de poliacrilamida 12%, corado com Coomassie blue, evidenciando expressão do VDR na sua fração insolúvel à 37°C, IPTG 0,4mM.....	53
Figura 14 - Eletroforese em gel de poliacrilamida 12%, corado com Coomassie blue, evidenciando expressão do VDR na sua fração insolúvel (setas), à 37°C, IPTG 0,2 e 1 mM.....	54
Figura 15 - <i>Western blotting</i> utilizando anticorpo anti-cauda de histidina.....	55
Figura 16 - Purificação por cromatografia de afinidade por íon metálico (Ni-NTA) para proteínas com cauda de histidina.....	56
Figura 17 - Purificação por cromatografia de afinidade por íon metálico (Ni-NTA) para proteínas com cauda de histidina.....	56
Figura 18 - Eletroforese em gel de agarose 0,8%. Digestão do pCMX.VDR.....	58
Figura 19 - Eletroforese em gel de agarose 0,8%.....	58

Figura 20 - Eletroforese em gel de agarose 0,8%. Análise da digestão do pFASTBacHTA após extração por Midiprep.....	59
Figura 21 - Eletroforese em gel de agarose 0,8%. M = marcador, 1 e 2: produto de PCR demonstrando a amplificação da sequência do receptor de vitamina D (1200 pb).....	60
Figura 22 - Eletroforese em gel de agarose 0,8%. Digestão do pFASTBacHT com as enzimas utilizadas para clonagem.....	61
Figura 23 - Eletroforese em gel de agarose 0,8%. Digestão pFASTBacHT.....	61
Figura 24 - Eletroforese em gel de agarose 0,8%. Demonstra o gel da figura 23 com as bandas correspondentes ao vetor pFASTBacHT aberto retiradas, para purificação e clonagem.....	62
Figura 25 - Eletroforese em gel de agarose 0,8%. Seleção de cinco clones para análise dos vetores recombinantes.....	63
Figura 26 - Placas de LB-ágar contendo IPTG e X-gal, após transformação de DH10Bac com os vetores pFASTBacHT.....	64
Figura 27 - Placas LB-ágar contendo IPTG e X-gal. Confirmação do fenótipo de transformação.....	65
Figura 28 - Eletroforese em gel de agarose 0,8%. Análise da reação de amplificação dos bacmídeos.....	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Antibióticos utilizados no trabalho, nas suas concentrações estoque e nas concentrações.....	37
Tabela 2 - Soluções utilizadas na purificação da proteína.....	38
Tabela 3 - Oligonucleotídeos utilizados na amplificação do VDR a partir do pCMX.VDR. Os sítios de restrição adicionados estão marcados.....	47
Tabela 4 - Oligonucleotídeos utilizados na reação de sequenciamento do VDR.....	49
Tabela 5 - Oligonucleotídeos utilizados na análise do bacmídeo.....	51
Tabela 6 - Tamanhos dos produtos de PCR que devem ser obtidos após análise em eletroforese em gel de agarose.....	65

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 OBJETIVOS	16
2.1 GERAL.....	16
2.2 ESPECÍFICOS.....	16
3 REVISÃO DA LITERATURA	17
3.1 RECEPTORES NUCLEARES.....	17
3.1.1 O receptor de vitamina D (VDR)	20
3.1.1.1 Ações biológicas do VDR.....	23
3.2 TECNOLOGIA DO DNA RECOMBINANTE.....	25
3.3 EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES.....	27
3.3.1 Sistema de expressão em <i>Escherichia coli</i>	27
3.3.2 Sistema de expressão em célula de inseto	28
3.3.2.1 Classificação dos baculovírus.....	29
3.3.2.2 Estrutura do vírion.....	30
3.3.2.3 Baculovírus como vetor de expressão.....	30
4 MATERIAIS E MÉTODOS	33
4.1 ORGANISMOS.....	33
4.2 MEIOS DE CULTURA.....	33
4.3 PLASMÍDEOS.....	34
4.3.1 HS_VDR_EC1-pQE-T7	34
4.3.2 pCMX.hVDR	35
4.3.3 pFASTBacHT A	35
4.4 ANTIBIÓTICOS.....	36
4.5 SOLUÇÕES E TAMPÕES.....	37
4.5.1 Soluções para purificação da proteína	38
4.5.2 Soluções para extração de bacmídeo	38
4.6 REAGENTES.....	38
4.6.1 Kits	39
4.7 SISTEMA DE EXPRESSÃO EM <i>Escherichia coli</i>	39
4.7.1 Células eletrocompetentes	40
4.7.2 Transformação bacteriana (eletroporação)	40
4.7.3 Indução	41
4.7.3.1 Condições testadas.....	42
4.7.4 Estoques dos cultivos	42
4.7.5 Avaliação da expressão por SDS-PAGE	43
4.7.6 Purificação da proteína recombinante	43
4.7.7 Western blotting	44
4.8 SISTEMA DE EXPRESSÃO EM BACULOVÍRUS.....	45
4.8.1 Digestão de DNA com enzimas de restrição	45
4.8.2 Eletroforese de DNA	45
4.8.3 Clonagem do gene de interesse no pFASTBacHTA	45
4.8.3.1 Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	46
4.8.3.2 Restrição enzimática (vetor e inserto).....	47
4.8.3.3 Reação de ligação do inserto ao vetor.....	48
4.8.4 Sequenciamento de DNA	49
4.8.5 Obtenção do baculovírus recombinante	49

4.8.5.1 Produção do bacmídeo recombinante.....	49
4.8.5.1.1 Transformação de <i>E. coli</i> DH10Bac com o plasmídeo recombinante pFASTBacHT_VDR.....	50
4.8.5.1.2 Confirmação do fenótipo e purificação dos bacmídeos.....	50
4.8.5.2 Verificação da presença do fragmento VDR nos bacmídeos.....	51
4.8.5.3 Produção de baculovírus recombinantes.....	51
5 RESULTADOS	53
5.1 EXPRESSÃO DO VDR RECOMBINANTE NO SISTEMA BACTERIANO	53
5.1.1 Purificação por cromatografia de afinidade por íons metálicos (IMAC)	55
5.2 EXPRESSÃO DO VDR RECOMBINANTE NO SISTEMA DE EXPRESSÃO EM BACULOVIRUS.....	57
5.2.1 Construção do vetor pFASTBacHT_VDR	57
5.2.2 Reação em cadeia da polimerase	59
5.2.3 Produção do bacmídeo recombinante	63
5.2.4 Produção de baculovírus recombinantes	66
6 DISCUSSÃO	67
7 CONCLUSÕES/SUMÁRIO DE RESULTADOS	72
REFERÊNCIAS	73

1 INTRODUÇÃO

O receptor da vitamina D (VDR) é uma proteína pertencente à da família dos receptores nucleares de hormônios, que atuam como fatores reguladores de transcrição gênica quando interagem com seus ligantes (OZONO, 1991). Apesar do VDR, em sua forma livre, estar presente no citoplasma (GRONEMEYER *et al.*, 2004), quando ligado à forma ativa da vitamina D ($1\alpha,25$ -dihidroxitamina D_3 [$1\alpha,25(OH)_2D_3$] ou calcitriol), transloca-se para o núcleo, onde irá associar-se a promotores de diversos genes modulando a expressão dos mesmos, produzindo múltiplos efeitos biológicos (ISSA *et al.*, 1998; BAKER *et al.*, 1988). O tratamento com calcitriol exerce um efeito imunomodulador em células apresentadoras de antígenos (MANOLAGAS *et al.*, 1994), em células citotóxicas naturais e também em células T/B pós-ativação (LEMIRE, 1995). Em particular, esta regulação é mediada através da interferência com fatores de transcrição pela interação direta com os elementos responsivos à vitamina D nos promotores dos genes que codificam citocinas (ETTEN & MATHIEU, 2005).

A tecnologia do DNA recombinante tem ampla aplicação na área biológica e é de extrema importância na expressão de genes de interesse e, conseqüentemente, na obtenção das proteínas que eles codificam. Essa tecnologia possibilita a geração de organismos com características específicas, não encontradas na natureza, o que permite uma nova alternativa para o melhoramento genético de espécies de valor biotecnológico. Diferentes sistemas de expressão são hoje utilizados na tentativa de isolar proteínas recombinantes. Desse modo, células de bactérias, leveduras e mesmo eucariontes superiores como plantas podem ser programadas com genes exógenos, abrindo a perspectiva de produção nestes organismos de polipeptídeos de interesse (LIMA, 2001). Os sistemas de expressão variam de acordo com as vantagens e desvantagens associadas à sua estratégia e célula de escolha.

Ultimamente, a manipulação de DNA *in vitro* tem sido desenvolvida através da transferência de informação genética entre organismos procariotos em uma tecnologia eficiente com produção controlada de proteínas no hospedeiro. Uma característica importante desse desenvolvimento é a habilidade de expressão de genes eucarióticos em procariotos. Microrganismos, tais como as enterobactérias da

espécie *Escherichia coli*, são importantes fatores para expressão de proteínas recombinantes, por apresentar capacidade de crescer rapidamente, em alta densidade, em substratos baratos e por possuir características genéticas bem definidas (BANEYX, 1999). Um sistema para a produção de proteínas recombinantes em *E. coli*, usualmente envolve a inserção do gene de interesse em uma cepa de *E. coli* através de um vetor (plasmídeo). O principal propósito para a produção de proteínas recombinantes é obter um elevado acúmulo de produto solúvel na célula bacteriana. A expressão em *E. coli* tem sido a primeira opção devido ao conhecimento extensivo de sua genética, a facilidade de uso, baixo custo e os altos níveis de expressão obtidos (HOZJAN, 2008).

Os sistemas de expressão eucarióticos são escolhidos com mais frequência na produção de proteínas recombinantes onde haja a necessidade da proteína produzida ser o mais funcionalmente semelhante à que seria produzida *in vivo*. Estes sistemas apresentam vantagens em relação ao sistema procariótico, como processamento, dobramento e modificações pós-traducionais das proteínas, o que pode propiciar a produção expressiva de proteínas puras e biologicamente ativas. Sistemas de expressão utilizando células hospedeiras de inseto são os mais indicados com relação às modificações pós-traducionais da proteína recombinante. As células de inseto representam um sistema mais barato e eficiente, quando comparado com outros sistemas de expressão já descritos, como leveduras (ORR-WEAVER *et al.*, 1981, CEREGHINO *et al.*, 2001) e células de mamíferos, que se trata de uma técnica de alto custo e pouca produtividade (CHATURVEDI *et al.*, 2005). Como vantagem, esse sistema apresenta grande quantidade de proteína recombinante que pode ser produzida, além do fato de que se trata de um sistema eucariótico de expressão (MORTON & POTTER, 2000).

O vetor mais utilizado na expressão de proteínas recombinantes em células de inseto é o baculovírus, que infecta hospedeiros artrópodes, especialmente patogênicos a insetos, pertencentes à família Baculoviridae. Sua utilização como ferramenta biotecnológica foi estabelecida na década de 80 (SMITH *et al.*, 1983) e a partir daí vem sendo utilizada de maneira intensa, promovendo a expressão de proteínas oriundas de diferentes organismos (O'REILLY *et al.*, 1992).

Sendo assim, no presente estudo, foram utilizados dois diferentes sistemas de expressão de proteína recombinante, na tentativa de obter o receptor de vitamina D recombinante solúvel. Inicialmente, foi feita a expressão da proteína em

Escherichia coli, e, posteriormente, foi utilizado o sistema de expressão em células de inseto, tendo o baculovírus como vetor. Obtendo o VDR solúvel será possível realizar ensaios de triagem de potenciais drogas e estudos de interação droga-receptor.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Expressar e purificar o receptor de vitamina D (VDR) na sua fração solúvel para realização de futuros ensaios de modulação da ativação do receptor.

2.2 ESPECÍFICOS

- Determinar as condições ideais da indução para a expressão do VDR no sistema bacteriano de expressão;
- Produzir um vetor recombinante para expressão do VDR no sistema de expressão em baculovírus;
- Produzir bacmídeos recombinantes para produção de baculovírus recombinantes;
- Produzir baculovírus recombinantes para expressar o receptor de vitamina D em células de inseto;
- Obter o receptor de vitamina D ativo, para otimização de futuros ensaios de ligação com possíveis agonistas.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 RECEPTORES NUCLEARES

A superfamília dos receptores nucleares (RNs) agrupa uma série de fatores de transcrição acionados por ligantes lipofílicos. Estes receptores estão envolvidos em diversos eventos celulares e são a maior classe de reguladores transcricionais dos metazoários (ROBINSON-RECHAVI *et al.*, 2003). Dentro desta superfamília estão os receptores ativados por hormônios tireoidianos, esteróides, retinóides, ácidos graxos, prostaglandinas e vitamina D.

Os RNs podem agir como monômeros ou formando dímeros, a exemplo do receptor de vitamina D (VDR), que dimeriza com o receptor de ácido retinóico (RXR) (GRONEMEYER *et al.*, 2004). Manglesdorf e colaboradores (1995) propuseram quatro categorias de RNs relacionadas com a dimerização e o modo de ligação com DNA e com o ligante. A classe I inclui todos os hormônios esteróides que funcionam como homodímeros, ou seja, as duas subunidades são idênticas, ligando-se a elementos responsivos palindrômicos. Os receptores classe II aparecem como heterodímeros (subunidades diferentes) com RXR, os quais funcionam dependentemente do ligante. A classe III é formada por homodímeros ligados a elementos responsivos diretos, enquanto que a classe IV abrange os RNs que atuam monomericamente (Figura 1) (MANGLESDORF *et al.*, 1995).

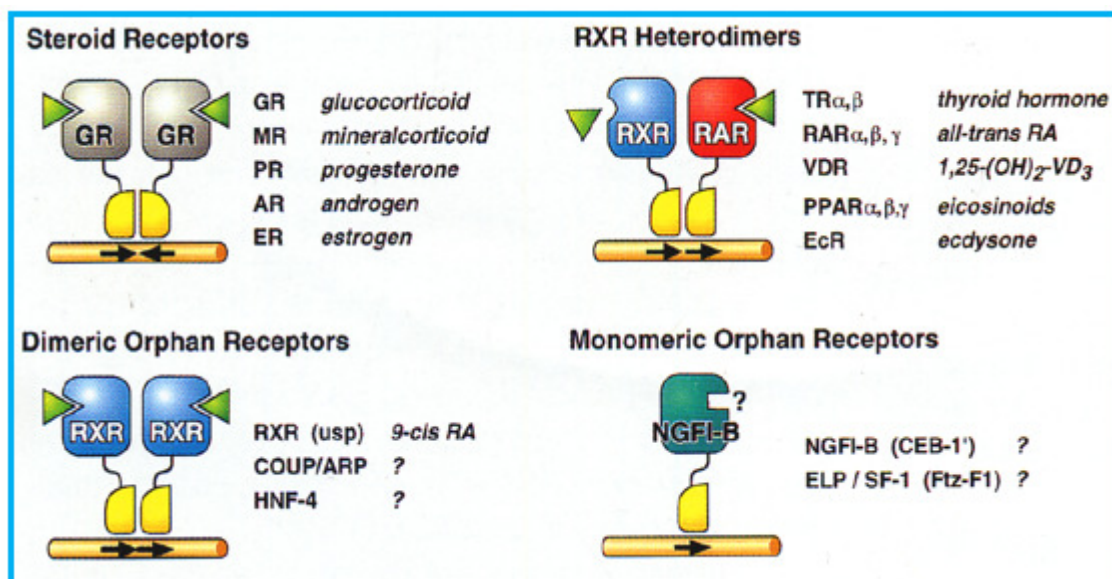


Figura 1: Classificação dos receptores nucleares, demonstrando quatro categorias relacionadas com a dimerização e o modo de ligação com DNA e com o ligante.

Fonte: MANGELSDORF *et al*, 1995

Proteínas da superfamília de receptores nucleares (RNs) apresentam uma organização estrutural composta por módulos com funções específicas que abrangem ligação ao DNA, interação com ligante e dimerização. Esses receptores apresentam dois domínios bem conservados: o domínio de ligação do DNA (DBD – do inglês *DNA binding domain*) e o domínio de ligação do ligante (LBD – do inglês *ligand binding domain*), que são conectados através de uma região de dobradiça, a qual se imagina ser flexível para permitir que homodímeros e heterodímeros de receptores nucleares se liguem a vários tipos de elementos responsivos do DNA (ISSA, 1998). O domínio N-terminal A/B é o mais divergente entre os receptores nucleares em relação ao comprimento e conservação da sequência (variando de 50 a mais de 500 aminoácidos), sendo diferente, inclusive, para isoformas do mesmo receptor, e contém uma função de ativação autônoma, AF-1 (Figura 2).



Figura 2: Representação esquemática dos Receptores Nucleares: N- Porção amino-terminal; C- Porção carboxi-terminal.
Fonte: ARANDA & PASCUAL, 2001

O mecanismo de ação dos RNs se inicia com a interação do ligante com o LBD do receptor. Após esta interação ocorrem alterações conformacionais no LBD, que levam à liberação de co-repressores e interação com co-ativadores, além de promover uma maior estabilização do receptor. A depender do tipo do RN, a interação poderá ocorrer no nível de citoplasma ou núcleo, sendo que, no primeiro caso, após a interação com o ligante, ocorre a migração do receptor em direção ao núcleo. A consequência deste processo é a interação do DBD com genes-alvo, resultando na regulação da transcrição gênica (Figura 3) (GRONEMEYER *et al.*, 2004).

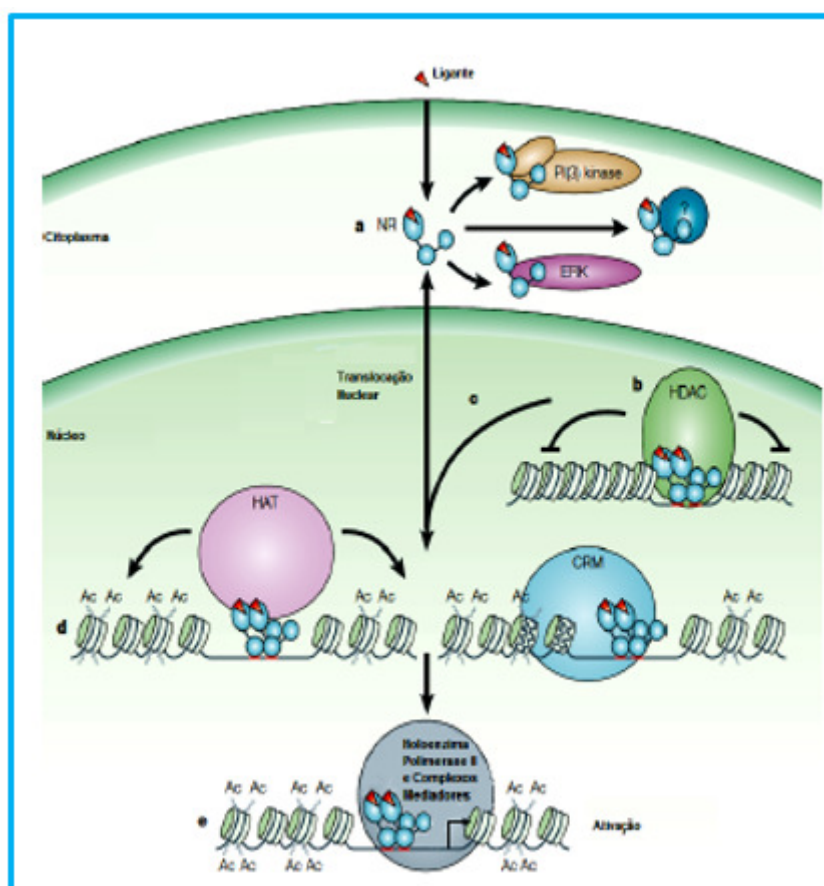


Figura 3: Esquema de ativação transcricional pelos receptores nucleares. O complexo receptor-ligante modula diversos fatores (a). Muitos RN, em ausência dos ligantes, podem apresentar-se ligados a regiões regulatórias dos genes-alvo atuando como co-repressor ou formando complexos de histonas desacetilases (HDAC) (b). Com a ligação da molécula sinalizadora, ocorre a liberação da HDAC (c) e o recrutamento de histonas acetiltransferases (HAT) e de complexos de remodelamento

da cromatina (CRM) (**d**). A holoenzima polimerase II e os complexos mediadores são recrutados, aumentando a frequência da inicialização transcricional (**e**).

Fonte: GRONEMEYER *et al.*, 2004.

Como os NRs estão envolvidos na regulação ligante-dependente da expressão gênica, eles representam alvos importantes para o desenvolvimento de drogas para o tratamento de várias doenças graves, como câncer, osteoporose e doenças autoimunes (NAGPAL *et al.*, 2003). O $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ou calcitriol em particular, regula várias funções biológicas do organismo, como o crescimento celular, diferenciação, proliferação, apoptose, resposta imune inata/adaptativa, mineralização óssea e homeostase do cálcio e fósforo (ORLOV, 2012). As funções do calcitriol se dão através da sua ligação com o VDR, que é expresso em diversos tecidos, tais como próstata, ovário, mama, pele, cérebro, coração, pâncreas, rins, intestino e colón (BANERJEE; CHATTERJEE, 2003). Consequentemente, a desregulação da função do VDR pode desencadear diversas doenças, incluindo câncer, psoríase, raquitismo, osteodistrofia renal e autoimunidade (esclerose múltipla, artrite reumatoide, entre outras) (BOUILLON *et al.*, 2006). A regulação da atividade gênica através da ligação de ligantes específicos envolve todo o RN, incluindo o DBD e LBD, através de sua ligação com o DNA e do recrutamento de proteínas co-reguladoras, que regulam modificações e remodelamento da cromatina (GRONEMEYER *et al.*, 2004). A superfamília dos receptores nucleares apresenta uma alta relevância para diversos aspectos da fisiologia humana, e são alvos farmacológicos promissores para diversas doenças, sendo a descoberta de novos agonistas e antagonistas para estes receptores um dos objetivos de estudos nesta área.

3.1.1 O receptor de vitamina D (VDR)

O receptor da vitamina D (VDR) é uma proteína de aproximadamente 50 kDa. É membro da superfamília de receptores nucleares classe II e, como seu nome já sugere, se liga à forma ativa da vitamina D – $1\alpha,25$ -dihidroxitamina D_3 [$1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$] ou calcitriol – e certos homólogos dela através de sítio de ligação no seu LBD (JIANG, 2004; TOCCHINI-VALENTINI, 2001). Quando ativado pelo seu

ligante, o VDR transloca-se para o núcleo onde irá interagir com as regiões promotoras as quais apresenta afinidade (elementos responsivos) no DNA, neste ponto irá atuar como fator de transcrição gênica, modulando a expressão de genes alvos e assim produzindo múltiplos efeitos biológicos (ISSA *et al.*, 1998; BAKER *et al.*, 1988; RACZ & BARSON, 1999). Este evento de translocação é uma das primeiras formas de avaliação da atividade do VDR frente a um ligante homólogo à vitamina D, o que também pode ser feito a partir da avaliação da atividade transcricional (YASMIN *et al.*, 2005; RACZ & BARSONY, 1999). O calcitriol entra na célula ligada à proteína de ligação da vitamina D (DBP do inglês *Vitamin D binding protein*) (ISSA *et al.*, 1998). O metabólito ativo 1,25(OH)₂D pode exercer sua função através do receptor de vitamina D, levando à regulação da expressão gênica, podendo induzir uma baixa regulação ou uma super regulação de produtos gênicos, processos que podem levar horas ou dias. Por outro lado, 1,25(OH)₂D pode agir através de receptores presente na membrana plasmática. Para esse tipo de resposta biológica, a sinalização celular acontece através da indução de canais voltagem-dependente de transporte de íons transmembrana, do controle do influxo e da quantidade de Ca⁺² no citosol e da ativação de segundos mensageiros, como o AMP cíclico e proteína quinase A. Essas respostas podem acontecer entre alguns segundos a 60 minutos (FELDMAN *et al.*, 2005).

A ativação mediada por ligante resulta na fosforilação e transporte do VDR para o núcleo (ISSA *et al.*, 1998, GRONEMEYER, 2004). Os homodímeros de VDR ou heterodímeros com RXR interagem com elementos de resposta a vitamina D (VDREs) em promotores de genes alvos. A interação com a maquinaria de transcrição geral é essencial para iniciar a transcrição de genes. O resultado final é a regulação da expressão de proteínas envolvidas na resposta celular (Figura 4).

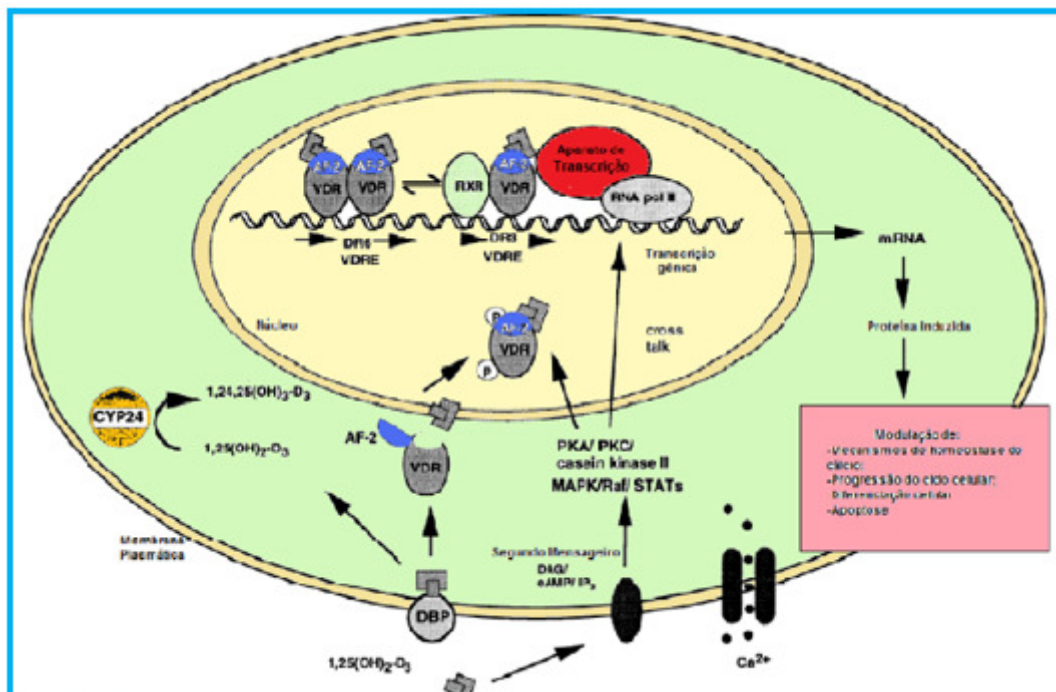


Figura 4. Modelo de vias de sinalização celulares relacionadas a ação do calcitriol através do VDR. Também é mostrada a via metabólica do calcitriol através 24-hidroxilase (CYP24).

Fonte:ISSA, 2010

O VDR segue a estrutura dos demais receptores nucleares, com algumas peculiaridades. Em comparação com outros RNs, o VDR não possui a região AF-1 (*activation function*), região de ativação independente do ligante (SONE, *et al.*, 1991). Além disso, a remoção do domínio A/B (a qual se apresenta em pequeno tamanho neste receptor) não afeta suas funções. Outra questão interessante a respeito deste receptor é que ele possui sítios de fosforilação no DBD e no LBD. O DBD contém estruturas chamadas dedos de zinco (*zinc fingers*) (Figura 5), importantes na interação com a molécula de DNA. No DBD-VDR destacam-se os dois domínios dedos de zinco, que são os motivos de ligação ao DNA marcantes dos RNs, contendo, ainda, o sinal de localização nuclear (HAUSSLER, 1998). A maioria das mutações naturais encontradas no VDR humano estão localizados no DBD, na região dedo de zinco, resultando no fenótipo clínico mais grave da resistência à vitamina D (HAUSSLER, 1998; JIANG, 2004).

Devido ao alto potencial farmacêutico de ligantes do VDR, várias estruturas cristalográficas do VDR LBD com ligantes têm sido determinadas (ROCHEL *et al.*, 2000; ANTONY *et al.*, 2010). O LBD do VDR contém uma interface de dimerização com o LBD do RXR e uma região de ativação transcrricional ligante-dependente, AF-2. Ao nível molecular, a $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ e seus análogos sintéticos

modulam a expressão gênica através do heterodímero entre VDR e o RXR. O RXR, um receptor nuclear para o ácido retinóico, é um parceiro obrigatório do VDR na mediação da ação do calcitriol (LEEUVEN *et al.*, 2001). O heterodímero se liga aos elementos de resposta da vitamina D₃ (VDREs), presente nas regiões promotoras dos genes responsivos. VDREs são repetições diretas (DR) de domínios 5'-AGGTCA-3' separados por 3 nucleotídeos e comumente referidos como domínios DR-3 (LEEUVEN, 2001).

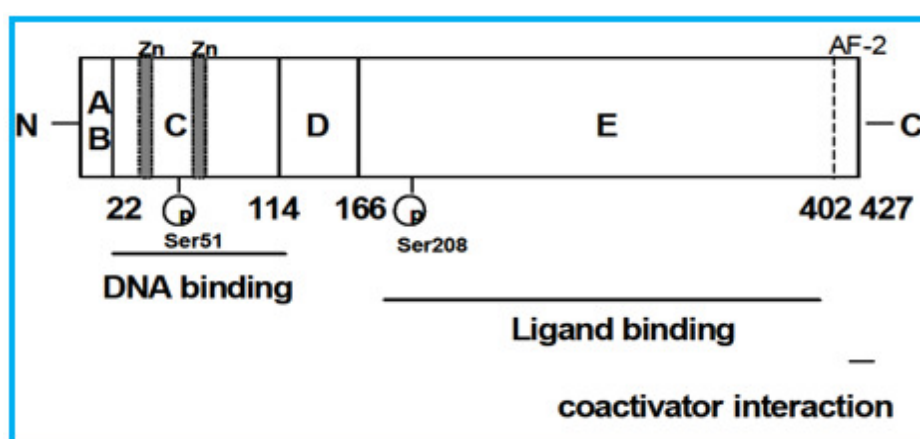


Figura 5: Estrutura do Receptor de Vitamina D (VDR).
Fonte: HAUSSLER, 1998

3.1.1.1 Ações biológicas do VDR

O VDR atua na modulação gênica de diversas células, estimulando a transcrição ou inibindo-a através da sua ligação com os elementos de resposta à vitamina D. A sua principal ação é a homeostase do cálcio e do fósforo (ISSA *et al.* 1998; DUSSO *et al.*, 2005). No entanto, a presença do VDR em tecidos diversos sugere a sua participação em outros processos fisiológicos além da atividade específica sobre o metabolismo mineral (ISSA *et al.* 1998, BARRAL *et al.*, 2007; BOUILLON *et al.*, 1995; DUSSO *et al.*, 2005; NEGPAL *et al.*, 2005). Distúrbios não relacionados à homeostase do cálcio, como a hipertensão, função muscular alterada, susceptibilidade a infecções, doenças autoimunes e câncer apresentam correlação com distúrbios endócrinos da vitamina D (ZITTERMANN, 2003; HOLICK,

2004). Atividades imunomoduladoras, antiproliferativas, pró-diferenciadoras e antineoplásicas vêm sendo associadas à vitamina D e seus análogos, sendo estas ações relacionadas à interação destes ligantes com o VDR (NEGPAL *et al.*, 2005; KOCHUPILLAI, 2008).

A vitamina D ocorre de duas formas: o ergocalciferol (ou vitamina D₂), que é sintetizada na epiderme através da ação da radiação ultravioleta da luz solar sobre o esteroide vegetal ergosterol; e o colecalciferol (ou vitamina D₃), a partir do colesterol (BARRAL *et al.*, 2007). A distinção entre elas é caracterizada pela presença de uma ligação dupla adicional e um grupo metil incorporados à longa cadeia lateral da forma biológica denominada D₂. Referidas vitaminas (D₂ e D₃), ao se formarem, se encontram inativas e, por isso, há necessidade de sua ativação, seja no fígado ou no rim, mediante a adição de grupos de hidroxila. Assim, resultará na forma hormonal ativa, 1 α ,25-diidroxicolecalciferol ou calcitriol (BAYNES, 2000).

As principais ações do calcitriol são a regulação e a manutenção dos níveis plasmáticos de cálcio e fósforo, o que aumenta a captação intestinal, minimizando a perda renal e estimulando a reabsorção óssea, quando necessário (CHAMPE, 2006). Também apresenta efeitos imunomoduladores, observados sobre a população de linfócitos, macrófagos e células *natural killer*, como também sobre a produção e ação de citocinas (ETTEN & MATHIEU, 2005; BERTOLINO & TZANNO-MARTINS, 2000). O efeito biológico do 1,25-(OH)₂D₃ é provocado a partir da ligação entre ele e os receptores celulares específicos (VDR), predominantemente nucleares, com alta afinidade. Assim, há interação desse complexo com o elemento de resposta da vitamina D (VDRE) no DNA, resultando na transcrição dos genes, seguida da síntese de RNA mensageiro (RNAm) para proteínas, como, por exemplo, a osteocalcina.

Os efeitos da vitamina D₃ ativa sobre o sistema imunológico apresenta-se em vários campos e inclui a supressão da ativação de células T, formação de padrões de secreção de citocinas, a indução de células T reguladoras, a modulação da proliferação e interferência na apoptose (ETTEN & MATHIEU, 2005, MAY *et al.*, 2004). A 1 α ,25 (OH)₂D₃ influencia a maturação, diferenciação e migração de células apresentadoras de antígenos. Ao todo, a sua potência imunomoduladora é comparável a outros imunossupressores estabelecida sem compartilhar seus típicos efeitos adversos (MAY, E. *et al*, 2004).

A vitamina D apresenta efeitos regulatórios na imunidade inata e adaptativa. Sabe-se que o receptor de vitamina D e a enzima CYP27b1 (25-hidroxivitamina D₃-1 α -hidroxilase), que cataliza a hidroxilação do calcidiol para o calcitriol (a forma ativa da vitamina D), também são expressos em células do sistema imune. (BRENNAN, 1987). O sistema imune inato é a primeira linha de defesa contra um patógeno, e sua resposta ocorre imediatamente e inespecificamente. Em 1986, Rook *et al.* demonstraram que 1,25(OH)₂D₃ inibe o crescimento do *Mycobacterium tuberculosis* (TB) em macrófagos cultivados (ROOK *et al.*, 1986). Etzioni *et al.*, mostraram que macrófagos e neutrófilos obtidos de pacientes com raquitismo hereditário vitamina D resistente e VDR mutado não funcional, apresentam atividade fungicida defeituosa (ETZIONI *et al.*, 1989).

A utilização da vitamina D₃ ou de seus análogos com pouco efeito hipercalcêmico poderá proporcionar a utilização desse hormônio com outros imunossupressores sinergicamente ou, ainda, mesmo de forma isolada, nos casos de doenças autoimunes, transplantes e neoplasias (BERTOLINI, 2000). A imunomodulação pela vitamina D₃ ativa e seus análogos *in vivo* tem sido demonstrada em diferentes modelos de doenças autoimunes e transplantes. (ETTEN & MATHIEU, 2005; BERTOLINO & TZANNO-MARTINS, 2000). O calcitriol exerce imunomodulação em células apresentadoras de antígenos, em células citotóxicas naturais e também em células T/B pós-ativação. Em particular, esta regulação é mediada através da interferência com fatores de transcrição como NF-AT e NF- κ B ou pela interação direta com os elementos responsivos à vitamina D nos promotores dos genes que codificam citocinas (ETTEN & MATHIEU, 2005; BERTOLINO & TZANNO-MARTINS, 2000).

A disponibilidade de novos agonistas do VDR com atividade seletiva pode permitir a exploração de seus efeitos imunomoduladores em tratamentos clínicos na prevenção da rejeição de enxertos, em doenças auto-imunes tais como psoríase, esclerose múltipla, artrite reumatóide, lúpus eritematoso sistêmico, além de outras doenças sem induzir hipercalcemia (MAY, E. *et al.*, 2004; ETTEN & MATHIEU, 2005; BERTOLINO & TZANNO-MARTINS, 2000).

3.2 TECNOLOGIA DO DNA RECOMBINANTE

A tecnologia do DNA recombinante, tem tido uma ampla aplicação a partir da década de 70, quando novas técnicas moleculares foram desenvolvidas, permitindo o isolamento e a purificação de genes específicos pelo processo de clonagem gênica (ZAHA *et al.*, 1996; STRYER *et al.*, 1988). Essa técnica pode ser usada para estudar mecanismos de replicação e expressão gênica, na determinação da sequência de um gene e conseqüentemente da proteína que ele codifica, ou no desenvolvimento de culturas microbianas capazes de produzir substâncias em grandes quantidades tais como a insulina humana, hormônios de crescimento, vacinas e enzimas industriais, importantes para aplicação comercial e biotecnológica (LARSON, 2007).

A clonagem molecular compreende dois estágios importantes. Inicialmente, o fragmento do DNA de interesse chamado de inserto é ligado à outra molécula de DNA chamada de vetor ou plasmídeo, formando o DNA recombinante. Essa construção se dá através do uso de enzimas de restrição. Estas enzimas reconhecem sequências específicas de 4 a 8 pares de base na molécula de DNA e fazem dois cortes, um em cada fita, deixando extremidades de fitas simples de DNA que permitam a ligação dos fragmentos. Uma enzima de restrição particular reconhece somente uma sequência única de bases. DNAs de origens diferentes sob a ação da mesma enzima de restrição produzem fragmentos com o mesmo conjunto de extremidades fitas simples. Portanto, fragmentos de dois diferentes organismos (por exemplo, bactéria e homem) podem ser ligados, sob o efeito da DNA ligase (Figura 6). Posteriormente, a molécula do DNA recombinante é introduzida numa célula hospedeira compatível, geralmente bactérias, num processo chamado de transformação, para que o vetor possa sofrer replicações e conseqüentemente amplificar o número de cópias do inserto. A célula hospedeira que adquiriu a molécula do DNA recombinante é agora chamada de transformante ou célula transformada. Em condições ideais, um único transformante, sofre muitos ciclos de divisão celular, produzindo uma colônia que contém milhares de cópias do DNA. Geralmente, antibióticos são acrescentados ao meio de cultura para selecionar somente as linhagens que portam os plasmídeos (o plasmídeo utilizado apresenta resistência a, pelo menos, um antibiótico).

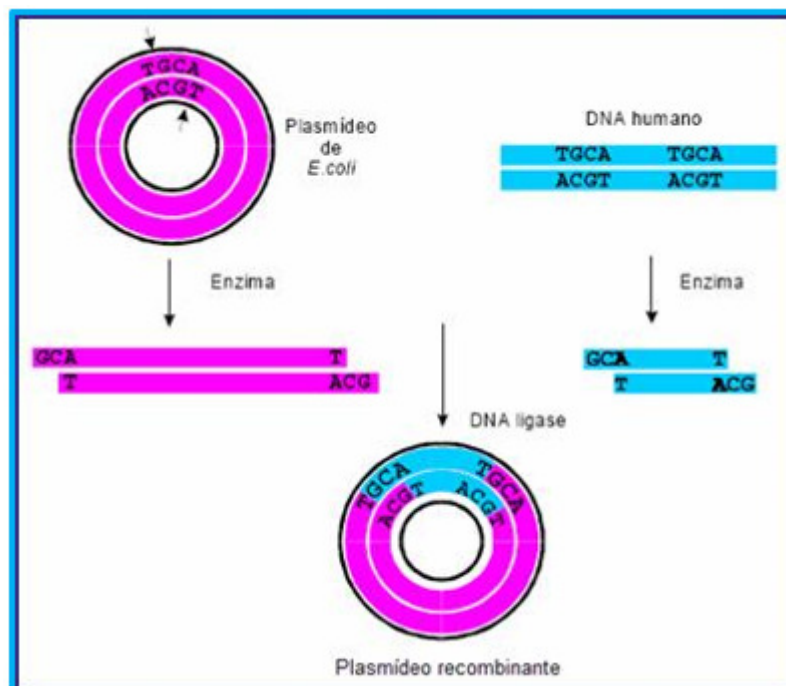


Figura 6: Construção de uma molécula de DNA híbrida a partir de fragmentos de diferentes organismos obtidos com o uso de enzima de restrição.

3.3 EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES

3.3.1 Sistema de expressão em *Escherichia coli*

Dentre os diversos sistemas disponíveis para a produção de proteínas heterólogas, a bactéria gram-negativa *Escherichia coli* tem sido o microorganismo mais estudado e usado como hospedeiro para a produção de proteínas recombinantes, como por exemplo, os receptores nucleares. Isso ocorre devido ao fato de *E. coli* ter a capacidade de crescer rapidamente, apresentar um baixo custo, uma boa reprodutibilidade e pelo potencial de obtenção da proteína de interesse em abundância. Além de ser bem caracterizada em termos de genética molecular, fisiologia e sistema de expressão (MAKRIDES, 1996).

O primeiro e mais comumente utilizado sistema de expressão de proteínas recombinantes em *E. coli* é baseado no operon lac. Nesse sistema, a indução da transcrição é obtida pela adição de um análogo da lactose sintético e não degradável (isopropil tiogalactopiranosídeo, IPTG), o qual se associa ao repressor,

inibindo-o e deixando o promotor livre para a interação com a RNA polimerase, possibilitando a transcrição do gene (NASCIMENTO *et al.*, 2003).

O IPTG representa hoje um dos indutores mais utilizados nos mais diversos sistemas de alta expressão.

Entretanto, altos níveis de expressão de proteínas recombinantes em *E. coli* frequentemente resultam no acúmulo destas como agregadas insolúveis, os corpúsculos de inclusão (FAHNERT *et al.*, 2004). Estes são desprovidos de atividade biológica e precisam de procedimentos de solubilização, redobramento e purificação para recuperarem sua atividade funcional. Evidências disponíveis sugerem que estes corpúsculos surgem da agregação inapropriada de polipeptídeos parcialmente dobrados ou mal dobrados, levando a insolubilidade ou instabilidade da proteína nativa. É imprevisível saber se a proteína expressa em alta quantidade em *E. coli* se manterá solúvel ou irá se acumular em corpúsculos (SAMBROOK, 2001).

Apesar da expressão da proteína na forma de corpúsculos de inclusão ser normalmente indesejada, sua formação pode ser vantajosa. As principais vantagens associadas a estes agregados são: expressão em níveis muito altos da proteína, mais que 30% da proteína celular, em alguns casos; fácil isolamento das células, através de diferenças no seu tamanho e densidade; baixa degradação da proteína expressa; resistência à ação proteolítica por proteases celulares, e homogeneidade da proteína, o que pode ajudar na redução dos passos na etapa de purificação (SINGH, 2005).

A formação dos corpúsculos de inclusão é parcialmente suprimida quando o crescimento da *E. coli*, produtora de grandes quantidades da proteína recombinante, é dado em baixas temperaturas (LIN, 1987). Normalmente, a proteína recombinante se agrega quando o cultivo bacteriano é feito à 37°C. Logo, a redução da temperatura de cultivo pode aumentar a quantidade de produção da proteína nativa, devido à diminuição da taxa de síntese proteica (SCHEIN, 1988). A obtenção de proteína na forma solúvel se deve ao fato de que em baixas temperaturas a proteína é expressa em quantidades menores ao longo do tempo, o que colabora com o enovelamento correto. Essa estratégia é muito utilizada para expressão de proteínas que agregam ou que são de difícil expressão (MAKRIDES, 1996).

3.3.2 Sistema de expressão em célula de inseto

Neste sistema de expressão, o vetor mais utilizado é o baculovírus, vírus que pertencem à família Baculoviridae e que infectam hospedeiros artrópodes, em especial insetos das ordens Lepidóptera, Diptera e Himenóptera (FEDERICI, 1997, HERNIOU *et al.*, 2004). Inicialmente o baculovírus foi estudado e bastante utilizado como controle biológico de insetos-praga associados à agricultura (CASTRO *et al.*, 1999). Sua utilização como ferramenta biotecnológica foi estabelecida em 1983, quando Smith e colaboradores expressaram β -interferon humana em células de inseto (SMITH *et al.*, 1983). Desde então, o sistema de expressão baculovírus tem se tornado um versátil e robusto sistema eucariótico de expressão. A expressão de genes heterólogos utilizando baculovírus permite múltiplas modificações pós-traducionais, como dobramento, fosforilação, glicosilação, formação de pontes dissulfeto, similarmente ao que ocorre em células de mamíferos (WANG *et al.*, 2013).

3.3.2.1 Classificação dos baculovírus

A família Baculoviridae é dividida em dois gêneros: *Nucleopolyhedrovirus* e *Granulovirus* (MURPHY *et al.*, 1995), que diferem pela morfologia do corpo de oclusão. Nos baculovirus os vírions encontram-se oclusos em uma proteína cristal, denominada corpo de oclusão ou OB (do inglês "occluded body"). Os nucleopoliedrovírus (NPV) possuem corpos de inclusão poliédrica, podendo ser chamado de poliedro, contendo múltiplas partículas virais, enquanto os granulovírus (GV) contêm, em geral, partículas únicas, ocluídas em corpos protéicos de forma ovóide (MARUNIAK, 1986). O baculovírus mais estudado até o momento é o Nucleopoliedrovírus de *Autographa californica* (AcNPV), o qual apresenta uma grande amplitude de hospedeiros, e infecta mais de 25 espécies de insetos (ADAMS & MCCLINTOCK, 1991).

A partir de 2006, a taxonomia dos gêneros da família Baculoviridae foi alterada com base na especificidade aos hospedeiros, e inclui os gêneros *Alphabaculoviruses* (NPV de lepidópteros), *Betabaculoviruses* (GV de lepidópteros),

Gammabaculoviruses (NPV de Himenópteros) e *Deltabaculoviruses* (NPV de Dípteros) (JEHLE *et al.*, 2006).

3.3.2.2 Estrutura do vírion

O epíteto Baculoviridae é originado da palavra latina *baculum*, que significa bastão, caracterizando a forma do capsídeo das partículas virais desta família (O'REILLY *et al.*, 1994). O genoma do baculovírus consiste em DNA de fita dupla, circular, variando entre 80 e 200kb (ARIF, 1986). Este genoma é envolto pelo capsídeo protéico com forma de bastonete, constituindo a unidade infectiva do vírus (nucleocapsídeo) (O'REILLY *et al.*, 1994). Durante o ciclo de vida dos baculovírus, os vírions podem assumir duas formas fenotipicamente distintas, que são essenciais para o processo de infecção e propagação do vírus. O BV (do inglês *budded virus*), ou vírus extracelular, responsável pela transmissão do vírus célula a célula, e OB (do inglês *occlusion boddies*), vírus oclusos ou corpos de oclusão, responsáveis pela transmissão do vírus inseto a inseto (SMITH *et al.*, 1983).

3.3.2.3 Baculovírus como vetor de expressão

Os baculovírus são amplamente utilizados como vetores de expressão em células de inseto e o sistema baculovirus de expressão se baseia na inserção de genes de interesse no genoma do baculovirus no lugar de um gene não essencial para replicação, sob o comando de um promotor forte. O modelo mais comumente utilizado é baseado na troca do gene da poliedrina por um gene heterólogo de interesse, sob o controle do promotor da poliedrina, que é um promotor forte (MILLER *et al.*, 1983; SMITH *et al.*, 1983).

As vantagens ao usar o sistema baculovírus de expressão incluem: capacidade para acomodar grandes inserções de DNA, já que o nucleocapsídeo do baculovírus é capaz de acomodar genomas virais maiores que o próprio genoma selvagem (O'REILLY *et al.*, 1994); fornece um ambiente apropriado para a síntese

de proteína eucarióticas, oferecendo condições para que ocorra modificações pós-traducionais e assim, permitindo a produção de proteínas biologicamente ativas (CASTRO *et al.*, 1999).; apresenta alto potencial para a expressão de proteínas heterólogas e simplicidade de manipulação (CASTRO *et al.*, 1999).

O procedimento original do sistema baculovírus de expressão é baseado na recombinação homóloga. São utilizados plasmídeos como vetores de transferência que contêm além do gene de interesse, sequências flanqueadoras que são homólogas às do vírus selvagem. Quando é feita uma co-transfecção para a célula de inseto, ocorre uma troca de insertos, por recombinação homóloga, e o gene original no vírus é substituído pelo gene de interesse contido no plasmídeo. Nas células, serão produzidos vírus selvagens e recombinantes, então é necessário um ensaio em placas para purificação dos baculovírus recombinantes (Figura 7) (POSSEE *et al.*, 2008).

Um método alternativo tem sido desenvolvido para superar essa etapa. Um modelo que utiliza a técnica de transposição, onde o gene de interesse é também clonado em um plasmídeo, só que este plasmídeo contém regiões flanqueadoras de transposição, para inserção do gene de interesse em bacmídeos (vetor que transporta o genoma do baculovírus) propagados em *E. coli* (LUCKOW *et al.*, 1993). Nesse processo é necessária a utilização de uma bactéria especial, que contém, além do seu próprio genoma, o genoma de um baculovírus na forma de um plasmídeo (denominado bacmídeo) e um plasmídeo que codifique o gene da transposase, responsável pela transposição do gene de interesse para o genoma do baculovírus, que é utilizado na transfecção de células de inseto (Figura 7).

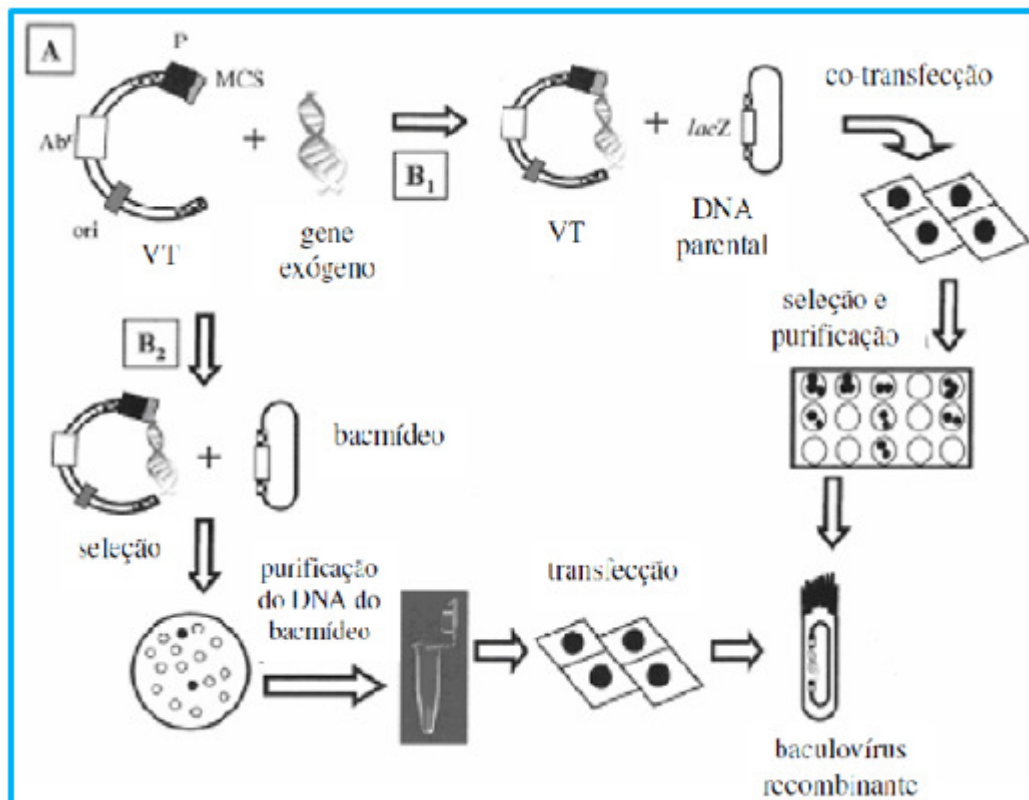


Figura 7: Principais passos para a obtenção do baculovírus recombinante, a partir de um vetor de transferência (VT), com origem de replicação bacteriana (ori), marcador de resistência à antibiótico (Ab), promotor (P) e múltiplo sítio de clonagem (MSC). Esquematização de dois caminhos que podem ser utilizados, o método por recombinação homóloga ou o método por transposição do bacmídeo.

Fonte: PALOMARES *et al.*, 2003

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ORGANISMOS

- **BL21(DE3)pLysS:** Linhagem de *E.coli* ideal para expressões utilizando o promotor T7. Essa *E. coli* possui DE₃ lisogene (produz T7 RNA polimerase) e o plasmídeo pLysS, que expressa baixos níveis de lisozima T7, reduzindo a expressão basal de genes recombinantes, inibindo os níveis basais de T7 RNA polimerase, antes da indução.

- **TOP10 F':** *E. coli* genotipicamente idêntica a linhagem TOP10 com a adição de um F' episomo, estas bactérias são resistentes a tetraciclina. Foram utilizadas para multiplicação plasmidial para estoque dos plasmídeos.

- **DH5α:** Linhagem de *E.coli* com alta eficiência de transformação, muito utilizada em experimentos de clonagem.

- **DH10Bac:** Linhagem de *E. coli* que contém um vetor transportador de baculovírus (bacmídeo) e um plasmídeo *helper*, que codifica transposase. Permite a geração de um bacmídeo recombinante, após transposição da construção de expressão pFASTBac. Foi utilizada para a geração do bacmídeo recombinante.

4.2 MEIOS DE CULTURA

- **LB – Meio Luria-Bertani:** 10 g/L de NaCl, 10 g/L de Triptona (caseína hidrolisada), 5 g/L de extrato de levedura, pH 7,0 (Sigma-Aldrich, St.Louis, EUA) – autoclavado, meio utilizado em cultura de bactérias;

- **LB/Agar:** 10 g/L de NaCl, 10 g/L de Triptona (caseína hidrolisada), 5 g/L de extrato de levedura, 15 g/L de ágar (Sigma-Aldrich), pH 7,0 – autoclavado, meio utilizado em cultura de bactérias;

- **GYT:** 10% glicerol; 0,125% extrato de levedura; 0,25% triptona - pH 7,0 – autoclavado, meio utilizado em cultura de bactérias;

- **Meio SOB:** para 1 L, 20 g Triptona; 5 g extrato de levedura; 0,5 g cloreto de sódio, pH 7,0 – autoclavado, meio utilizado em cultura de bactérias;
- **Meio SOC:** meio SOB mais 20 mM de glicose (Sigma-Aldrich) - autoclavado, meio utilizado em cultura de bactérias.
- **Meio TNM-FH (Meio Grace)** (Himedia, Mumbai, India): meio de cultivo utilizado em cultura de células de inseto.

4.3 PLASMÍDEOS

4.3.1 HS_VDR_EC1-pQE-T7

Para o desenvolvimento do trabalho, foi utilizado um vetor de expressão para a produção da proteína VDR recombinante em *E. coli* comercialmente disponível. O plasmídeo HS_VDR_EC1-pQE-T7, fornecido pela QIAGEN (QIAGEN GmbH, Hilden, Alemanha), apresenta a seqüência codificante do receptor da vitamina D (VDR) melhorada para sua expressão em *E. coli* sob o controle do promotor T7, induzível por isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosídeo (IPTG) (pela presença do operador lactose). Este vetor apresenta uma cauda 6xHis-tag em sua extremidade N-terminal que permite sua rápida purificação por coluna de afinidade (Figura 8). Apresenta resistência a kanamicina e é compatível para a expressão de proteínas recombinantes em cepas B de *E. coli*, como BL21 (DE3) entre outras. Com este vetor, foi realizada a transformação de células bacterianas compatíveis para expressar a proteína recombinante. Para isso, foi necessário tornar as células eletrocompetentes para viabilizar a introdução do DNA.

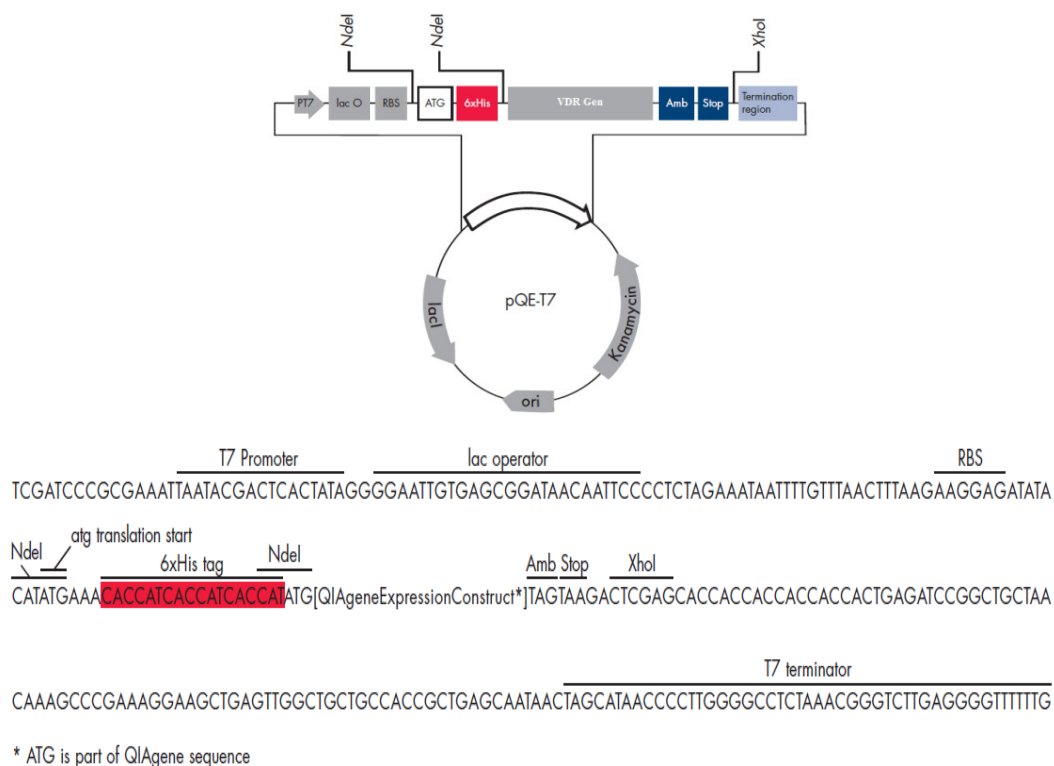


Figura 8: Plasmídeo HS_VDR_EC1-pQE-T7 (QIAGEN). Vetor de expressão para a produção do VDR recombinante em *E.coli*. Sequência codificante do VDR sob o controle do promotor T7, induzível por IPTG, com a sequência para a cauda 6xHis-tag em sua extremidade N-terminal.

Fonte: QIAGEN, 2005.

4.3.2 pCMX.hVDR

Utilizamos um vetor contendo o gene do VDR humano, o pCMX.hVDR, clonado pelo Dr. Umesono (1991). É um vetor de expressão eucariótica preparado por modificação do plasmídeo CDM8 (SEED, 1987), para aprimorar a produção de receptores em células COS. A sequência codificante para o VDR foi adicionada no *polylinker* do pCMX (Umesono, 1991). Esse plasmídeo foi uma doação do Dr. Steven Kliewer, Department of Molecular Biology and Pharmacology, The University of Texas – Southwestern Medical Center.

4.3.3 pFASTBacHT A

O pFASTBacHT A é um vetor que foi utilizado no sistema *Bac to Bac* de expressão (Invitrogen™, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) em baculovírus. Apresenta forte promotor da polihedrina, para alto nível de expressão; cauda de histidina N-terminal e um sítio de clivagem de protease (TEV), para remoção da cauda após purificação. Apresenta elementos Tn7, que permitem a transposição sítio-específico do gene de interesse no genoma do baculovírus, e resistência à gentamicina (Figura 9), que permite a seleção de bacmídeos recombinantes em *E.coli* DH10Bac.

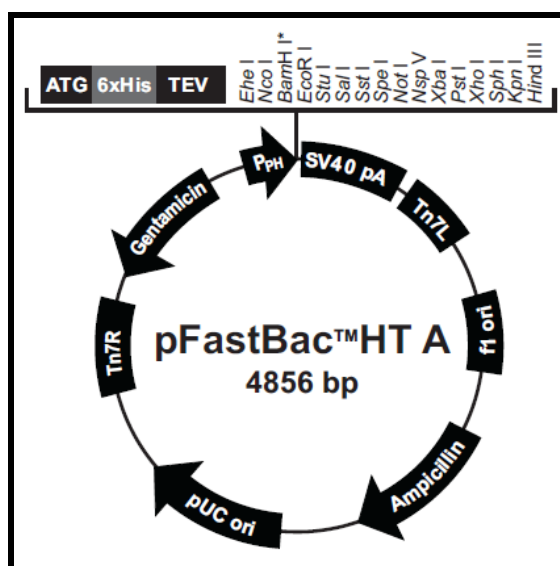


Figura 9: Elementos do plasmídeo pFASTBacHT A. Apresenta promotor da polihedrina, sequência codificante para cauda de histidina, sítio de reconhecimento para TEV, Tn7L e Tn7R, elementos que permitem transposição sítio-específica e apresenta resistência à gentamicina.

4.4 ANTIBIÓTICOS

Todos os procedimentos descritos na metodologia envolvendo antibióticos foram realizados nas concentrações de trabalho, feitas a partir de diluições das soluções estoques no meio de cultura utilizado (Tabela 1).

Tabela 1: Antibióticos utilizados no trabalho, nas suas concentrações estoque e nas concentrações de uso.

Antibiótico	Concentração estoque	Concentração uso
Ampicilina	50mg/ml	50µg/ml
Cloranfenicol	50mg/ml	25µg/ml
kanamicina	100mg/ml	50µg/ml
Tetraciclina	5mg/ml	10µg/ml
Gentamicina	40mg/ml	50µg/ml

4.5 SOLUÇÕES E TAMPÕES

- 30% acrilamida/ 0.8% bis-acrilamida (Sigma-Aldrich): 300 g de acrilamida e 8 g de bis-acrilamida, 1 L de água deionizada. Solução para gel de acrilamida;
- Solução de descoloração de gel de proteínas: 30% v/v de Metanol (Sigma-Aldrich), 10% v/v ácido acético (VETEC Química, Duque de Caxias, Brasil), 60% v/v água deionizada;
- Solução para coloração de géis de proteínas SDS-PAGE: Azul de comassie R-250 (Sigma-Aldrich) a 0,05% m/v, 40% v/v de etanol (VETEC Química), 10% v/v de ácido acético glacial (VETEC Química), 49,05% de água deionizada;
- TA - Tampão de amostra 6x para eletroforese de DNA em gel de agarose: Azul de bromofenol (Sigma-Aldrich) a 0,25%, xileno cianol a 0,25%, glicerol a 30%;
- TAE (tris acetato/EDTA) 50x: 147 g/L de ácido acético glacial, 18,6 g/L de EDTA (Sigma-Aldrich), 300 g/L de Tris base (pH para 7,7), foi utilizado como tampão de imersão para corrida eletroforética de proteínas;
- Tampão de amostra de proteínas para eletroforese em gel de acrilamida 5X: Tris-HCl a 200 mM e pH 6,8; SDS a 5%, β-mercaptoetanol (Sigma-Aldrich) a 12,5%, glicerol a 30% e azul de bromofenol a 0,025%;
- Tampão de corrida 5X para eletroforese em gel de acrilamida: 0,5 M de Tris base, 1,92 M de glicina, 0,5% (m/v) de SDS, pH 8,8;
- Tampão de lise: Tris 25 mM, EDTA 2 mM e Triton 0,1%;
- Buffer do gel de resolução: 1.5 M Tris-HCl, pH 8.8
- Buffer do gel de empilhamento: 0.5 M Tris-HCl, pH 6.8

4.5.1 Soluções para purificação da proteína

Foram utilizadas soluções para a purificação da proteína nativa e desnaturada (preparadas na solução de uréia 8 M), como descritas abaixo (Tabela 2).

Tabela 2: Soluções utilizadas na purificação da proteína.

Soluções condições nativas		
Tampão de lise (pH 8,0)	Tampão de lavagem (pH 8,0)	Tampão de eluição (pH 8,0)
50mM NaH ₂ PO ₄	50mM NaH ₂ PO ₄	50mM NaH ₂ PO ₄
300mM NaCl	300mM NaCl	300mM NaCl
10mM imidazol	20mM imidazol	250mM imidazol
Soluções condições desnaturantes		
Tampão de lise (pH 8,0)	Tampão de lise (pH 6,3)	Tampão de lise (pH 4,5)
8M Uréia	8M Uréia	8M Uréia
0,1M NaH ₂ PO ₄	0,1M NaH ₂ PO ₄	0,1M NaH ₂ PO ₄
0,01M Tris-Cl	0,01M Tris-Cl	0,01M Tris-Cl

4.5.2 Soluções para extração de bacmídeo

Para extração do bacmídeo, foram utilizadas as seguintes soluções: Solução 1: 15 mM Tris-HCl (pH 8,0), 10 mM EDTA, 100 ug/ml RNase A (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, California, EUA); Solução 2: 0,2N NaOH, 1% SDS; Acetato de potássio 3 M (pH 5,5); Isopropanol absoluto; Etanol 70% e TE (Tris-EDTA) 1x.

4.6 REAGENTES

- 250 bp DNA ladder (Invitrogen): Padrão de peso molecular para DNA;
- Padrões de proteínas (em kDa) (Invitrogen): 97-fosforilase, 66–soralbumina, 45–ovalbumina, 30-anidrase carbônica;
- Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase (New England BioLabs (NEB), Ipswich, Massachusetts)
- Cloreto de magnésio ($MgCl_2$) (NEB)
- 5-bromo-4-cloro-3-indolyl-beta-D-galacto-piranoside (X-gal) (Sigma-Aldrich)
- Isopropyl β -D-1-tiogalactopiranoside (IPTG) (Sigma-Aldrich)
- Lipofectamina (Invitrogen)

4.6.1 Kits

- GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Fermentas, Vilnius, Lithuania).
- EndoFree Plasmid Midi Kit (Qiagen, Duesseldorf, Alemanha): Utilizado para purificação de plasmídeos a partir de cultura de *E. coli*, com resultado final livre de endotoxinas;
- Ni-NTA Superflow Cartridges (Qiagen): colunas utilizadas para purificação de proteínas com cauda de histidina, utilizando sistemas de cromatografia por íon afinidade (IMAC).
- Nucleo Spin Gel and PCR Clean up (Macherey-Nagel, Dueren, Germany).
- Bac to Bac Baculovirus Expression System: Eficiente sistema de transposição sítio-específico para gerar baculovírus para expressão de proteínas recombinantes.

4.7 SISTEMA DE EXPRESSÃO EM *Escherichia coli*

4.7.1 Células eletrocompetentes

Bactérias eletrocompetentes foram preparadas. Foi inoculada uma colônia da cepa de *E. coli* (BL21(DE3) pLysS) em 10 mL de meio LB e incubada a 37°C *overnight* sob agitação em incubadora refrigerada. No dia seguinte, o pré-inóculo foi diluído em 100 ml de meio LB e incubado novamente a 37°C sob agitação até atingir OD600 = 0,4. Após atingir a OD ideal, a cultura foi transferida imediatamente para o gelo por 15-30min. Então, a cultura foi centrifugada a 4.000 rpm por 20 minutos a 4°C. As células foram mantidas sempre no gelo durante todo o procedimento. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e as células foram lavadas com 90 ml de água gelada. Após centrifugação, 4000 rpm por 15 min a 4°C, o precipitado de células foi lavado com 45 ml de glicerol 10% gelado e centrifugado novamente nas mesmas condições. O sobrenadante foi descartado cuidadosamente e as células foram ressuspensas em 2 ml de glicerol 10% gelado. Após centrifugação, as células foram ressuspensas em 200ul de meio GYT. Foram feitas alíquotas de 40 ul por tubo (0,6 ml), que foram congeladas a -80°C (SAMBROOK *et al.*, 2001).

4.7.2 Transformação bacteriana (eletroporação)

A transformação bacteriana foi feita por eletroporação, método que consiste na aplicação de pulsos elétricos nas células para aumentar transitoriamente a permeabilidade da membrana plasmática, permitindo, assim, a entrada do DNA na célula (Figura 10).

Alíquotas de células competentes foram retiradas do -80°C e transferidas para o gelo, juntamente com cubetas de eletroporação (Biorad, Hercules, CA, USA). Foram adicionados 25 ng do DNA (pQET7-VDR) nas células e a mistura foi incubada no gelo por 30-60 s. Logo em seguida, as células com o DNA foram transferidas para uma cubeta de eletroporação, previamente resfriadas no gelo, e foi dado um pulso elétrico (capacitância 25 uF, 2,5 kV e resistência de 200 ohm) utilizando o eletroporador Gene Pulser Xcell (Biorad). Uma constante de tempo de 4-5 milissegundos com um campo força de 12,5 kV/cm foi registrado na máquina. Rapidamente, foi adicionado 1ml de meio LB a temperatura ambiente. Para

recuperação, as células foram incubadas durante 1 hora em 1 ml de meio LB a 37° C. Após este tempo, a cultura foi plaqueada em meio sólido (LB-Ágar) contendo o antibiótico apropriado (kanamicina - kan) na concentração de 50 µg/ml. As placas foram mantidas a temperatura ambiente até o líquido ser absorvido no ágar, e então as placas foram invertidas e incubadas a 37°C, por 12-16 h.

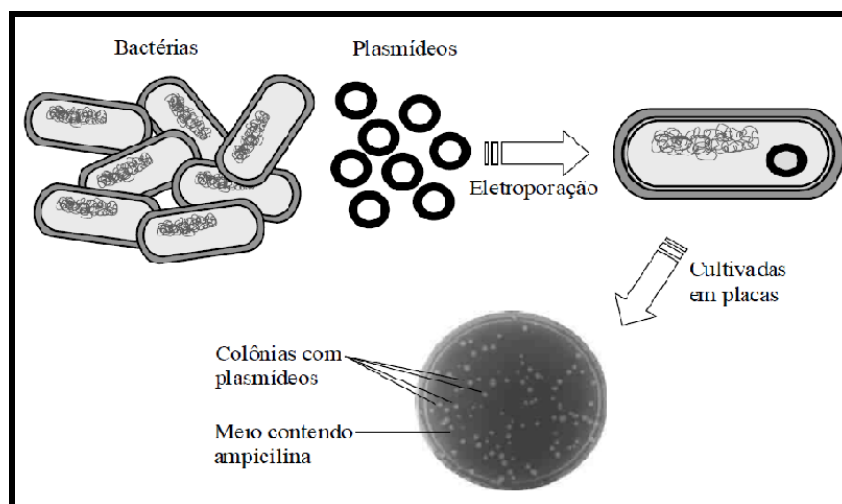


Figura 10: Desenho experimental da transformação bacteriana.

4.7.3 Indução

Colônias transformadas foram inoculadas em 10 ml de meio LB/kan e cultivadas, *overnight* a 37°C. No dia seguinte, este pré inóculo foi diluído 1:50 em meio LB/kan para posterior crescimento a 37° C sob agitação constante. Ao atingir a absorbância de 0,6 a 600 nm, foi adicionado IPTG (isopropil- β -D-tiogalactosídeo) 0,2-1 mM para a indução da expressão da proteína recombinante. Após a adição do IPTG, a cultura foi incubada a 37°C por 4 h (Figura 11). Uma alíquota de 1 ml da cultura foi coletada em diferentes tempos durante a indução e centrifugada a 4000 rpm por 10 minutos, juntamente com o restante do cultivo, após a indução, o qual teve o pellet de células congelado. A alíquota foi utilizada para avaliar a expressão da proteína nas diferentes frações, solúvel e insolúvel. Foi adicionado tampão de lise no pellet da alíquota de 1ml, a qual foi centrifugada para separação do sobrenadante (fração solúvel) e pellet (fração insolúvel). Em ambas as frações foi adicionado 100

μ l de tampão de amostra redutor duas vezes concentrado e 20 μ l de cada amostra foi submetida a SDS-PAGE 10% (eletroforese em gel de poliacrilamida) (SAMBROOK *et al.*, 2001).

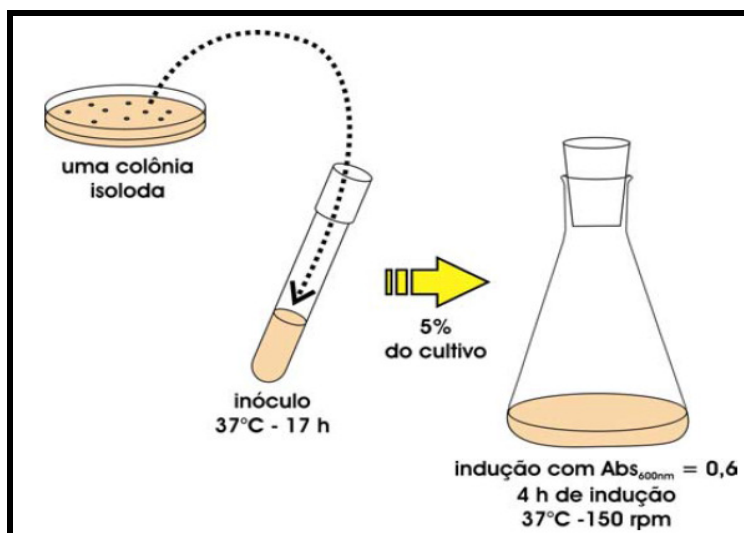


Figura 11: Metodologia do sistema de expressão

4.7.3.1 Condições testadas

Na tentativa de viabilizar a expressão da proteína recombinante na sua forma solúvel, algumas modificações foram feitas ao protocolo original, como variações na temperatura, no tempo de indução e na concentração de IPTG. Foram testadas as concentrações de IPTG variando de 0,2mM a 1mM; tempo de indução analisados em 2, 3, 4 e 6 h e, quanto às temperaturas de indução, foram testadas 37 e 15°C.

4.7.4 Estoques dos cultivos

Todos os cultivos tiveram alíquotas congeladas com glicerol 25%, e estocadas a -80°C, em tubos de microcentrífuga.

4.7.5 Avaliação da expressão por SDS-PAGE

A análise das proteínas foi feita qualitativamente após a eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) (LAEMMLI, 1970) a 30 mA, em temperatura ambiente e coloração do gel com azul de Coomassie (Sigma-Aldrich). Dois géis foram elaborados, cada gel contém superiormente gel para empilhamento com 5% de bisacrilamida/acrilamida e inferiormente o gel para separação elaborada com 12%, em tampão Tris. Os géis foram polimerizados em placas de vidro adaptáveis a sistemas verticais, as quais foram acopladas a seus respectivos reservatórios contendo tampão de corrida. Um volume de 10 μ L de tampão Tris-HCl a 0,0625 M, pH 6,8 contendo glicerol 10 %, -mercaptoetanol 5 % (v/v), SDS 2% e azul de bromofenol a 0,001 % (tampão de amostra) foi adicionado a 20 μ L de todas as amostras submetidas a eletroforese. As soluções foram aquecidas a 100°C por 5 min e aplicadas nos poços, num volume final de 20 μ L. A eletroforese foi realizada a 100V, durante 3 h. Após corrida, o gel foi corado *overnight* com azul de Coomassie e no dia seguinte descorado com solução descorante (SAMBROOK & RUSSELL, 2001), durante 2 h.

Após análise da expressão, foi feito um cultivo do clone selecionado em larga escala. O clone que apresentou alta taxa de expressão da proteína VDR foi cultivado em 1000 ml de meio de cultura líquido, com agitação, a 37°C. Quando as culturas atingiram a absorbância de 0,6 a 600 nm, foram induzidas à expressão utilizando 1 mM de IPTG e a cultura foi incubada por quatro horas. O meio de cultura foi centrifugado e o sedimento celular foi utilizado para a purificação.

4.7.6 Purificação da proteína recombinante

A purificação da proteína foi feita por cromatografia de afinidade em resina contendo níquel, utilizando as colunas Ni-NTA *superflow*, como recomendado pelo fabricante. O precipitado foi ressuspenso em 2 ml solução de lise

desnaturante e submetido a sonicação. O extrato bacteriano obtido foi centrifugado a 4000rpm por 20 minutos à 4°C e o sobrenadante foi então submetido à cromatografia de afinidade a metal imobilizado (IMAC). A proteína recombinante VDR se ligou à fase estacionária Ni-NTA-Agarose (Qiagen) através de ligação de coordenação do cátion Ni²⁺ imobilizado. A eluição foi testada com mais de um ponto de concentração de imidazol.

4.7.7 Western blotting

Para a realização do *Western Blot*, foi feita a transferência das proteínas do gel de poliacrilamida para membrana nitrocelulose 45 µm (Bio-Rad). A transferência foi feita pelo método semi-seco em um aparelho *transblotter* (Hoefer, Massachusetts, EUA) seguindo-se as instruções do fabricante. A transferência foi realizada utilizando o tampão Tris a 24 mM, glicina a 192 mM, metanol a 20 % (v/v), pH 8.3), por 1 h, 45 mA. Em seguida, a membrana foi bloqueada com tampão Tris a 24,8 mM, NaCl a 137 mM (TBS), leite desnatado a 5 % (m/v) e Tween 20 a 0,1 % (v/v), pH 8,0 (TBS-TL), *overnight*, a 4°C. A membrana foi lavada sob agitação constante (todas as lavagens foram feitas com TBS-Tween 0,1%), incubada com o anticorpo primário (anti cauda de histidina (Millipore, Massachusetts, EUA)) diluído 1:1000 em numa solução bloqueante de TBS-Tween 0,1% com leite a 3% p/v) durante 2 h à temperatura ambiente (TA), sob agitação constante. A membrana foi lavada novamente e depois, incubada com o anticorpo secundário (anti IgY) (Rheabiotech, São Paulo, Brasil) conjugado com a enzima peroxidase (HRP) diluído 1:1000, por 2 h, sob agitação constante, a TA. Depois de lavada, a membrana foi incubada com um reagente de detecção da atividade da HRP. A revelação foi feita com 1 mg/ml de Diaminobenzidina (DAB) (Sigma-Aldrich), adicionando 12 µl de peróxido de hidrogênio, no momento da revelação.

4.8 SISTEMA DE EXPRESSÃO EM BACULOVÍRUS

4.8.1 Digestão de DNA com enzimas de restrição

As digestões com endonucleases de restrição foram feitas para análise dos plasmídeos, observando os fragmentos gerados após o corte, e para a clonagem do VDR em outro vetor. O DNA foi digerido 2-4 h com 1-10 unidades (U) da(s) enzima(s) de restrição com o tampão adequado e temperatura ideal, como recomendados pelo fabricante. Para confirmar a completa digestão do DNA, uma alíquota de DNA foi analisada por eletroforese em gel de agarose 0,8%. Após o recebimento do plasmídeo pCMX.VDR, foi feita uma restrição utilizando as enzimas BamHI e HindIII, para confirmar a presença do inserto. Após o recebimento do plasmídeo pFASTBacHTA, foi feita uma restrição utilizando as enzimas MscI e NcoI, para análise do vetor.

4.8.2 Eletroforese de DNA

Os produtos das reações de PCR, as mini-preparações de DNA plasmidial e as digestões com enzimas de restrição, foram separados por eletroforese em gel de agarose 0,8%, preparado em tampão TAE, contendo brometo de etídio na concentração final de 0,5 mg/ml. Após a corrida, o DNA foi visualizado sob luz ultravioleta (SAMBROOK *et al.*, 1989).

4.8.3 Clonagem do gene de interesse no pFASTBacHTA

Foi realizada uma clonagem do inserto contendo a sequência do VDR no vetor pFASTBacHTA, para assim avaliar a expressão da proteína no sistema de expressão em Baculovírus (Bac-to-Bac) (Invitrogen) (Figura 12). A clonagem foi feita do pCMX.VDR para o pFASTBacHTA, após a digestão do mesmo com as enzimas BamHI e XhoI, XhoI e HindIII (NEB), como duas diferentes possibilidades para a clonagem, como recomendado pelos fabricantes.

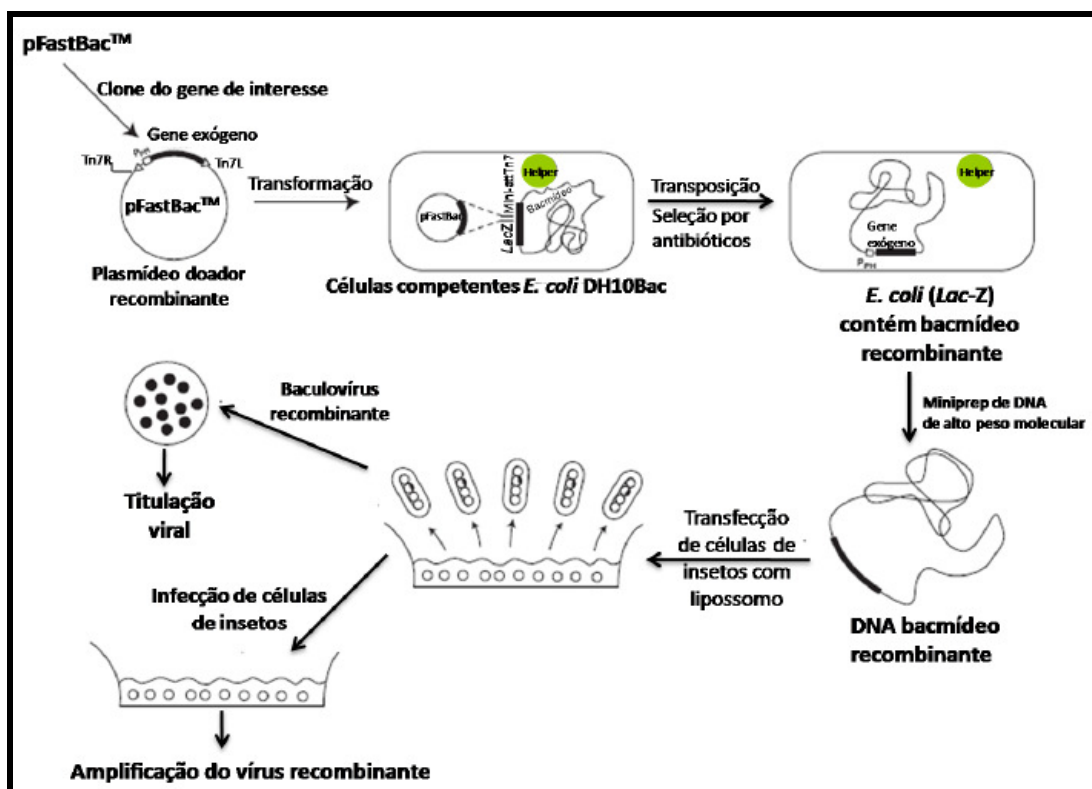


Figura 12: Sistema Bac-to-Bac de expressão. A figura mostra a transformação de bactérias DH10Bac, que contém o genoma do baculovírus AcMNPV na forma de um bacmídeo, com o plasmídeo pFastBac1 com o inserto de interesse em vermelho (1). A seguir é mostrado o evento de transposição (2), que permite a inserção do gene de interesse no bacmídeo e a seleção por antibióticos, seguido pela extração do DNA do bacmídeo (3) e utilização desde na transfecção de células de inseto (4). Os vírus recombinantes obtidos podem ser avaliados quanto ao seu título viral ou ainda utilizados para infectar novas células e promover a produção da proteína recombinante (5). Adaptado de Bac-to-Bac Baculovirus Expression System manual Invitrogen

4.8.3.1 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

O pCMX. VDR foi usado como molde para amplificação do VDR e clonagem no pFASTBacHTA. Utilizamos o plasmídeo pCMX-hVDR como vetor de origem do gene VDR humano. Foi feita uma reação de PCR utilizando os oligonucleotídeos *Forward* e *Reverse*, os quais tiveram sítios para enzimas de restrição adicionados (BamHI e XhoI, XhoI e HindIII), obtendo duas opções para a clonagem do inserto, como descritos abaixo (Tabela 3). Foi realizado um *touch down PCR*, reação em que a temperatura de anelamento dos *primers* diminui gradativamente (68° a 62°C).

Tabela 3: Oligonucleotídeos utilizados na amplificação do VDR a partir do pCMX.VDR. Os sítios de restrição adicionados estão marcados.

Oligonucleotídeo	Sequência
VDR-F_BamHI	TAACGGATCCAATGGAGGCAATGGCG
VDR-R_XhoI	AATCTCTCGAGTCAGGAGATCTCATTGCCA
VDR-F_XhoI	TAACCTCGAGAATGGAGGCAATGGCG
VDR-R_HindIII	AATCTAAGCTTTCAGGAGATCTCATTGCCA

A reação de PCR consistiu em 5 ng de DNA, 2 mM de cloreto de magnésio, 2,5 mM de dNTP, 0,4 U de Taq DNA polimerase *High Fidelity*, 10% buffer HiFi 10x, 0,2 uM de cada primer e água em quantidade suficiente para um volume final de 50 µl. A desnaturação foi feita a 95°C por três minutos, posteriormente as amostras foram submetidas a 5 ciclos nas condições: 95°C, 30 segundos, 68°C, 30 segundos, 68°C, 1 minuto e 30 segundos; 5 ciclos nas condições: 95°C, 30 segundos, 66°C, 30 segundos, 68°C, 1 minuto e 30 segundos; 5 ciclos nas condições: 95°C, 30 segundos, 64°C, 30 segundos, 68°C, 1 minuto e 30 segundos; 20 ciclos nas condições: 95°C, 30 segundos, 62°C, 30 segundos, 68°C, 1 minuto e 30 segundos e um ciclo a 68°C, por 3 minutos.

Após a reação em cadeia da polimerase para amplificação da sequência do VDR, o produto de PCR foi purificado utilizando o *Nucleospin Gel and PCR clean-up* (Macherey-Nagel), de acordo com instruções do fabricante, para retirada de *primers*, enzima e nucleotídeos que restaram na reação.

4.8.3.2 Restrição enzimática (vetor e inserto)

O inserto, extraído do produto de PCR, e o vetor, pFASTBacHTA, foram submetidos à restrição enzimática (1,5 e 3 µg, respectivamente), gerando extremidades coesivas, com as enzimas BamHI e Xho; e Xho e HindIII, durante 2 h a 37°C. Posteriormente, toda a reação de digestão do pFASTBacHT foi submetida à eletroforese em gel de agarose para retirada da banda do gel correspondente ao plasmídeo aberto, utilizando um bisturi estéril. A banda do gel foi colocada em um

tubo de 1,5 ml e pesada para posterior purificação do vetor e do inserto, utilizando o *Nucleospin Gel and PCR clean-up*, conforme o fabricante.

Foi obtida quantidade suficiente dos insertos de interesse com extremidades coesivas adequadas para serem clonados nos vetores de expressão, previamente digeridos com as mesmas endonucleases de restrição.

4.8.3.3 Reação de ligação do inserto ao vetor

O vetor e o produto do gene hVDR pré digeridos foram então submetidos a uma reação de ligação, na proporção de 3:1. Para ligar extremidades coesivas, 100 ng de DNA de vetor foi ligado com 3 vezes de DNA de inserto em reações de 20 µl contendo 10% de tampão da ligase 1x e 1U T4 DNA Ligase (NEB). Água Milli-Q foi utilizada para completar o volume total. As reações de ligação foram incubadas 30min, a temperatura ambiente. Os plasmídeos recombinantes pFASTBacHTA_VDR recém construídos foram inseridos por choque térmico em bactérias de *E. coli DH5a* competentes para nova propagação plasmideal. Como controles, foram feitas reações de ligação somente com o inserto, sem o vetor; somente com vetor, sem inserto e somente com meio SOC. Também foi feita a transformação com todos os controles.

As células transformadas foram plaqueadas (100 µl) em placas de petri contendo 20 mL de meio seletivo LB ágar contendo ampicilina 50 µg/ml. As placas foram incubadas a 37°C, *overnight*. Foram selecionadas colônias isoladas para purificação do plasmídeo. As colônias previamente selecionadas foram repicadas, individualmente, em tubos estéreis para cultivo de bactérias contendo 5 mL de meio LB líquido contendo ampicilina 50 µg/ml. Os tubos foram incubados a 37°C por 16 horas, sob agitação de 250 rpm. A seguir, as células tiveram seus DNAs plasmideais extraídos seguindo o kit GeneJET Plasmid Miniprep, e posterior análise por digestão enzimática, utilizando as enzimas BamHI e XhoI; e XhoI e HindIII. A seleção definitiva dos recombinantes foi realizada através da análise de restrição e confirmada pelo do seqüenciamento de DNA.

4.8.4 Sequenciamento de DNA

Para a reação de sequenciamento, foi utilizado o método de Sanger *et al.*, 1977, baseado no método da terminação em cadeia e na eletroforese capilar, como metodologia para leitura da reação, feita no sequenciador ABI 3730xl, fabricada pela Applied Biosystems (California, USA). As amostras foram preparadas e encaminhadas para Silvana da Paz, da Plataforma Tecnológica de Sequenciamento de DNA - CPqGM/Fiocruz - RPT01B, onde a reação foi feita em colaboração com a Plataforma Tecnológica de Sequenciamento de DNA - IOC/Fiocruz - RPT01A.

Para cada reação foi utilizado 250 ng de DNA e 2 pmol de cada *primer*. Foram utilizados os *primers* abaixo (Tabela 4) para sequência do VDR. As amostras sequenciadas foram o pCMX_VDR e o pFASTBacHT_VDR.

Tabela 4: Oligonucleotídeos utilizados na reação de sequenciamento do VDR

Primer	Sequência	Tm °C
VDR2_Seq_F	CGGGAGATGATCCTGAAGC	65.2
VDR3_Seq_F	TTACAGCATCCAAAAGGTC	58.3
VDR4_Seq_F	TACATCCGCTGCCGCCAC	71.1
VDR4_Seq_R	TGGCGGCAGCGGATGTAC	71.1
VDR3_Seq_R	ACCTTTTGGATGCTGTAAC	57.2
VDR2_Seq_R	GCTTCAGGATCATCTCCCGC	68.6

4.8.5 Obtenção do baculovírus recombinante

4.8.5.1 Produção do bacmídeo recombinante

4.8.5.1.1 Transformação de *E. coli* DH10Bac com o plasmídeo recombinante pFASTBacHT_VDR

Aproximadamente 1 ng do pFASTBacHT_VDR foi utilizado para transformar *E. coli* DH10Bac quimicamente competentes (Invitrogen), por choque térmico (COHEN *et al.*, 1972), para transposição com bacmídeo, seguindo as recomendações do “Bac-to-Bac Baculovirus Expression System” (Invitrogen). O DNA foi adicionado a tubos eppendorfs contendo 100 µl de célula DH10Bac competentes. A mistura foi incubada no gelo durante 30 minutos, posteriormente sendo rapidamente transferida para banho-maria, à 42°C, durante 45 s, e em seguida, incubada novamente no gelo durante 2 min. Foram acrescentados 900 µl de meio SOC ao tubo, que foi incubado a 37°C, sob agitação, durante 4 h. Diferentes volumes foram semeados em placas LB-agar contendo ampicilina 50 µg/ml, tetraciclina 10 µg/ml gentamicina, 7 µg/ml, IPTG 40 µg/ml e X-gal 100 µg/ml, a 37°C, por 48 h. A transformação foi feita com o vetor teste (pFASTBacHT_VDR) e o vetor vazio, sem o inserto de interesse (pFASTBacHT), utilizado como controle negativo. Como controle positivo, foi utilizado o estoque do LPBI, CpqGM, de DH10Bac transformada com o pFASTBac1GUS, o qual contém o gene para a β-glucuronidase. Foi semeada uma placa, com suplementos necessários, obtendo colônias isoladas para extração do bacmídeo.

4.8.5.1.2 Confirmação do fenótipo e purificação dos bacmídeos

As colônias brancas resultantes tiveram seu fenótipo confirmado semeando-as novamente em placa contendo os mesmos suplementos. As colônias que se mantiveram brancas foram inoculadas em meio LB líquido, suplementado com os mesmos antibióticos, *overnight*. Após a transposição, os bacmídeos foram purificados a partir de 1,5 ml de cultivo, utilizando as soluções descritas no item 3.6.2, metodologia adaptada pela Invitrogen para isolar plasmídeos grandes (>100 kb). Os bacmídeos purificados foram armazenados a 4°C, para seguir com a transfecção em células de inseto.

4.8.5.2 Verificação da presença do fragmento VDR nos bacmídeos

Foi feita a análise do bacmídeo recombinante por PCR, utilizando os *primers* descritos abaixo (Tabela 5):

Tabela 5: Oligonucleotídeos utilizados na análise do bacmídeo

Primer	Sequência
Bacmid F	CCCAGTCACGACGTTGTAAAACG
Bacmid R	AGCGGATAACAATTTACACAGG

A reação de PCR consistiu em 1 µl de DNA, 1,5 µl de Cloreto de magnésio 50 mM, 1 µl de dNTP 10 mM, 0,4 U de Taq DNA polimerase *High Fidelity*, 10% buffer HiFi 10x, 1,5 µl de cada primer a 10µM e água em quantidade suficiente para um volume final de 50µl. A desnaturação foi feita a 93°C por três minutos, posteriormente as amostras foram submetidas a 35 ciclos nas condições: 94°C, 45 segundos, 55°C, 45 segundos, 72°C, 5 minutos e um ciclo a 72°C, por 7 minutos. Após a reação de amplificação, 5 µl do produto de PCR foi analisado em gel de agarose 0,8%.

4.8.5.3 Produção de baculovírus recombinantes

Para a produção de baculovírus recombinantes, foi feita uma transfecção em placas de 6 poços, utilizando os bacmídeos com o gene do VDR (teste), com o gene da β-glucuronidase (controle positivo) e com o bacmídeo vazio (gerado a partir da transposição com o pFASTBachTo) (controle negativo). Além disso, foi utilizado um poço para o *mock* (recebe todo o processo de transfecção, sem receber DNA) e um poço contendo somente célula.

Foram plaqueadas 9×10^5 células/poço em 2 ml de meio TNM-FH completo (Soro bovino fetal e gentamicina). A placa foi incubada por 1 h a 27°C para aderência das células. Neste período, as soluções A e B foram preparadas e incubadas 20 min. A solução A é composta por 5 µl do bacmídeo mais 100 µl de

meio incompleto (no poço *mock* não foi adicionado nenhum bacmídeo). Já a solução B é composta por 8 µl de lipofectamina (Invitrogen) em 100 µl de meio incompleto. Após incubação das soluções, foram adicionados 100 µl da solução B em cada tubo com a solução A e incubadas 30 min à temperatura ambiente. Foram adicionando 800 µl de meio incompleto em cada mistura, a qual foi adicionada gota-a-gota, de forma lenta e uniforme nos devidos poços. A placa foi incubada por 5 h, à 27°C. Após esse período, o meio das células foi trocado, adicionando 2 ml de meio completo. A placa foi incubada por 6 dias, à 27°C. Durante esse período, o aspecto das células foi analisado, para verificar sinais de infecção. Por fim, o sobrenadante foi coletado cuidadosamente, centrifugado a 500 g, por 5 min e guardado para titulação.

5 RESULTADOS

5.1 EXPRESSÃO DO VDR RECOMBINANTE NO SISTEMA BACTERIANO

E. coli BL21(DE3) pLysS eletrocompetentes foram transformadas com o plasmídeo HS_VDR_EC1-PQE T7. O referido plasmídeo foi adquirido da Qiagen, para expressar o VDR em bactérias para futuros ensaios de ligação. Este plasmídeo codifica o VDR associado a uma cauda de histidina na extremidade N-terminal que permite sua rápida purificação por coluna de afinidade. Inicialmente, a indução foi feita utilizando 0,4 mM de IPTG, a 37°C, e foram retiradas alíquotas de 1 ml nos tempos 2, 3 e 4 h e analisadas por SDS-PAGE (Figura 13).

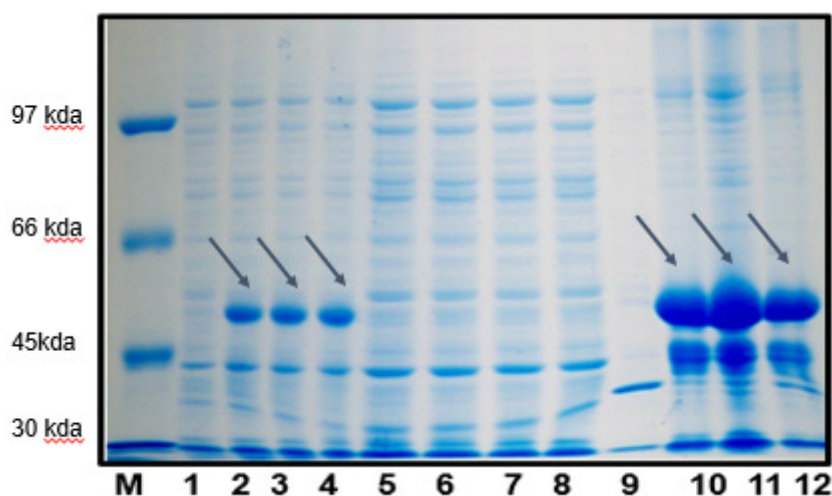


Figura 13: Eletroforese em gel de poliacrilamida 12%, corado com Coomassie blue, evidenciando expressão do VDR na sua fração insolúvel à 37°C, IPTG 0,4mM, sendo M = marcador de peso molecular, poços 1, 2, 3 e 4 a fração insolúvel, s/ IPTG, 2, 3 e 4h, respectivamente; poços 5, 6, 7 e 8 a fração solúvel, s/ IPTG, 2, 3 e 4h, respectivamente e poços 9, 10, 11 e 12 a fração total, s/ IPTG, 2, 3 e 4h, respectivamente.

A análise do gel, na figura 13, evidencia a produção da proteína recombinante (setas) nas condições descritas acima, porém na forma de corpúsculos de inclusão, na sua forma insolúvel.

Posteriormente, *E. coli* BL21(DE3) pLysS foram transformadas com o mesmo plasmídeo e também foi feita a indução da expressão do VDR, em diferentes condições. A expressão da proteína foi, inicialmente, induzida com IPTG a 0,2 e 1 mM, a 37°C, durante 6 h. Alíquotas de 1 ml foram retiradas após 6 h de indução e as frações totais e solúveis foram avaliadas por SDS-PAGE (Figura 14). Os resultados da análise demonstraram a presença de um banda com peso molecular correspondente a aproximadamente 50 kDa. O mesmo ocorreu quando foi realizada a reação de *Western-blotting*, utilizando um anticorpo anti cauda de histidina, revelando uma banda intensamente marcada (setas) pelo anticorpo, com aproximadamente 50 kDa (Figura 15), referente à proteína de interesse. No entanto, todas as condições avaliadas nas quais houve produção da proteína, esta se apresentou na forma insolúvel.

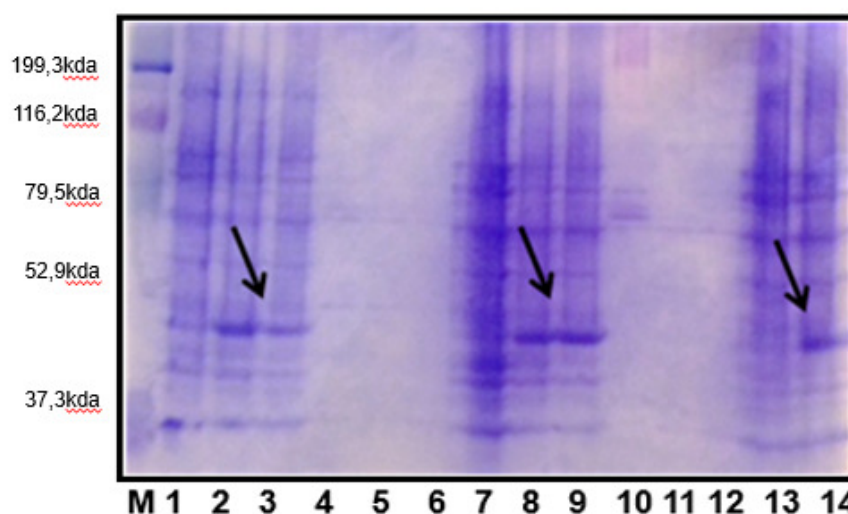


Figura 14: Eletroforese em gel de poliacrilamida 12%, corado com Coomassie blue, evidenciando expressão do VDR na sua fração insolúvel (setas), à 37°C, IPTG 0,2 e 1 mM. M = marcador de peso molecular. Coluna 1: fração total s/ IPTG; coluna 2: fração total VDR IPTG 0,2 mM; coluna 3: fração total IPTG 1 mM; coluna 4, 5 e 6, fração solúvel VDR, s/IPTG, 0,2 e 1mM de IPTG, respectivamente. Colunas 7-14 seguem a mesma ordem das anteriores, porém com diferentes clones.

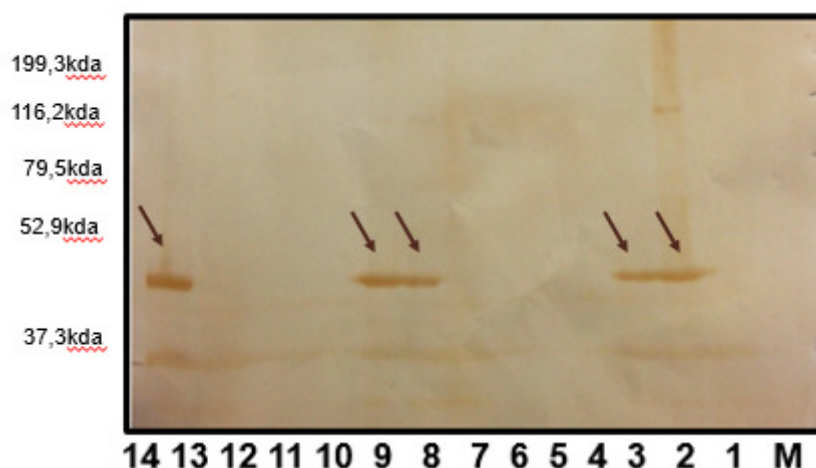


Figura 15: *Western blotting* utilizando anticorpo anti-cauda de histidina. Coluna 1: fração total s/ IPTG; coluna 2: fração total VDR IPTG 0,2 mM; coluna 3: fração total IPTG 1 mM; coluna 4, 5 e 6, fração solúvel VDR, s/IPTG, 0,2 e 1 mM de IPTG, respectivamente. Colunas de 7-14 seguem a mesma ordem das anteriores, porém com diferentes clones.

Na tentativa de favorecer a expressão da proteína recombinante na sua forma solúvel, algumas modificações foram empregadas ao protocolo original, dentre elas a diminuição da temperatura de expressão (15°C), porém também não foi possível obter a expressão da proteína recombinante (dados não apresentados).

5.1.1 Purificação por cromatografia de afinidade por íons metálicos (IMAC)

Prosseguiu-se, então, com a purificação através de coluna de níquel, sob condições desnaturantes (tampão contendo 8 M de uréia), uma vez que a proteína de interesse encontrava-se em corpúsculos de inclusão. Foi possível observar na purificação (Ni-NTA) a visualização da proteína nos eluatos (Figura 16), indicando a presença do receptor de vitamina D, na sua forma insolúvel.

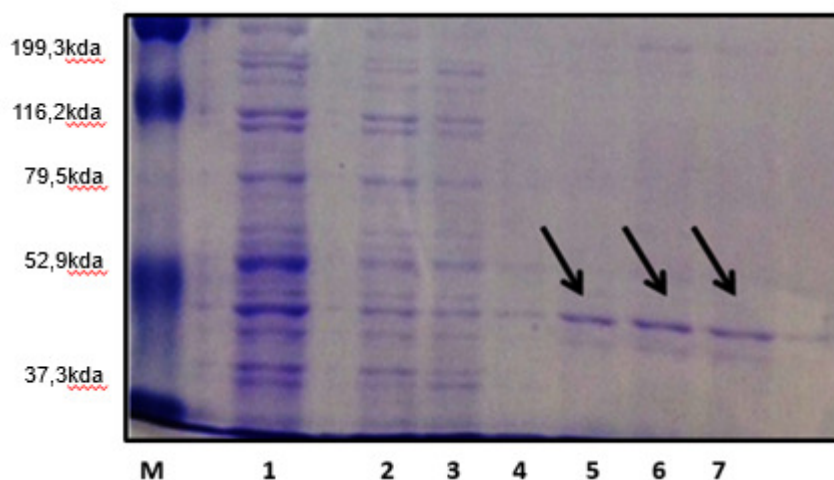


Figura 16: Purificação por cromatografia de afinidade por íon metálico (Ni-NTA) para proteínas com cauda de histidina, na condição desnaturante. M= marcador de peso molecular; coluna 1: lisado; coluna 2: efluentes; colunas 3 e 4: lavados; colunas 5, 6 e 7: eluatos (evidenciando proteínas purificadas - setas).

Também foi feita a purificação sob condições nativas, para verificar se havia proteína nativa no lisado bacteriano. Porém, pode-se observar na figura 17 que não foi obtida a proteína solúvel nos eluatos.

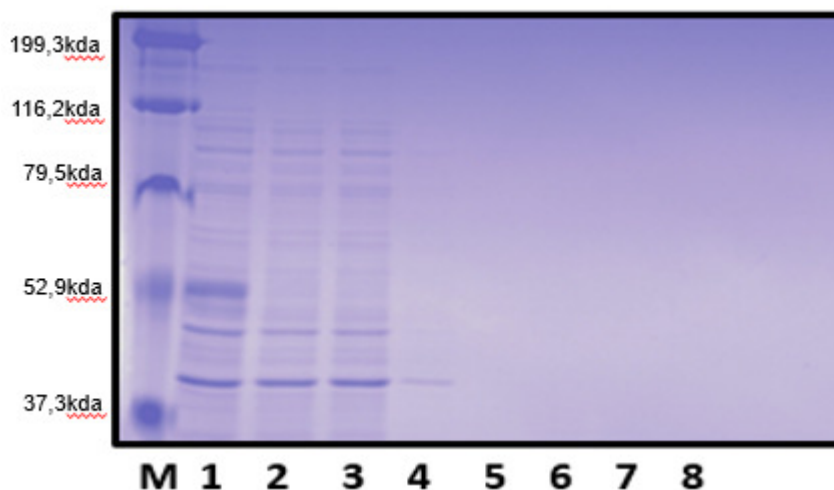


Figura 17: Purificação por cromatografia de afinidade por íon metálico (Ni-NTA) para proteínas com cauda de histidina, na condição nativa. M= marcador de peso molecular; coluna 1: lisado; coluna 2 e 3: efluentes; colunas 4 e 5: lavados; colunas 6, 7 e 8: eluatos (não evidenciando proteínas solúveis purificadas).

Como não foi possível obter a proteína na fração solúvel em nenhuma das condições testadas, foram feitas modificações na temperatura, concentração de IPTG e tempo de indução. No entanto, nenhuma modificação empregada foi capaz

de promover a solubilização da proteína de interesse para que esta fosse purificada através da lise nativa.

Sendo assim, na tentativa de obter a proteína solúvel, substituímos o sistema bacteriano e conduzimos a expressão em um diferente sistema, o de expressão em Baculovírus, baseado no *Bac-to-Bac Baculovirus Expression System* (Invitrogen).

5.2 EXPRESSÃO DO VDR RECOMBINANTE NO SISTEMA DE EXPRESSÃO EM BACULOVIRUS

5.2.1 Construção do vetor pFASTBacHT_VDR

A expressão da proteína recombinante em células de inseto foi baseada no sistema Bac-to-Bac da Invitrogen. Para a expressão do VDR em células de inseto, foi realizada uma clonagem do inserto contendo a sequência do VDR no vetor pFASTBacHTA. A clonagem foi feita do pCMX.VDR para o pFASTBacHTA, após a digestão do mesmo com enzimas de restrição. Para análise do pCMX.VDR, foi feita uma digestão com as enzimas BamHI e HindIII, para confirmar a presença do inserto (Figura 18). Pode-se observar a banda correspondente ao inserto (1200 pb), quando digerido com dois cortes.

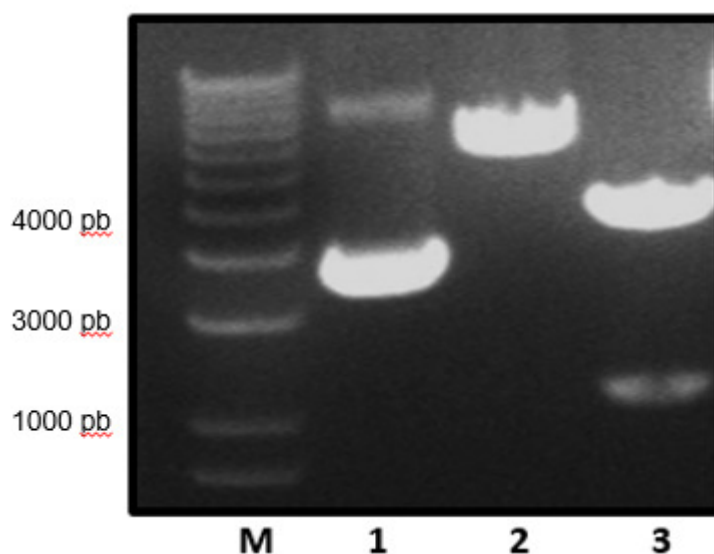


Figura 18: Eletroforese em gel de agarose 0,8%. Digestão do pCMX.VDR. M = marcador, 1: pCMX.VDR sem corte, 2: pCMX.VDR com um corte (BamHI), 3: pCMX.VDR com dois cortes (BamHI e HindIII).

Para a análise do pFASTBachHTA, foi feita uma digestão utilizando as enzimas MscI e NcoI, gerando fragmentos de 3442 e 1414 pb, confirmando a integridade do plasmídeo (Figura 19). Após a análise do plasmídeo, foi selecionado um clone para realização da extração plasmideal (Maxiprep), obtendo uma maior quantidade de DNA para realização dos experimentos e para estoque (Figura 20).

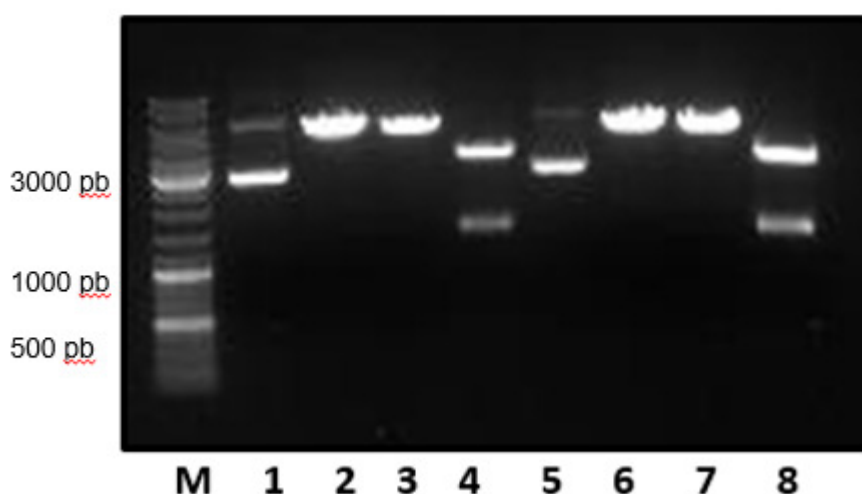


Figura 19: Eletroforese em gel de agarose 0,8%. M = marcador, 1: pFASTBachHTA s/ corte, 2: pFASTBachHTA com um corte com NcoI, 3: pFASTBachHTA com um corte com MscI, 4: pFASTBachHTA com dois cortes, NcoI e MscI; poços 5-8 seguem a mesma ordem, porém com outro clone.

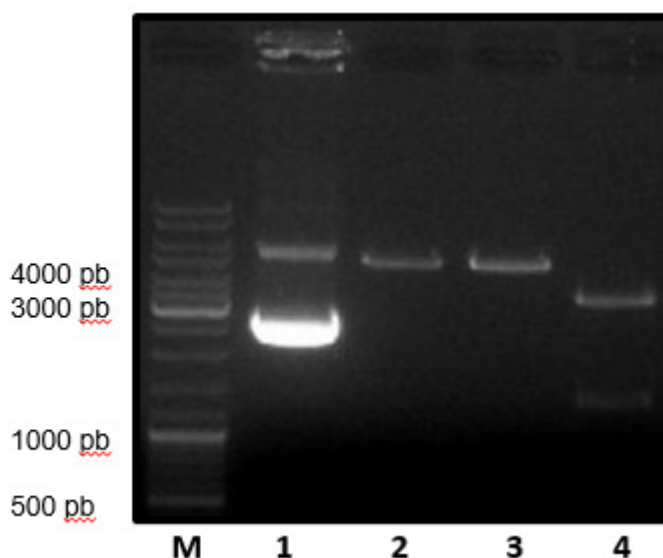


Figura 20: Eletroforese em gel de agarose 0,8%. Análise da digestão do pFASTBacHTA após extração por Midiprep. M = marcador, 1: vetor sem corte, 2: vetor com um corte (NcoI), 3: vetor com um corte (MscI), 4: vetor com dois cortes (NcoI e MscI).

5.2.2 Reação em cadeia da polimerase

Inicialmente, foi feita uma reação de PCR para amplificar o gene do VDR a partir do pCMX_VDR. A avaliação dos produtos de PCR confirmou a amplificação do DNA de tamanho esperado (aproximadamente 1200 pb), que corresponde ao gene do receptor de vitamina D, contendo sítios para as enzimas BamHI e XhoI; XhoI e HindIII (Figura 21), já que os *primers* utilizados adicionaram esses sítios de restrição. Estes sítios de restrição nos *primers* empregados para a amplificação foram inseridos de forma a permitir sua clonagem nos vetores de expressão.

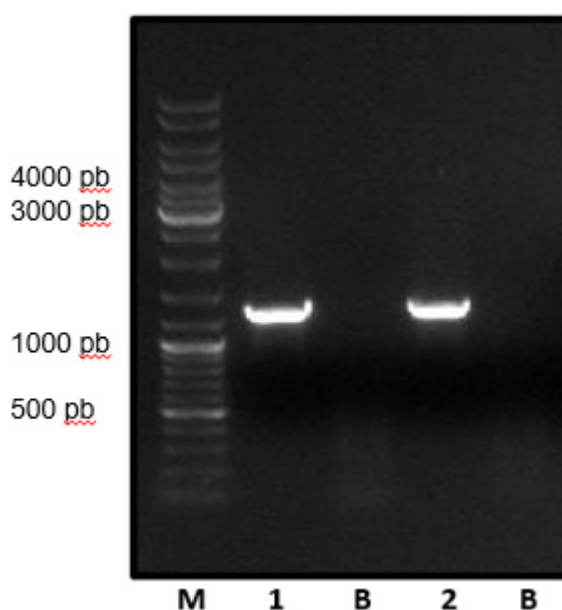


Figura 21: Eletroforese em gel de agarose 0,8%. M = marcador, 1 e 2: produto de PCR demonstrando a amplificação da sequência do receptor de vitamina D (1200 pb), utilizando diferentes pares de *primers*. B = branco.

A Figura 21 demonstra o resultado desta amplificação, que gerou o produto de 1200 pares de bases. O produto de PCR obtido teve o seu tamanho ideal, não apresentou nenhuma banda inespecífica, indicando o sucesso da otimização e resultou em quantidades suficientes para posterior clonagem.

Após a reação de amplificação, o produto de PCR foi purificado para retirada de *primers*, enzima e nucleotídeos que restaram na reação. O inserto, extraído do produto de PCR, e o vetor, pFASTBachTA, foram submetidos à restrição enzimática gerando extremidades coesivas, utilizando as enzimas BamHI e XhoI, e XhoI e HindIII. Foi obtida quantidade suficiente do inserto de interesse com extremidades coesivas adequadas para serem clonados no vetor de expressão, previamente digeridos com as mesmas endonucleases de restrição.

Apenas para uma análise, foi feita uma eletroforese em gel de agarose para observar a restrição do vetor, utilizando apenas 5 μ l da reação de digestão (Figura 22). Pode-se observar que, na digestão com as duas enzimas, não é possível visualizar a banda do fragmento entre os sítios, já que, entre BamHI e XhoI há um fragmento de 75 pb e, entre XhoI e HindIII, há um fragmento de 20 pb.

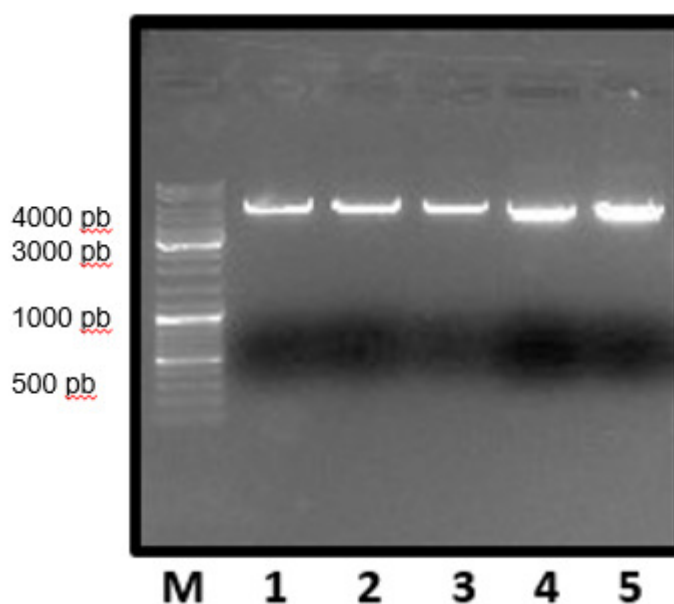


Figura 22: Eletroforese em gel de agarose 0,8%. Digestão do pFASTBacHT com as enzimas utilizadas para clonagem. M = marcador, 1: vetor cortado com BamHI, 2: vetor cortado com XhoI, 3: vetor cortado com HindIII, 4: vetor cortado com BamHI e Xho I e 5: vetor cortado com XhoI e HindIII.

Posteriormente, toda a reação de digestão do pFASTBacHT foi submetida à eletroforese em gel de agarose (Figura 23). A banda correspondente ao plasmídeo aberto (4780 pb BamHI/XhoI e 4835 pb XhoI/HindIII) foi retirada do gel (Figura 24) e purificada, para a reação de ligação.

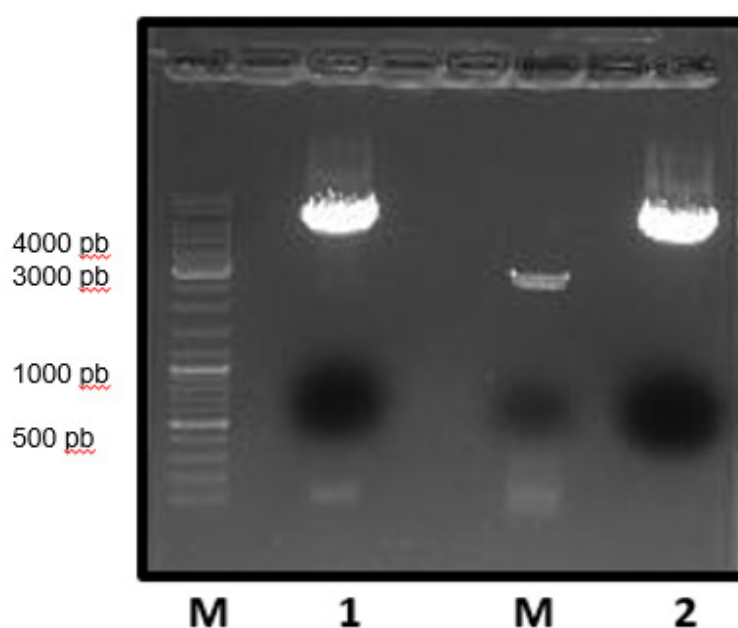


Figura 23: Eletroforese em gel de agarose 0,8%. Digestão pFASTBacHT. M = marcador, 1: vetor com dois cortes (BamHI e XhoI), 2: vetor com dois cortes (XhoI e HindIII).

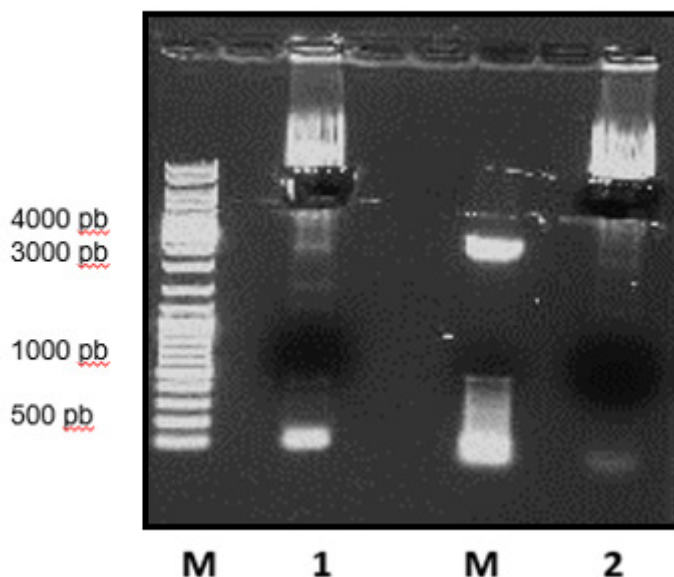


Figura 24: Eletroforese em gel de agarose 0,8%. Demonstra o gel da figura 23 com as bandas correspondentes ao vetor pFASTBacHT aberto retiradas, para purificação e clonagem.

O vetor e o inserto, pré-digeridos, foram então submetidos a uma reação de ligação, para que as extremidades coesivas fossem ligadas, construindo um vetor recombinante, gerando o pFASTBacHTA_VDR. Os plasmídeos recombinantes recém-construídos foram inseridos em bactérias *E. coli DH5a* competentes, para nova propagação plasmideal e extração do DNA. Como controles, foram feitas transformações com as reações de ligação feitas somente com o inserto, sem o vetor (C1); somente com vetor, sem inserto (C2) e somente com meio SOC (C3). As células transformadas foram semeadas em placas de LB ágar contendo ampicilina. No dia seguinte, foi possível observar colônias isoladas nas placas com as ligações feitas tanto com os sítios BamHI e XhoI quanto XhoI e HindIII. Os resultados obtidos com a transformação demonstraram que não houve crescimento nas placas C1 e C3 e houve crescimento na placa C2, indicando que, ao inserir o plasmídeo aberto na bactéria, ela teve a capacidade de fechá-los, porém, estes não continham o inserto.

Foram selecionados cinco clones para análise do vetor recombinante, por digestão enzimática, utilizando as enzimas BamHI e XhoI; e XhoI e HindIII. Todos continham o fragmento de tamanho esperado. A figura 25 mostra os resultados obtidos após a digestão. É possível observar duas bandas predominantes, sendo o fragmento maior o tamanho do vetor pFASTBacHT, linearizado, sem inserto (4,5 kb) e a outra banda corresponde ao tamanho do inserto, de 1,2 kb clonado. A presença

da sequência do VDR clonado no pFASTBacHTA foi confirmada por sequenciamento de DNA.

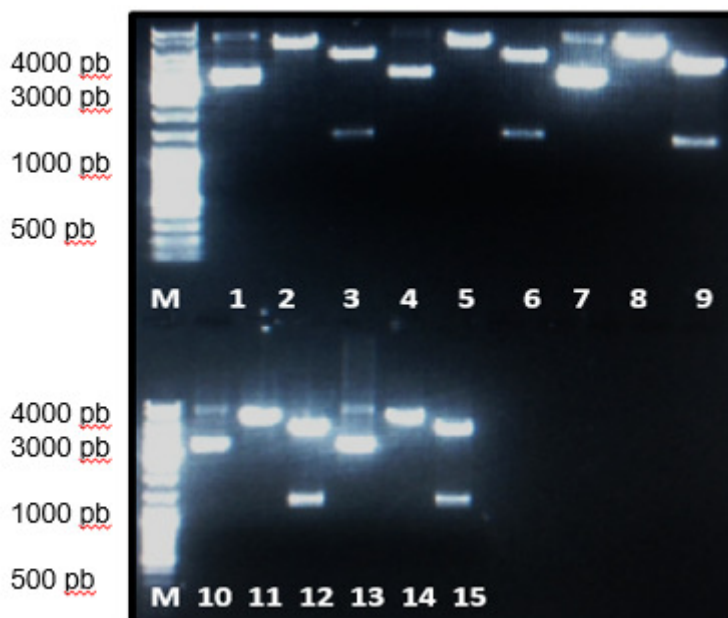


Figura 25: Eletroforese em gel de agarose 0,8%. Seleção de cinco clones para análise dos vetores recombinantes. M = marcador, 1: pFASTBacHT_VDR sem corte, 2: vetor recombinante com um corte (BamHI) 3: vetor recombinante com dois cortes (BamHI e XhoI), demonstrando a presença de um fragmento de tamanho correspondente ao inserto. Poços 4-9 seguem a mesma ordem, com clones diferentes. Poços 10-15 seguem a mesma ordem, porém a digestão foi feita com XhoI e Xho e HindIII.

5.2.3 Produção do bacmídeo recombinante

Células de *E. coli* DH10Bac quimicamente competentes foram transformadas com o novo vetor pFASTBacHT_VDR, por choque térmico, para transposição com bacmídeo, seguindo as recomendações do “Bac-to-Bac Baculovirus Expression System”. Diferentes volumes foram semeados em placas LB-agar contendo os suplementos necessários. Foram obtidas diversas colônias azuis e brancas (Figura 26). Foram selecionadas colônias brancas e azuis para confirmação de fenótipo, e foi possível observar que as colônias tiveram seus fenótipos devidamente confirmados (Figura 27). Foi feita a seleção de colônias brancas, indicando a presença do inserto dentro da região codificadora da enzima β -

galactosidase, considerando o processo de α -complementarização (SAMBROOK E RUSSELL, 2001), e os bacmídeos foram purificados. Após purificação, os bacmídeos foram analisados por PCR, para confirmação da amplificação ideal para cada bacmídeo. A tabela 6 mostra os tamanhos ideais a serem obtidos a partir dos produtos de PCR. A figura 28 mostra os produtos de PCR obtidos após amplificação dos bacmídeos, demonstrando a amplificação nos tamanhos ideais para cada bacmídeo.

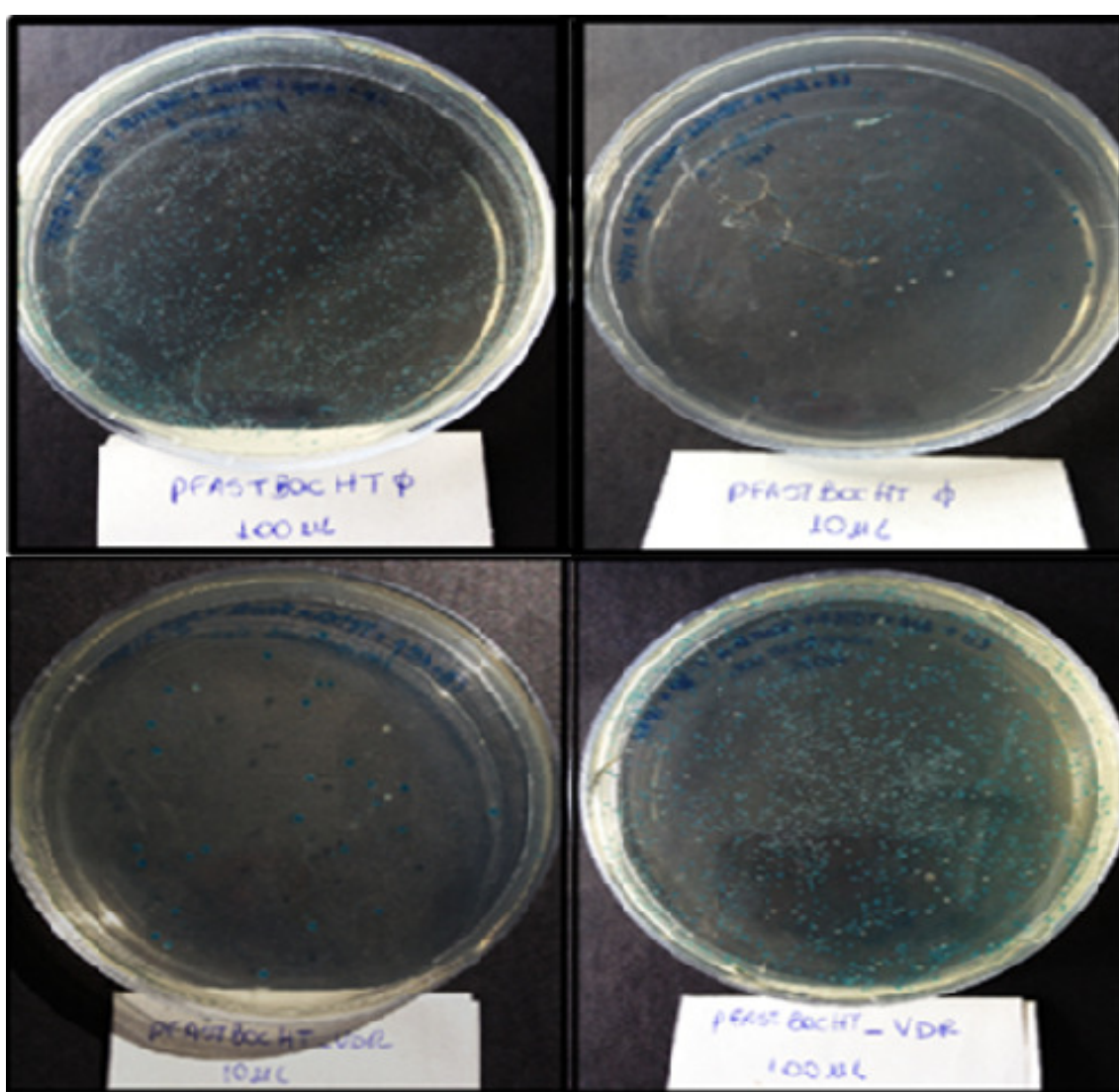


Figura 26: Placas de LB-ágar contendo IPTG e X-gal, após transformação de DH10Bac com os vetores pFASTBacHT. Pode-se observar a presença de colônias azuis e brancas.

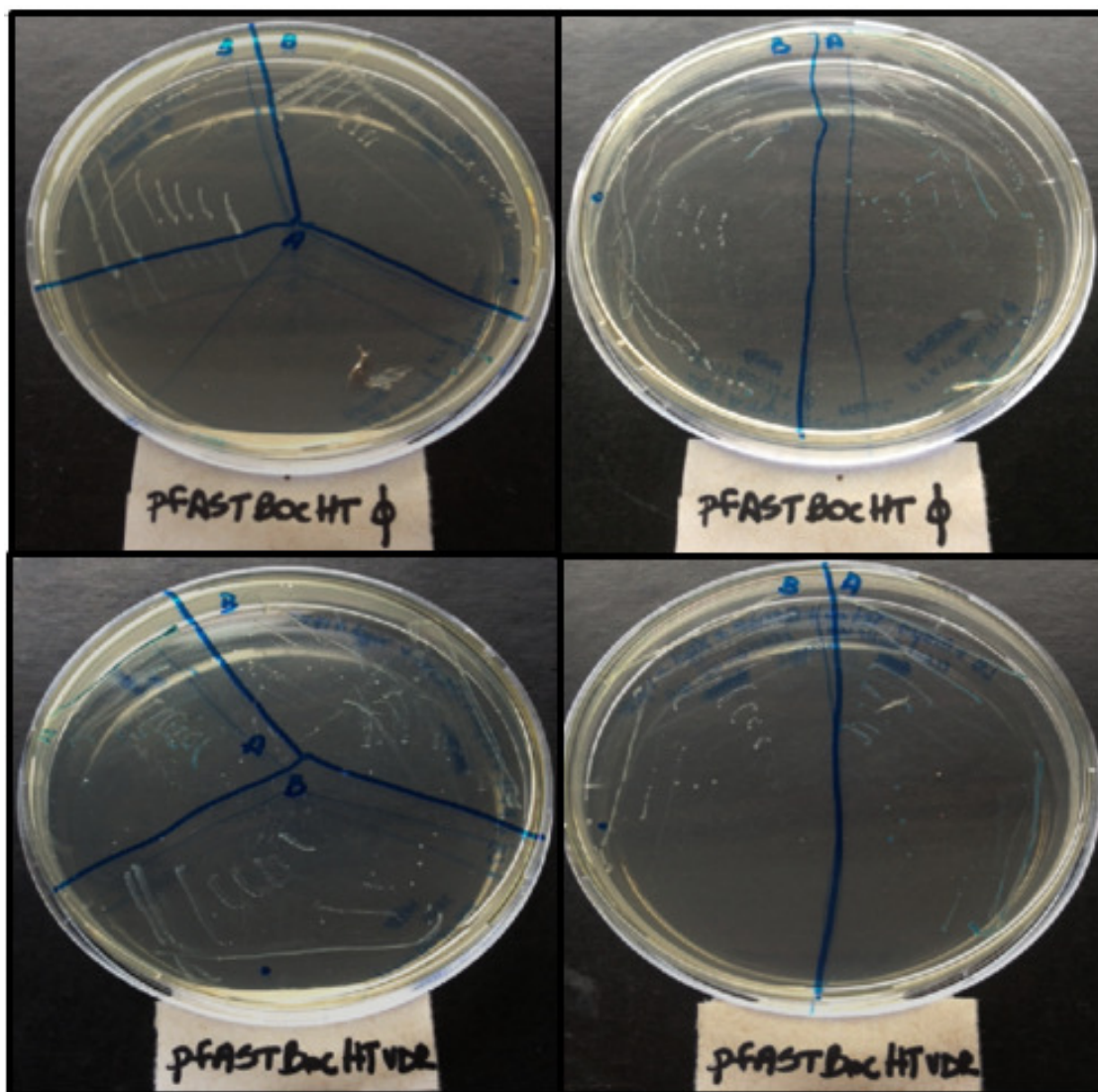


Figura 27: Placas LB-ágar contendo IPTG e X-gal. Confirmação do fenótipo de clones selecionados da transformação.

Tabela 6: Tamanhos dos produtos de PCR que devem ser obtidos após análise em eletroforese em gel de agarose.

Amostra	Tamanho do produto de PCR
bacmídeo (transposição com o pFASTBacHT)	~2430pb
bacmídeo (transposição com o pFASTBacHT_VDR)	~2430pb + tamanho do inserto (1200pb)
bacmídeo (transposição com o pFASTBac-GUS)	~4200pb

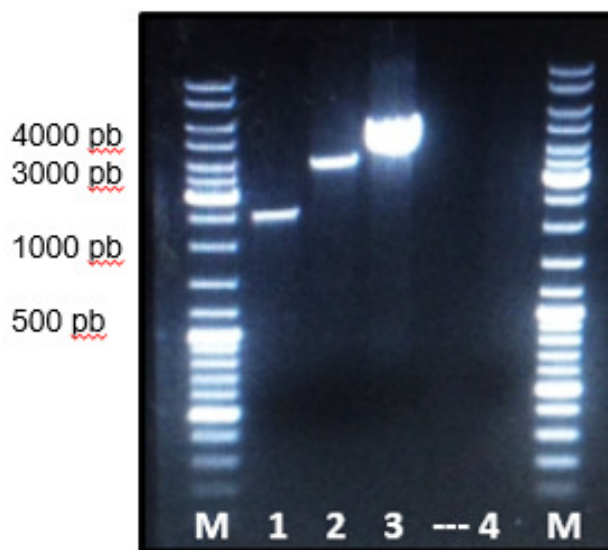


Figura 28: Eletroforese em gel de agarose 0,8%. Análise da reação de amplificação dos bacmídeos. M = marcador, 1: bacmídeo após transposição com o pFASTBacHT, 2: bacmídeo após transposição com o pFASTBacHT_VDR, 3: bacmídeo após transposição com o pFASTBacGUS.

5.2.4 Produção de baculovírus recombinantes

Após a confirmação do bacmídeo recombinante contendo o gene de interesse, foi feita a geração dos primeiros baculovírus recombinantes (P1). Após transfecção de células Sf9, as células foram incubadas durante 6 dias. Os primeiros sinais de infecção foram analisados, nos poços transfectados com bacmídeos recombinantes, nas primeiras 24 h, como aumento do diâmetro celular e aumento do tamanho do núcleo; nas 24-72 h após transfecção, foi possível observar cessamento do crescimento celular, aspecto granular e perda da aderência celular; e a partir das 72 h houve lise celular (dados não apresentados). O sobrenadante foi coletado e foi gerado o primeiro estoque viral (P1).

6 DISCUSSÃO

Visando avaliar o potencial uso do receptor de vitamina D recombinante como importante alvo biológico, buscou-se expressar essa proteína através de dois sistemas. Inicialmente, utilizou-se o método de expressão procariótico (*Escherichia coli*) e, no segundo momento, o sistema eucariótico, em células de inseto (baculovírus). Atualmente, diferentes sistemas de expressão gênica podem ser empregados visando uma maior produção de proteínas, facilitando o processo de purificação, para obter a proteína desejada em quantidade adequada para estudos funcionais e estruturais posteriores, dentre esses estão incluídos os de expressão em bactérias, leveduras, células de insetos e mamíferos.

O plasmídeo HS_VDR_EC1-PQE T7 foi utilizado neste trabalho com o objetivo de expressar o VDR em bactérias para futuros ensaios de ligação. A expressão da proteína é controlada fortemente pelo sinal de transcrição e translação de bacteriófago T7. Para que haja a expressão é necessária uma fonte de RNA polimerase T7 na célula hospedeira, encontrada em linhagens B de *E. coli*. Nestas bactérias a expressão desta RNA polimerase pode ser induzida pela adição de IPTG ou lactose (QIAGEN, 2005). A expressão da proteína VDR foi induzida em *E. coli* BL21(DE3)pLysS com IPTG em concentrações variadas (0,2, 0,4 e 1mM), sob diferentes condições de temperatura (15° e 37°C) e avaliada em diferentes tempos de indução. Observamos a expressão do receptor de vitamina D somente na forma insolúvel, em corpúsculos de inclusão, o que não seria útil para futuros ensaios de interação utilizando a proteína, já que, para isso, é necessária a obtenção da proteína ativa biologicamente.

Prosseguiu-se, então, com a purificação através de coluna de níquel, sob condições desnaturantes (tampão contendo 8 M de ureia), uma vez que a proteína de interesse encontrava-se em corpúsculos de inclusão, e foi possível observar a presença da proteína nos eluídos, detectando proteínas que se ligaram ao níquel da coluna. O mesmo não ocorreu na purificação da proteína na condição nativa, demonstrando que não houve expressão da proteína solúvel. No entanto a insolubilidade obriga a realização de procedimentos de desnaturação para purificação da proteína. O processo de desnaturar e renaturar a proteína coloca em risco a sua estrutura terciária, que pode não ser mais recuperada, inviabilizando

ensaios de ligação como a cristalografia, por exemplo. Rochel *et al.*, (2010) estudaram análogos sintéticos do calcitriol que agem como superagonistas e exibem propriedades antiproliferativas e prodiferenciadores *in vitro*. Ele produziram estruturas de cristais do VDR LBD ligados com estes análogos. Para isso, o LBD de VDR humano foi clonado em um vetor de expressão pET28b e foi superexpressado em *E. coli* BL21(DE3). As células foram cultivadas a 25°C, por 3 h com 1 mM de IPTG, conseguindo, com sucesso, o VDR recombinante, o que não foi possível observar no presente trabalho. Já Shaffer *et al.* (2002) descreveram estruturas de cristais do DBD VDR em complexo com elementos de respostas do DNA de três diferentes promotores. Para isso, o DBD de VDR humano foi expresso em *E. coli* BL21 (DE3), em corpúsculos de inclusão. Posteriormente, foi feita a solubilização da proteína com guanidina e renaturada por diálise. Chea *et al.* (2011) estudando o complexo VDR/RXR, também expressaram o VDR no sistema procarioto, obtendo-o desnaturada e solubilizando-o em tampão de ureia. Embora na literatura existam trabalhos que obtiveram sucesso com a renaturação, no nosso trabalho, decidimos por não realizar este procedimento.

A formação dos corpúsculos de inclusão é parcialmente suprimida quando o crescimento da *E. coli*, produtora de grandes quantidades da proteína recombinante, é dado em baixas temperaturas (LIN, 1987). Neste trabalho, a redução da temperatura não foi um fator determinante para a obtenção da solubilidade da proteína estudada. Vera *e cols.* (2007), estudando a proteína fluorescente GFP (*Green Fluorescent Protein*) expressa na forma agregada, encontraram uma relação interessante entre os efeitos da temperatura de ativação e a conformação estrutural. A diminuição da temperatura de ativação permitiu a obtenção da proteína GFP na forma solúvel e com o dobramento correto. Entretanto, no nosso trabalho não foi possível observar essa relação, já que só houve a obtenção de proteína agregada, mesmo com temperatura mais baixas de indução.

A formação de corpúsculos de inclusão, em bactérias, especialmente em *E. coli*, tornou-se um dos eventos indesejáveis mais comuns ao usar esse sistema de expressão para a produção de proteína recombinante solúvel, tanto para aplicações industriais e para a pesquisa (MARTINEZ-ALONSO *et al.*, 2010). Apesar de ter sido testado diversas condições de cultivo, não foi possível obter resultados satisfatórios na expressão utilizando *E. coli*, e portanto optou-se por prosseguir com

a expressão do receptor de vitamina D em um sistema eucariótico. O sistema baculovírus de expressão em células de inseto vem sendo amplamente utilizado e apresenta inúmeras vantagens frente a outros métodos de expressão. Uma das grandes vantagens desse sistema é que ele permite modificações pós-traducionais complexas, e as proteínas recombinantes podem reter as características originais.

Uma grande variedade de genes de vírus, fungos, plantas e animais têm sido expressadas em células de inseto infectadas com baculovírus recombinantes (LUCKOW *et al.*, 1991). O uso de vetores de baculovírus é uma estratégia importante para produção de proteínas em ambiente eucariótico que dificilmente seriam sintetizadas adequadamente em sistema procarióticos.

O método utilizado nesse trabalho foi baseado em um sistema que apresenta capacidade de gerar vírus recombinantes por transposição sítios-específicas em *E. coli*. A sequência do VDR foi inserida no plasmídeo pFastBacHTA, o qual faz parte de um sistema de expressão que promove a obtenção de um baculovírus recombinante contendo o gene de interesse através do mecanismo de transposição, conhecido como sistema *Bac-to-Bac Baculovirus Expression System*.

Inicialmente foi feita a clonagem do inserto contendo a sequência do VDR no vetor pFASTBacHTA. Células de *E.coli* DH10Bac competentes foram transformadas com o novo vetor pFASTBacHT_VDR, para transposição com bacmídeo. No presente estudo, após a transformação, foi possível detectar colônias azuis e brancas, que tiveram os seus fenótipos confirmados. Isso se deve ao fato de que no bacmídeo selvagem, há sítios receptores de transposição situados de modo que o fragmento transposto fique sob o controle do promotor da poliedrina. Tais sítios ficam em meio ao gene da enzima β -galactosidase, o que permite identificar os clones dos bacmídeos que receberam o gene transposto, cultivando as bactérias em placas contendo agar e um substrato, como X-gal, capaz de mudar de cor em contato com a β -galactosidase. Dessa forma, o bacmídeo em que não ocorreu a transposição, produz β -gal e colônia bacterianas azuis, enquanto o vetor recombinante gera apenas colônias brancas, devido à interrupção da sequência codificados da β -gal. Assim, é possível identificar e isolar os bacmídeos recombinantes e distingui-los dos selvagens antes de transfectá-los nas células de inseto, eliminando a necessidade de realizar um ensaio de placas. Os bacmídeos recombinantes foram extraídos e utilizados para transfectar células de inseto em cultura, visando à produção de baculovírus recombinantes.

A expressão de receptores nucleares hormonais em culturas de células de inseto é rotineiramente conduzida por um vetor de baculovírus. Uma vantagem na utilização desse sistema é a obtenção de grandes quantidades de receptores funcionais obtidos para estudos *in vitro* subsequentes. Niles *et al.* (1994) expressaram o receptor de ácido retinóico alpha 1 (hRAR alpha 1) em células Sf9 de insetos, utilizando o sistema de vetor de expressão de baculovírus, através do Nucleopoliedrovírus de *Autographa californica* (AcNPV). O receptor nuclear foi expresso em altos níveis, exibindo propriedades bioquímicas da proteína nativa, incluindo translocação nuclear, alta afinidade com o ligante específico e apresentou possível formação de heterodímero. Klinge *et al.* (2003) compararam a evolução e o nível de produção do receptor de estrogênio beta (ER beta) a partir de baculovírus em duas linhagens de células de inseto (Sf9 e Sf21). A expressão do ER beta e a atividade foi determinada por ligação específica ao [3H]estradiol (E2). Foi observado que a maior quantidade, melhor funcionalidade e bioatividade da proteína foram obtidas na linhagem Sf21, sendo esta a melhor célula para a produção de ER beta. Young *et al.* (2009) expressaram o receptor de mineralocorticóide utilizando também células Sf9, e descobriram um método rápido de expressar e purificar este receptor com sucesso. Em relação ao VDR, Haussler *et al.* (1991) utilizaram o sistema baculovírus de expressão para produção do VDR recombinante, utilizando células Sf9 e o baculovírus AcNPV. Foram avaliadas algumas propriedades funcionais da proteína, incluindo a interação do VDR com elementos responsivos do DNA (VDRE) do gene da osteocalcina de ratos. Foi possível concluir que esse sistema de expressão possibilitou um alto nível de expressão do VDR com características funcionais críticas preservadas. Desse modo, embora ainda não tenhamos demonstrado no nosso trabalho que o VDR recombinante estará ativo, com base nos resultados da literatura é provável que isso ocorra.

Uma vez que os NRs estão envolvidos na regulação ligante-dependente da expressão gênica, eles representam importantes alvos de drogas diretamente associados a várias doenças graves (NAGPAL *et al.*, 2003). Diante disso, o VDR ostenta uma valiosa e significativa contribuição na descoberta de novos fármacos. Uma característica do VDR é o fato de ele poder ser ativado por outras substâncias (HAUSSLER *et al.*, 2008). Numerosos análogos do calcitriol, que apresentem poucos efeitos colaterais calcêmicos e/ou propriedades antitumorais, têm sido sintetizados (ROCHEL, 2010). Mais de 3000 análogos sintéticos da forma

biologicamente ativa da vitamina D são atualmente conhecidos (CARLBERG et al., 2003). Eles foram sintetizados com o objetivo de melhorar o perfil biológico da natureza do hormônio, o que tem sido limitado pelos seus efeitos hipercalcêmicos, para uma aplicação terapêutica em doenças hiperproliferativas, tais como psoríase e diferentes tipos de câncer, bem como doenças ósseas tais como a osteoporose (BROWN *et al.*, 2011). Além disso, vários destes análogos representam modelos interessantes de ligantes, úteis para o estudo de mecanismos moleculares de sinalização da vitamina D (CARLBERG et al., 2003). Sendo assim, após obter o VDR recombinante biologicamente ativo, será possível realizar estudos como esses, buscando análogos do calcitriol, para que novas drogas possam ser descobertas, através de estudos de ligação, interação droga-receptor e análise cristalográfica.

Justamente por isso, os mesmos são estudados intensamente e objeto de muitas pesquisas, principalmente no sentido de proporcionar o melhoramento dos ligantes já existentes e, também, na busca de novas moléculas com potencialidade de vir a ser ligantes promissores. Além disto, tais estudos poderão fornecer conhecimento de cunho teórico para o entendimento aprofundado da ação do VDR ativado e da própria vitamina D e, após obtenção da proteína pura, será possível realizar as etapas subsequentes, como os estudos de interação e as análises estruturais.

Os resultados descritos no presente trabalho demonstraram que o sistema procariótico de expressão de proteína recombinante não foi eficaz para a produção do receptor de vitamina D de forma solúvel. Na tentativa de alcançar esse objetivo, optou-se pelo sistema eucariótico baculovírus de expressão. Foi possível, então, produzir bacmídeos recombinantes, utilizando-os na transfecção de células de inseto para produção de baculovírus recombinantes, para assim realizar experimentos de expressão do VDR recombinante nesse sistema. Sendo assim, faz-se necessária a continuação de estudos com objetivo final de obter a proteína na condição solúvel, para utilizá-la em futuros ensaios de ligação.

7 CONCLUSÕES/SUMÁRIO DE RESULTADOS

- O receptor de vitamina D foi expresso somente na forma de corpúsculos de inclusão;
- O sistema de expressão em *Escherichia coli* não foi eficiente para produzir o receptor de vitamina D recombinante solúvel;
- A redução da temperatura na indução da expressão do VDR recombinante não foi um fator determinante para solubilizar a proteína, assim como diferenças nas concentrações de IPTG e no tempo de indução;
- Foi possível detectar a presença do VDR através da imunodeteção utilizando anticorpo anti cauda de histidina;
- A proteína foi detectada nos eluídos após purificação, somente em condições desnaturantes;
- Foi construído um vetor contendo a sequência do VDR para expressar a proteína no sistema baculovírus-célula de inseto;
- Após análise por sequenciamento, confirmou-se a sequência correta do VDR no novo vetor;
- Com o novo vetor, foram obtidos bacmídeos recombinantes, através de transposições sítio-específicas;
- Foi observado a presença de colônias azuis e brancas, após transformação de bactérias DH5a;
- Após análise por PCR, foi demonstrada a amplificação nos tamanhos ideais para cada bacmídeo;
- Foram observados sinais de infecção após transfecção de células de inseto com bacmídeos recombinantes;
- Foram gerados baculovírus recombinantes após transfecção de células de inseto para, assim, seguir com a expressão do VDR recombinante.

REFERÊNCIAS

ADAMS, J. R.; MCCLINTOCK, T. J. Baculoviridae: nuclear polyhedrosis virus. In: _____. **Atlas of invertebrate viruses**. Boca Raton: CRC, 1991, p.87-204.

ANTONY, P. *et al.* Structure-function relationships and crystal structures of the vitamin D receptor bound 2 alpha-methyl-(20S,23S)- and 2 alpha-methyl- (20S,23R)-epoxymethano-1 alpha, 25-dihydroxyvitamin D3. **J Med Chem**, v. 53, p. 1159-1171.

ARANDA, A.; PASCUAL, A. Nuclear hormone receptors and gene expression. **Physiological reviews**, v. 81, n. 3, p. 1269-1304, 2001.

ARAUJO, R. B. Vitamina D: uma abordagem molecular. **A. Pesq. Bras. Odontoped. Clin. Integr.**, João Pessoa, v. 7, p. 309-315, 2007.

ARIF, B. M. The structure of the viral genome. **Current Topics Microbiology and Immunology**, v. 131, p. 21-29, 1986.

BAKER, A. R. *et al.* Cloning and expression of full-length cDNA encoding human vitamin D receptor. **Proc. Nat. Acad. Sci.**, v. 85, n. 10, p. 3294-3298, 1988.

BANERJEE, P.; CHATTERJEE, M. Antiproliferative role of vitamin D and its analogs - a brief overview. **Mol Cell Biochem**, v. 253, p. 247-254, 2003.

BANEYX, F. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. **Current Opinion in Biotechnologt**, v. 10, p. 411-421, 1999.

BARRAL, D. *et al.* Vitamina D: Uma Abordagem Molecular. **Pesq. Bras. Odontoped. Clin. Integr.**, v. 7, n. 3, p. 309-315, 2007.

BAYNES, J.; DOMINICZAK, M. H. **Bioquímica médica**. São Paulo: Manole, 2000, p. 566.

BERTOLINI, D. L.; TZANNO-MARTINS, C. Revisão: efeitos imunomoduladores da vitamina D. **J Bras Nefrol**, v. 22, n. 3, p. 157-161, 2000.

BOUILLON, R. *et al.* Structure-function relationships in the vitamin D endocrine system. **Endocr. Rev.**, v. 16, n. 2, p. 200-257, 1995.

BRENNAN, A. *et al.* Dendritic cells from human tissues express receptors for the immunoregulatory vitamin D3 metabolite, dihydroxycholecalciferol. **Immunology**, v. 61, p. 457–461, 1987.

CASTEELS, K. *et al.* Immunomodulatory effects of 1,25-dihydroxyvitamin D₃. **Curr Opin Nephrol Hypertens**, v. 4, p. 313-318, 1995.

CASTRO, Luiz Claudio Gonçalves de. O sistema endocrinológico vitamina D. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, São Paulo, v. 55, n. 8, 2011.

CASTRO, M.E.B. *et al.* Molecular biology of baculovirus and its use in biological control in Brazil. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v. 34, n. 10, 1999.

CHAE, Y. K. *et al.* Recombinant Expression, isotope Labeling and Purification of the Vitamin D Receptor Binding Peptide. **Bull Korean Chem Soc.**, v. 32, n. 12, p. 4337-4340, 2011.

CHAMPE, P. C; HARVEY R. A.; FERRIER D. R. **Bioquímica ilustrada**. Porto Alegre: Artmed, p. 533, 2006.

CHATURVEDI, U.C. *et al.* Cytokine cascade in dengue hemorrhagic fever: implications for pathogenesis. **Immunology and Medical Microbiology**, v. 28, p. 183-188, 2000.

CEREGHINO, G.P.L. *et al.* Expression of foreign genes in the yeast *Pichia pastoris*. In: SETLOW, J.K. **Genetic Engineering: Principles and Methods**. London: Kluwer Academic/Plenum, p. 157–169, 2001.

DOWD, D. R.; MACDONALD, P. N. The molecular biology of the vitamin D receptor. In: HOLICK, M. F. Nutrition and Health Series - Vitamin D: Physiology, Molecular Biology, and Clinical Applications. **Humana Press**, p. 135-137, 2010.

DUSSO, A. *et al.* Am. J. Physiol. **Renal Physiol.**, v. 289, p. 8-28, 2005.

ETTEN, E. V.; MATHIEU, C. Immunoregulation by 1,25-dihydroxyvitamin D₃: Basic concepts. **J Steroid. Biochem. Mol. Biol.**, v. 97, p. 93–101, 2005.

ETZIONI, A. *et al.* Defective leukocyte fungicidal activity in end-organ resistance to 1,25-dihydroxyvitamin D. **Pediatr Res**, v. 25, p. 276–279.

FEDERICI, B. A. Baculovirus pathogenesis. In: MILLER, L. K. **The baculoviruses**. New York: Plenum Press, p. 33-59, 1997.

FELDMAN, D.; PIKE, J. W.; GLORIEUX, F. H. **Vitamin D**. 2^a ed. London/San Diego: Elsevier, Academic Press, 2005.

FINK, A. L. Protein aggregation: folding aggregates, inclusion bodies and amyloid. **Folding & Desing**, v. 3, p. R9-R23, 1998.

GRONEMEYER, H. *et al.* Principles for modulation of the nuclear receptor superfamily. **Nat. Rev. Drug. Discov.**, v. 3, n. 11, p. 950-64, 2004.

HAUSSLER, M. R. *et al.* The Nuclear Vitamin D Receptor: Biological and Molecular Regulatory Properties Revealed. **Jour. B. Min. Res.**, v. 13, n. 3, p. 325-349, 1998.

HERNIOU, E.A. *et al.* Ancient coevolution of baculoviruses and their insect hosts. **Journal of Virology**, v. 78, n. 7, p. 3244-3251, 2004.

HEWISON, M. *et al.* Differential regulation of vitamin D receptor and its ligand in human monocyte-derived dendritic cells. **J. Immunol.**, v. 170, p. 5382–5390, 2003.

HOZJAN, V. *et al.* Ligand supplementation as a method to increase soluble heterologous protein production. **Proteomics**, v. 5, n. 1, 137-143, 2008.

ISSA, L. L. *et al.* Molecular mechanism of vitamin D receptor action. **Inflamm. Res.**, v. 47, n. 12, p. 451-75, 1998.

JEHLE, J. A. *et al.* On the classification and nomenclature of baculoviruses: a proposal for revision. **Archives of Virology**, v. 151, n. 7, p. 1257-1266, 2006.

JIANG, F. **Molecular Mechanism of Vitamin D Action and its Implications in Ovarian Cancer Prevention and Therapy**. Dissertation (Doctor of Philosophy) – University of South Florida, Florida, May, 2004.

KOCHUPILLAI, N.. The physiology of vitamin D: Current concepts. **Indian J. Med. Res.**, v. 127, p. 256-262, 2008.

KING, L. A.; POSSEE, R. D. The baculovirus expression system: a laboratory guide. **Chapman & Hall**, p. 1-229, 1992.

LAEMMLI, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 259, p. 680-685, 1970.

LARSON, R. E. *et al.* **IV Curso de Verão em Biologia Celular e Molecular**. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo – USP, 2007.

LEMIRE, J.M. Immunomodulatory actions of 1,25-dihydroxyvitamin D₃. **J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.**, v. 54, p. 599-602, 1995.

LIMA, B. D. A produção de insulina humana por engenharia genética. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, n. 23, nov./dez. 2001.

LUCKOW, V. A. Cloning and expression of heterologous genes in insect cells with baculovirus vectors. In: PROKOP A., *et al.* **Recombinant DNA technology and applications**. New York: McGraw-Hill, p. 97-152, 1991.

_____. *et al.* Efficient generation of infectious recombinant baculoviruses by site-specific transposon-mediated insertion of foreign genes into a baculovirus genome propagated in *Escherichia coli*. **J. Virol**, v. 67, n. 8, p. 4566-4579, 1993.

MAKRIDES, S.C. Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. **Microb. Review**, v. 60, p. 512-538, 1996.

MANGELSDORF, D. J. *et al.* The Nuclear Receptor Superfamily: The Second Decade. **Cell**, v. 83, n. 6, p. 835-839, 1995.

MANOLAGAS, S. C. *et al.* Vitamin D and the hematolymphopoietic tissue: A 1994 update. **Sem Nephrol**, v. 14, p. 129–143, 1994.

MARUNIAK, J. E. Baculovirus structural proteins and protein synthesis. In: GRANADOS, R.R., FREDERICI, B.A. **The Biology of Baculovirus**. Boca Raton: CRC Press, 1986, p. 275.

MARTINEZ-ALONSO, M. *et al.* Side effects of chaperone gene co-expression in recombinant protein production. **Microb Cell Fact**, v. 9, n. 64, 2010.

MAY, E. *et al.* Immunoregulation through 1,25-dihydroxyvitamin D3 and its analogs. **Curr Drug Targets Inflamm Allergy**, v. 3, n. 4, p. 377-393, 2004.

MILLER, L.K. **The Baculoviruses**. New York: Plenum Press, 1997, p. 447.

MOREIRA, R.O. *et al.* Distúrbios do eixo cálcio-PTH-vitamina D nas doenças hepáticas crônicas. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 48, n. 4, p. 443-450, 2004.

MORTON, C.L.; POTTER, P.M. Comparison of *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*, *Spodoptera frugiperda*, and COS7 Cells for Recombinant Gene Expression: Application to a Rabbit Liver Carboxylesterase. **Molecular Biotechnology**, v. 16, n. 3, p. 193-202, 2000.

MURHAMMER, D. W. The use of insect cell cultures for recombinant protein synthesis: engineering aspects. **Appl. Biochem. Biotechnol**, v. 31, p. 283-310, 1991.

MURPHY, F.A. *et al.* **Virus Taxonomy**: classification and nomenclature of viruses. New York: Springer-Verlag Wien, 1995. p.104-113. Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.

NASCIMENTO, A. A. C. *et al.* **Apostila de Tecnologia do DNA Recombinante**. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2003.

NAGPAL, S. *et al.* **VDR Noncalcemic Actions of Vitamin D Receptor Ligands** **Endocrine Reviews**, v. 26, n. 5, p. 662–687, 2005.

NORMAN, A.W.. Minireview: vitamin D receptor: new assignments for an already busy receptor. **Endocrinology**, v. 147, p. 5542-5548, 2006.

O'REILLY, D. R.; MILLER, L. K.; LUCKOW, V. A. **Baculovirus expression vectors: a laboratory manual**. 4 ed. Oxford: University Press, 1994.

ORLOV, I. *et al.* Structure of the full human RXR/VDR nuclear receptor heterodimer complex with its DR3 target DNA. **The EMBO Journal**, v. 31, p. 291-300, 2012.

ORR-WEAVER, T. L., *et al.* Yeast transformation: a model system for the study of recombination. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 78, N. 10, p. 6354-6358, 1981.

OZONO, K. *et al.* Perspectives: The genomic mechanism of action of 1,25-dihydroxyvitamin D₃. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 6, n. 10, p. 1021-1027, 1991.

POLAYES, D. *et al.* New baculovirus expression vectors for the purification of recombinant proteins from insect cells. **Facus**, v. 18, p. 10-13, 1996.

POSSEE, R.D. *et al.* Generation of baculovirus vectors for the high-throughput production of proteins in insect cells. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 101, p. 1115-1122, 2008.

QIAGEN. **EndoFree Plasmid Purification Handbook: EndoFree Plasmid Maxi, Mega, Giga Kits For purification of advanced transfection grade plasmid DNA**, nov. 2005.

QUICK, T.C. Characterization of human retinoic acid receptor alpha 1 expressed in recombinant baculovirus-infected Sf9 insect cells. **Receptor**, v. 4, p. 65-80, Summer 1994.

RACZ, A.; BARSONY, J. Hormone-dependent translocation of vitamin d receptors is linked to transactivation. **J. Bio. Chem.**, v. 274, n. 27, p. 19352–19360, 1999.

REILLY, D.R. *et al.* **Baculovirus Expression Vectors: A Laboratory Manual**. New York: W.H. Freeman and Company, 1992.

ROBINSON-RECHAVI *et al.* The nuclear receptor superfamily. **Journal of Cell Science**, v. 116, p. 585-586, 2003.

ROCHEL, N. *et al.* The Crystal Structure of the Nuclear Receptor for Vitamin D Bound to Its Natural Ligand. **Mol. Cell**, v. 5, p. 173–179, 2000.

ROOK, G.A. *et al.* Activation of macrophages to inhibit proliferation of Mycobacterium tuberculosis: comparison of the effects of recombinant gamma-interferon on human monocytes and murine peritoneal macrophages. **Immunology**, v. 59, p. 333–338, 1986.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular Cloning - a Laboratory Manual**. 3 ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SHAFFER, P. L.; GEWIRTH, D. T. Structural basis of VDR-DNA interactions on direct repeat response elements. **The EMBO Journal**, v. 21, n. 9, p. 2242-2252, 2002.

SINGH, S. M.; PANDA, A. K. Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 99, n. 4, p. 303-310, 2005.

SMITH, G. E.; SUMMERS, M. D.; FRASER, M. J. Production of Human Beta Interferon in Insect Cells Infected with a Baculovirus Expression Vector. **Molecular and Cellular Biology**, v. 3, n. 12, p. 2156-2165, 1983.

STRYER, L. **Biochemistry**. New York: W.H. Freeman and Company, p. 881, 1998.

TOWBIN, H., *et al.* Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proc Natl Acad Sci**, v. 76, n. 9, p. 4350-4354, 1979.

TOCCHINI-VALENTINI, G. *et al.* Crystal structures of the vitamin D receptor complexed to superagonist 20-epi ligands. **PNAS**, v. 98, n. 10, p. 5491-5496, 2001.

UMESONO, K. *et al.* Direct repeats as selective response elements for the thyroid hormone, retinoic acid, and vitamin D₃ receptors. **Cell**, v. 65, p. 1255-66, 1991.

VERA, A. *et al.* The conformational quality of insoluble recombinant proteins is enhanced at low growth temperatures. **Biotechnology and bioengineering**, v. 96, n. 6, p. 1101-1106, 2007.

WILLIAMS, D.C., *et al.* Cytoplasmic inclusion bodies in *Escherichia coli* cells overproducing bovine growth hormone. **Science**, v. 215, p. 687-689, 1982.

YASMIN R., *et al.* Nuclear import of the retinoid X receptor, the vitamin D receptor, and their mutual heterodimer. **J Biol Chem**, v. 280, n. 48, p. 40152-40160, 2005.

VALLEJO, L.F.; RINAS, U. Strategies for the recovery of active proteins through refolding of bacterial inclusion body proteins. **Microb Cell Fact**, v. 3, n. 11, 2004.

ZAHA, A. *et al.* **Biologia Molecular Básica**. Porto Alegre: Mercado Aberto, 1996, p. 336.

ZITTERMANN, A. Vitamin D in preventive medicine: are we ignoring the evidence? **Br J Nutr**, v. 89, p. 552–572, 2003.