

81.306



- R E S U M O -

"PROCESSO DE MODIFICAÇÃO DE CÉLULAS EUCARIÓTICAS INFECTADAS
COM VÍRUS DE CLONAGEM OU DE EXPRESSÃO DE UM GENE ESTRANHO,
COMPREENDENDO O GENOMA DA ERITROBLASTOSE AVIÁRIA "

Descreve-se um processo de modificação de células
eucarióticas, segundo o qual, as células são infectadas com
vírus de clonagem ou de expressão de um gene estranho, cons-
tituído por todo ou parte do genoma de um retrovírus, designa-
damente, de um genoma do vírus da eritroblastose aviária, e
que compreende, pelo menos, um gene estranho situado entre
duas sequências LTR (REPETIÇÃO TERMINAL COMPRIDA).



1

5

15

20

25

30

30

35



1 uma sequência exógena numa célula em cultura.

5 O presente invento diz respeito a novos vectores deste tipo e em particular a vectores de transferência de genes derivados de retrovírus, designadamente de retrovírus da eritroblastose aviária.

10 Os retrovírus devem à sua estrutura particular a aptidão para se integrarem facilmente na forma de provírus no ADN genómico das células que eles infectam. Os elementos estruturais que promovem esta integração encontram-se nas duas extremidades do provírus e denominam-se "Repetição Terminal Comprida" (Long Terminal Repeat) ou LTR. Esta facilidade de inserção dos retrovírus no interior do genoma das células que eles infectam conduziu à ideia da sua utilização como vector potencial para a transferência de material genético.

15 O genoma do retrovírus da eritroblastose aviária (AEV) contém dois genes onc denominados v-erbA e v-erbB e cujas expressões são responsáveis pelo potencial oncogénio deste retrovírus.

20 Numa primeira forma de realização do presente invento, o potencial oncogénico do vírus da AEV foi utilizado como marcador de selecção e a sua aptidão de inserção para a transferência nas células em cultura de um gene exógeno inserido neste retrovírus.

25 Numa segunda forma de realização do presente invento, o potencial oncogénico do vírus da AEV é suprimido e o gene marcador é um gene estranho, por exemplo de resistência a um antibiótico como o G418.

Um estudo rápido das características dos retrovírus permitirá compreender melhor o presente invento.

30 O genoma de um retrovírus não defectivo para replicação (figura 1) é formado por uma molécula de ARN que tem no sentido da transcrição (5' → 3') uma sequência curta igual a cada uma das extremidades e denominada R (entre 21 e 80 bases). A esta sequência seguem-se, por ordem, uma sequência única denominada U5 (com 70 a 80 bases), um local de fixação de um ARNt (TBS, aproximadamente 20 bases), e uma se-

35



1 quência não codificadora (sequência "guia"). A molécula de
ARN prossegue por uma região codificadora para três genes cu-
jos produtos de tradução são indispensáveis para a replicação
do vírus e que são gag (proteínas estruturais dos viriões),
5 pol (polimerase inversa), env (invólucro). O genoma ter-
mina, por ordem, por uma sequência não codificadora, uma se-
quência rica em purinas (PU), uma sequência única denominada
U3 (com 200 a 450 bases), e, finalmente, a sequência R. As
sequências extremas repetidas (R) ou únicas (U5 e U3) parti-
10 culares dos retrovírus parecem bastante bem conservadas neste
grupo de vírus e contêm os sinais implicados no controlo da
expressão do genoma viral.

Alguns retrovírus como a AEV, responsáveis por transfor-
mações neoplásicas que dão origem a leucemias ou tumores, de-
15 vem o seu potencial transformador à presença de sequências
particulares "onc" nos seus genomas. As sequências onc têm
origem celular e foram integradas no genoma viral depois de
recombinações com o genoma das células hospedeiras do vírus.
Na maior parte destes vírus, esta integração é acompanhada
20 pela perda total ou parcial dos genes gag, pol e env. Estes
vírus, por consequência, são defectivos para a replicação.
Para se replicarem, estes vírus necessitam da presença de um
vírus assistente funcional na mesma célula hospedeira.

Os vírus assistentes (helper) (ajudantes) podem repli-
25 car-se.

O seu genomas apenas contêm os genes funcionais gag, pol
e env.

O ciclo de infecção de um retrovirus começa pela adsor-
ção dos viriões à superfície das células, seguida pela pene-
tração no citoplasma. As fases que representam a replicação
30 e o ciclo viral de um retrovirus estão resumidas na figura 1.
No citoplasma da célula, o ARN viral de fibra única (a) é
transcrito pela polimerase inversa, presente no virião, numa
cópia linear de ADN fibra dupla (b).

35 A cópia de ADN resultante desta transcrição inversa é



1 um pouco mais extensa que a molécula de ARN viral que lhe ser-
viu de matriz. Esta diferença é o resultado da adição de uma
sequência U3 na extremidade 5' e de uma sequência U5 na extre-
midade 3'.

5 A combinação por ordem das sequências U3-R-U5 constitui
uma sequência nas duas extremidades da molécula de ARN denimi-
nada LTR (Long Terminal Repeat) (Repetição Terminal Comprida).
As cópias de ADN viral que contêm uma ou duas sequências
LTR são encaminhadas até ao núcleo onde são transformadas em
10 moléculas de formas circulares (c). Algumas moléculas circu-
lares já só têm uma única LTR. Estas moléculas são seguidamen-
te integradas no ADN genómico celular (d). O ADN viral é in-
tegrado no ADN celular de maneira que fica enquadrado por uma
LTR em cada extremidade e denomina-se então ADN proviral ou
15 provírus. Daqui por diante chamaremos " LTR esquerda " de um
provírus a LTR situada a montante do gene gag e "LTR direita"
a LTR situada a jusante do gene env.

20 É o provírus que serve de matriz para a transcrição de
moléculas de ADN virais. A transcrição inicia-se ao nível da
sequência R da LTR esquerda e termina para além do sinal de
poliadenilação deslocado pela sequência U3 ou R da LTR direi-
ta. Os ARN obtidos após transcrição do provírus são iguais aos
ARNm das células eucarióticas, revestidos por um resíduo 7mG
terminal na extremidade 5', e com uma sequência poliadenilada,
nas suas extremidades 3' terminais.

25 As moléculas de ARN associam-se em dímeros por meio de
ligações de hidrogénio nas suas extremidades 5' e estão encer-
rados no invólucro proteico viral. As partículas virais formam
um conjunto que sedimenta em 70S. São rejeitadas no exterior
da célula produtora e vão infectar as células próximas. Esta
30 libertação de partículas virais não é acompanhada pela morte
da célula.

35 A utilização do retrovírus AEV como vector de clonação
ou de expressão de um gene estranho (a seguir AEV vector)
pode revestir-se de diversas formas, tendo em conta o seu
processo de desenvolvimento.



1 A descrição que se segue diz respeito mais particular-
mente aos vírus AEV, mas o presente invento refere-se de ma-
neira geral aos retrovírus, e mais particularmente aos retro-
vírus aviários. Entre os retrovírus, o invento é mais particu-
larmente interessante para os retrovírus nos quais dois genes
5 podem ser expressos simultaneamente a partir do mesmo promo-
tor, em particular do promotor contido nas LTR e que dependem
de dois ARN genómico e subgenómico.

Quando o AEV vector é aplicado em condições que permi-
tem a sua replicação e a formação de viriões. isto é, com um
10 vírus auxiliar a infecção de cultura de células in vitro pode-
rá fazer-se com uma eficácia considerável. tendo em conta a
multiplicação dos viriões infecciosos.

Mas por outro lado a integração na forma de provírus
permite considerar o caso da modificação permanente do genoma
15 de um conjunto de células sem que o carácter infeccioso se
mantenha na ausência de vírus auxiliar.

O presente invento diz respeito, portanto, à utilização
de retrovírus aviários, em particular do AEV, como vectores
20 de clonação ou de expressão de um gene estranho.

É evidente que quando o AEV é utilizado como vector pa-
ra as necessidades da realização do vector ou por razões prá-
ticas de utilização, uma parte do genoma poderá ter sido su-
primida ou modificada.

Contudo, continuará a falar-se de AEV na medida em que
25 o vírus obtido continuará a manter as características essen-
ciais do vírus do AEV selvagem, isto é, a existência de sequ-
ências LTR que asseguram a sua integração.

Os termos " vector de clonação ou de expressão" são co-
nhecidos no campo da engenharia genética.

30 Além disso, tendo em conta o facto de o AEV ser um ví-
rus de ARN, a terminologia " vírus " poderá designar por ve-
zes o genoma viral na forma de ADN, assim como em certos ca-
sos o " gene " estranho poderá estar na forma de ARN, em par-
ticular quando está inserido no genoma de um virião.
35



1 As técnicas que proporcionam a passagem de uma forma ADN para a forma ARN e reciprocamente são conhecidas e são a transcrição e a transcrição inversa.

5 A expressão " gene estranho " significa um gene que não está no genoma do AEV natural e de preferência que não se encontra no genoma de um vírus.

10 O vírus recombinante pode ser utilizado sem alteração na forma de virião em ARN, mas o genoma viral na forma de ADN que compreende a inserção de um gene estranho, ele próprio também na forma de ADN e correspondente à transcrição inversa do ARN do vírus, pode ser integrado num vector de ADN como, por exemplo, um plasmídeo, um cosmídeo ou um fago.

15 A característica essencial destes vectores é que o gene estranho está inserido entre as duas sequências LTR do retrovírus, em particular do AEV.

20 Os retrovírus em causa são, a maior parte das vezes, defectivos, e é por isso que quando o vector em questão deve ser replicado, será utilizado em presença de um vírus auxiliar funcional que incluirá pelo menos os genes funcionais que faltam para a replicação do AEV, isto é, em geral os genes gag pol e env.

25 De maneira geral, o gene ou genes estranhos devem ser inseridos, portanto, de maneira a preservar o início e a suspensão da transcrição, o local da adição de poliA na LTR e os sinais de entrançamento.

30 Conforme se disse anteriormente, este tipo de vector poderá ser utilizado em duas formas essenciais, conforme o carácter do gene marcador utilizado.

35 De facto, o gene marcador pode aproveitar as propriedades oncogénicas do AEV, ter-se-ão então vectores oncogénicos mais particularmente utilizáveis para as culturas celulares, ou a actividade oncogénica terá sido suprimida e substituída por um gene marcador de resistência a uma droga análoga a um antibiótico como o G418, ter-se-á então um vector não oncogénico utilizável por exemplo para certas transferências de genes " in vivo ".



Os vectores oncogénicos

O genoma do AEV, esquematizado na figura 2, b, é constituído por uma sequência "guia" situada imediatamente a jusante da região U5. Esta sequência é seguida por um gene gag truncado na sua metade 3'. O gene pol está ausente.

Os genes onc v-erbA e v-erbB cobrem aproximadamente 3 kb. Estes dois genes estão separados por uma sequência de união que contém um local aceitante de entrançamento.

O genoma do AEV, portanto, é completamente desprovido do gene pol e parcialmente dos genes env e gag. A replicação do vírus obriga, por isso, à infecção simultânea por um vírus auxiliar. Neste trabalho, o vírus auxiliar é RAV-2 cujo genoma está representado na figura 3.

Por meio de recombinação genética "in vitro", foi possível criar supressões respectivamente nos genes v-erbA e v-erbB. Da análise do potencial transformador dos vírus mutantes assim criados resulta que:

. o gene v-erbB promove por si só a transformação dos fibroblastos "in vitro" e a indução de sarcomas "in vivo";

. o gene v-erbA isolado parece incapaz de induzir qualquer transformação "in vitro", e os resultados das análises "in vivo" relativamente ao gene v-erbA mantêm-se ambíguos;

. a supressão do gene v-erbA isolado provoca uma diminuição do potencial transformador sobre os precursores eritrócíticos "in vitro".

Este potencial oncogénico do AEV, localizado essencialmente sobre erbB, pode ser utilizado como meio de controlo da transformação de células expostas a este vírus. Deste ponto de vista, o carácter transformador dos retrovírus em geral e do AEV em particular pode ser comparado com o que resulta dos genes que codificam para a expressão de marcadores dominantes (gene xgprt ou gene Neo^r) que são aplicados na segunda forma de realização do presente invento. A vantagem desta transformação oncogénica induzida por um retrovírus é provocar alterações fisiológicas que conferem às células transformadas um poder multiplicador maior. Designadamente a aptidão espe-



1 cial dos fibroblastos transformados para se desenvolverem no
ágar mole proporciona um processo de selecção das células ten-
do incorporado exprimindo o genoma viral.

5 Com o fim de preservar a função do gene-v-erbB indispen-
sável para o desenvolvimento do potencial oncogénico, os genes
estranhos são inseridos quer no gene v-erbA quer a jusante do
gene v-erbB e antes da sequência LTR direita.

10 A escolha destes locais de inserção deve ter em conta,
além da preservação do gene v-erbB, a de outras zonas "sensi-
veis" do vírus (início e interrupção da transcrição, local
de adição de poliA na LTR, sinais de entrançamento).

As experiências realizadas mostraram que o gene estranho
podia ser orientado num ou noutro sentido em relação ao sen-
tido de leitura do genoma viral.

15 A inserção do gene estranho no local EcoRI(2) do AEV con-
duziu a dois vectores activos, AEVdelta(28) e AEVdelta(17) in-
corporando o gene da globina delta humana, que podem ser utili-
zados se se substituir o gene da globina por outro gene.

20 Nas experiências realizadas, os elementos de expressão
do gene estranho não foram estudados sistematicamente, mas é
evidente que o gene estranho pode ser precedido por elementos
de expressão que lhe são próprios, independentemente dos ele-
mentos de expressão que já existem no vírus.

25 Por razões de comodidade, as construções foram realizadas
primeiro sobre plasmídeos que compreendem uma sequência compó-
sita de ADN correspondente ao transcrito inverso de um vírus
conforme descrito anteriormente.

30 É evidente que este plasmídeo pode compreender uma parte
de plasmídeo bacteriano, que tem, por exemplo, uma origem de
replicação nos procariotas, e, por exemplo, um carácter de re-
sistência a um antibiótico, conforme se sabe, mas também se
pode tratar de um fago ou um cosmídeo.

35 Fibroblastos de frango em cultura transfectados pelos
vírus recombinantes na forma de clones de ADN deram origem a
uma produção de partículas virais infecciosas com títulos mui-



1 to grandes.

As análises dos ADN dos provírus e dos ARN resultantes das partículas virais mostraram que os vírus recombinantes conservam e transmitem o fragmento de ADN do gene humano de globina delta.

Escolha de gene humano de globina delta

Como exemplo de gene estranho, utilizaram-se os genes de globina, em particular da globina delta humana, porque pode imaginar-se que poderá ser facilmente posto em evidência depois da sua incorporação no genoma de células de frango. A escolha particular do gene de globina desta assenta em diversos critérios:

.a cartografia e a sequência foram estabelecidas e existe um clone deltaPst (figura 7);

.a dimensão do fragmento deltaPst não excede 2,3kb; um fragmento com dimensão muito maior provocaria um aumento da dimensão do genoma viral, que poderia inibir a sua encapsidação nas partículas virais;

.esta sequência tem, finalmente, uma cartografia de restrição que facilita a sua inserção no genoma do AEV.

Os vectores não oncogêneos

Neste segundo tipo de vector, o gene v-erbB já não se exprime, de preferência porque foi suprimido pelo menos parcialmente. Assim, nos vectores que serão estudados pormenorizadamente, os 1,6 kb de sequências nucleótidas de origem do gene erbB são eliminados e substituídos pelo gene estrutural Neo^r do transportador procariótico Tn5. Daqui resultam três ADN recombinantes pXJ1, pXJ2 e pXJ3.

É evidente que a utilização do gene estrutural Neo^r é descrita apenas como exemplo, e é claro que é possível utilizar outros genes de resistência como gene marcador.

O clone pXJ1 compreende uma só cópia do gene Neo^r que está orientada no mesmo sentido transcricional que o do AEV.

As sequências heterólogas introduzidas têm o comprimento de



1 1,2kb. São compostas por uma sequência resultante de "poly-linker" de clonação do fago mp11, nucleótidos derivados de um "linker" BglII, de um fragmento BglII-HincII do transportador bacteriano Tn5 no qual está situado o gene Neo^r, e de uma sequência curta do gene tk de HSV que tem designadamente o local de adição de sequência poliA.

5 No clone pXJ3, são introduzidas duas cópias do gene Neo^r na localização do gene erbB suprimido. Estes dois genes iguais colocam-se em tandem na mesma orientação transcripcional que a do gene erbB suprimido. Neste recombinante, as sequências heterólogas introduzidas são de 2,4 kb. As junções entre as sequências heterólogas e o vector retroviral são as mesmas que no caso de pWJ1.

10 Em resumo, a única diferença entre o AEV selvagem e os vectores retrovirais construídos é que o oncogénico viral v-erbB é substituído pelo gene procariótico Neo^r.

15 Quando as bactérias são transformadas pelos vectores portadores do gene Neo^r (pXJ1, pXJ2 e pXJ3), adquirem uma resistência à canamicina.

20 Quando a concentração de canamicina excede 50 µg/ml de cultura, as células bacterianas transformadas pXJ1 e pXJ3 mostram um crescimento 10 vezes maior que o das células transformadas por pXJ2.

25 O clone pXJ5 destituído de gene Neo^r não induz nenhuma resistência à canamicina das bactérias transformadas.

Assim, é possível que a LTR do AEV contenha sequência que desempenham um papel de promotor procariótico. No entanto não se pode por de parte a possibilidade de o gene Neo^r ser activado por promotores potenciais presentes nas sequências conservadas de pBR322.

30 Estes vectores foram introduzidos nas células L de rato e nas células QT6 de codorniz por transfecção. Apenas os vectores pXJ1 e pXJ3 induzem a resistência das células transfectadas com doses de G418 maiores que 300 µg/ml. Estes resultados mostram que a transcrição do gene Neo^r é iniciada ao nível do promotor suportado pela LTR esquerda.



1 O vector que suporta dois genes Neo^r em tandem induz
a resistência das células transfectadas com uma frequência
muito menor que o vector pXJ1. Esta propriedade poderia provir
quer da dimensão superior do vector pXJ3 que reduziria a sua
5 capacidade de integração no genoma celular, quer da existência
de recombinações entre as duas sequências Neo^r repetidas que
conduzem a supressões mais ou menos extensas destas sequências.
A interacção entre a terminação da tradução do primeiro gene
e a iniciação da do segundo poderia exercer também efeito so-
bre a expressão destes dois genes.

10 É evidente que o gene Neo^r, além da sua utilização
como marcador, deve ser considerado um exemplo da expressão
de um gene estranho num vector de acordo com o presente inven-
to. No entanto, neste tipo de vector, o gene Neo^r será utili-
zado como marcador e no vector será incorporado outro gene es-
15 tranho.

Outros vectores não oncogénicos provêm do AEV no qual
os dois oncogénicos v-erbA e v-erbB são inactivados por supres-
são parcial ou total.

20 Neste caso, é possível inserir dois genes estranhos
que poderão ser expressos simultaneamente, em particular se
um destes genes estiver situado entre as sequências de entran-
çamento e se o outro gene estiver situado no exterior das zo-
nas de entrançamento a jusante destas. Estes dois genes serão
então traduzidos a partir do ARN genómico para um e a partir
25 do ARN subgenómico para o outro.

As experiências mostraram que era possível fazer va-
riar a quantidade de ARN genómico em relação à quantidade de
ARN subgenómico.

30 Assim, a inserção do gene Neo^r foi efectuada primeiro
numa sequência que deixa subsistir vários codões de inicia-
ção em fases de leitura diferentes, em seguida numa construção
que já só tinha codões de iniciação numa mesma fase de leitu-
ra. Verifica-se que esta última construção influencia a rela-
ção de produção ARN genómico/ARN subgenómico num sentido fa-
35



1 vorável à produção de ARN genómico, isto é, à expressão do gene situado no local colocado em 5'. A utilização deste vector compreendeu a elaboração de um método de titulação específico para os vírus aviários que contêm o gene Neo.

5 Os vectores particularmente interessantes de acordo com o presente invento são aqueles em que se inseriu um local de restrição único entre os dois locais aceitantes e dadores de entrançamento e um local de restrição única a jusante destes locais de entrançamento; nestas condições, é possível inserir nestes locais genes estranhos que correspondem a um ARN genómico e um ARN subgenómico durante a transcrição.

De preferência, estes locais serão colocados para que os genes inseridos possam estar em fase no quadro de leitura, diz-se que os genes estão sincronizados.

15 Estes genes serão colocados de preferência para estarem na dependência do promotor da LTR 5'.

Um dos genes em questão poderá ser, por exemplo, um gene de selecção como Neo^r ou outro.

Conforme resulta da descrição precedente, visto que os genes estranhos inseridos nos vectores de acordo com o presente invento foram expressos frequentemente por meio de elementos de expressão que se encontram no genoma do vírus, é obviamente possível inserir a montante do gene estranho elementos de expressão específicos que promovem uma expressão acrescida da proteína estranha; estes elementos de expressão poderão ser, 25 por exemplo, promotores de vírus, em particular de vírus aviários.

Obviamente, quando o vector é um plasmídeo, um cosmídeo ou um fago, compreenderá também os elementos necessários para a replicação destes nas células procarióticas, assim como os elementos característicos deste tipo de vector, como as extremidades cos no cosmídeo.

O presente invento diz respeito, além disso, a células transfectadas pelos vectores de acordo com o invento, quer estejam na forma de vírus quer na de plasmídeos. É evidente que 35



1 a transfecção primária será efectuada geralmente com vectores
de tipo plasmídeo, quer dizer que o AEV estará na forma do
ADN do seu genoma; mas, em presença do ADN do vírus assisten-
te células aviárias transfectadas vão, neste caso, transfor-
5 mar-se e libertar vírus recombinantes que vão poder transfec-
tar outras células.

Este processo permite que se tenha um rendimento de
transformação de células muito grande, que será particularmen-
te precioso nas culturas celulares " in vitro ". Este tipo de
10 processo permite também constituir " stocks " de vírus vec-
tores utilizaveis depois no lugar dos vectores plasmídicos.

No caso de as células serem transfectadas por vecto-
res oncogéneos, a sua selecção é natural sem que seja necessá-
rio juntar um agente de selecção; em contrapartida, no segun-
do tipo de vector não oncogéneo que compreende um gene codifi-
15 cador para a resistência a um antibiótico, a cultura deverá
ser efectuada em presença do referido antibiótico.

As células em questão podem ser diversas, mas, de pre-
ferência, são células aviárias, em particular células hemato-
20 poéticas, germinais ou de tipo fibroblástico.

As células preferidas para a aplicação dos vectores
de acordo com o presente invento são os fibroblastos de embri-
ão de frango.

Finalmente, o presente invento diz respeito ao proces-
25 so para a preparação de uma proteína determinada, processo no
qual se cultivam células modificadas por um vector AEV de
acordo com o presente invento no qual o gene estranho codifica
para a referida proteína e em que se recupera a proteína da
cultura celular.

30 Convém observar que as células nas quais o vírus se
integrou na forma de provírus podem constituir categorias ce-
lulares, pode tratar-se, aliás, de células aviárias ou não
aviárias.

Quando a infecção é efectuada ao nível das células
35 germinais, designadamente ao nível do ovo, podem obter-se ani-



1 mais transformados.

Os exemplos que se seguem permitirão pôr em destaque outras características e vantagens do presente invento.

5 Estes exemplos são descritos com referência aos desenhos nos quais:

a figura 1 é um esquema de diversas fases de desenvolvimento de um retrovírus,

a figura 2 representa a estrutura do genoma de AEVwt e de AEVPst124,

10 a figura 3 representa o genoma do vírus assistente RAV2 na forma de ADN fibra dupla,

a figura 4 representa a formação " in vitro " de genoma virais com ADN portador de uma LTR em cada extremidade; o ADN do clone pRAV2 é aberto por Sall e em seguida submetido à acção da ligase, em condições que favorecem a formação de concatêmeros entre as moléculas; na mistura assim realizada, algumas moléculas estão rodeadas por uma LTR em cada extremidade; poderão integrar-se no ADN do genoma da célula hospedeira e dar origem a viriões; representou-se aqui apenas os arranjos em dímeros;



: sequência viral de RAV2

25 _____: sequência do plasmídeo pBR322

o sentido das setas indica o sentido da transcrição,

30 a figura 5 representa a construção de um genoma de ADN de AEV que compreende sequências LTR em cada extremidade (pAEV2LTR),

a figura 6 representa a carta do plasmídeo recombinante pBR-deltaPst e dos diversos fragmentos do gene humano de globina delta utilizados nas experiências de construção de vectores de transferência,

35



- 1 a figura 7 representa a construção de vectores recombinantes
do tipo pAEV2LTRdelta,
a figura 8 representa a estrutura de AEVdelta (28),
a figura 9 representa fragmentos de ADN clonados utilizados
5 como sondas,
a figura 10 representa as cartas teóricas de restrição dos
genomas provirais de tipo selvagem (a), mutante
AEVdelta(28) (b), mutante AEVdelta(17) (c),
a figura 11 representa a clonação dos fragmentos Bal31 em
10 mpl1,
a figura 12 representa a construção do mutante do AEVpAEV/
erbB (pXJ4),
a figura 13 representa a introdução do gene Neo^r do transpor-
tador Tn5 no vector retroviral pXJ5,
15 a figura 14 representa as estruturas dos clones pAEV/erbB
(pXJ4, pXJ5) e a construção de pXJ5,
a figura 15 representa a estrutura do genoma do AEV clonado
em pBR313,
a figura 16 representa a clonação do fragmento HincII-BamHI
20 (1,2 kb) que contém a junção entre v-erbA e v-
erbB nos bacteriófagos mp8 e mpl1 na forma de
ADN bicatenário,
(1,2 kb) nos bacteriófagos mp8 e mpl1 na forma
de ADN bicatenário,
25 a figura 17 é uma comparação das sequências nucleotídicas en-
tre o gene v-erbB do AEV e o do AEV-H (YAMAMOTO
et al., 1983),
---: nucleótidos idênticos,
os nucleótidos diferentes estão indicados na se-
30 quência do AEV o local BamHI na região 5' de
v-erbB está sublinhado,
a figura 18 representa a sequência nucleotídica dos fragmen-
tos Bal31 seleccionados,
a sequência não codificadora intercalada entre o
35 gene erba e o gene erbB está numerada;



1 os limites das sequências dos genes v-erbA e
v-erbB e a do vector de clonação mpl1 estão indi-
cados por linhas verticais; as linhas horizontais
representam as sequências do gene v-erbB conser-
vadas depois da digestão por Bal31; os locais de
5 restrição nas sequências de mpl1 estão sublinha-
dos; p15-16, p15-21, p15-25, p15-28; nomes dos clo-
nes, CAG: local receptor de entrançamento presu-
mido;

10 a figura 19 representa a estrutura do clone pXJ1 e a carta
dos locais de restrição;

a figura 20 representa a carta dos locais de restrição e a
estrutura de pXJ2;

15 a figura 21 representa a carta dos locais de restrição e a
estrutura de pXJ3;

a figura 22 representa as sequências de junções entre o gene
Neo^r e os vectores retrovirais nos clones pXJ1 e
pXJ3;

a figura 23 representa a preparação do clone mJS21 erb⁻;

20 a figura 24 representa a preparação do clone mpl1-gag;

a figura 25 representa a preparação do clona mpl0-J;

a figura 26 representa a preparação do clona pBRgag-2,7γ;

a figura 27 representa a preparação do clone pBRgag-J;

a figura 28 representa a preparação do clone pBRgag-J-env LTR;

25 a figura 29 representa a preparação do clone pBRgag-J-env
2LTR;

a figura 30 representa a preparação do clone pXJ11

a figura 31 esquematiza a estrutura de pXJ12.

30 Estas figuras e as sequências de nucleótidos corres-
pondentes fazem parte explicitamente da presente descrição,
mas não foram repetidas para evitar adensar a referida descri-
ção.

Os locais de restrição são abreviados da maneira se-
guinte: .

35



1	B	:	BamHI	
	BII	:	BglII	
	E	:	EcoRI	
	F	:	FkoI	
5	P	:	PstI	
	C	:	ScaI	
	Sm	:	SmaI	
	S	:	SalI	
	X	:	Xho	} figuras 1 à 22
10	H	:	HincII	
	X	:	XbaI	} figuras 23 à 31
	H	:	HindIII	

I - TÉCNICAS GERAIS

A) CULTURA DE CÉLULAS EUCARIÓTICAS

1) As células L (ratinho) são mantidas em cultura a 37°C e a 5% de CO₂. As células são substituídas de maneira regular de 3 em 3 ou de 4 em 4 dias. O meio de cultura é composto por DMEM (Gibco) complementado com 10% de soro de vitelo fetal, 2mM de glutamina, 2,2 mg/ml de bicarbonato de sódio, 100 µg/ml de estreptomicina, 100 ui/ml de penicilina.

2) Os fibroblastos de frango obtêm-se depois da substituição das culturas primárias preparadas a partir de embriões de 10 a 11 dias e mantidos em cultura em meio HAM F10 (Gibco) complementado com 10% de caldo de fosfato de triptose (Gibco), e µg/ml de polibreno, 5% de soro de vitelo, 1% de soro de galinha inactivado, 2 mg/ml de bicarbonato de sódio, 100 µg/ml de estreptomicina, 100 ui/ml de penicilina e 60 mg/ml de fungizona.

B) PREPARAÇÃO DOS ÁCIDOS NUCLEICOS

1) Preparação dos ADN

a) Preparação dos plasmídeos



1 As fontes bacterianas de E. coli HB101 ou C600RS que
contêm os plasmídeos utilizados são cultivadas sobre meio de
caldo L. (bactotripton 10 g/l, extractos de levedura 5 g/l,
NaCl 5 g/l) complementado com 5 ml/l de uma solução de glucose
5 a 20% e pelos antibióticos apropriados.

Os plasmídeos são isolados pela técnica do lisato cla-
rificado de acordo com EL-GEWELY e HELLING (1980), e purifi-
cados sobre gradiente de cloreto de cézio. Os ADN plasmídianos
purificados são novamente postos em suspensão em água bidesti-
lada e conservados a + 4º C.

10 b) Preparação de ADN de fibroblastos de frango

O ADN dos fibroblastos de frango é obtido depois de
homogeneização das células em Tris-HCl 100 mM pH 7,4, EdtNa₂
10mM, NaCl 100 mM, SDS 0,5%. Acrescenta-se pronase a 0,5% mg/
15 ml e incuba-se a mistura a 37ºC durante 8 a 12 horas. O ADN é
extraído com fenol-clorofórmio e com clorofórmio-álcool isoa-
mólico. A solução é ajustada para 200 mM de NaCl e precipitada
uma primeira vez com isopropanol e em seguida duas vezes com
atanol. O resíduo suspenso de novo em tampão T-E (Tris 10 mM
20 pH 7,4, Edta 1mM), é tratado com RNase (50 µg/ml) durante 1
hora a 37ºC, em seguida com pronase (100 µg/ml) durante 1 ho-
ra a 37ºC.

A solução de ADN é extraída uma vez com fenol duas
vezes com clorofórmio-álcool isoamílico, e, finalmente, o ADN
25 é precipitado por dois volumes de etanol. O resíduo de ADN
assim purificado é novamente suspenso em tampão T-E e guarda-
do a + 4º C.

2) Digestão da parte das enzimas de restrição

As enzimas de restrição provêm de Boehringer e são
30 utilizadas nas condições de incubação dadas pelo fabricante.
Em geral, utilizam-se 1 a 4 unidades de enzima para digerir
1 µg de ADN durante 2 horas a 37ºC. A reacção enzimática é
por incubação a 65ºC durante 5 a 10 minutos.

3) Preparação dos ARN



Os objectos de vidro utilizados para a extracção dos ARN são previamente esterilizados por meio de aquecimento no forno Pasteur durante 2 horas, pelo menos. Os tubos que servem para a extracção são tratados, além disso, com pirocarbonato de dietilo a 1% (Sigma). Os tampões são esterilizados a 120°C durante 30 a 40 minutos.

a) ARN celular total

O ARN celular total é extraído das células eucarióticas segundo técnica de AUFFRAY e ROUGEON (1980) a partir de $20 \cdot 10^6$ a $50 \cdot 10^6$ fibroblastos de frango infectados por retrovírus.

Depois de centrifugação das células a 800 rpm, os resíduos celulares são congelados em azoto líquido durante 10 a 15 minutos e voltam a ser postos em suspensão num tampão desnaturante (LiCl 3 M, ureia 6 M, acetato de sódio 0,01 M pH 5, complexo de vanadil - ribonucleico (BRL) 0,01 M). A solução é ajustada para 0,01% SDS e conservada durante uma noite a + 4°C. O ARN é recuperado depois de centrifugação a 10.000 rpm durante 20 minutos a 4°C. O resíduo é lavado com uma solução de ureia 8 M, LiCl 4 M, em seguida suspenso de novo em água bidestilada. A solução de ARN é extraída uma vez com fenol, uma vez com fenol-clorofórmio, e, finalmente, o ARN é precipitado com 2 volumes de etanol em presença de acetato de sódio 0,2 M pH 5.

b) Preparação dos ARN polia⁺

Os ARN polia⁺ são preparados segundo a técnica descrita por LONCAGRE e RUTTER (1977), por filtração sobre coluna.

Depositam-se 200 a 500 µg de ARN total sobre uma coluna que contém 200 a 300 mg de oligodT celulose de tipo 3 (Collaborative Research). A filtração de ARN é efectuada num tampão que contém Tris 10 mM pH 7,4 e KCl 500 mM. O eluato é reciclado duas vezes sobre a coluna. O ARN polia⁺ é desligado pelo tampão de eluição (Tris 10 mM pH 7,4). As soluções de ARN polia⁺ são ajustadas para 200 mM de acetato de sódio pH 5 e os ARN polia⁺ são precipitados por dois volumes de etanol.



1 Os resíduos são postos novamente em suspensão em água bides-
tilada e conservados a -20°C .

c) Preparação dos ARN viriões

Os viriões são recuperados nos sobrenadantes de cultu-
5 ra de fibroblastos de frango infectados pelo vírus. Na prático-
ca, quando as culturas infectadas pelo vírus contêm uma maio-
ria de células transformadas, o meio de cultura é substituído
por meio acabado de preparar. Os viriões são seguidamente co-
lhidos 24 horas depois. Os sobrenadantes são então centrifu-
10 gados uma primeira vez a 2.000 rpm durante 10 minutos para
eliminar os restos celulares. Os viriões são seguidamente por
ultracentrifugação num rotor sedimentados 50,2 Ti a 16.000 -
18.000 rpm durante 2 horas a 4°C . Os resíduos que contêm os
viriões são postos novamente em suspensão em Tris 10 mM pH
15 7,4 contendo Edta 10 mM, NaCl 100 mM e o complexo vanadil-ri-
bonucleico 10 mM. Juntam-se SDS a 0,1% e proteínase K (0,5 mg/
ml) e incuba-se a suspensão durante 1 hora a 38°C e em segui-
da extrai-se duas vezes com fenol, duas vezes com clorofórmio
e o ARN é precipitado com 2 volumes de etanol.

20 C) ELECTROFORESE E TRANSFERÊNCIA DOS ÁCIDOS NUCLEICOS SOBRE
FILTRO DE NITROCELULOSE

1) Electroforese e transferência de ADN

Depositaram-se 15 a 20 μg de ADN total previamente
25 digerido com enzimas de restrição sobre gel horizontal com 1%
de agarose. Efectuou-se a electroforese em tampão E-T (Tris
40 mM pH 7,5, acetato de sódio 20 mM, Edta 2 mM) contendo
0,5 μg de brometo de etídio, durante 12 a 16 horas. O gel é
desnaturado por imersão numa solução de NaOH 0,5 N e NaCl 1,5
30 M durante 2 a 3 horas, em seguida neutralizado por Tris-HCl
500 mM pH 5,6, NaCl 300 mM durante 3 horas, à temperatura am-
biente. A transferência do ADN é efectuada aplicando uma mem-
brana de nitrocelulose (Sartorius ou Schleicher e Schüll)
sobre o gel de agarose durante uma noite de acordo com a téc-
35 nica de SOUTHERN (1975).



2) Electroforese e transferência de ARN

15 a 20 µg de ARN total ou ARN polia⁺ ou 2 a 5 µg de ARN polia⁺ são desnaturados com formaldeído de acordo com LEH-RACH et al., (1977). Os ARN são equilibrados por tampão MOPS (ácido morfolinopropano sulfónico 20 mM pH 7, acetato de sódio 5 mM, Edta 1 mM) e desnaturados em presença de 6% de formaldeído e 50% de formamida a 65°C, durante 5 a 10 minutos, em seguida arrefecidas rapidamente em gelo. O fraccionamento dos ARN desnaturados é efectuado sobre gel horizontal de 1% a 1,5 % de agarose, contendo 6% de formaldeído, em tampão MOPS. A migração efectua-se durante 16 a 20 horas a 30-40 vóltios, à temperatura ambiente com reciclagem do tampão. A transferência dos ARN do gel sobre filtros de nitrocelulose realiza-se de acordo com a técnica de SOUTHERN (1975) modificada por THOMAS (1980). O filtro de nitrocelulose lavado em água bi-destilada é equilibrado durante 5 a 10 minutos em SSC× 20 antes de ser aplicado sobre o gel. A transferência dura uma noite a + 4°C. O filtro é seguidamente recuperado, seco sob uma lâmpada durante 5-10 minutos.

D) PREPARAÇÃO DE SONDAS RADIOACTIVAS

0,4 µg a 0,5 µg de diversos fragmentos de ADN utilizados como sondas são marcados " in vitro " por translação de corte (RIGBY et al. ., 1977). A reacção efectua-se num volume de 100 µl final contendo Tris-HCl 50 mM pH 7,8 MgCl₂ 5mM, BSA µg/ml, betamercaptoetanol 10 mM, dGTP 3,5µM, dATP 3,5 µM, 40 µCi de dCTPalfa p³² e 40 µCi de TTPalfa p³² (actividade específica 400 Ci/m mole - Amersham), 2 pg de DNaseI (Worthington) e 4 a 5 unidades de ADN polimerase (Boehringer). A mistura é incubada durante 2 horas a 15°C. A reacção é suspensa por meio da adição de 50 µl de Edta 250 mM, e o ADN marcado é separado dos nucleótidos não incorporados sobre coluna de Séphadex G.50 ou de biogel (Bio-Rad A. 1,5 m).

E) HIERIDAÇÃO DOS FILTROS



Depois da transferência quer de ADN quer de ARN, secam-se os filtros a 70-80°C durante 2 horas, tratam-se com um tampão de hibridação prévia (Tris-HCl 50 mM pH 7, SSC× 3, ARN_t 20 µg/ml, ADN de esperma de salmão 20 µg/ml, Denhardt's 1×, formamida 50% durante 8 a 20 horas a 42°C. A hibridação faz-se no mesmo tampão que contém 5-10.10⁶ cpm da sonda radioactiva durante 24 a 48 horas a 42°C.

No fim da hibridação, lavam-se os filtros uma vez em SSC 2× durante uma hora a 42°C e em seguida duas vezes em SSC 0,1×, SDS 0,1% durante 45 minutos a 50°C, e, por fim são lavados 4 vezes em SSC 0,1× durante 5 minutos. Depois de secagem, os filtros são expostos para auto-radiografia em película (Kodak royal X Omat AR) a -80°C com resguardos reforçadores. A exposição dura desde 5 horas até alguns dias.

F) DESIBRIDAÇÃO DOS FILTROS

Os filtros hibridados uma primeira vez com uma sonda marcada com ³²P são desibridados em SSC 70-75°C, durante 10 a 15 minutos. São secos e expostos durante 48 horas em auto-radiografia. Os filtros são tratados pelo tampão de hibridação prévia e utilizados com uma nova sonda.

II - TÉCNICAS UTILIZADAS PARA A RECOMBINAÇÃO GENÉTICA "IN VITRO"

A) ISOLAMENTO DE FRAGMENTOS CLONADOS EM PLASMÍDEOS

1) Isolamento depois de electroforese sobre gel de agarose

50 µg a 100 µg de ADN de plasmídeo contendo o fragmento a isolar são digeridos pelas enzimas de restrição, permitindo libertar o fragmento. Os fragmentos de ADN são seguidamente separados por electroforese sobre gel horizontal de agarose durante uma noite a 30-40 vóltios. A região do gel que contém o fragmento a isolar é seguidamente cortada. Ex-



1 tai-se o ADN da agarose por meio da aplicação de uma ou outra
das duas técnicas seguintes:

a) Técnicas de electroeluição

5 A região cortada do gel, e que contém o fragmento a
isolar, é colocada num saco de diálise contendo tampão E-T
(Trio 40 mM pH 7,5, acetato de sódio 20 mM, Edta 2 mM). O
saco é submetido a um campo eléctrico (30-40 vóltios) numa
tina que contém tampão E-T. A eluição do ADN é seguida por
iluminação breve com luz ultravioleta. No fim da eluição, o
10 ADN é extraído 3 a 4 vezes com álcool isoamílico e em seguida
precipitado com dois volumes de etanol.

b) Técnica denominada " freeze squeeze "

(TAUTZ e RENZ, 1983)

15 O pedaço do gel que contém o fragmento a isolar é
equilibrado em 10 vezes o seu volume de uma solução que con-
tém acetato de sódio 300 mM pH 7, e EDTA 1 mM, com agitação
durante 30 a 45 minutos ao abrigo da luz. O pedaço de gel é
colocado num tubo Eppendorf de 0,6 ml, perfurado no fundo e
rolhado com lã de vidro, e o conjunto é congelado em azoto
20 líquido. O tubo que contém o pedaço de gel é colocado num tu-
bo Eppendorf de 1,5 ml e em seguida centrifugado a 12.000 rpm
durante 10 minutos à temperatura ambiente. A solução recupera-
da que contém o fragmento a isolar é ajustada com uma solução
que contém $MgCl_2$ 1mM e ácido acético 10%, em seguida é preci-
25 pitada com 2,5 volumes de etanol. O resíduo é lavado sucessi-
vamente com uma mistura que contém etanol a 70%. O resíduo é
seco rapidamente, e em seguida volta a ser posto em suspensão
num tampão T-E.

30 2) Gradiente de sacarose

Depositam-se 50 µg a 100 µg de ADN de plasmídeos
previamente digerido pelas enzimas de restrição sobre um gra-
diente de sacarose 5-20%. O gradiente é centrifugado durante
14 a 16 horas, entre 30.000 e 36.000 rpm, num rotor SW41 a
35 20°C. As faixas observadas com luz ultravioleta são recupe-



1 radas por meio de uma pipeta.

Os ADN são dialisados em tampão T-E durante uma noite e em seguida purificados com fenol e com clorofórmio, e, por fim, precipitados com etanol.

5 B) DESFOSFORILAÇÃO DAS EXTREMIDADES 3' DO ADN

O ADN é incubado na presença de fosfatase alcalina bacteriana ou BAP (BRL) durante uma hora a 65°C. Geralmente, utilizam-se 10 unidades de BAP por mole de extremidade 3' de
10 ADN a desfosforilar. Em seguida elimina-se a enzima por meio de duas extracções sucessivas com fenol-clorofórmio e recupera-se o ADN por precipitação com etanol.

C) LIGAÇÃO

15 A ligação de fragmentos de ADN efectua-se num tampão composto por TRIO 600 mM pH 7,6 $MgCl_2$ 66 mM, DDT 100 mM, ATP 4 mM, em presença de ligase do fago T4 (Boehringer) com a concentração de 2 u/ μ g de ADN. Os ADN a ligar são adicionados em quantidades equimolar com a concentração final de 5 a 10 μ g/ml.
20 A mistura final que não excede 60 μ l é incubada durante uma noite a 65°C.

D) ADIÇÃO DE "LINKERS "

Os "linkers" PstI foram utilizados para a construção dos recombinantes pAEVdelta Δ Hpa. Neste caso particular, os
25 "linkers" são adicionados no local HpaI do gene humano de globina delta.

0,5 μ g de "linkers" PstI (BRL) são fosforilados numa mistura que contém Tris HCl mM pH 7,8 $MgCl_2$, 10 mM, beta-mercaptoetanol 15 mM, 4 unidades de polinucleótido quinase (Boehringer), de ATP 50 μ M e 10 μ Ci de ATP gama ^{32}P . A reacção é
30 incubada a 37°C durante 30 minutos. A mistura de "linkers" PstI fosforilados é acrescentada a 5 μ g de plasmídeo pBRdelta Pst aberto previamente no local HpaI e desfosforilado. A mistura é submetida à acção de ligase T4 durante uma noite a 15°C.
35 C.

1 E) IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS

Os ADN de plasmídeos recombinantes são introduzidos em bactérias C-600 RS tornadas competentes de acordo com a técnica de MANIATIS et al., (1982). As bactérias transformadas são seguidamente espalhadas sobre caixa de agar que contém os antibióticos apropriados.

F) IDENTIFICAÇÃO DOS PLASMÍDEOS NOS CLONES BACTERIANOS1) Transferência de colónias bacterianas sobre filtro

Esta técnica aplica-se no caso em que os plasmídeos recombinantes pretendidos representam uma proporção pequena entre os diferentes plasmídeos recombinantes possíveis, e permite uma crivação rápida num grande número de colónias bacterianas. Um papel filtro (Whatman) esterilizado por aquecimento a 150°C durante 2 horas é aplicado durante 10 a 15 segundos sobre a caixa de agar que contém colónias bacterianas bem individualizadas. Depois da transferência, os filtros são secos ao ar durante 5 a 10 minutos, em seguida tratados em NaOH 0,5 M durante 5 minutos e colocados numa estufa a 37°C durante 1 hora. Os filtros são seguidamente tratados duas vezes durante 5 minutos em cada um dos três banhos seguintes, com agitação:

NaOH 0,5 M - Tris 0,5 M pH 8 - SSC2x, e, finalmente, lavados em etanol e secos ao ar.

As colónias que contêm os recombinantes pretendidos são identificadas por meio de hibridação do filtro com uma sonda de ADN marcada com dCTP alfa ³²P por translação de corte.

Os filtros são hibridados previamente numa mistura de formamida 50% e SSC5x durante 2 horas a 37-42°C. A hibridação efectua-se na mesma mistura em presença de sondas específicas apropriadas durante 24 a 48 horas a 42°C. Os filtros são lavados respectivamente 30 minutos em formamida 50% e SSC5x a 37-42°C e 4 vezes 30 minutos em SSC2x à temperatura ambiente. Os filtros, finalmente, são lavados em etanol e em seguida secos ao ar e expostos para auto-radiografia durante



2 a 4 horas. As colónias que contêm o fragmento de ADN pretendido são identificadas após revelação da auto-radiografia, em seguida isoladas e analisadas por preparação rápida dos plasmídeos.

2) Preparação rápida dos ADN de plasmídeos

Os plasmídeos são preparados a partir de 1,5 ml de cultura de acordo com o método de lise alcalina de BIRNBOIM e DOLY (1979) modificado por MANIATIS et al. (1982).

Os ADN plasmídicos são analisados por digestão por meio de enzimas de restrição e fraccionamento sobre geles de agarose.

III - PRODUÇÃO DE PARTÍCULAS VIRAIS DE TRANSFEÇÃO DE FIBROBLASTOS DE FRANGO

A técnica de transfecção utilizada é a técnica do fosfato de cálcio descrita por GRAHAM e VAN DER EB (1973), modificada por WIGLER et al. (1977).

A) PREPARAÇÃO DO ADN

A quantidade de ADN transfectada por caixa de cultura de diâmetro 60 mm é de 10 a 15 ug. Este ADN compõe-se de ADN de esperma de salmão (3 a 4 ug) e de ADN viral. O ADN viral é constituído, por sua vez, pelo plasmídeo que contém o genoma AZV modificado e pelo plasmídeo que contém o ADN do vírus assistente RAV-2 numa relação molar de 5/1 a 10/1.

A mistura de ADN é posta em suspensão num volume de tampão A (HEPES 25 mM, CaCl_2 250 mM, pH 7,15). A precipitação fosfocalcica faz-se por meio de adição de um volume de tampão B (HEPES 25 mM, NaCl 280 mM, Na_2HPO_4 1,5 mM 7,15) com agitação rápida (10 a 15 segundos). Observa-se um precipitado muito fino na mistura ao fim de 20 a 30 minutos à temperatura ambiente.

B) PREPARAÇÃO DAS CÉLULAS RETRANSFEÇÃO

6.10^5 fibroblastos secundários de embriões de frango são semeados em caixas de Pétri de 60 mm de diâmetro, 16 horas



1 antes da transfecção.

Para a transfecção, a mistura de ADN precipitado é depositada em cada caixa de cultura e as células são incubadas durante 5 a 6 horas a 37°C. O meio de transfecção é seguidamente substituído por meio acabado de preparar e as células são substituídas numa caixa de Pétri de 100 mm de diâmetro. De 3 em 3 ou 4 em 4 dias, cada caixa de cultura é depois repartida em três caixas de 100 mm de diâmetro.

10

EXEMPLO 1

CLONE DO ADN DO VÍRUS ASSISTENTE

15

O genoma do vírus assistente RAV-2 foi obtido de BOONE e SKALKA (1981). O genoma é constituído por uma sequência de 8 kb inserido no local SalI do ADN do fago lambda. Esta sequência foi subclonada no plasmídeo pBR322 para fornecer o clone pRAV2. O genoma RAV2 apresenta um só local SalI situado no gene env. Em virtude disto, no plasmídeo, as sequências do genoma são em parte permutadas (figura 3).

20

A fim de produzir viriões RAV-2, o ADN pRAV2 deve ser transfectado sobre fibroblastos de frango. O ADN viral deve ser introduzido nas células receptoras na forma de um genoma enquadrado de LTR e no qual a disposição dos genes corresponde à existente no ARN viral.

25

Esta disposição pode ser realizada "in vitro" depois de digestão do plasmídeo pRAV2 por SalI e reunião entre si dos fragmentos obtidos a fim de criar concatémeros (figura 4).

30

A concatemerização por ligação permite gerar algumas moléculas que poderão ser integradas no genoma das células hospedeiras e transcrever ARN genómicos que podem gerar viriões infecciosos. Deverá notar-se que só uma proporção dos concatémeros pode dar nascimento a viriões.

35

Assim, se se considerar apenas o arranjo em dímeros indispensável para assegurar o funcionamento do sistema, calcula-se que apenas 1/3 das moléculas apresentarão a estrutura de um genoma proviral reconstituído.

EXEMPLO 2CLONE DO ADN DO AEV SELVAGEMa) Clone pAEV11

O clone de partida é constituído pelo plasmídeo pAEV11 isolado por VENNSTROM et al. (1980) e que está representado na figura 2,a.

Este clone é constituído por plasmídeo pBR313 no qual o genoma de AEV com aproximadamente 5,4kb foi inserido no local único EcoRI. Neste clone, o genoma viral apresenta uma permutação devida à presença do local EcoRI situado a 37 pb a montante do codão de terminação de v-erbB. Convém salientar que este clone encerra uma estrutura LTR dupla.

Como no caso de pRAV2, a produção de viriões a partir de pAEV11 implica a transfecção, sobre fibroblastos de frango, de concatémeros que reconstituem um genoma integral. Neste caso também, a proporção de concatémeros que apresenta o arranjo favorável é pequena. A fim de aumentar a eficácia de produção viral por transfecção, recriou-se por recombinação genética "in vitro" um clone no qual o genoma viral é reconstituído numa forma idêntica ao provírus.

b) Construção do clone pAEV2LTR

A redistribuição efectuada consiste em isolar o fragmento viral EcoRI-BamHI de 1,8 kb (figura 5) cobrindo o fim do v-erbB, o resíduo 3' terminal do gene env (Δ env), as sequências LTR e o começo do gene gag. Este fragmento foi inserido e clonado em pBR322, com o seu fragmento menor EcoRI-BamHI suprimido. O plasmídeo obtido denomina-se pJS21.

O genoma inteiro do AEV é isolado de pBR313 depois de digestão do plasmídeo pAEV11 por EcoRI. O fragmento que suporta o genoma AEV é ligado ao plasmídeo pJS21 previamente aberto no local único EcoRI. Um dos recombinantes obtidos, denominado pAEV2LTR, apresenta a estrutura de um vírus com uma cópia LTR em cada extremidade.



1 O ADN pAEV2LTR pode ser transfectado sobre fibroblas-
tos de frango sem digestão prévia. Depois de cotransfecção com
o ADN que suporta as sequências do vírus auxiliar RAV2, os fi-
broblastos produzem viriões de tipo AEV e sofrem uma trans-
5 formação oncogénea que se pode notar aproximadamente 15 dias
depois da transfecção. Nota-se que a transfecção com pAEV2LTR
aumenta muito claramente a eficácia da produção viral em re-
lação à transfecção com pAEV11 concatemerizado.

Assim, para induzir a transformação oncogénea de uma
10 cultura de fibroblasto, são necessários aproximadamente 25 µg
de pAEV11 concatemerizado, ao passo que se obtém o mesmo re-
sultado com 10 µg de pAEV2LTR. Além disso, a transformação on-
cogénea dos fibroblastos transfectados com pAEV2LTR surge mui-
to mais rapidamente do que com AEV11 concatemerizado.

15 EXEMPLO 3

INSERÇÃO DO GENE HUMANO DE GLOBINA delta NO GENOMA DO AEV

20 a) Natureza do fragmento inserido

O fragmento de globina delta é obtido depois de diges-
tão do plasmídeo pBRdelta Pst (figura 6) por EcoRI e isola-
mento sobre gradiente de sacarose. Este fragmento de ADN começa
a montante por uma sequência derivada do plasmídeo pBR322 (Eco
25 RI-PstI de aproximadamente 0,750 kb). O fragmento pBR é manti-
do essencialmente com o fim de conservar um local EcoRI na ex-
tremidade 5' do fragmento delta.

A estrutura específica da região delta prolonga-se
desde o local PstI até ao local EcoRI. Nesta sequência, o ge-
ne delta propriamente dito começa a 460 pb a jusante do local
30 PstI. Este local, denominado "cap", é o ponto de iniciação da
transcrição dos ARN mensageiros delta. 30 pb a montante do lo-
cal "cap" está a sequência CATAAAAG, que é a homóloga da se-
quência "TATA". Ao passo que a homóloga da segunda sequência
35 consenso "CAT" encontrada na maioria dos genes de eucarióti-



cas entre 70 e 80 pb a montante do local cap parece modificada no caso do gene delta (AACCAAC). As duas sequências consenso TATA e CAT estão implicadas na regulação da transcrição dos genes eucarióticos transcritos pelo ARN polimerase II.

A região transcrita compreende respectivamente indo do local cap de 5' para 3':

- uma sequência guia ("leader") cobrindo 50 pb,
- o primeiro exon (93 pb),
- o primeiro intron (128 pb),
- o segundo exon (221 pb),
- o segundo intron (889 pb),
- os cinquenta primeiros pares de bases do terceiro exon.

Em virtude disto, a extremidade 3' do gene é encurtada a partir do local EcoRI. A consequência desta supressão é a eliminação de 75 pb do 3º exon e toda a região 3' não codificadora que suporta entre outros o sinal de poliadenilação (AAUAAA) situado a 18 pb antes do local de terminação da transcrição.

b) Clonação do fragmento pERdeltaEcoRI em pAEV2LTR

O conjunto das sequências pER e delta forma um fragmento EcoRI-EcoRI com 2,6Kb que é inserido num dos locais EcoRI de pAEV2LTR. A identificação dos clones pAEV2LTR que sofreram esta inserção foi realizada pela técnica de transferência das colónias bacterianas sobre filtro. Só as colónias que apresentam hibridação positiva duma vez só com a sonda de ADN de globina delta e com a sonda de ADN gag-erba são retidas. Em 800 colónias analisadas, 24 satisfaziam estes critérios. O local de inserção e a orientação do fragmento delta são em seguida determinados por cartografia de restrição dos plasmídeos contidos nestas bactérias positivas.

Entre as numerosas combinações possíveis, apenas



os plasmídeos recombinantes que tinham inserido o gene de glo-
bina no local EcoRI situado na extremidade do gene v-erbB, nas
duas orientações possíveis, foram retidos (figura 7). Estes
recombinantes denominam-se pAEV2LTRdelta(28) no caso em que o
sentido de transcrição do gene é orientado na mesma direcção
que a do vírus, e pAEV2LTRdelta(17) no caso da orientação in-
versa.

Dos 24 clones que tinham incorporado o fragmento, do-
is eram do tipo pAEV2LTRdelta(28) e 4 eram do tipo pAEV2LTR
delta(17). Os clones pAEV2LTRdelta apresentam, portanto, 3
locais EcoRI que identificaremos da esquerda para a direita
respectivamente com os nomes: EcoRI(1), EcoRI(2), EcoRI(3).

c) Estrutura do plasmídeo pAEV2LTRdelta(28)

A inserção do fragmento portador do gene delta no lo-
cal EcoRI único do AEV interrompe a estrutura normal do gene
v-erbB (figura 8, a). O resultado desta inserção traduz-se
na criação de um novo codão de terminação (UGA) para a proteí-
na ErbB, situado a 1 pb a jusante do local EcoRI(2). Consequ-
entemente, a proteína erbB do mutante AEVdelta(28) deve apre-
sentar 12 ácidos aminados a menos na região C terminal.

Estando os sinais de suspensão de transcrição e de
poliadenilação suprimidos no fragmento PstI-EcoRI inserido,
são provavelmente as estruturas virais localizadas na sequên-
cia LTR da direita que deverão verdadeiramente desempenhar es-
tas funções.

d) Estrutura do plasmídeo pAEV2LTRdelta (17)

A inserção do fragmento delta em sentido contrário
ao da transcrição do vírus dá também origem a uma deslocação
da fase de leitura do gene v-erbB. Cria-se um novo codão de
terminação a 75 pb a jusante do local EcoRI (figura 8, b).
Daqui resulta que a proteína erbB deste mutante deve conter
teoricamente na região C terminal, 72 ácidos aminados mais que
a proteína erbB do vírus selvagem. Neste genoma viral recombi-
nante, a fibra viral que transcreve o ARN genómico (fibra +)



1 transporta a fibra anticodificadora do gene delta. Nesta dis-
posição, a fibra anticodificadora do gene delta faz surgir
duas sequências que lembram sinais de poliadenilação (AAUAAA)
a 93 pb e 800 pb a jusante do local EcoRI(2) (figura 9b).
5 Nesta construção, o promotor próprio do gene situado a mon-
tante do local cap já não é suportado pela fibra viral trans-
crita.

EXEMPLO 4

CARACTERIZAÇÃO DOS DIFERENTES VECTORES

10 Todos os plasmídeos recombinantes obtidos por recom-
binação " in vitro " são caracterizados por cartografia de
restrição e hibridação com uma sonda específica do gene de
15 globina delta. Os ADN plasmídicos dos diferentes clones re-
tidos, pAEV2LTR, pAEV2LTRdelta(28), pAEV2LTRdelta(17), são
preparados pela técnica de lise alcalina (MANIATIS et al.
1982), digeridos respectivamente pelas 4 enzimas de restri-
ção seguintes:

20 EcoRI, BamHI, PstI e SalI. O fragmento de di-
gestão são separados sobre um gel de agarose e observados à
luz U.V.. O ADN é seguidamente desnaturado no gel e em segui-
da transferido para um filtro. O filtro é hibridado com uma
sonda deltaPst marcada com ³²P por translação de corte. As
25 faixas correspondentes aos fragmentos portadores do gene são
reveladas por exposição em auto-radiografia. Para cada recom-
binante, as dimensões dos fragmentos resultantes das 4 diges-
tões (EcoRI, BamHI, PstI e SalI) são deduzidas das dimensões
dos fragmentos do marcador de peso molecular utilizado (ADN
30 do fago lambda digerido por HindIII).

No fim destas análises, observa-se o seguinte:
1º) as dimensões dos fragmentos que resultam das diversas
assimilações concordam para cada recombinante com as
dimensões esperadas;



- 1 2º) a hibridação pela sonda delta Pst apenas revela os fragmentos portadores da sequência delta, apresentando também as dimensões esperadas.

5 Destas duas observações, pode concluir-se que os clones recombinantes retidos são conformes com as construções procuradas.

EXEMPLO 5

10 TRANSFERÊNCIA DO GENE DE GLOBINA delta PELAS PARTÍCULAS VIRAIS AEVdelta(28) e AEVdelta(17)

A) PRODUÇÃO DE VÍRUS

- 15 1) Transfecção dos ADN provirais nos fibroblastos de frango

20 Para determinar se os vectores recombinantes construídos produzem vírus transmissíveis, o plasmídeo recombinante pAEV2LTR e os seus derivados pAEV2LTRdelta(28) e pAEV2LTRdelta(17) foram transfectados separadamente em presença de ADN do vírus auxiliar (pRAV2) em culturas secundárias de fibroblastos embrionários de frango.

25 As células foram mantidas em meio líquido e substituídas regularmente. A modificação morfológica característica da transformação dos fibroblastos pelo AEV surgiu a partir da 4ª passagem (2ª semana) para os três vírus. Depois de sementeira em gelose mole, estas células produzem colónias de fibroblastos transformados. Os sobrenadantes das culturas transformadas foram recuperados para se constituírem "stocks" de vírus e utilizados para infectar fibroblastos secundários acabados de preparar cuja transformação oncogénica visível induzem ao fim de uma semana aproximadamente. Isto demonstra

30 que as células transfectadas pelos ADN de vírus recombinantes produziram partículas virais, partículas que são infecciosas e conservaram a sua potência oncogénica. Denominaremos

35 AEVdelta(17) e AEVdelta(28) os vírus produzidos respectiva-



1 mente a partir dos plasmídeos pAEV2LTRdelta(17) e pAEV2LTRdelta(28).

2) Titulação dos vírus recuperados

5 Os "stocks " de vírus AEVdelta(17) e AEVdelta(28) foram titulados quanto ao seu potencial transformador, de acordo com a técnica de enumeração de focos de transformação. Para isso, inoculou-se 1 ml de suspensão viral diluída sobre culturas de fibroblastos acabados de preparar. As culturas foram seguidamente cobertas com agar, a fim de permitir o desenvolvimento de focos de transformação. O título do vírus é dado pelo número de focos de transformação por caixa multiplicado pela diluição da suspensão do vírus inoculado. O título é expresso em F.F.U. (Focus Forming Unit) por ml.

15 O vírus AEVdelta(28) recuperado a partir das células transfectadas apresentava um título de $5,10^4$ FFU/ml, superior ao do vírus AEVdelta(17) ($2,10^4$ FFU/ml).

O vírus selvagem AEVwt, produzido em condições análogas, tem geralmente um título próximo de $5,10^5$ FFU/ml.

20 A fim de verificar a estabilidade dos vírus recombinantes, os vírus são mantidos sobre culturas de fibroblastos de frango durante períodos de tempos diversos. Para isso, os "stocks" originais, derivados das culturas transfectadas, foram inoculados de fibroblastos acabados de preparar que sofreram em seguida duas substituições depois das quais se colheram os sobrenadantes de cultura para constituir os "stocks " virais II. Os vírus dos " stocks" II foram depois propagados novamente sobre fibroblastos acabados de preparar durante duas substituições, depois das quais se colheu o "stock" viral II.

30 Os títulos dos vírus nos "stocks" II e III foram determinados e são apresentados no quadro I

35

QUADRO I

<u>STOCK VIRAL</u>	<u>NÚMERO DE PARTÍCULAS VIRAIS</u>	
	<u>TRANSFORMADORAS POR ml</u>	
	<u>AEVdelta(28)</u>	<u>AEVdelta (17)</u>
Original I	5.10^4	2.10^4
II	2.10^4	1.10^4
III	2.10^4	$0,7.10^4$

Observa-se de maneira geral uma redução do título do vírus durante passagens sucessivas. Embora o AEVwt não tenha sido experimentado em paralelo, a experiência da utilização deste vírus mostra que o seu título se mantém aproximadamente estável depois de diversas passagens sobre cultura celular.

B) ANÁLISE DOS ARN VIRAIS TRANSCRITOS NAS CÉLULAS INFECTADAS E ENCAPSIDADOS NOS VIRIÕES

Infectaram-se fibroblastos embrionários de frango pelos vírus AEVwt, AEVdelta(17) e AEVdelta(28). Quando as culturas apresentaram uma maioria de células transformadas, recuperaram-se separadamente os sobrenadantes das culturas e as células.

A partir dos sobrenadantes, colhem-se viriões por centrifugação. Os ARN foram extraídos respectivamente dos viriões e das células. Os ARN celulares foram separados sobre oligodT celulose em ARN polia⁺ e polia⁻. Os ARN polia⁺ celulares e os ARN totais dos viriões foram fraccionados em eletroforese sobre agarose e transferidos sobre filtro de nitrocelulose. Os filtros foram hibridados sucessivamente com diversas sondas representadas na figura 9. Depois de exposição em auto-radio-grafia e revelação, as dimensões das faixas observadas foram resumidas no quadro II.



QUADRO II

SONDAS VÍRUS	erbA	erbB	deltaPst	intron 2 delta	pBR
AEVwt	5,3*	5,3*	-	-	-
	-	3,2	-	-	-
AEVdelta (17)	8	8	8	8	8
(inserção inversa)	6,3*	6,3*	6,3	6,3*	6,3*
	-	5,9	5,9	5,9	-
	-	4	4	4	4
	-	3,7	3,7	3,7	-
AEVdelta (28)	7*	7*	7*	-	7*
(inserção directa)	5,2-4,8*	5,2-4,8*	5-4,8	-	5-4,8
	-	3	-	-	-
	-	2,8	-	-	-

O quadro indica as dimensões das faixas identificadas pelas diversas sondas, nos fibroblastos infectados por AEVwt, AEVdelta(17) e AEVdelta(28). Os valores assinalados com um asterisco (*) correspondem aos transcritos presentes nos ARN polia⁺ celulares e nos ARN dos viriões duma vez só.

Este quadro demonstra a obtenção de viriões portadores do ARN do gene humano globina delta, assim como uma parte do ARN correspondente ao vector plasmídeo pBR.

C) ANÁLISE DOS PROVÍRUS NOS FIBROBLASTOS INFECTADOS PELOS VÍRUS RECOMBINANTES

1) Objectivo da investigação do ARN proviral

O ADN proviral representa, com excepção das LTR, uma cópia perfeita do ARN genómico a partir do qual é sintetizado. A análise do provírus deve proporcionar, portanto, informações



1 sobre a estrutura do genoma viral transferido para estas células. Esta análise aplicada aos mutantes AEVdelta(17) e AEV
delta(28) deve permitir verificar se estes vírus são capazes
de transferir, para o ADN das células infectadas, os genes
5 que foram enxertados nos seus genomas. Permite também saber
se estes genes são transmitidos integralmente ou se se produ-
ziram modificações estruturais no decurso dos diversos ciclos
de desenvolvimento dos vírus.

10 2) Identificação das sequências de ADN proviral

A existência no ADN de fibroblastos de frango de se-
quências c-erb aparentadas com as sequências oncogêneas virais
é revelada depois de hibridação com as sondas de origem viral.
Estas sequências c-erb distinguem-se das sequências v-erb pe-
15 las suas cartografias de restrição.

15 3) Análise dos provírus

Infectaram-se culturas de fibroblastos embrionários
de frango separadamente com AEVwt, AEVdelta(17) e AEVdelta
(28). Depois do aparecimento do fenotipo transformado, as cé-
lulas são tripsinadas e lisadas para se extrair delas o ADN
20 total. O ADN é purificado e digerido pelas enzimas de restri-
ção EcoRI ou BamHI. Os produtos de digestão foram separados
sobre gel de agarose, desnaturados e em seguida transferidos
para filtros. Os filtros foram hibridados sucessivamente pe-
las sondas erbB e deltaPst. As faixas foram reveladas depois
25 de exposição em auto-radiografia de 5 a 10 dias. As faixas
relativas aos genomas provirais AEVdelta(17) e AEVdelta(28)
são identificadas por comparação com diagramas de ADN prove-
niente de células infectadas por AEVwt.

30 D) INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS: ESTRUTURA DOS PROVÍRUS E TRANSCRIÇÃO DOS ARN VIRAIS

As dimensões das faixas características de cada pro-
vírus foram resumidas no quadro IV. A interpretação destas
faixas pode ser efectuada considerando a cartografia de res-
35 trição dos provírus representada na figura 10. No quadro III



indicou-se a dimensão teórica das faixas esperadas a partir dos genomas virais que foram construídos. Para o vírus AEVdelta(28), considerou-se que o intron2 do gene delta foi eliminado.

QUADRO III

DIMENSÕES (kb) TEÓRICAS DOS FRAGMENTOS OBTIDOS DEPOIS DE DIGESTÃO DOS PROVÍRUS AEVdelta(17) E AEVdelta(28) QUER POR BamHI, QUER POR EcoRI E RECONHECIDOS PELAS SONDAS VIRAIS erbB OU DE GLOBINA deltaPst

(Estas dimensões foram calculadas a partir dos plasmídeos pAEV2LTRdelta(28) e pAEV2LTRdelta(17). Considerou-se que o provírus perdeu o intron2 e eventualmente o intron 1 do gene delta).

<u>VIRUS</u>	<u>ENZIMAS</u>	<u>SONDAS</u>	<u>erbB</u>	<u>deltaPst</u>
AEVdelta (17)	EcoRI BamHI		- 1,5	2,6 1,5
AEVdelta (28)	EcoRI BamHI		- 2,2	1,5-1,6 2,2

QUADRO IV

DIMENSÕES (kb) DOS ADN DOS PROVÍRUS AEVdelta(17) E AEVdelta(28) APÓS CARTOGRAFIA DE RESTRIÇÃO (figura 10)

(Os valores assinalados com um asterisco (*) correspondem às dimensões dos fragmentos esperados após digestão por EcoRI e por BamHI).



1	PROVÍRUS	ENZIMAS	DIMENSÕES (kb)	
			SONDAS	
			<u>erbA</u>	<u>erbB</u>
5	AEVdelta(17)	EcoRI BamHI	- 1,5*	2,6* 1,4 1,5*
10	AEVdelta(28)	EcoRI BamHI	- 2,2* 2,1*	- 2,2* 2,1*

15 As correlações entre estes dois quadros demonstram a presença dos segmentos de ADN dos provírus que contêm sequências de globina delta humana.

20 A partir do genoma do AEV clonado num plasmídeo, construiu-se, portanto, por recombinação genética "in vitro", um genoma de AEV que contém sequências do gene humano de globina delta. Depois de transfecção do ADN viral recombinante em fibroblastos de frango em cultura, obtêm-se viriões infecciosos que contêm um genoma viral portador das sequências humanas delta. Depois de infecção de fibroblastos de frango acabados de preparar, por estes viriões, observa-se que as células integram nos seus genomas uma informação genética nova representada pelo gene humano de globina delta.

EXEMPLO 6

30 ESTABILIDADE DOS GENES TRANSFERIDOS

1) Eliminação dos introns dos genes transferidos

35 Quando o gene delta é inserido no ADN viral, numa orientação em que a fibra codificadora do gene delta coincide com a fibra codificadora viral, observa-se uma perda mais ou menos rápida dos introns do gene delta que conduz à estabi-



1 lização de genomas virais que já só são portadores das sequên-
cias codificadoras de delta.

Não se observa a perda dos introns quando o gene delta
é inserido com orientação inversa no genoma de AEV. Temos de
concluir daí que os introns são provavelmente eliminados por
5 fenómenos clássicos de entrançamento nos ARN virais que são
transcritos durante os ciclos sucessivos de infecção viral.

2) Dimensão dos genomas encapsidados

Os viriões AEVdelta(28) podem encapsidar um genoma de
10 7kb, ao passo que o genoma de AEVwt apenas representa 5,4kb.
Esta experiência demonstra que se podem transferir por meio
deste vector sequências com pelo menos 1,6 kb. Verifica-se
que nos viriões AEVdelta(17), o ARN genómico de 8 kb não se
nota. Este defeito de encapsidação pode resultar, quer de uma
15 dimensão grande demais do genoma viral, quer de uma modifica-
ção da estrutura secundária do genoma viral, quer de uma mo-
dificação da estrutura secundária do genoma viral devida à
presença do gene delta.

3) Estabilidade dos genes transferidos

Quando o gene delta é inserido em sentido directo,
não se notam rearranjos importantes aonivel das sequências
codificadoras deste gene nos provírus integrados nas células
infectadas.

25 Depois de infecção por AEVdelta(17), observa-se a in-
tegração de provírus que apresentam rearranjos mais ou menos
importantes na região 5' do gene delta e nas sequências pBR
flanqueadoras.

SELECÇÃO DOS VÍRUS QUANDO AO SEU PODER TRANSFORMADOR-DOMÍNIO 30 FUNCIONAL DA PROTEÍNA CODIFICADA POR v-erbB

Os vírus gerados a partir dos plasmídeos pAEV2LTRdel-
ta(17) e pAEV2LTRdelta(28) induzem a transformação oncogénea
dos fibroblastos de frango "in vitro". No "stock" viral
35 AEVdelta(17), os únicos genomas detectados contêm pelo menos



1 uma parte, das sequências pBR e delta inseridas. Estes vírus
dão origem a uma proteína erbB que contém na região C-termi-
nal 24 ácidos aminados mais que a proteína selvagem. Esta mu-
tação não influencia, portanto, o poder transformador do pro-
5 duto do gene erbB.

No "stock" viral AEVdelta(28), encontra-se com abundân-
cia um genoma viral recombinante que manteve as sequências
pBR e as sequências codificadoras do gene delta. Não se pode
excluir a presença de genomas que tenham suprimido estas se-
10 quências e cujas estruturas se aproximaria da do genoma selva-
gem. A persistência do genoma recombinante nalguns viriões su-
gere que estes viriões tenham uma vantagem selectiva de produ-
ção que poderia estar ligada com o seu potencial oncogénico.

Nestes genomas recombinantes, o gene v-erbB apresenta, em re-
15 lação ao gene selvagem, uma modificação estrutural que provoca
uma paragem prematura da tradução da proteína (figura 8').
A proteína erbB produzida por AEVdelta(28) não contém os 12
ácidos aminados C-terminais, normalmente observados na proteí-
na selvagem. Se AEVdelta(28) é capaz de transformar os fibro-
20 blastos "in vitro", temos de concluir daí que estes 12 ácidos
aminados C-terminais não desempenham um papel essencial no po-
der transformador da proteína ErbB.

Estas observações demonstram que se podem inserir se-
quências nucleotídicas estranhas no local EcoRI do gene v-erb
25 B sem deixar de manter o poder oncogénico e selectivo do vírus.

Nos genomas de AEVdelta(17) e AEVdelta(28), o gene del-
ta está associado às suas próprias sequências, contendo desi-
gnadamente os sinais de controle de transcrição. Nos dois ti-
pos de provírus, não se observa iniciação de transcrição ao
30 nível do promotor do gene. Todos os transcritos parecem ini-
ciados ao nível do promotor viral situado na LTR da esquerda.

Para explicar estes resultados, podem apresentar-se di-
versas hipóteses, entre os quais se reterão essencialmente as
três seguintes:

35 1) O gene de globina delta é pouco expresso



nas células eritrocíticas humanas e pode imaginar-se que o seu promotor é pouco activo.

2) A transcrição a partir dos provírus foi analisada em fibroblastos nos quais os genes endógenos de globina não são normalmente transcritos.

3) Estudos recentes de CULLEN et al. (1984) mostram que a LTR da esquerda funcional de um provírus exerce um efeito inibidor sobre a iniciação de transcrição a partir de um promotor situado na proximidade a jusante. Pode pensar-se que este fenómeno é identico ao que observamos no provírus AEV delta(28).

Os exemplos que se seguem dizem respeito a vírus vectores não oncogénicos; os materiais e os métodos utilizados são um pouco diferentes dos utilizados nos exemplos precedentes.

MATERIAIS E MÉTODOS

1) SUBCLONES DOS ADN DO AEV

Um fragmento SalI-BamHI (1,2 kb) que cobre a região situada entre os genes v-erbA e v-erbB é inserido entre os locais SalI e BamHI do plasmídeo pBR322. A estrutura deste clone (perb1) está apresentada na figura 11.

O clone pJS21 resulta da clonação de um fragmento EcoRI-BamHI (1,8 kb) que cobre a região 5' viral de pAEV11, entre os locais EcoRI e BamHI de pBR322 (figura 12).

O recombinante pAG50 foi construído por COLBERE-GARAPIN et al. (1981). Contém um fragmento BglII-HincII (1,1 kb) derivado do transportador procariótico Tn5 no qual se encontra o gene estrutural de resistência à neomicina, Neo^r, destituído do seu próprio promotor (figura 13) (BECK et al., 1982).

2) ASSIMILAÇÃO DOS ADN POR ENZIMAS DE RESTRIÇÃO

A digestão dos ADN pelas enzimas de restrição efectua-se conforme atrás descrito. Nalguns casos, os ADN assimilados são purificados por extração com fenol-cloroformio e em seguida com uma mistura cloroformio-álcool isoamílico e de-



1 pois precipitados com etanol.

3) TÉCNICA DA DIGESTÃO DOS ADN PELA NUCLEASE Bal31

5 A nuclease Bal31 degrada progressivamente o ADN bicate-
nário linear a partir das extremidades 5' e 3' de cada fibra.
Dada uma quantidade definida de ADN, a velocidade de digestão
pode ser controlada em função da concentração de Bal31, da
temperatura de reacção e do tempo de incubação. A especifici-
dade de Bal31 permite-nos eliminar, de maneira sucessiva, a
sequência nucleotídica num interior da qual os metais da res-
10 trição utilizáveis estão ausentes.

12 µg de ADN de perbl linearizado por BamHI são in-cuba-
dos a 30°C, em presença de um tampão de incubação que contém
12mM CaCl₂, 12 mM MgCl₂, 600 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH 8)
11 mM Edta, e de 2,2unidades de Bal31. As alíquotas (2 µg)
15 são retiradas ao fim de 5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos res-
pectivamente. A enzima é inactivada por adição de uma solução
que contém 0,5% SDS e 25 mM Edta. Seguidamente, os ADN dige-
ridos são tratados com fenol, precipitados com alcool absolu-
to frio e em seguida submetidos a uma digestão da parte de
20 SalI, e, finalmente, analisados por electroforese sobre o gel
de agarose a 1,6%. Segundo a cinética desta reacção obtida,
a velocidade de degradação de uma molecula é aproximadamente
30 nucleotidos por minuto.

Com base na experiência preliminar, submeten-se 25 µg
25 de ADN perbl a uma digestão da parte de Bal31 nas condições
atrás descritas durante 15 minutos. Os ADN digeridos são se-
guidamente purificados e depois as suas extremidades são re-
paradas pelo fragmento de "Klenow" derivados da DNA polimera-
se I de E.coli em presença dos 4 nucleotidos trifosfatos (
30 dATP, TTP, dCTP, dGTP).

4) ISOLAMENTO DOS FRAGMENTOS DE ADN DE DIFERENTES DIMENSÕES

A mistura dos fragmentos de ADN de dimensões variáveis
é primeiramente dissolvida de novo em água bidestilada de
35 maneira a obter uma concentração de 100 µg de ADN por ml.



1 A separação electroforética é realizada em seguida a 30 vól-
os durante uma noite (16 horas) sobre gel de agarose prepa-
ratório horizontal, cuja concentração varia desde 0,8 até 1,6
5 % conforme as dimensões dos fragmentos a separar. Marcadores
de pesos moleculares, em geral quer de ADN do bacteriófago
lambda digerido pela endonuclease de restrição HindIII, quer
de ADN do plasmídeo pBR322 digerido pela endonuclease de res-
trição AluI, são submetidos a electroforese paralelamente às
10 amostras. A cloração do gel por brometo de etídio permite
observar as faixas de ADN com iluminação ultra violeta. A re-
gião do gel que contém a faixa dos fragmentos de ADN com di-
mensões determinadas é cortada. Os ADN são seguidamente elui-
dos pelo método de "Freeze Squeeze". Esta operação conduz à
obtenção dos ADN prontos para serem submetidos à ligação ou
15 digestão pelas enzimas de restrição.

5) LIGAÇÃO DE FRAGMENTOS DE ADN E DOS VECTORES DE CLONAÇÃO

A ligação dos fragmentos de ADN isolados e dos ADN
de vectores efectua-se de acordo com a técnica descrita
precedentemente.

20

6) CLONAÇÃO DE SELECÇÃO DOS PLASMÍDEOS RECOMBINANTES

A transformação das bactérias, a selecção das bacté-
rias e a análise rápida dos plasmídeos efectuan-se de acordo
com as técnicas descritas precedentemente.

25

7) PREPARAÇÃO DOS ADN PLASMÍDIANOS

Os ADN de plasmídeos são isolados sobre gradiente de
cloreto de cézio conforme descrito precedentemente.

Nalguns casos, estes ADN são purificados ulteriormen-
te sobre camada de NaCl a fim de eliminar os oligoribonucleó-
30 tidos contaminantes (MANIATIS, 1982).

8) SEQUENCIACÃO

Os fragmentos sequenciais são clonados nas variantes
mp8 e mp11 do fago M13. A sequenciação dos fragmentos efectua-
35 -se segundo o método de SANGER et al., 1977.



9) LIGAÇÃO DE OLIGONUCLEÓTIDOS SINTÉTICOS " LINKERS"

No caso de ausência de locais de restrição compatível com as extremidades coesivas do fragmento de ADN a clonar, a utilização dos oligonucleótidos sintéticos " linkers" que têm a sequência do local de restrição permite criar novos locais de clonagem nos vectores.

9.1) Fosforilação dos " linkers"

Para introduzir um local de restrição BglII no vector pXJ4 (figura 14), escolhem-se os " linkers" BglII5'-d(CAGATCTG)-3' (PRL).

3 µg de "linkers" BglII são fosforilados a 37°C durante 30 minutos em presença de uma solução de 100 µl composta por 1 µM ATP frio, 30 µCuries ^{32}P -ATP (5.000 µCuries/mole), um tampão que contém 60 mM Tris-HCl (pH 7,8), 10 mM MgCl_2 e 15 mM 2-mercaptoetanol e 80 unidades de polinucleotido quinase de fago T4 (BRL). Os "Linkers" fosforilados são seguidamente submetidos a diversos controlos destinados a verificar as suas capacidades para se ligarem em presença de ligase do fago T4 e para serem digeridos pela enzima de restrição BglII.

9.2) Modificação das extremidades coesivas 5' de saída

A digestão dos ADN por algumas endonucleases de restrição conduz à obtenção de moléculas portadoras de extremidades coesivas 5' de saída. Para ligar os braços do vector portadores das extremidades coesivas 5' de saída com os "linkers" cujas extremidades são francas, é indispensável, portanto, transformar as extremidades coesivas em extremidades francas.

17,5 µg de pXJ4 linearizado pela enzima de restrição EcoRI são incubados a 25°C durante 10 minutos em presença de 39 unidades do fragmento de "Klenow" derivado da DNA polimerase e de E.coli (BRL), de um tampão de incubação que contém 50 mM Tris-HCl (pH7,4), 10 mM MgSO_4 , 0,1 mM DTT e 50 µg de albumina de soro de bovino por ml, de $3,9 \cdot 10^{-2}$ mM de nucleotidos trifosfatos frios (dATP, dCTP, dGAP) e de 40 µCuries ^{32}P -TTP.



Decorridos 10 minutos, adicionam-se 10 µl de 2 mM TTP frios em 515 µl de meio de reacção e a incubação continua a efectuar-se durante 10 minutos. Os ADN modificados são depois purificados por extracção com fenol e precipitados com etanol frio.

9.3) Inserção de "linkers" nos vectores

A proporção molecular entre os " linkers" e os vectores a ligar é em geral superior a 50/1.750 µg de ADN de pXJ4 e 570 µg de " linkers" BglII são incubados a 15°C durante 20 horas em presença de 5 unidades de ligase do fago T4 e de um tampão de ligação identico ao descrito no parágrafo 6), num volume final de 60 µl.

Para eliminar " linkers" excessivos, o meio de reacção de ligação é seguidamente incubado em presença da enzima de restrição BglII. Os ADN linearizados são seguidamente submetidos a duas precipitações a -80°C durante 30 minutos em presença de uma mistura de etanol e 1,5 M de acetato de amónio. Estas duas precipitações permitem recuperar os ADN com grandes pesos moleculares (vectores) por meio de centrifugação, enquanto que os " linkers" livres e digeridos continuam no sobrenadante. Os vectores assim modificados são depois reunidos e clonados nas bacterias C600. A introdução de um local BglII é identificada por cartografia de restrição.

10) TRANSFECCÃO DAS CÉLULAS AUCARIÓTICAS

10.1) Cultura das Células

As células utilizadas para a transfecção são as seguintes: células L de ratinho (descendência contínua), células de codorniz QT6 (descendência contínua), e fibroblastos de embriões de frango CEF.

As culturas das células L de ratinho e dos fibroblastos de embrião de frango são realizadas de acordo com as técnicas descritas precedentemente.

As células QT6 de codorniz são cultivadas a 37°C em meio MEM (Gibco) que contém 2,5 mg/ml TPB ("tryptose phos-



phate broth) (caldo de fosfato de triptose), 10% de soro de vitelo fetal, 1% de soro de frango, 0,19% de bicarbonato de sódio, 100 unidades de penicilina por ml, 100 ug de estreptomina por ml, ácidos aminados não essenciais, vitaminas, 4mM glutamina, e 1% DMSO (dimetil sulfóxido).

Estas células são cultivadas a 37°C em atmosfera húmida que contém 5% de CO₂.

10.2) Transfecção das células pelo método de fosfato de cálcio

A técnica é idêntica à descrita precedentemente.

10.3) Transfecção das células pelo método de polibreno-DMSO

O princípio deste método baseia-se no facto de a presença dos policatiões (polibreno) conduzir à ligação dos ADN sobre as membranas celulares. A penetração dos ADN nas células é facilitada por tratamento das células com DMSO (dimetil sulfóxido) que aumenta a permeabilidade das membranas celulares (KAWAI et al . 1984).

5.10⁵ células L de ratinho são semeadas numa caixa de Pétri cujo diâmetro é de 60 mm. Depois de uma incubação de 16 horas, as células são postas em contacto com 4 µg de ADN transformador e incubadas a 37°C em presença de um ml de meio de cultura acabado de preparar que contém 25 µg de polibreno. Ao fim de 6 horas, as células são tratadas com 2 ml de meio de cultura acabado de preparar que contém 25% de DMSO a 37°C durante 4 minutos.

10.4) Seleccção das células transformadas em presença de G418

2 a 4 dias depois da transfecção, as células são submetidas à selecção em presença do antibiótico G418 cuja concentração é de 800 µg/ml de cultura para as células L de ratinho, de 400 µg/ml de cultura para as células QT6, e de 300 µg/ml para os fibroblastos de frango.



EXEMPLO 8

LOCALIZAÇÃO DA REGIÃO 5' DO GENE erbB DO AEV-R

No genoma do AEV do tipo selvagem, os dois oncogeneos virais v-erbA e v-erbB ocupam a parte maior das regiões codificadoras (figura 15). Um fragmento HincII--BamHI (1,2 kb) contém a região 3' do gene ErbA, uma sequência não codificadora intercalada entre o gene v-erbA e o gene v-erbB, e a região 5' do gene v-erbB. A fim de determinar a posição exacta do códon iniciador do gene v-erbB e do local aceitante de entrançamento situado entre v-erbA e v-erbB, determinou-se a sequência nucleotídica desta região. O fragmento HincII-BamHI é primeiramente clonado nos vectores derivados do bacteriófago M13, mp8 e mpl1 (figura 16). Em estado monocatenário, a fibra " mais " do fragmento estudado está presente no clone p42 derivado de mp8, enquanto que a fibra " menos " se encontra no clone p314 derivado de mpl1.

A sequenciação efectuada sobre o clone p42 permite determinar uma parte de sequência da região 5' do gene v-erbB a partir do local BamHI (figura 17).

A comparação da sequência do gene v-erbB do AEV com a do gene v-erbB do variante AEV-H fornecida por YAMAMOTO et al., 1983 revela uma homologia de 276 nucleótidos em 279. Esta homologia importante permite deduzir que no genoma de AEV a distância entre o local BamHI e o códon iniciador "AUG" do gene v-erbB mede 400 a 500 nucleotidos, supondo que os dois genes v-erbB são identicos nas suas sequências 5'.

EXEMPLO 9

ELIMINAÇÃO DA SEQUÊNCIA NUCLEOTÍDICA DA REGIÃO 5' DO GENE v-erbB

Considerando a ausência de local de restrição utilizável a montante do local BamHI na região 5' do gene v-erbB, empregou-se a nuclease Bal31 para a eliminação desta região



1 a partir do local BamHI.

O clone perbl que contém as sequências de união entre v-erbA e v-erbB (figura 11) é digerido pela enzima de restrição BamHI e em seguida pela nuclease Bal31 que opera uma
5 degradação progressiva da região 5' do gene v-erbB a partir do local BamHI. A digestão é controlada de maneira que uma sequência nucleotídica com cerca de 0,45 kb seja eliminada a montante do local BamHI. A separação dos fragmentos virais importados do vector pBR322 é realizada por digestão pela en-
10 zima de restrição Sall, seguida por uma electroforese sobre gel de agarose preparatório.

Uma família de fragmentos virais cujas dimensões são próximas de 0,8 kb é isolada do gel. Estes fragmentos apresentam uma supressão mais ou menos ampla na região 5' do gene
15 v-erbB.

EXEMPLO 10

ESTUDO ESTRUTURAL DA REGIÃO NÃO CODIFICADORA ENTRE OS GENES v-erbA e v-erbB

20

Para determinar a supressão introduzida na região 5' do gene v-erbB, os fragmentos encurtados Bal31 são primeiramente clonados entre os locais Sall e SmaI de mp11 (figura
25 11).

4 clones sequenciados mostram resíduos mais ou menos compridos de sequência v-erbB (figura 18).

Entre todos estes clones, o clone pl5-16 apenas mantém os 13 primeiros nucleotídeos do gene v-erbB.

A análise das sequências a montante do codão "ATG" do
30 gene v-erbB indica que existe um local de consenso aceitante de entrançamento "CAG" na posição 171 precedido por uma sequência de 15 nucleotídeos "TTTCTTCCTTTTGT" (figura 18) (SH-ARP, 1981).

35 O codão de determinação " TAG" do gene v-erbA encon-



tra-se a 188 nucleótidos a montante do codão "ATG" do gene v-erbB. Por outro lado, a sequência não codificadora é caracterizada por uma frequência elevada de pares e tripletos dos nucleótidos A e dos nucleótidos T respectivamente.

O estudo comparativo com a sequência do AEV-H fornecido por YAMAMOTO et al., 1983 mostra que as sequências imediatamente a jusante do codão "ATG" do gene v-erbB são praticamente iguais entre o AEV e o AEV-H.

EXEMPLO 11

CONSTRUÇÃO DO MUTANTE pAEV-ΔerbB

Com o fim de substituir o gene v-erbB por um gene "marcador", o gene Neo^r derivado do transportador bacteriano Tn5 foi inserido no genoma modificado do AEV.

A estratégia adoptada nesta construção está esquematizada na figura 12.

O clone p15-16 é primeiramente assimilado pelas enzimas de restrição EcoRI e SalI. Um fragmento SalI-EcoRI (0,75 kb) que cobre a região 5' do gene v-erbA, a sequência não codificadora que contém o local aceitante de entrançamento, os 13 primeiros nucleotidos do gene v-erbB e 11 nucleotidos derivados do polilinker de mp11, é isolado por electroforese sobre gel de agarose. A dupla digestão do clone pAEV124Ba por SalI e EcoRI permite isolar um fragmento de 3,1kb que contém entre outras as LTR, as sequências residuais gag e a metade 5' do gene v-erbB do AEV.

Estes dois fragmentos estão ligados em tandem e são clonados no local EcoRI do plasmídeo pJS21 que fornece as sequências virais 3'. O plasmídeo final que contém um genoma viral reconstituído, destituído do gene v-erbB, denomina-se pXJ4. A estrutura do plasmídeo pXJ4 é confirmada pelos resultados da digestão por SalI, SacI, PstI, BamHI e SalI + EcoRI.

EXEMPLO 12



INTRODUÇÃO DO GENE ESTRUTURAL Neo^r DE Tn5 NO VECTOR RETROVI- RAL pXJ4

A obtenção do vector retroviral pXJ4 oferece a possibilidade de inserir um gene de selecção na localização do gene v-erbB suprimido sem aumento da dimensão total do vector em relação ao AEV do tipo selvagem.

O plasmídeo pAG50, apresentado na figura 13 compreende o gene estrutural de resistência ao antibiótico neomicina (gene Neo^r) limitado pelos locais BglII (COLBERE-GARAPIN et al., 1981).

A digestão de pAG50 por BglII permite isolar um fragmento de 1,2 kb contendo o gene Neo^r.

Para introduzir este fragmento no plasmídeo pXJ4 na localização do gene v-erb suprimido, foi preciso criar um local de restrição BglII no plasmídeo pXJ4 ao nível do local EcoRI situado a jusante do local aceitante de entrançamento. O plasmídeo pXJ4 foi submetido a uma digestão parcial por EcoRI, em seguida isolaram-se, sob gel de agarose preparatório as moléculas linearizadas de 9,7 kb resultantes de um só corte por EcoRI. As extremidades dos fragmentos isolados foram em seguida reparadas em extremidades rectas e em seguida ligadas a " linkers" BglII.

Esta maneira de proceder dá origem a dois locais EcoRI que rodeiam o local BglII criado (figura 14). O genoma assim produzido é representado pelo plasmídeo pXJ5 (figura 14).

A digestão de pXJ5 por BglII prova a inserção de um local BglII. As duplas digestões por BglII e SacI, ou BglII e SalI, confirmam a posição deste local a jusante do códon iniciador " AUG " residual do gene v-erbB. A restituição do local EcoRI é confirmada por digestão de EcoRI.

A inserção do gene Neo^r no vector pXJ5 é realizada pela operação seguinte: O plasmídeo pXJ5 é primeiramente linearizado no local BglII e em seguida ligado com o fragmento BglII-BglII contendo o gene Neo^r isolado de pAG50.

A análise dos clones recombinantes mostra que o clo-



1 ne pXJ1 compreende uma só cópia do gene Neo^r inserida na mes-
ma orientação transcricional que a do vector retroviral (fi-
gura 19). O clone pXJ2 (figura 20) tem uma só cópia do gene
Neo^r cuja orientação é oposta à do vector. O clone pXJ3 (fi-
5 gura 21) tem duas cópias do gene Neo^r associadas em tandem,
ambas orientadas no sentido de transcrição do genoma viral.
Os locais de inserção, o número e a orientação dos genes Neo^r
nos plasmídeos pXJ1, pXJ2 e pXJ3, foram determinados por di-
gestão dos plasmídeos com cada uma das enzimas BglII, EcoRI,
10 HincII e PstI.

As sequências de junção entre o gene Neo^r e os vecto-
res retrovirais nos clones pXJ1 e pXJ3 estão apresentados na
figura 22.

15 EXEMPLO 13

EXPRESSÃO DO GENE Neo^r NAS CÉLULAS PROCARIÓTICAS

As bactérias do tipo Kan^s (sensível à canamicina)
transformadas por pXJ1, pXJ2 e pXJ3 são cultivadas a 37°C du-
20 rante 16 horas em presença de um meio líquido nutritivo con-
tendo canamicina cuja concentração varia de 0 a 600 µg/ml de
cultura. As bactérias transformadas pelo clone pXJ5 sem gene
Neo^r são também experimentadas como prova.

25 Em presença de 50 µg de canamicina por ml de cultura
apenas as bactérias transformadas pelos recombinantes que são
portadores do gene Neo^r mostram um crescimento normal. No en-
tanto, quando a concentração de canamicina é maior que 50 µg/
ml de cultura, as bactérias que alojam os clones pXJ1 e pXJ3
30 apresentam um crescimento 10 vezes maior, pelo menos, que o
das bactérias que contêm o plasmídeo pXJ2. Não se observa ne-
nhuma diferença de sensibilidade à canamicina entre as bacté-
rias que contêm pXJ1 e as que contêm pXJ3.

35 EXEMPLO 14



EXPRESSÃO DO GENE Neo^r NAS CÉLULAS EUCARIÓTICAS

1) Transfecção em presença de fosfato de cálcio

1.1) Transfecção das células L de ratinho (quadro V)

Submetem-se $5 \cdot 10^5$ células L de ratinho a uma transfecção de 15 μg de ADN de cada um dos vectores pXJ1, pXJ2 ou pXJ3. O plasmídeo pAG50 no qual o gene Neo^r está sob comando dos elementos do control de transcrição do gene tk do vírus Herpes simplex é escolhido como prova (COLBERE-GARAPIN et al., 1981).

24 horas depois da transfecção, as células são seleccionadas em meio líquido em presença de 800 μg de H418 por ml de cultura. Ao fim de 14 dias de selecção, as células que não sofreram transfecção assim como as células transfectadas com o plasmídeo pXJ2 estão todas mortas. Em contrapartida, as células transfectadas com pXJ1 e pXJ3 sobrevivem e começam a formar as colónias. Os números de colónias resistentes são contados ao fim de 19 dias de selecção. A eficácia de transformação manifestada pelo clone pXJ3 portador de duas cópias de gene Neo^r é menor que a do clone pXJ1 que compreende apenas uma cópia.

1.2) Transfecção das células de codorniz QT6 (Quadro V)

$5 \cdot 10^5$ células de codorniz QT6 são transfectadas com 5 μg dos vectores retrovirais pXJ1, pXJ2 e pXJ3 respectivamente. Paralelamente, 15 μg de pAG50 são utilizados como prova. 25 horas depois da transfecção, as células são submetidas à selecção em meio líquido em presença de 400 μg de G418 por ml de cultura.

Ao fim de 7 dias de selecção, as células normais não transfectadas estão todas mortas devido à pressão de uma selecção como esta. Para facilitar o desenvolvimento de colónias resistentes, reduz-se a concentração de G418 para 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Depois de uma selecção continua de 4 dias, estão formadas 33 colónias resistentes no caso de pXJ1, ao passo que os outros clones não manifestam nenhuma actividade de transformação.



1.3) Transfecção dos fibroblastos de embrião de frango
(quadro V)

5.10⁵ fibroblastos de embrião de frango secundários são transfectados com 5 µg dos vectores pXJ1, pXJ2 e pXJ3 respectivamente. Ao mesmo tempo, empregam-se 15 µg de pAG50 como prova. 6 dias depois da transfecção, as células transfectadas são seleccionadas em meio líquido que contém 300 µg de G418 por ml de cultura. Ao fim de 2 semanas de selecção, os fibroblastos normais não transfectadas, assim como os fibroblastos transfectados por pXJ2 e pAG50 estão todos mortos. Em contrapartida, as células transfectadas com pXJ1 e pXJ3 começam a formar colónias. Os números de colónias resistentes são contados depois de uma selecção continua de 3 dias. O clone pXJ1 contendo uma cópia do gene Neo^r fornece aproximadamente duas vezes mais colónias resistentes que o clone pXJ3. Os fibroblastos transformados pelos vectores pXJ1 e pXJ3 apresentam uma morfologia idêntica à das células normais.

2) Transfecção das células L de ratinhos em presença de polibreno (quadro V)

5.10⁵ células L de ratinho são transfectadas com 4µg de cada um dos ADN transformadores pXJ1, pXJ2, pXJ3 e pAG50. 48 horas depois da transfecção, as células são cultivadas em meio líquido que contém 800 µg de G418 por ml de cultura. Ao fim de 12 dias de selecção, as células normais não transfectadas, assim como as células transfectadas com os plasmídeos pXJ2 e pAG50 estão todas mortas. Em contrapartida, os clones pXJ1 e pXJ3 induzem o desenvolvimento de colónias resistentes.

A eficácia do método de transfecção pelo polibreno-DMSO mostra-se muito maior que a do método do fosfato de cálcio.



QUADRO V

TRANSFEÇÃO DAS CÉLULAS EUCARIÓTICAS PELOS VECTORES
RETROVIRAIS

5

Clone	Estrutura	ADN (µg)	Número de colónias transfor- madas	Método de transformação
Número de células L de ratinho: 5×10^5 Selecção em presença de G418 800µg/ml				
pXJ1	LTR neo ^r LTR	15	19	CaPO ₄
pXJ2	LTR neo ^r LTR	15	0	
pXJ3	LTR neo ^r neo ^r LTR	15	17	
pAG50	tkpr neo ^r tkpolyA	15	9	
pXJ1	LTR neo ^r LTR	4	32:36	POLIBRENO- DMSO
pXJ2	LTR neo ^r LTR	4	0;0	
pXJ3	LTR neo ^r neo ^r LTR	4	20;24	
pAG50	tkpr neo ^r tkpolyA	4	35;32	
5 10^5 células de codorniz QT6 G418:400µg/ml				
pXJ1	LTR neo ^r LTR	5	33	CaPO ₄
pXJ2	LTR neo ^r LTR	5	0	
pXJ3	LTR neo ^r neo ^r LTR	5	0	
pAG50	tkpr neo ^r tkpolyA	5	0	
5 10^5 fibroblastos de frango embrionário (CEF) G418:300µg/ml				
pXJ1	LTR neo ^r LTR	5	7	CaPO ₄
pXJ2	LTR neo ^r LTR	5	0	
pXJ3	LTR neo ^r neo ^r LTR	5	3	
pAG50	tkpr neo ^r tkpolyA	5	0	

10

15

20

25

30



- 1 . A organização transcricional dos ADN transformadores está
indicada neste quadro. A orientação transcricional de cada
componente é indicada por uma seta horizontal.
- . tkpr : promotor do gene tk de HSV
- 5 . tkpoliA : sinal de poliadenilação do gene tk de HSV.

EXEMPLO 15

1) Preparação do clone mJS21 erb⁻ (figura 24)

10 Este clone foi preparado a partir do clone pJS21 (exemp
lo 2, figura 23) que contém, além das sequências já descritas,
40 nucleótidos pertencentes ao oncogéneo erbB que estão situa
dos em 5' do gene env. Esta sequência residual foi eliminada
por linearização EcoRI e digestão com Bal31.

15 Os fragmentos obtidos são reparados pela DNA polimerase
I. A inserção é solta no local BamHI por assimilação enzimáti
ca e purificada por electroeluição depois de separação sobre
gel de agarose.

20 Os fragmentos purificados são seguidamente clonados na
forma replicativa do fago M13 previamente preparado. Depois
de ligação e transformação de uma cultura bacteriana JM103
competente, os fagos monocatenários recombinantes são analisa
dos por hibridação com um clone que contém o fragmento JS21
integrado em sentido inverso. Os clones pressupostos são então
verificados por sequenciação.

25 O clone mJS21 erb⁻ retido começa no gene env 9 nucleó
tidos em 3' do codão terminal do gene erbB.

2) Preparação do clone mpllgag

30 mpl0gag erba contém os últimos 400 nucleótidos do gene
gag assim como os 400 primeiros nucleótidos do gene erba. Da
mesma maneira que para o clone mJS21 erb⁻, a sequência erba
do clone mpl0gag erba foi eliminado por digestão com a exonuc
lease Bal31 (figura 24).

35 No clone mpllgag retido, depois de análise por sequencia
ção clones pressupostos, o gene erba é completamente elimina
do, assim como 12 nucleótidos 3' terminais do gene gag.



3) Preparação do clone mpl0-J (figura 25)

O fragmento J foi preparado a partir do clone mpl1 p15-16 (exemplo 10) (denominado 15-16). Este contém, além da sequência J, os 550 últimos nucleótidos do gene erbA. Depois de análise da sequência publicada por DEBUIRE e col. (1984) a respeito desta região do AEV, identificou-se um local de restrição FokI único situado na proximidade da junção das duas sequências erbA e J. Assim, a digestão do ADN do clone mpl1 p15-16 por esta endonuclease liberta o fragmento J. Em 5' de J, apenas se mantêm 10 nucleóticos da sequência codificadora do gene erbA.

EXEMPLO 16

RECONSTRUÇÃO DO VECTOR DESTITUÍDO DE SEQUÊNCIAS ONCOGÊNEAS

A reunião dos diferentes clones obtidos no exemplo 15 efectua-se no plasmídeo bacteriano pBR328 (BOLIVAR e col., 1977). Este pode inserir, de facto, fragmentos de grande dimensão e ser seleccionado quanto à sua resistência à ampicilina.

1) Clonação da sequência gag do mpllgag no pBR328 (figura 26)

O primeiro fragmento introduzido no plasmídeo é o que contém o gene presente sobre o clone mpllgag. O clone pBRgag assim obtido é analisado por cartografia nas endonucleases de restrição.

2) Preparação do clone pBRgag-J (figura 27)

a) Preparação do vector pBRgag

A preparação do vector pBRgag para a inserção do fragmento J necessitou de uma série de fases destinadas a conservar o local EcoRI situado em 3' da sequência gag. Este local EcoRI deve, de facto, na construção final, servir de local único de clonação para os genes a inserir no retroviral.



1 Para preparar o vector pBRgag, utiliza-se a T4 DNA poli-
merase, a fim de obter extremidades francas depois de diges-
tão pela endonuclease SacI. A actividade desta T4 DNA polime-
rase não é rigorosamente controlável, e, tendo em conta que
5 os dois locais enzimáticos utilizados para esta subclonação
(SacI e EcoRI) pertencem ao polilinker do fago M13, e estão
muito próximos um do outro, corre-se o risco de perder o local
EcoRI. É por esta razão que se introduz no vector pBRgag, a
fim de afastar o local EcoRI do local SacI, um fragmento de
10 ADN com 2,7 kb pertencente ao gene de gama globina Humana. Es-
ta astúcia técnica permite, depois de diversas fases, conservar
o local EcoRI.

b) Preparação do clone mp10-J

15 O fragmento J, tal como foi preparado, está contido no
vector mp10 entre os locais SamI e EcoRI do polilinker. Isto
provoca o aparecimento, em 5' do fragmento J, de 5 locais de
restrição(BamHI, XbaI, SalI, PstI e HindIII). Ora, para o
prosseguimento da construção, o local BamHI deve ser suprimido.
Isto faz-se por digestão com a endonuclease BamHI, em seguida
20 enchimento pela DNA polimerase I e ligação. Depois de análise
por cartografia das formas replicativas do fago M13, os clones
pressupostos são analisados por sequenciação.

O clone mp10 assim preparado é então clonado no pBRgag.
Depois de transformação de uma cultura bacteriana C600 R/S
25 competente, os clones recombinantes pBRgag-J são analisados
por cartografia. A clonação do fragmento J no pBRgag cria um
local único XbaI situado em 5' de J que será utilizado para
clonação dos genes a inserir no vector.

30 3) Clonação do fragmento JS21 erb⁻ em 3' de J no vector
pBRgag-J (figura 28)

O vector pBRgag-J e o fragmento JS21 erb⁻ são separa-
dos conforme indicado na figura. A clonação do fragmento JS21
erb⁻ em 3' de J proporciona ao vector a sequência do gene env
35 e a LTR 3'. Cria também um local unico EcoRI que será utiliza-



1 do para a subclonação dos genes a inserir no vector. Os clones pBRgag-J env LTR assim obtidos são analisados por cartografia.

5 4) Clonação do vector pBRgag-J env LTR no pJS21
(figura 29)

O fragmento pBRgag-J env LTR e o pJS21 são preparados conforme indicado na figura. Esta subclonação proporciona ao vector a LTR 5', a sequência guia, e permite reconstituir o gene gag tal como existe no AEV selvagem. O clone pBRgag-J-env 2LTR assim obtido é analisado por cartografia.

Deve notar-se que esta fase conduz ao aparecimento de um local EcoRI suplementar situado na junção das sequências AEV e pBR322. Este deverá ser eliminado ulteriormente por digestão parcial a fim de não se ter senão um local EcoRI situado em 3' do fragmento J e que servirá para a clonação dos genes a inserir.

Este clone pBRgag-J-env 2 LTR contém entre os 2LTR o genoma do AEV sem sequência oncogénica, e tem também um local de clonação único XbaI situado em 5' do fragmento J.

Um fragmento de restrição XbaI do transportador Tn5 incluindo o gene Neo^r é introduzido no local XbaI de pBRgag-J-env 2LTR, o plasmídeo resultante é pAEV TSN que induziu a resistência ao G418 para as células aviárias transformadas.

25 EXEMPLO 17

TRANSFERÊNCIA DE GENES NA DEPENDÊNCIA DO PROMOTOR VIRAL

Numa primeira série de construções, o gene Neo^r do transportador bacteriano Tn5 foi inserido em vez do gene verBB (exemplo 12 e seguintes). Os vírus produzidos podiam induzir a resistência das células infectadas à droga G418 demonstrando assim a transcrição e a tradução correctas do gene inserido. Esta construção deixava subsistir, no entanto, vários codões de iniciação potenciais de tradução, em quadros de leituras diversas, a montante da sequência codificadora do



1 gene Neo^r. A fim de aumentar a eficácia de tradução do gene e
com o objectivo de produzir um vector universal de transferên-
cia, a sequência do vector foi modificada para deixar subsis-
tir apenas os codões iniciadores normalmente utilizados para
5 a tradução dos genes virais.

a) Construção de um vector universal portador de um
local de clonação NdeI ao nível de um codão ini-
ciador ATG (figura 30)

10 A região codificadora do gene v-erbB apresenta em 5' a
sequência seguinte:

- - - 5' GGC CCA GAC CAC TGC ATG AAG TGT 3' - - -

15 Depois de entrancamento do ARN genómico em ARN subgenó-
mico, esta sequência ordena-se depois da sequência guia do
ARN subgenómico que é portador do codão iniciador de tradução.
Esta disposição fornece a trama codificadora indicada acima
().

20 Criou-se um local NdeI recobrindo o codão ATG pelo méto-
do de mutagénese pontual dirigida, de acordo com ZOLLER e col.
(1983), utilizando um oligonucleótido sintético de sequência:

5' CACTTCATATGGTGGTCTGG
 ↑
 NdeI

25 A modificadora de sequência foi realizada sobre o clone
p15-16 (figura 12) para fornecer o clone pXJ7 no qual a sequên-
cia em 5' do gene v-erb é agora a seguinte:

30 - - - 5' GGC CCA GAC CAC CAT ATG AAG TGT 3' - - -
 ↑
 NdeI

35 Esta sequência foi inserida no vector de acordo com a
construção apresentada na figura 30 para fornecer finalmente
o genoma viral vector suportado pelo plasmídeo pXJ11 a partir
de pJS21 e pAEV124 obtido por supressão PstI-PstI no gene



1 v-erba de pAEV11.

Este clone proporciona, portanto, um sistema universal de construção de genomas vectores nos quais qualquer sequência inserida no local de clonação NdeI estará automaticamente em fase com a trama de tradução proteica iniciada na região guia dos ADN virais transcritos. Os genes que deverão ser integrados nestes vectores deverão compreender, por conseguinte, um local de restrição NdeI ao nível do seu codão ATG iniciador.

10 b) Construção de um gene Neo^r portador de um local de restrição NdeI ao nível do codão iniciador

A sequência nucleotídica ao nível da região 5' do gene Neo^r é a seguinte:

15 5' GATCTGATCAAGAGACAGGATGAGGATCGTTTCGC ATG ATT GAA - - - 3'

Esta sequência foi modificada por mutagénese pontual dirigida por meio de um oligonucleótido de síntese de sequência:

20 5' GATCGTTTCATATGATTGAAC 3'
NdeI

Construiu-se assim o plasmídeo pXJ10 que contém o gene Neo^r modificado no qual um local NdeI se encontra ao nível do codão iniciador. A parte codificadora do gene pode ser isolada deste plasmídeo depois de digestão por NdeI e BglII.

25 c) Construção de um vector retroviral portador do gene Neo^r modificado

30 A parte codificadora do gene Neo^r modificado foi inserida no plasmídeo pXJ11 ao nível do local NdeI de maneira que a sequência Neo^r esteja no sentido de transcrição normal do genoma viral. Obteve-se assim o plasmídeo pXJ12. A estrutura final do plasmídeo e do genoma viral foi verificada por cartografia de restrição, designadamente para confirmar a presença do local NdeI, e, por conseguinte, a validade da sequência proxi-



1 ma do codão iniciador do gene. A estrutura deste plasmídeo está indicada na figura 31.

5 Quando é transferido para as bactérias, este plasmídeo induz as suas resistências à canamicina para a concentração de 50µg/ ml. Este plasmídeo constitui assim uma espécie de vector naveta podendo ser seleccionado tanto entre bactérias sob a forma de plasmídeos como entre células aviárias sob a forma de provírus.

10 d) Produção de vírus derivados do plasmídeo pXJ21

Por co-transformação do ADN do plasmídeo pXJ12 e do ADN que contém os genomas de vírus auxiliar RAV-1 ou RAV-2 sobre fibroblastos de frango, foi possível recuperar viriões AEV-XJ1 (RAV-1) e AEV-XJ12 (RAV-2). Estes viriões podem infectar fibroblastos de frango "in vitro" e induzir a sua resistência à droga G518.

15 O vírus AEV-XJ12 constitui, portanto, um vector viral seleccionável. Os genes a transferir poderão ser inseridos na região ainda ocupada pelas sequências v-erbA.

20 e) Expressão dos genes virais nos fibroblastos de frango infectados pelos vectores AEV-XJ1 e AEV-XJ12

A fim de verificar se a inserção do gene Neo^r no genoma viral não altera os mecanismos de transcrição, analisaram-se os ARN produzidos nos fibroblastos de frango infectados pelos vectores AEV-XJ1 (vector que contém vários ATG) e AEV-XJ12.

25 Encontram-se de novo nas células dois tipos de ARN que correspondem ao ARN genómicos e subgenómicos, o que demonstra que a maturação dos ARN é correcta. No entanto, nas células infectadas por AEV-XJ1, observa-se uma predominância dos ARN subgenómico que codifica para a proteína Neo^r. As expressões relativas dos ARN genómicos e subgenómicos não são sensivelmente diferentes nas células cultivadas em presença ou na ausência de G418. Em contrapartida, nos fibroblastos



1 infectados por AEV-XJ12, observa-se sensivelmente mais ARN genómico que ARN subgenómico, numa proporção igual à observada no AEV selvagem.

5 f) Método de titulação de vírus aviários
portadores do gene Neo^r

10 A titulação biológica de vírus portador de um gene Neo^r baseia-se na indução da resistência ao G418 das células infectadas. Não foi proposto até agora nenhum método padrão para os vírus aviários. Elaborou-se um método baseado na utilização de fibroblastos de embrião de frango de estirpe Leghorn Spafas C/O. Estas células são sensíveis a todos os subgrupos retrovirais aviários.

15 Na prática, infectam-se fibroblastos secundários em cultura com diluições crescentes de suspensão de vírus, em seguida cultivam-se em presença de G418. O título do vírus em r-ffu/ml (resistant focus forming unit) representa o produto do número de focos resistentes por cultura pela diluição da suspensão viral utilizada para a infecção.

20 Um ponto critico desta experiência é o momento da adição da droga em relação ao momento da infecção. A adição da droga não deve ser tardia de mais, para evitar as infecções secundárias, o que conduziria a sobrestimar o título do vírus, nem precoce de mais, a fim de permitir a expressão da proteína Neo^r em quantidade suficiente nas células infectadas a fim de torná-las resistentes.

25 Uma análise cinética mostra que a estimativa do título por meio desta experiência é igual quando a droga é adicionada dentro das 24 horas que se seguem à infecção. A dose de G418 utilizada para os fibroblastos de frango Spafas é de 200ug/ml.

30 Os vectores de acordo com o presente invento permitem preparar células resistentes ao G418 e permitiram clonar e exprimir a globina humana, em particular a delta globina humana, tendo as experiências com as outras globinas dado resultados equivalentes.



1 DEPÓSITO DE ESTIRPES

Depositararam-se as estirpes seguintes na Colecção Nacional de Culturas de Microrganismos do Instituto Pasteur, 28, rua do Doutor Roux, 75724 Paris Cedex 15, com os numeros seguintes:

Estirpe E. coli 600 pAEV TSN no.I-492

Estirpe E. coli 60ORS pAEVA28 no.I-493

Estirpe E.coli 60ORS pAEVXJ12 no.I-494

10 EXEMPLO 18

15 DESENVOLVIMENTO DE CÉLULAS AUXILIARES AVIÁRIAS

Este exemplo diz respeito a culturas de células auxiliares aviárias nas quais os 3 genes gag, pol e env exprimem-se mas não se podem introduzir nos viriões produzidos.

20 O conjunto dos genes gag-pol-env foi isolado num fragmento único de ADN a partir de um plasmídeo contendo o genoma do vírus auxiliar RAV-1 fornecido por J.M. Bishop (UCSF). Este fragmento está limitado em 5' por um local SacI situado a 146 nucleotidos a montante do codão iniciador de gene gag, e em 3' por um local AccI situado a 120 nucleótidos a jusante do codão de terminação do gene env. As sequências responsáveis pela encapsidação dos genomas virais aviários não estão presentes no fragmento considerado. Este fragmento foi inserido nos plasmídeos permitindo a expressão dos genes nas células eucarióticas.

30 No plasmídeo HP1, o conjunto gag-pol-env foi clonado entre o promotor do gene TK do vírus HSV1 e o sinal de poliadenuilação do mesmo vírus ambos isolados do plasmídeo pAG60 de COLBERE-GARAPIN e al. (1981).

35 No plasmídeo HP2, os genes gag-pol-env foram inseridos



entre o promotor - aumento do gene precoce do vírus SV40 e uma sequência contendo o intron do gene T e o sinal de poliadrenilação do vírus SV40, isolados do plasmídeo pSV2gpt de MULLIGAN E BERG (1981).

Estes plasmídeos foram transfectados sobre células de codorniz, estirpe QT6, e fibroblastos de frango. Tendo em vista seleccionar as células transfectadas, os ADN destes plasmídeos foram co-transfectados com o ADN de plasmídeos tendo o marcador de selecção, quer seja o plasmídeo pAG60, quer seja o plasmídeo pXJ12. Os focus de células resistentes depois de selecção de G418 foram recolhidos previamente e cultivados isoladamente. Outros foram reagrupados e cultivados em conjunto. A produção de partículas virais por estas células foi testada ao procurar a presença de transcriptase inversa sob a forma particular nos sobrenadantes das culturas. Esta actividade foi comparada à dos sobrenadantes das células eritróleucémicas 6C2 de frango altamente produtoras de vírus AEV. Entre 9 culturas de células QT6 transfectadas com HP1 e HP2, 7 apresentam uma actividade inversa de transcriptase significativa em que 5 mostram uma actividade superior à das células 6C2.

Estes resultados demonstram:

- por um lado, que a expressão dos genes gag, pol e env é possível a partir de um promotor diferente do contido nas LTR virais,
- por outro lado, que se pode produzir viriões extra-celulares a partir de genomas virais auxiliares desprovidos de LTR e de sequências de encapsulação.

O depósito do primeiro pedido para o invento acima descrito foi efectuado em França em 15 de Outubro de 1984 sob o nº. 84 15764.



- R E I V I N D I C A Ç Õ E S -

1
5
10
1ª - Processo de modificação de células eucarióticas, caracterizado pelo facto de se efectuar uma infecção das células com um vírus de clonação ou de expressão de um gene estranho constituído por todo ou parte do genoma de um retrovírus e que compreende um gene estranho, pelo menos, situado entre as duas sequências LTR (REPETIÇÃO TERMINAL COMPRIDA).

2ª - Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto de o retrovírus ali referido ser um vírus aviário.

3ª - Processo de acordo com as reivindicações 1 ou 2, caracterizado pelo facto de o retrovírus ser o vírus da eritrobastose aviária.

4ª - Processo de acordo com as reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo facto de o vírus apresentar um carácter oncogénico.

5ª - Processo de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo facto de ter sido conservada a sequência v-erbB.

6ª - Processo de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 5, caracterizado pelo facto de o gene estranho ter sido inserido entre o fim do gene v-erb e a sequência LTR a jusante.

7ª - Processo de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 6, caracterizado pelo facto de o gene estranho estar orientado no sentido da leitura do genoma viral.

8ª - Processo de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 7, caracterizado pelo facto de o gene estranho estar orientado no sentido contrário ao sentido da leitura do genoma viral.

9ª - Processo de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 8, caracterizado pelo facto de o gene estranho estar na dependência de um promotor do retrovírus.



1 10ª - Processo de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo facto de o vírus vector ser o vírus AEV2LTR.

 11ª - Processo de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo facto de o vírus ser despro-

5 vido de carácter oncogénico.

 12ª - Processo de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo facto de o gene v-erbB ter sido, pelo menos parcialmente suprimido.

 13ª - Processo de acordo com qualquer das reivindicações 11 e 12, caracterizado pelo facto de um gene estranho, pelo menos, estar inserido a jusante do gene v-erbA.

10

 14ª - Processo de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo facto de os genes v-erbB e v-erbA terem sido suprimidos.

15 15ª - Processo de acordo com a reivindicação 14, caracterizado pelo facto de dois genes estranhos estarem inseridos entre as duas sequências LTR.

 16ª - Processo de acordo com a reivindicação 14, caracterizado pelo facto de um dos genes estranhos estar inserido entre os dois situs de entrançamento e o outro gene estranho estar inserido no exterior dos situs de entrançamento e a jusante destes.

20

 17ª - Processo de acordo com qualquer das reivindicações 15 e 16, caracterizado pelo facto de os dois genes estranhos inseridos estarem, cada um, de maneira independente e numa relação determinada, sob o controlo de um mesmo promotor.

25

 18ª - Processo de acordo com a reivindicação 17, caracterizado pelo facto de entre os dois genes estranhos inseridos, um proporcionar um carácter seleccionável.

30

 19ª - Processo de acordo com as reivindicações 11 a 18, caracterizado pelo facto de o vírus compreender um gene marcador, pelo menos, em particular um gene de resistência a um antibiótico, que se exprime nas células.

35 20ª - Processo de acordo com as reivindicações 11 a



1 19, caracterizado pelo facto de um gene estranho inserido, pelo menos, ser escolhido entre os genes humanos de globina delta, globina beta, globina alfa e o gene de origem bacteriana Neo^R.

5 21^a - Processo de acordo com as reivindicações 1 a 20, caracterizado pelo facto de o gene ou genes estranhos inseridos compreenderem a montante os seus próprios elementos de expressão nas células eucarióticas.

10 22^a - Processo de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 20, caracterizado pelo facto de os genes estranhos inseridos estarem na dependência de um elemento de expressão viral.

15 23^a - Processo de acordo com qualquer das reivindicações 14 a 22, caracterizado pelo facto de o vírus de clonagem e de expressão em si próprio compreender um locus de restrição, pelo menos, único entre os dois locus de entrançamento e um locus de restrição único no exterior e a jusante dos locus de entrançamento.

20 24^a - Processo de acordo com a reivindicação 23, caracterizado pelo facto de o locus de restrição único no exterior dos locus de entrançamento ser um locus NdeI situado ao nível do codão de iniciação do gene v-erbB.

25 25^a - Processo de acordo com a reivindicação 23, caracterizado pelo facto de os genes inseridos estarem na dependência do promotor da sequência condutora.

26^a - Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto de se efectuar uma co-infecção com um " vírus assistente " que compreende os genes que asseguram a replicação do vírus de clonagem ou de expressão.

30 27^a - Processo de modificação de células eucarióticas de acordo com as reivindicações anteriores, caracterizado pelo facto de se efectuar uma transfecção das células com um plasmídeo vector de clonagem ou de expressão de um gene estranho, que compreende uma sequência compósita de ADN transcrito inverso de um vírus obtido de acordo com qualquer das

35



1 reivindicações 1 a 25.

28ª - Processo de acordo com a reivindicação 27, caracterizado pelo facto de o plasmídeo compreender uma sequência de ADN de um plasmídeo bacteriano, um fago ou um cosmídeo.

29ª - Processo de acordo com a reivindicação 28, caracterizado pelo facto de a sequência de ADN de plasmídeo bacteriano compreender, pelo menos, uma origem de replicação, nas bactérias e um gene marcador de selecção nas bactérias.

30ª - Processo de acordo com a reivindicação 27, caracterizado pelo facto de ser efectuada uma co-transfecção das células com um " plasmídeo assistente " cujos genes asseguram a replicação do vector de clonação ou de expressão.

31ª - Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto de as células modificadas serem células aviárias.

32ª - Processo de acordo com a reivindicação 31, caracterizado pelo facto de as células modificadas serem células hematopoéticas ou células germinais.

33ª - Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto de as células modificadas serem fibroblastos embrionários de frango.

34ª - Processo de acordo com qualquer das reivindicações 1 e 31 a 33, caracterizado pelo facto de o gene estranho estar integrado no genoma da célula na forma de provírus.

35ª - Processo de acordo com a reivindicação 34, caracterizado pelo facto de se tratar de uma célula não aviária.

36ª - Processo de preparação, de pelo menos, uma proteína determinada, por meio de cultura de células de acordo com qualquer das reivindicações 33 a 38, com o gene estranho a codificar para a referida proteína e sendo a proteína recuperada após a cultura.

35

56.705

Ref: 10912/332813

1 Lisboa, 14. OUT. 1985

5 Por INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE (INRA)

O AGENTE OFICIAL



15

20

25

30

35

REFERÊNCIAS

- 1 BECK E., LUDWIG C., AUERSWALD E.A., REISS B. e SCHALLER H.
(1982). Sequência nucleótida e localização exacta da neomi-
cina. Gene 19 : 327-336.
- 5 KAWAI S. e NISHIZAWA M . (1984). Novo processo para transfe-
ção DNA com poliacetilato e dimetil sulfoxido. Mol. Cell. Biol.
4: 1172-1174.
- 10 MESSING J. e VICIRA J. (1982). Novo par de vectores M13 para
seleccionar cordão ADN ou fragmentos de restrição de dupla di-
gestão. Gene 19: 269-276.
- SANGER F., NICKLEN S e COULSON A.R. (1977). Sequência de ADN
com inibidores de terminação de cadeia. Proc. Natl. Acad.
Sci. 74: 5463-5467.
- 15 SHARP P.A. (1981). Especulação sobre entrançamento ARN. Cell
23: 643-646.
- AUFFRAY C. e ROUGEON F. (1980). Purificação de Mensageiro de
Imunoglobulina de Cadeia Pesada. ARNs de Tumor Mieloma Total
20 ARN. Eur. J. Biochem. 107: 303-314.
- BIRNBOIM H.C. e DOLY J. (1979). Processo de extração alcali-
na rápida para crivagem de ADN plasmídeo recombinante. Nucl.
Acid. Res. 7 : 1513-1523.
- 25 BOONE L.R. e SKALKA A.M. (1981). ADN viral sintetizado " in
vitro " por partículas de Retrovírus Aviário permeabilizadas
com melitina. J. Virology 37 (1) 117-126.
- COLBERE-GARAPIN F., HORODNICEANU F., KOURILSKY P. e COLBERE-
GARAPIN A. (1981). Novo marcador seleccionável híbrido para
30 células eucarióticas superiores. J. Mol. Biol. 150: 1-14.
- CULLEN P.R., LOMEDICO P.T. e JU G. (1984). Interferência
transcricional em implicação de retrovírus aviários para o
promotor do modelo de inserção de leucemogénese. Nature 307:
35 241-245.



- 1 EL-GEWELY M.R. e HELLING R.B. (1980). Separação preparatória de centrifugação de gradiente de densidade zonal de complexos de brometo de etídio ADN. Anal. Biochem. 102: 423-428.
- 5 GRAHAM F.L. e VAN DER EB A.T. (1973). Nova técnica para a experiência de capacidade de infecção de adenovírus humano 5 ADN. Virology 52: 456-457.
- 10 LEHRACH H., DIAMON D., WOZNEY J.M. e BOEDTKER H. (1977). determinação de peso molecular de ARN por electroforese de gel em condições desnaturantes; revisão crítica. Biochem 16: 4763-4751.
- LONGACRE S.S. e RUTTER W. (1977). Isolamento de sequências ADN específicas por cromatografia de sefarose sulfidrilo de polinucleótidos mercurados. J. Biol. Chem. 252: 2742-2752.
- 15 MANIATIS T., FRITSH E.F. e SAMBROOCK J. (1982). Clonagem molecular. Manual de laboratório (Cold Spring Harbor NEW-YORK: Cold Spring Harbor Laboratory).
- 20 McMASTER M. e CARMICHAEL G.G. (1977). Análise de ácidos nucleicos de faixa simples ou dupla sobre geles de poliacrilamida e agarose com utilização de glioxal e acridina laranja. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 4835-4838.
- 25 MILLER A.D., JOLLY D.J., FRIEDMAN T. e VERMA M. (1983). Expressão de retrovírus transmissível de transferase fosforibosil hipoxantina humana (HPRT): Transferência de gene em células obtidas de humano deficiente em HPRT. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 4709-4713.
- 30 PONCZ M., SCHWARTZ E., BALLATINE M. e SURREY S., (1983). Análise de sequência nucleotídica da região de gene delta beta globina em humano. J. Biol. Chem. 258: 11599-11609.
- 35 RIGBY P.W.J., DIEKMAN M., RHODES C. e BERG P. (1977). Marcação de ácido desoxirribonucleico para grande actividade específica in vitro por translação de Nick com ADN polimerase. J. Mol. Biol. 113: 237-251.



- 1 SOUTHERN E.M. (1975). Detecção de sequência específica entre fragmentos ADN separados por eletroforese de gel. J. Mol. Biol. 98: 503-517.
- 5 TAUTZ D. e RENZ M. (1983). Método "freeze-squeeze" otimizado para a recuperação de fragmentos ADN a partir de geles agarse. Anal. Biochem. 132: 14-19.
- 10 THOMAS P.S. (1980). Hibridação de ARN desnaturado e fragmentos ADN pequenos transferidos para nitrocelulose. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77 (9) : 5201-5209.
- VENNSTROM B., FANSHIR L., MOSCOVICI C. e BISHOP J.M. (1980). Clonagem molecular do genoma do vírus de eritroblastose e recuperação de vírus oncogénico por transfecção de células de frango. J. Virol. 36: 575-587.
- 15 WIGLER M., SILVERSTEIN S., LEE L.S., PELLICER A., CHENG Y.c. e AXEL R. (1977). Transferência de gene cinase timidina de vírus de herpes para células de cultura. Cell 11: 223-232.
- 20 YAMAMOTO T., NISHIDA T., MIYAJIMA N., KAWAI S., OOI T. e TOYOSHIMA K. (1983). O gene erbB do vírus de eritroblastose aviária é um membro da família do gene src. Cell 35: 71-78.
- SANGER F., WICKLEN J., COULSON A.R. (1977). Sequenciação de ADN com inibidores de terminação de cadeia. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5463-5467.
- 25 SORGE J., WRIGHT D., ERDMAN V.D., CUTTING A.E. (1983). Sistema vector retrovírus anfotrópico para transferência de gene de células humana. Mol. Cell. Biol. 4, 1730-1737.
- 30 YAMAMOTO T., HINARA H., NISHIDA T., KAWAI S., TAYASHIMA K. (1983). Um novo virus AEV-H de eritroblastose aviária é portador de gene erb-B responsável pela indução de eritroblastose e sarcomas. Cell 34, 225-232.
- 35 BIGGIN M.D., GIBSON T.J., HONG G.F. (1983). Geles gradientes tampão e marca 35S como ajuda para determinação rápida de sequência ADN. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 3963-3965.



- 1 BOLIVAR F., RODRIGUEZ R.L., GREEN P.J., BETLACH M.C., HEYNEC_
KER H.L., BOYER H.W., CROSA J.H., FALKOW S. (1977). Constru-
ção e caracterização de novos portadores de clonação . Siste-
ma de clonação de objectivos múltiplos. Gene 2, 95-113.
- 5 DEBUIRE B., HENRY C., BENAISSA M., BISERTE G., CLAVERIE J.M.,
SAULE S., MARTIN P., STEHELIN D. (1984). A sequênciãção do
gene erb-A de vírus de eritroblastose aviária revela um tipo
novo de oncogêneo. Science 224, 1456-1459.
- 10 DENTE L., CORTESE R. (1983). pEMBL: nova família de plasmíde-
os de faixa única. Nucl. Acids Res. 11, 1645-1655.
- 15
- 20
- 25
- 30
- 35

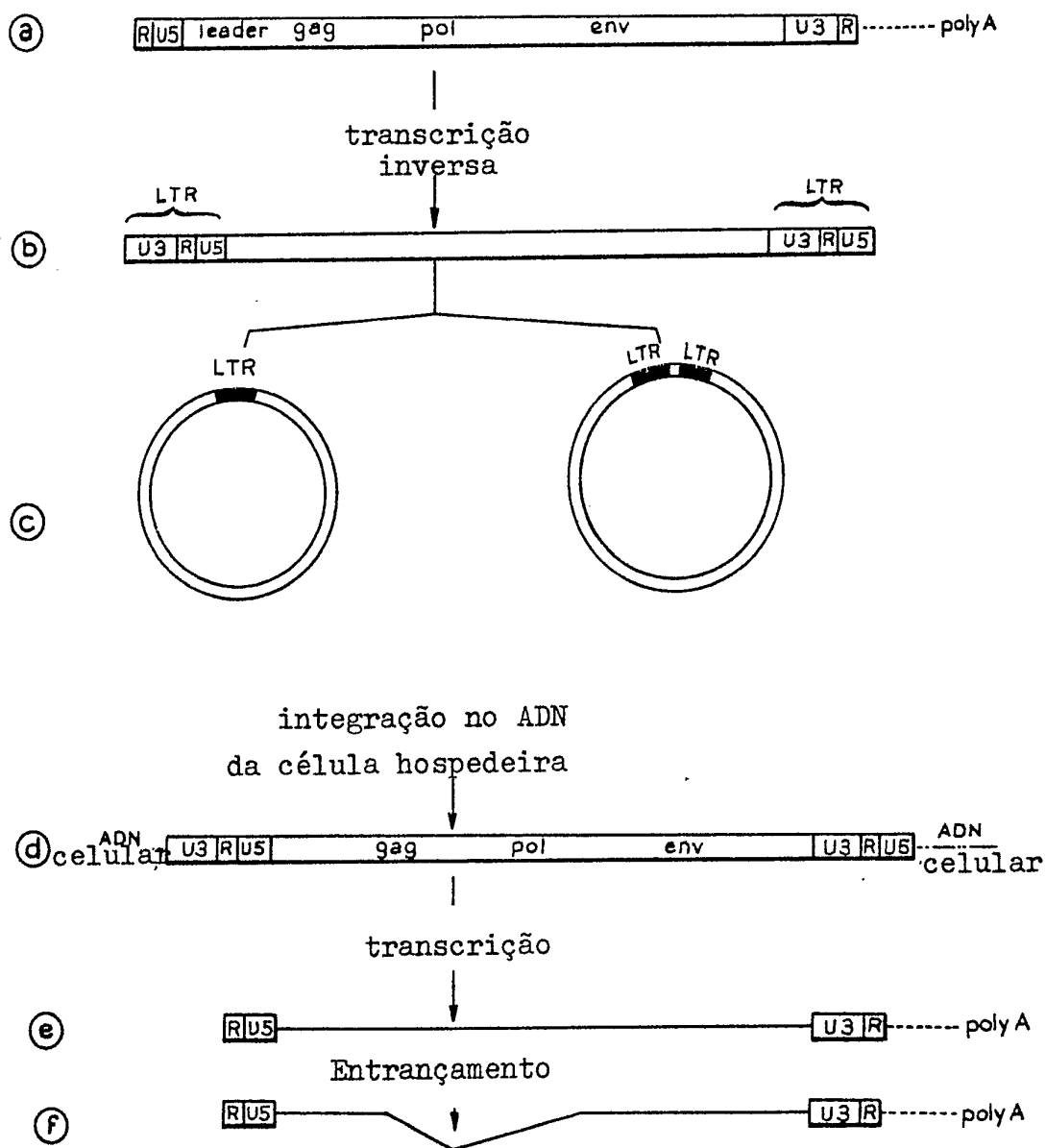


FIG.1

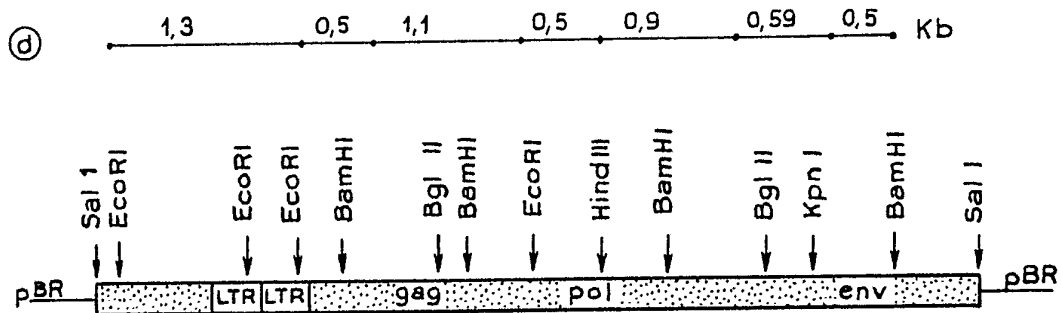
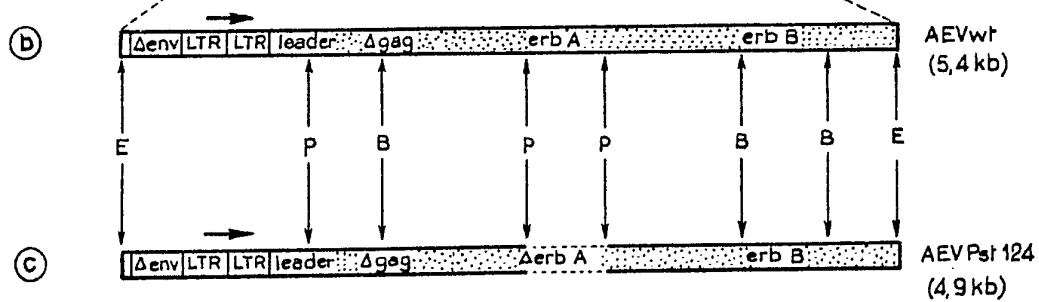
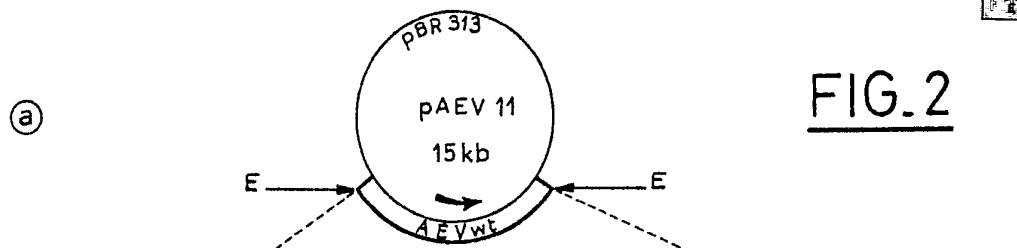


FIG. 3

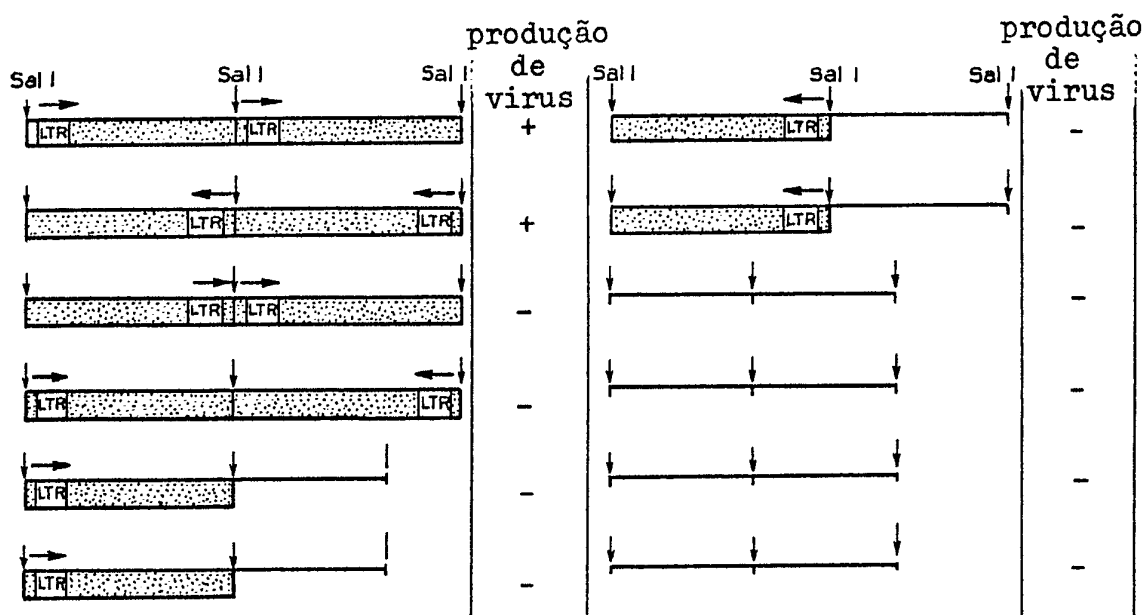


FIG. 4

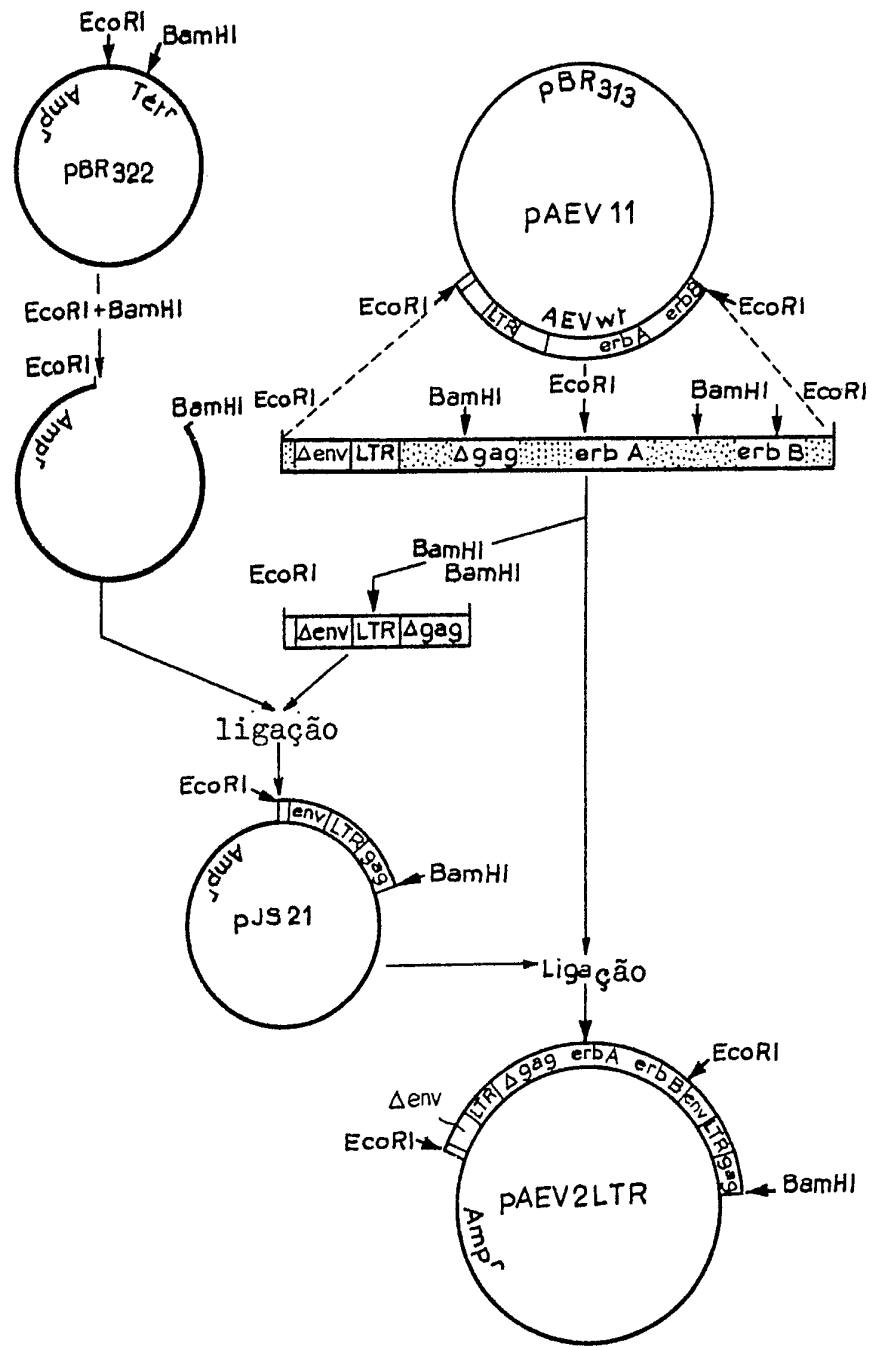


FIG.5

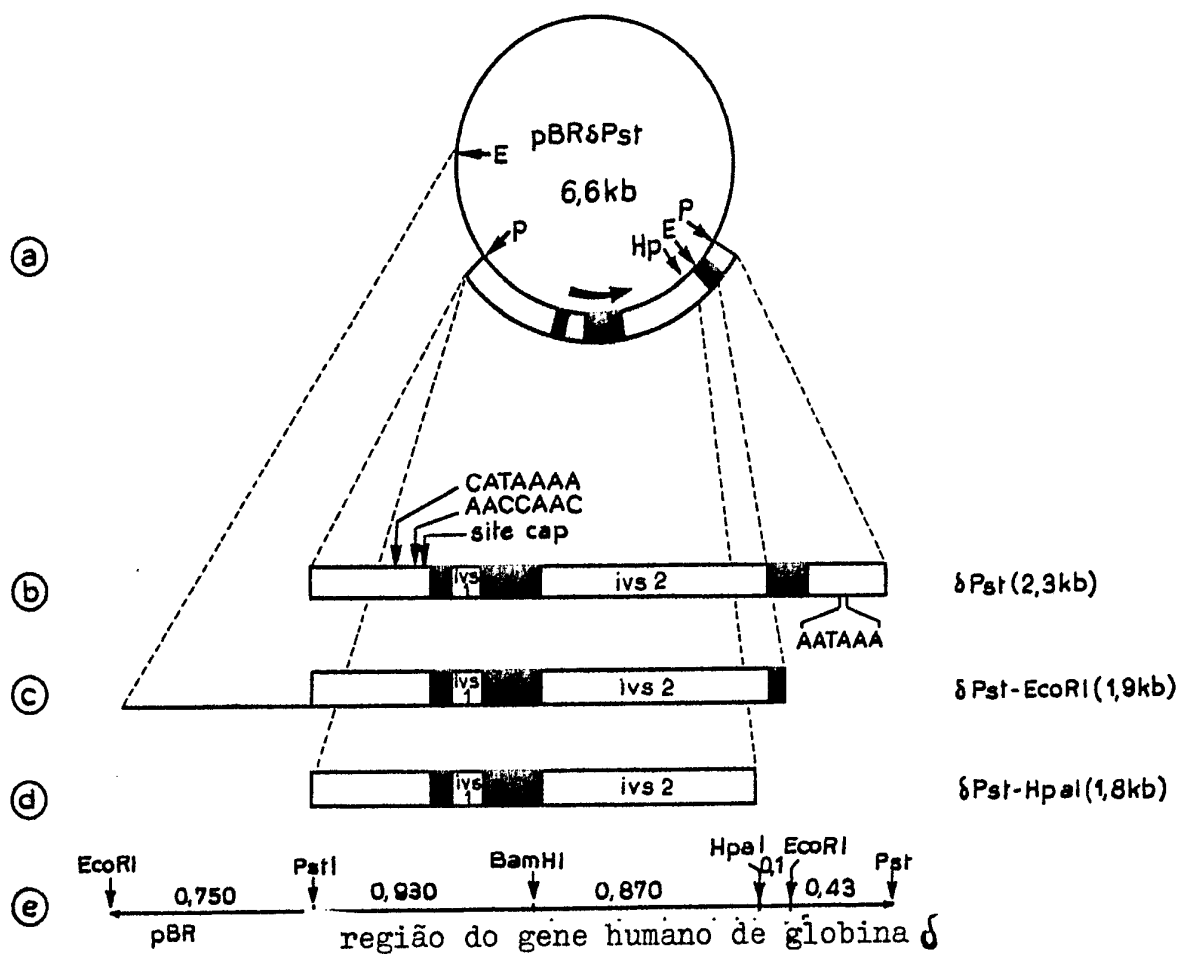


FIG. 6

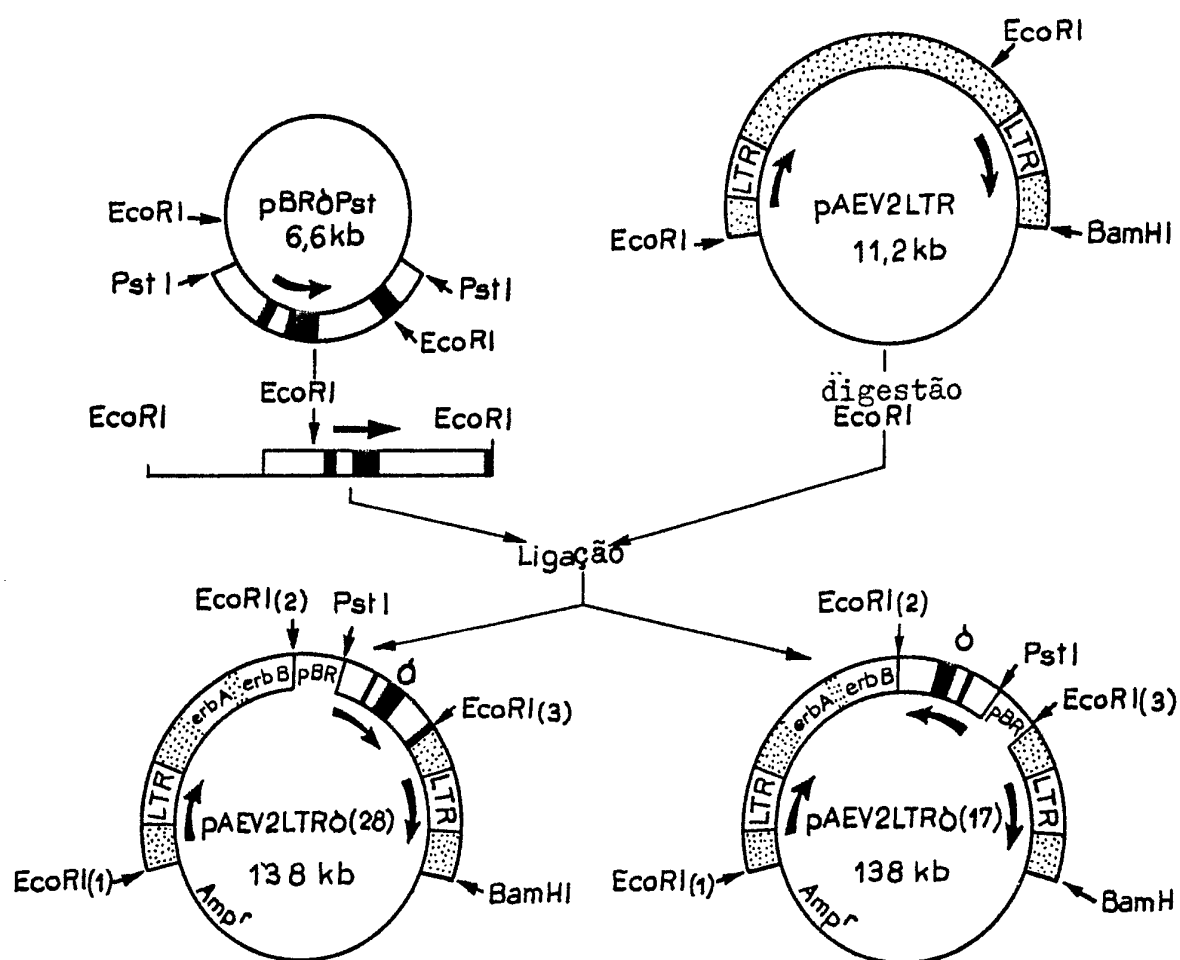


FIG. 7

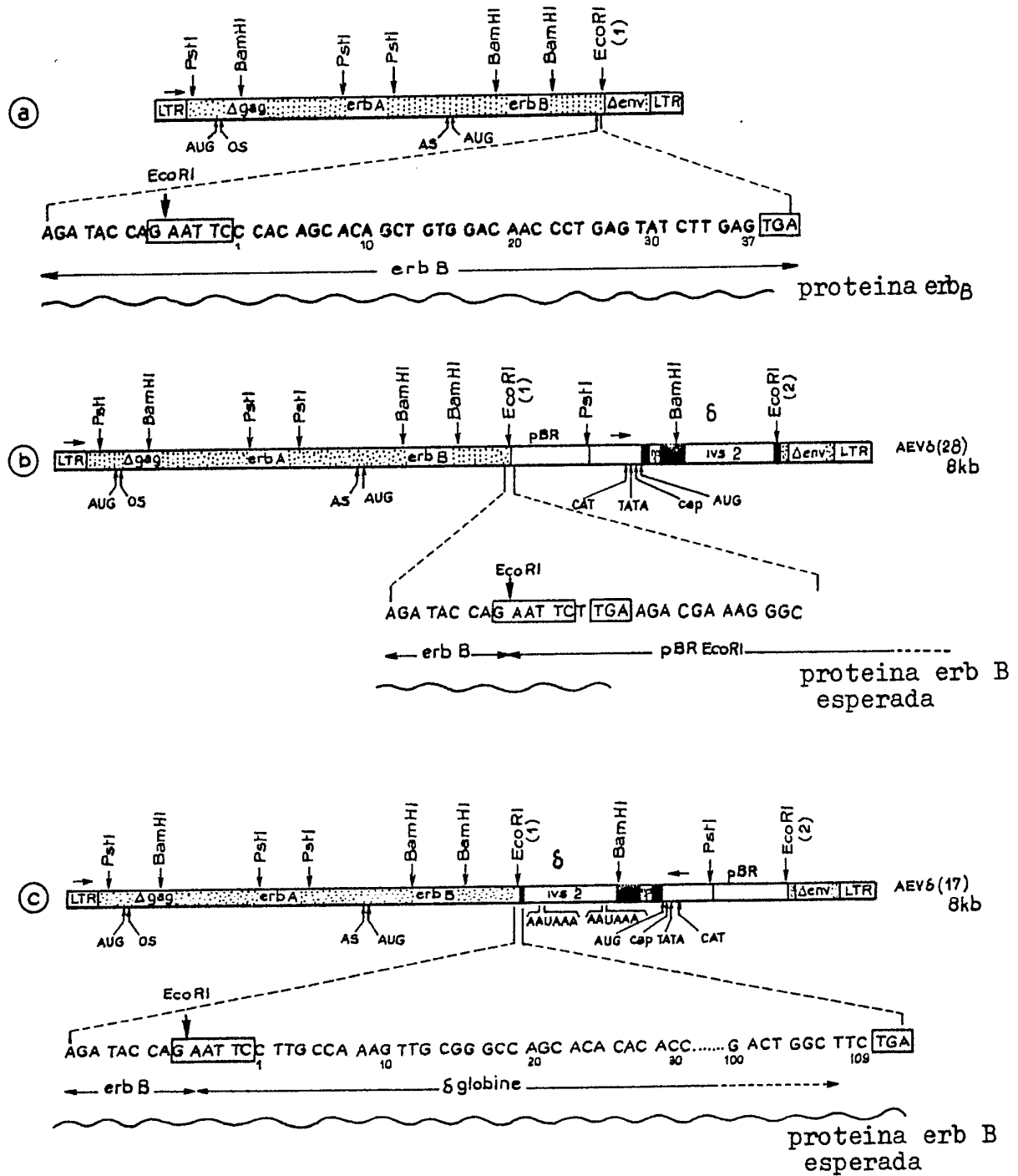


FIG.8

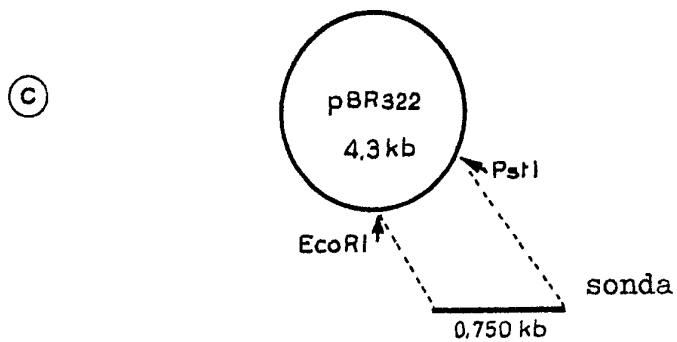
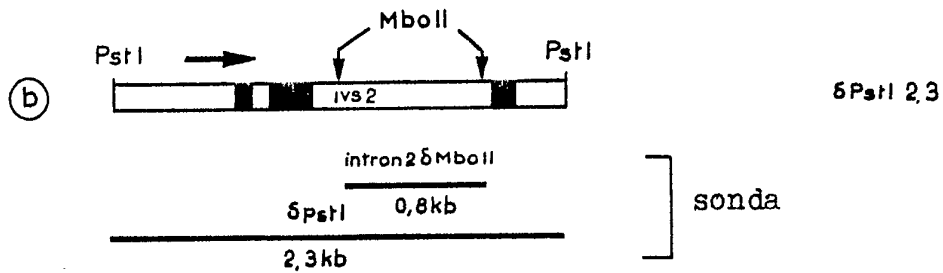
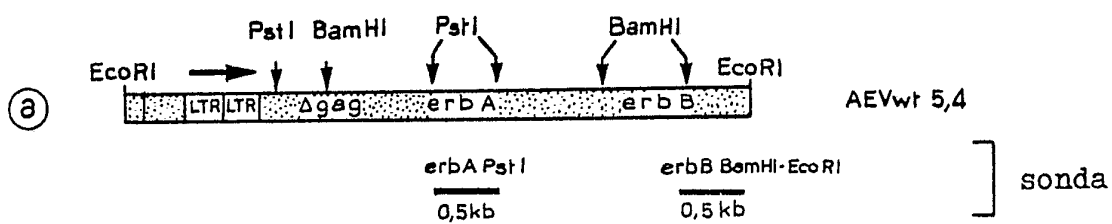


FIG.9

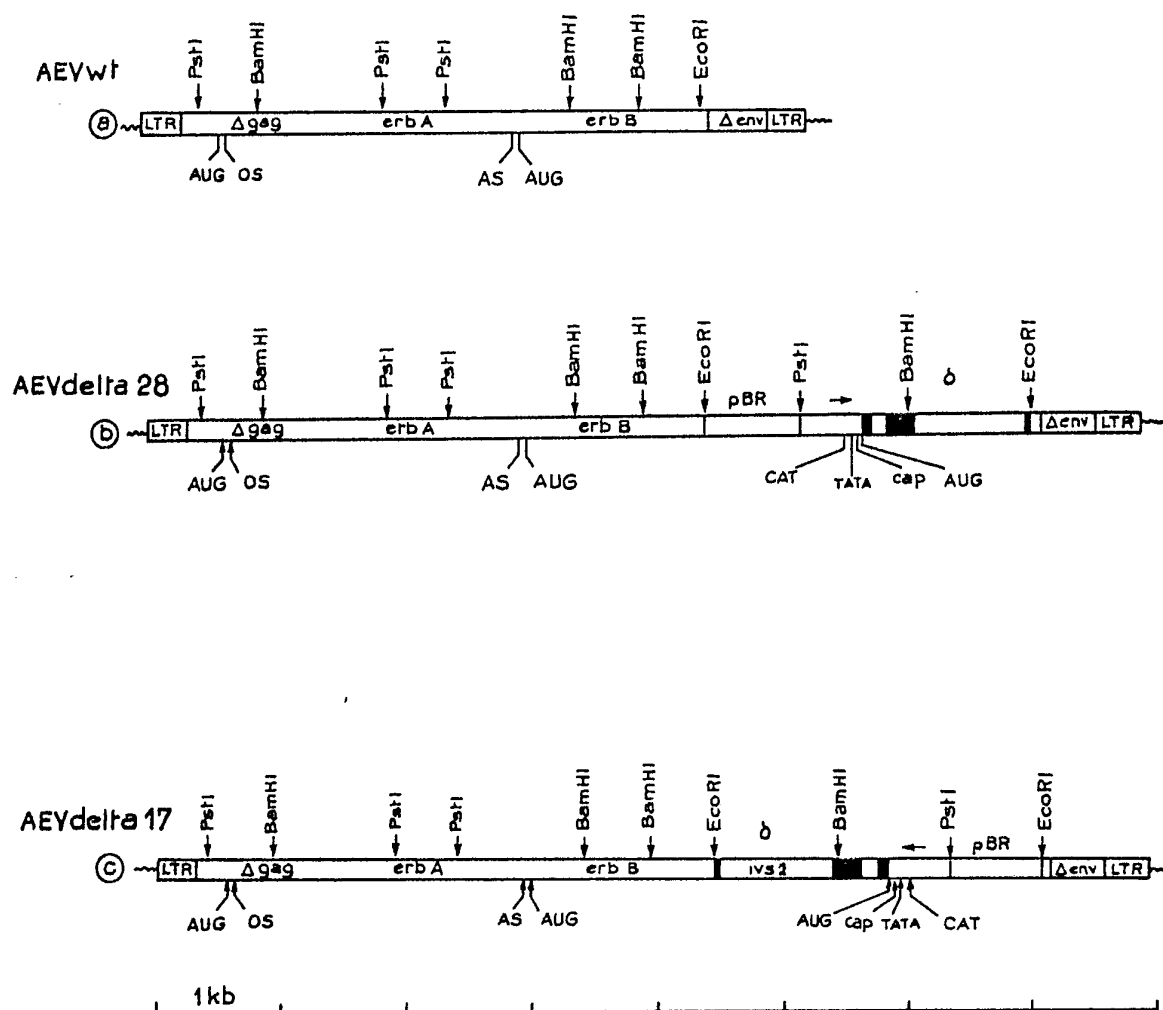


FIG.10

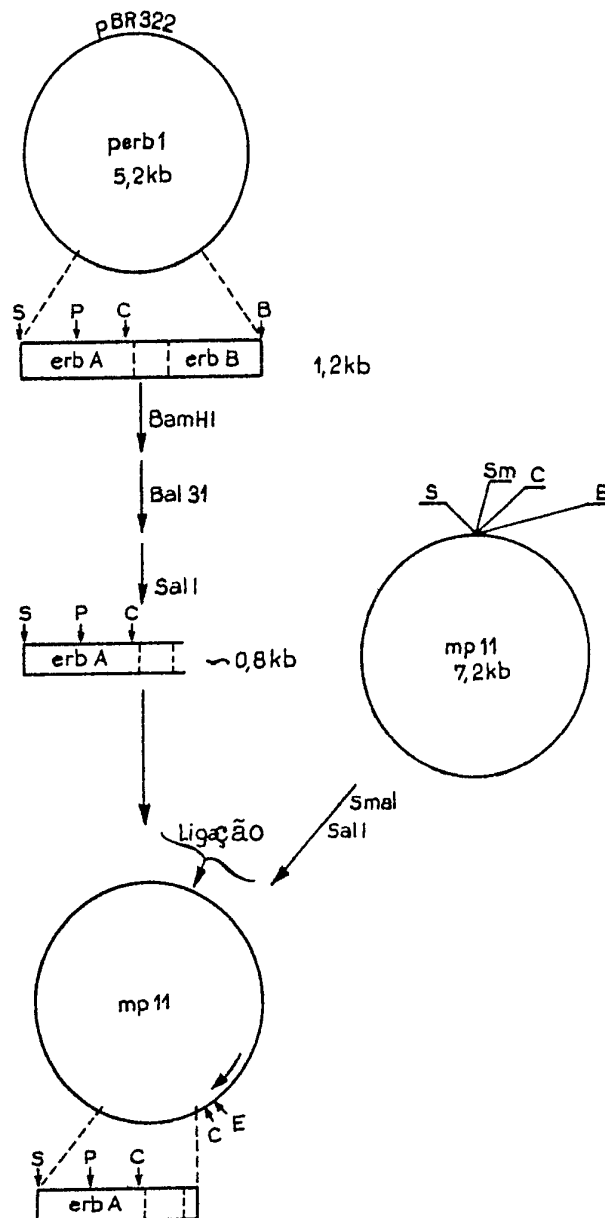


FIG.11

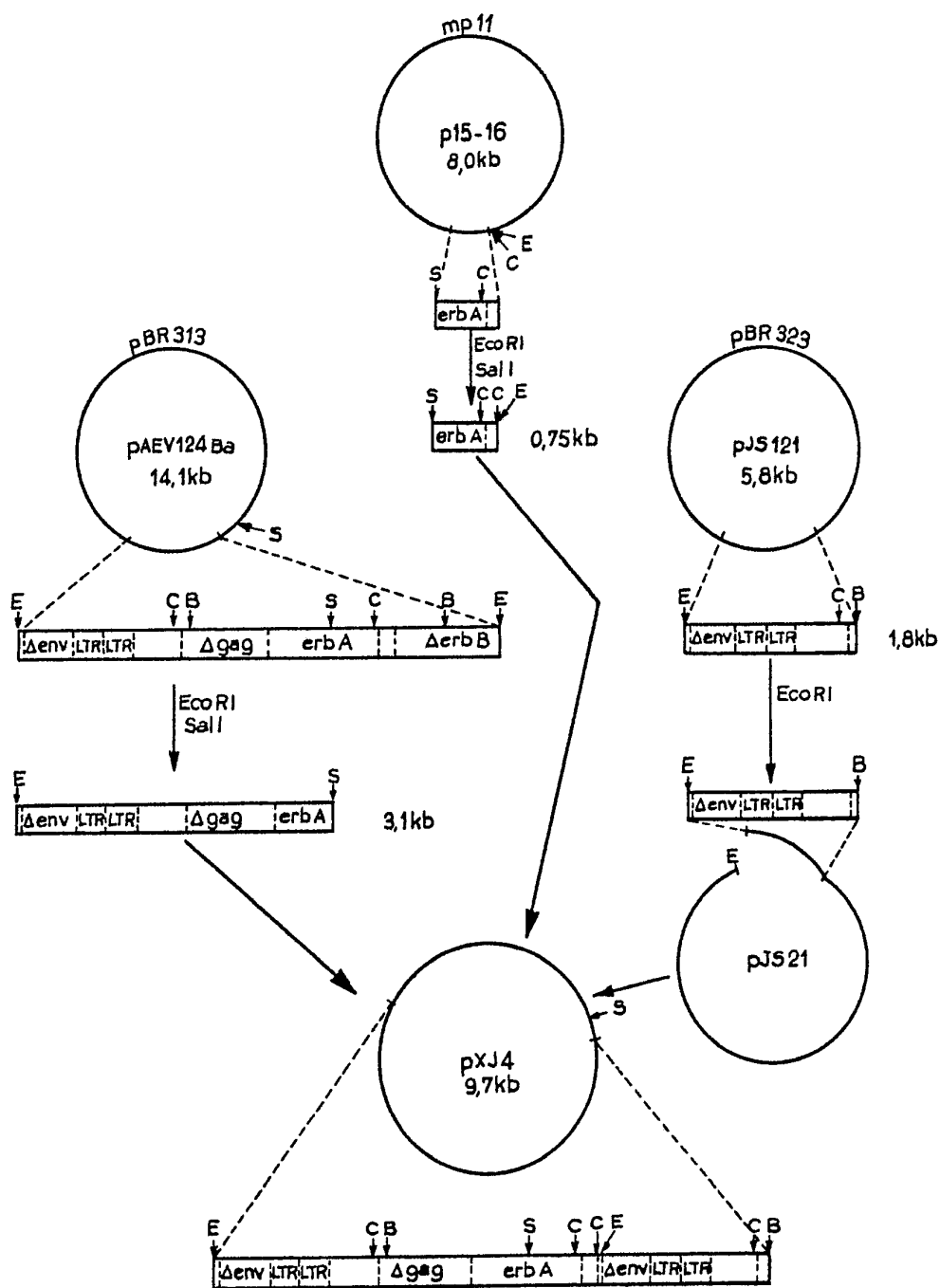


FIG.12

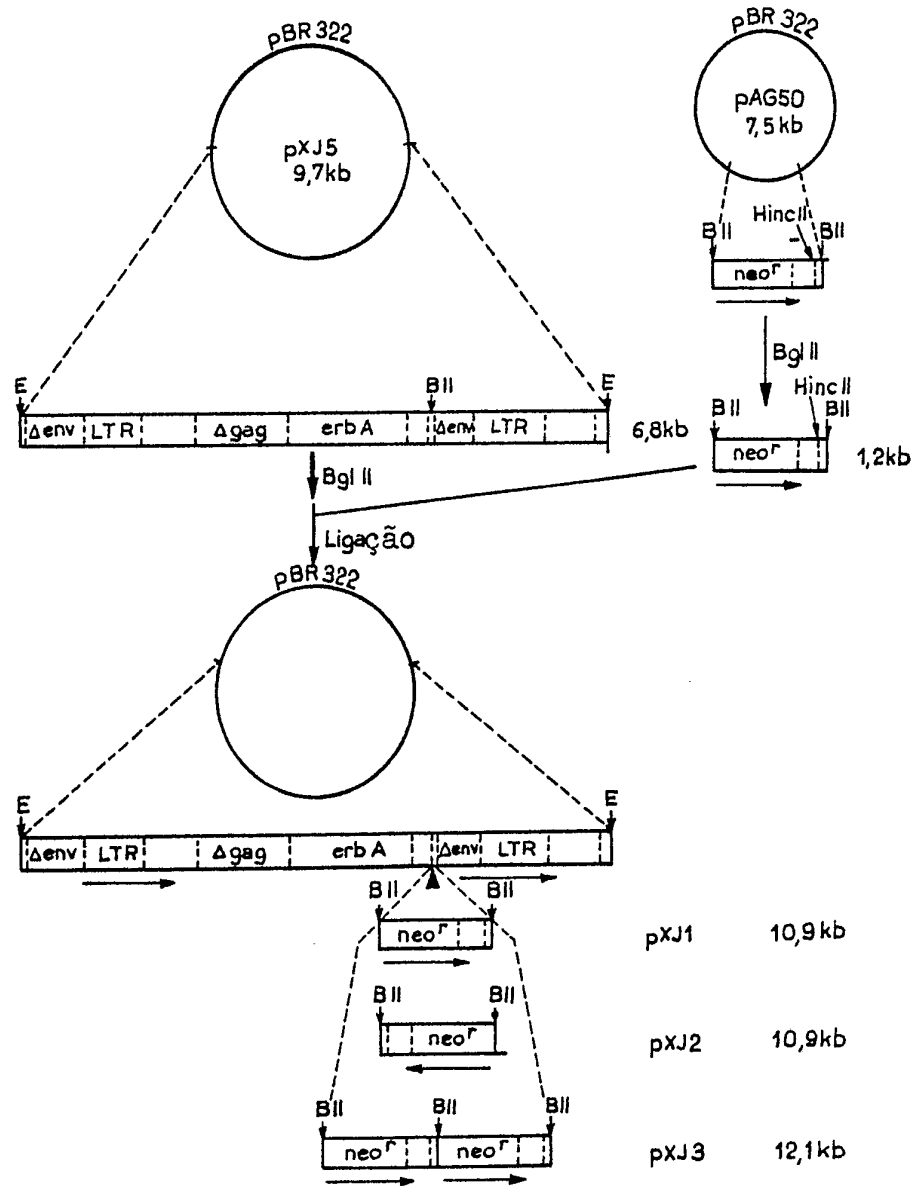


FIG.13

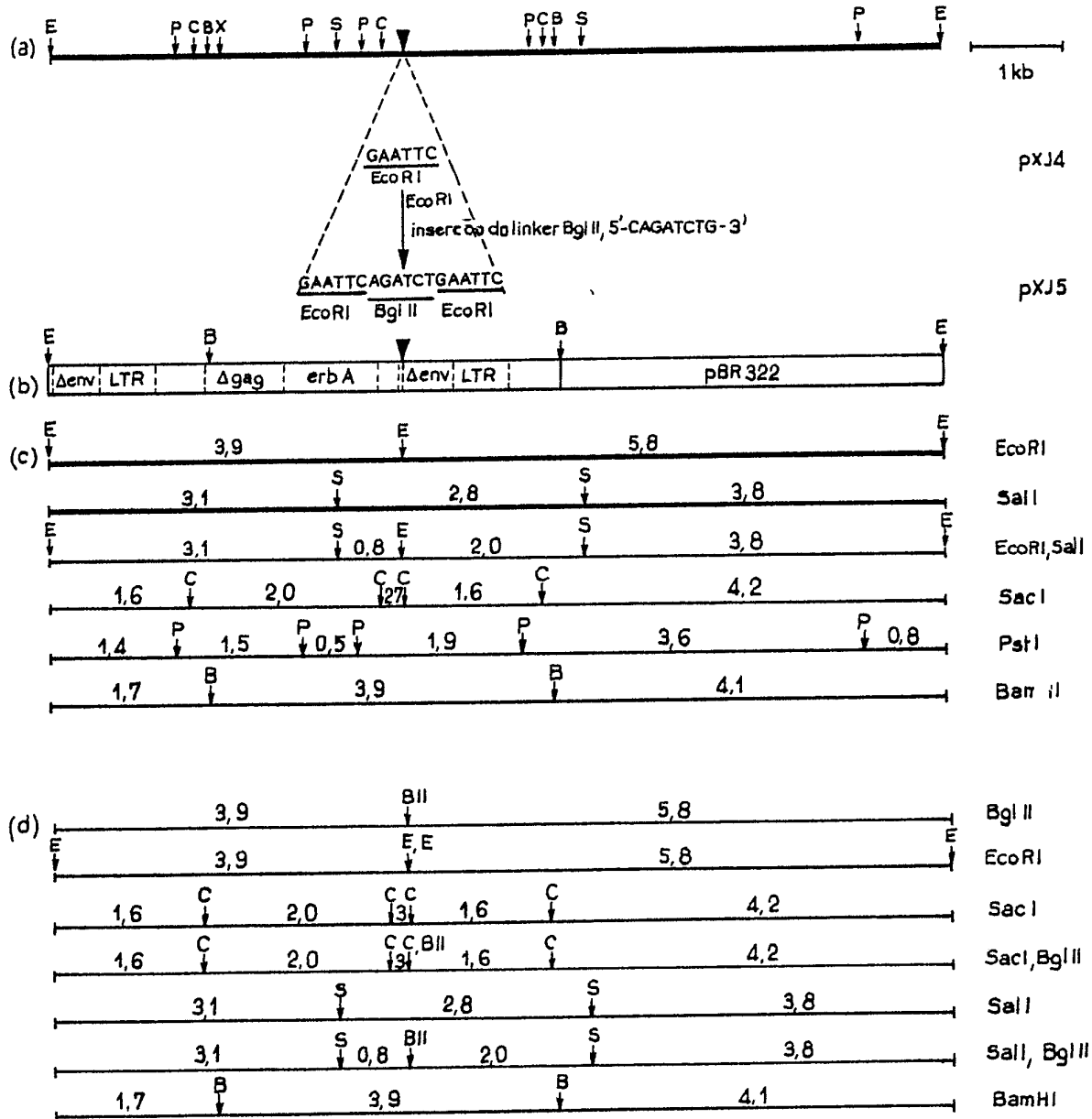
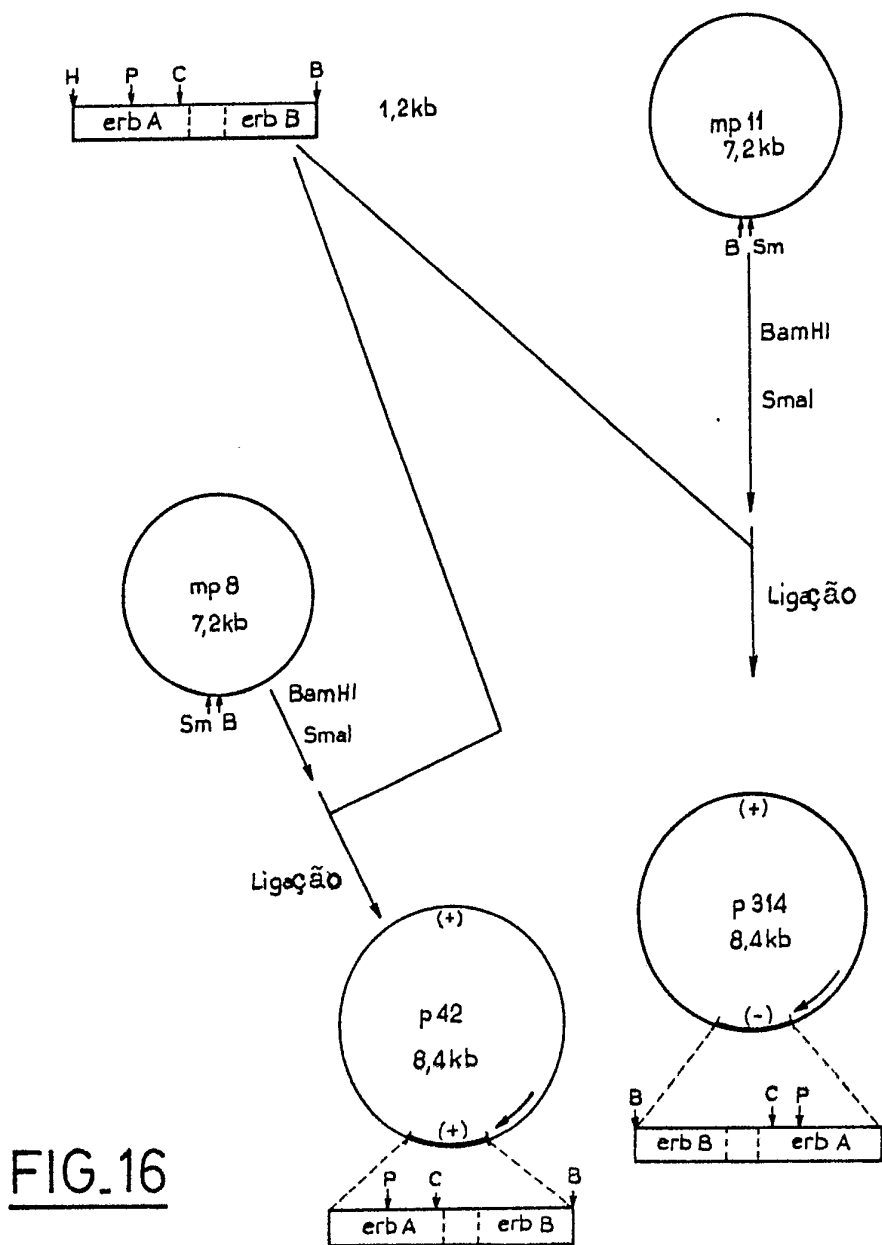
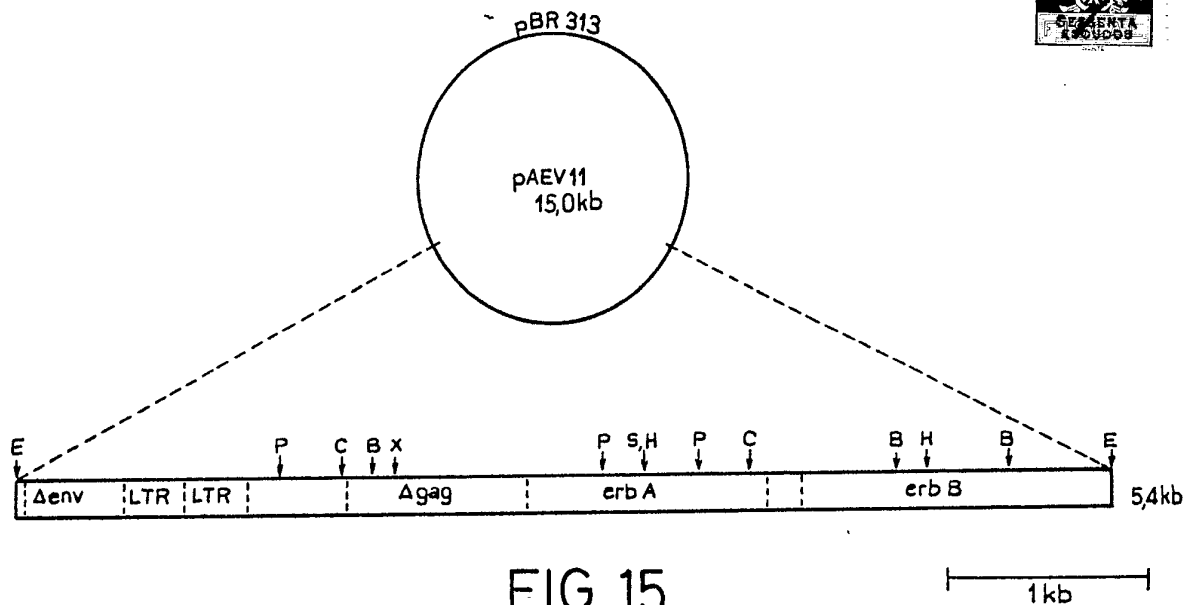


FIG. 14





AEV-H 5'-AUG — CCA AAT GGC TCC AAA ACT CCA TCT ATC GCG GCT GGT
 AEV 5'-AUG — --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
 GTT GTC GGA GGA CTC CTG TGC CTG GTT GTG GTT GGT
 --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
 CTA GGC ATC GGT CTT TAC CTG CGG CGA CGT CAT ATC
 --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---C --- ---
 GTG CGG AAG CGC ACC CTG CGC AGG CTG CTG CAA GAG
 --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
 AGG GAG CTT GTC GAA CCA CTG ACA CCC AGT GGG GAG
 --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
 GCA CCA AAC CAG GCC CAC CTG AGA ATT TTA AAG GAA
 --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
 ACA GAA TTT AAA AAG GTC AAA GTT TTG GGC TCT GGA
 --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---T- ---
 GCT TTT GGC ACT ATT TAT AAG GGA CTT TGG ATC AEV-H
 --- --- --- ---G- --- --- --- --- --- ---AEV
 --- --- --- --- --- --- --- --- ---C
 BamHI

FIG.17

5'-TAG TCCATCCTAC AAGAGCAAAA ACTTGTAAGC ATTTCAGGTA GCAAAGTAAT GAAACCACAA AATGCTGAAA ATGCTCCACA
 v-erba 10 20 30 40 50 60 70 80
 GTTGAATGCA CAGATATTTA TGTTCCTGTG TTATTCCTGA AGTGTAAGGA ATGTAAGGAA ATCATAGATT AGTTGTTTCT
 90 100 110 120 130 140 150 160
 TTCCTTTTTC CAGGCCCCAG ACCACTGC ATG AAG TGT GCT CAT TTT ATA GAT GGT CCC CAC TGT GTG AAG
 170 180 **←** v-erbB
 p15-16
 p15-28
 p15-21
 p15-25
 GCC TGC CCC GCT GGG GTC CTG GGT GAG---v-erbB--3'
 p15-28
 p15-21
 p15-25
 GG GCG AGC TCG AAT TCA CTG---mp11---
 SacI EcoRI

FIG.18



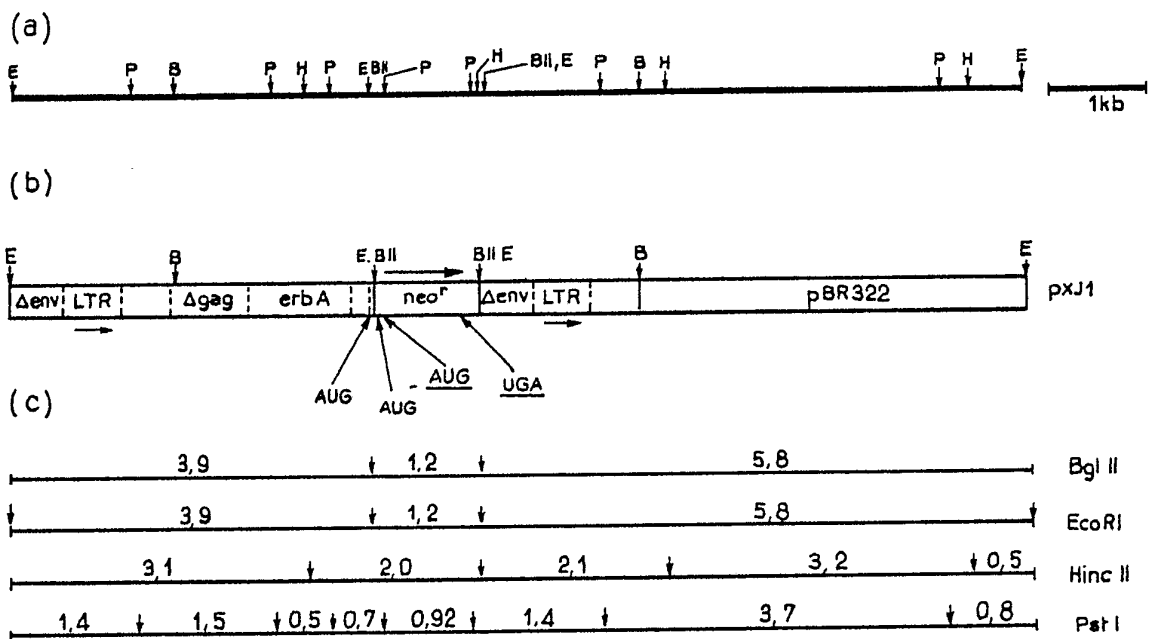


FIG.19 .

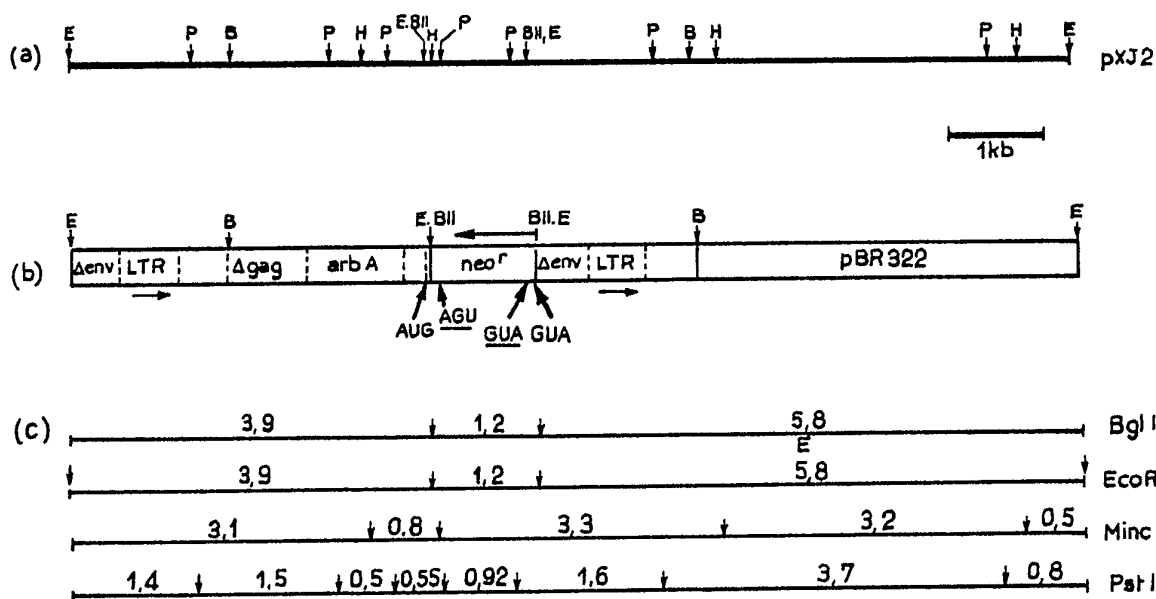
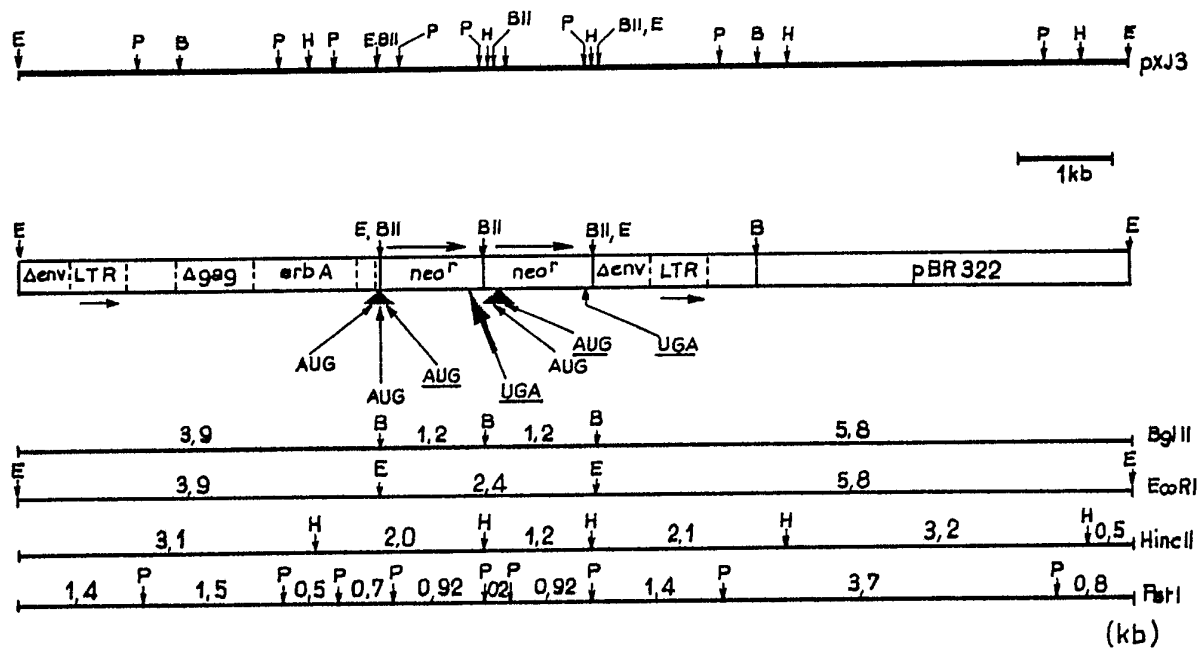


FIG. 20



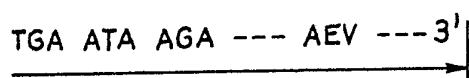
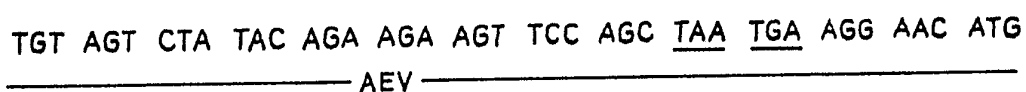
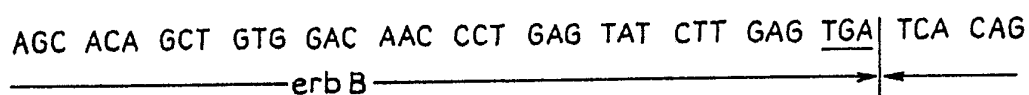
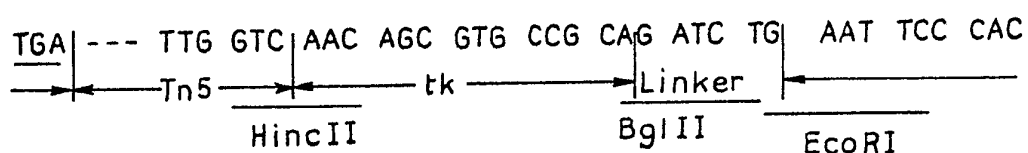
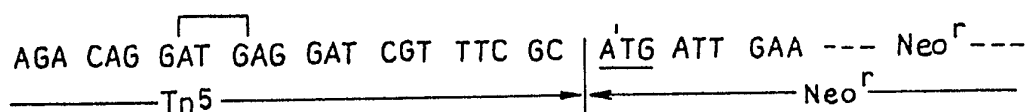
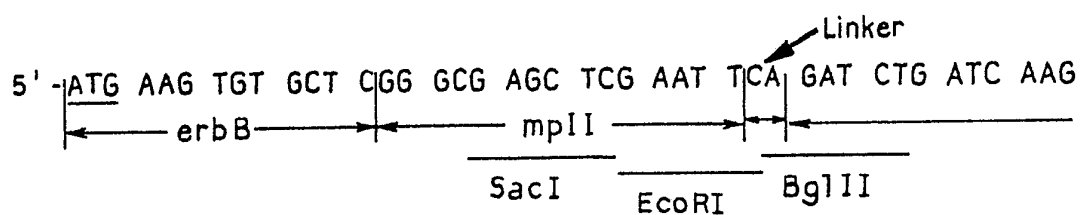


FIG. 22

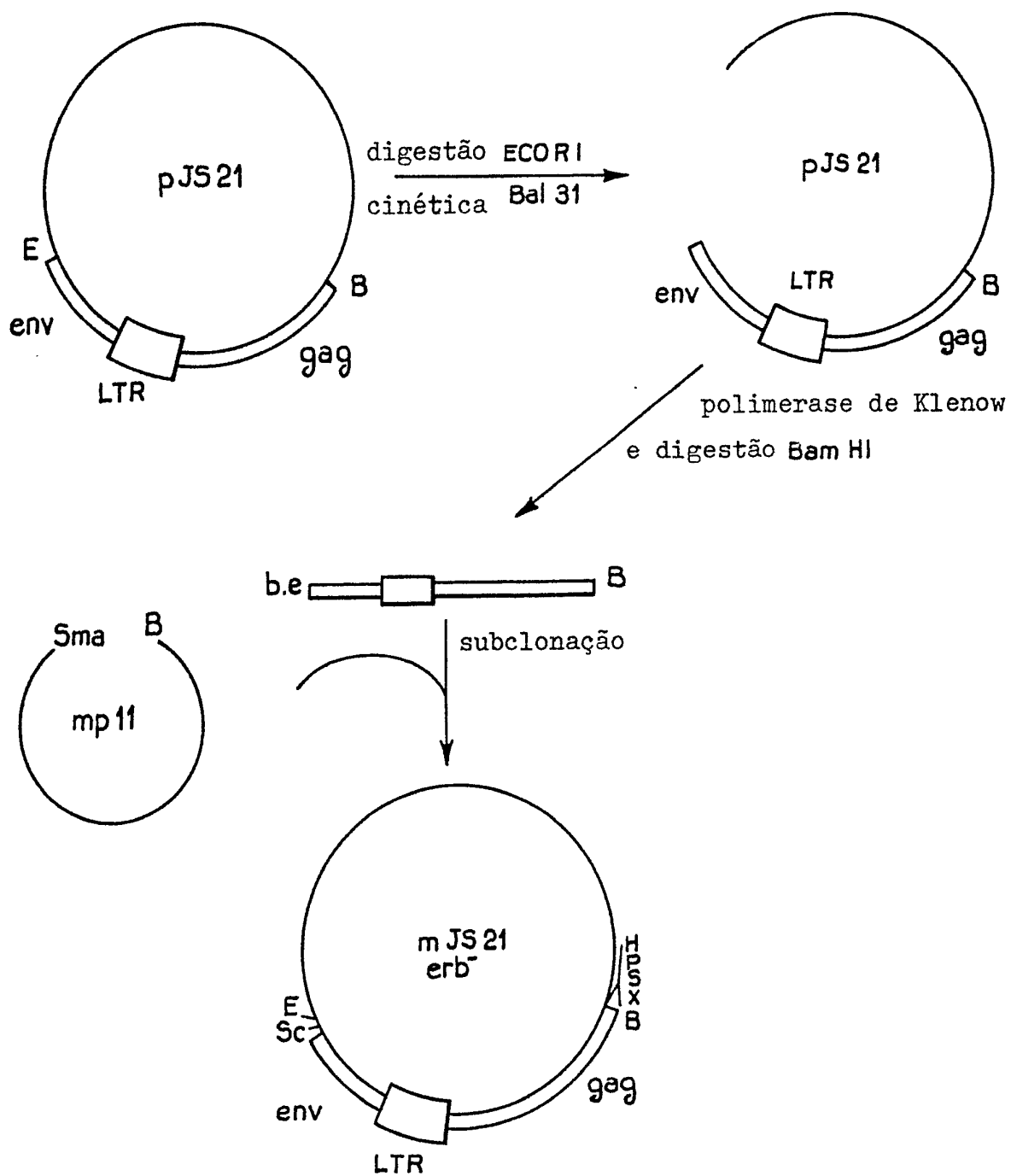


FIG. 23

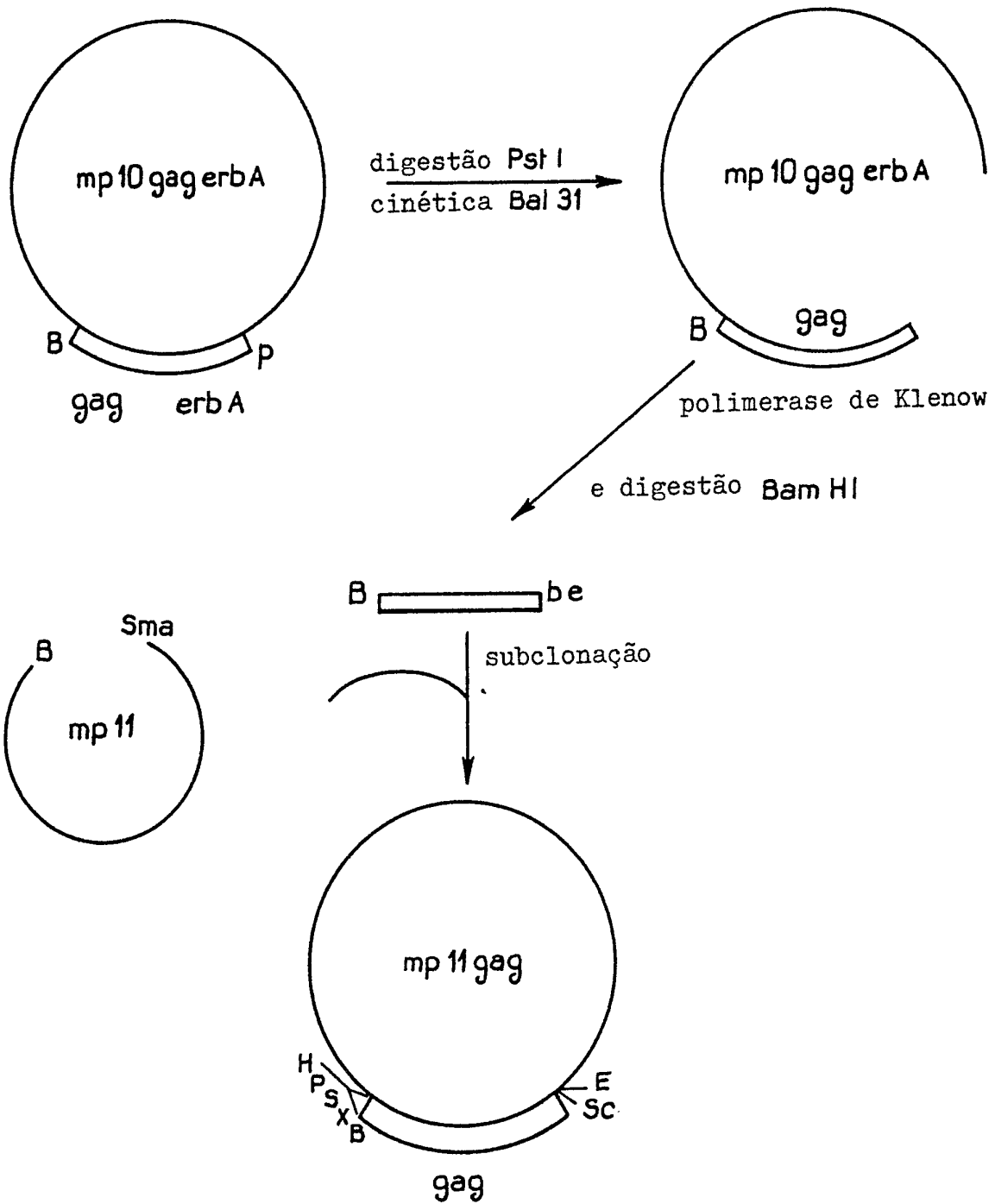


FIG. 24

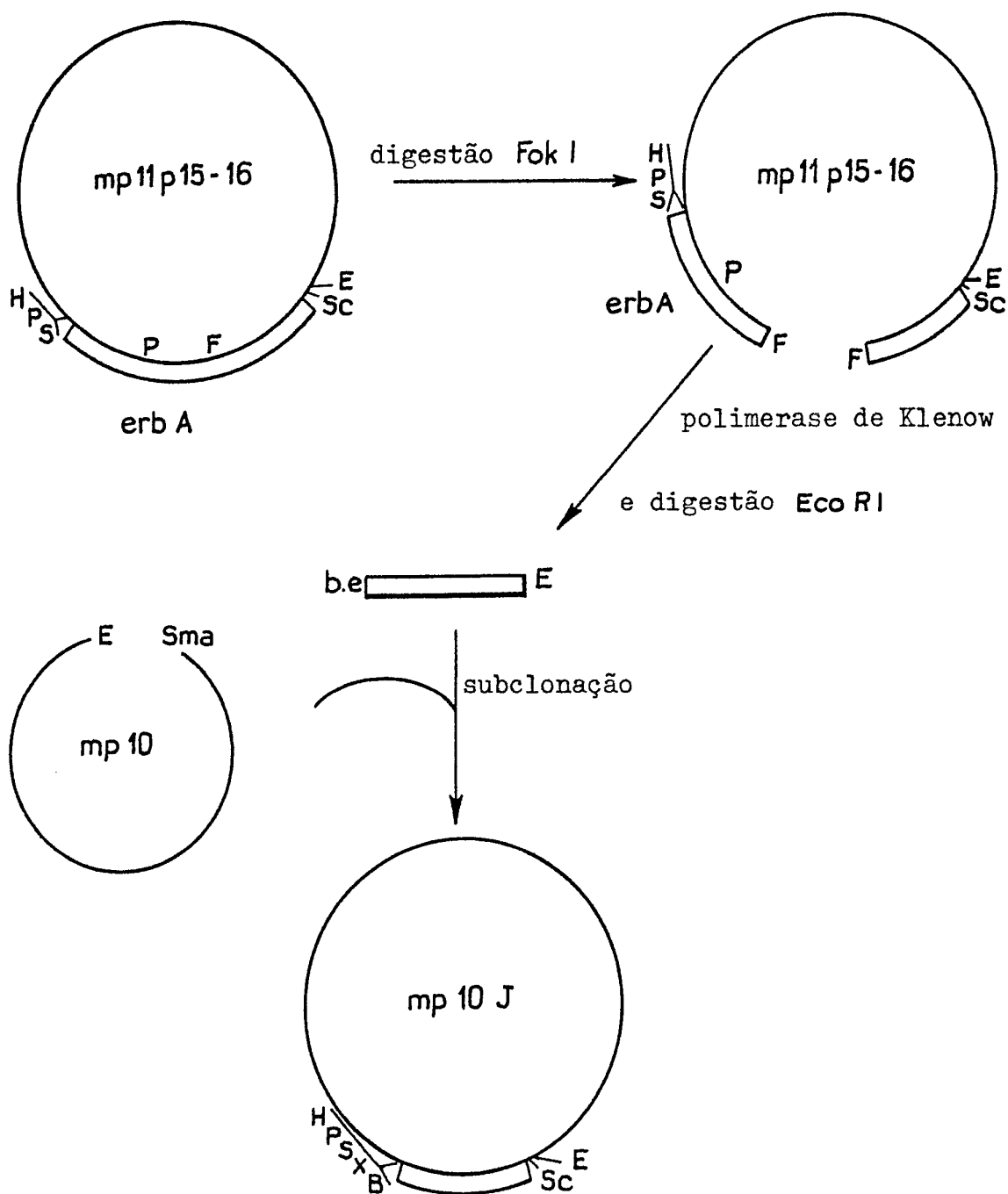


FIG. 25

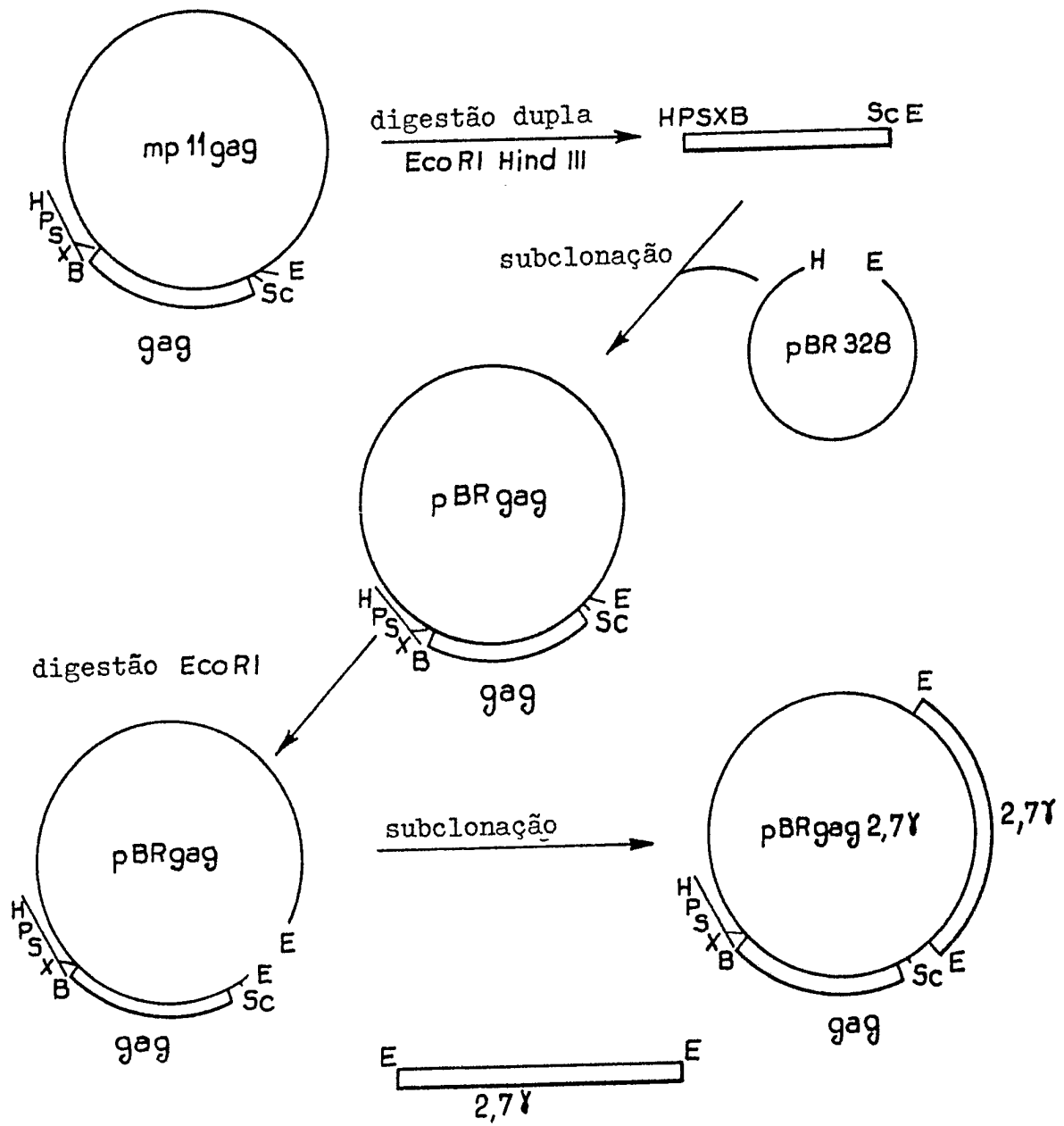


FIG. 26

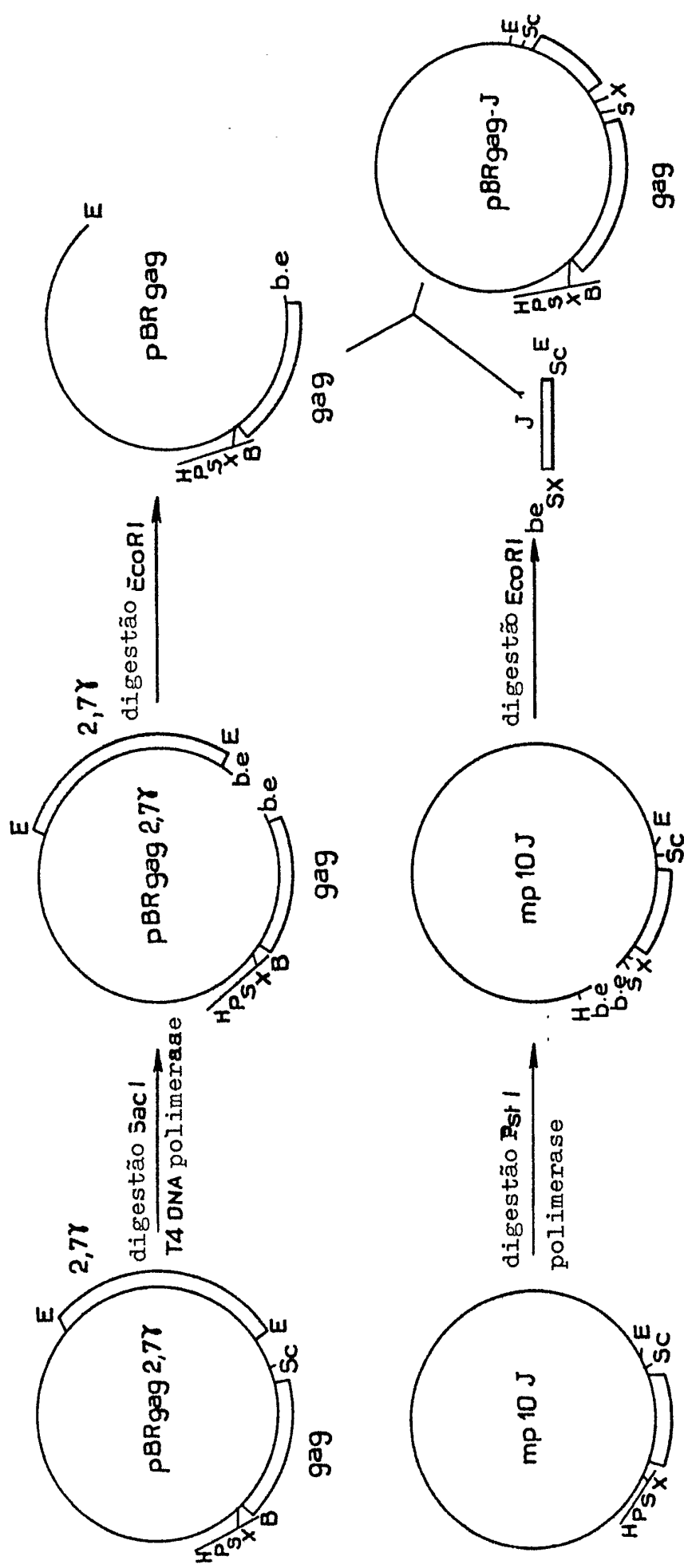


FIG. 27

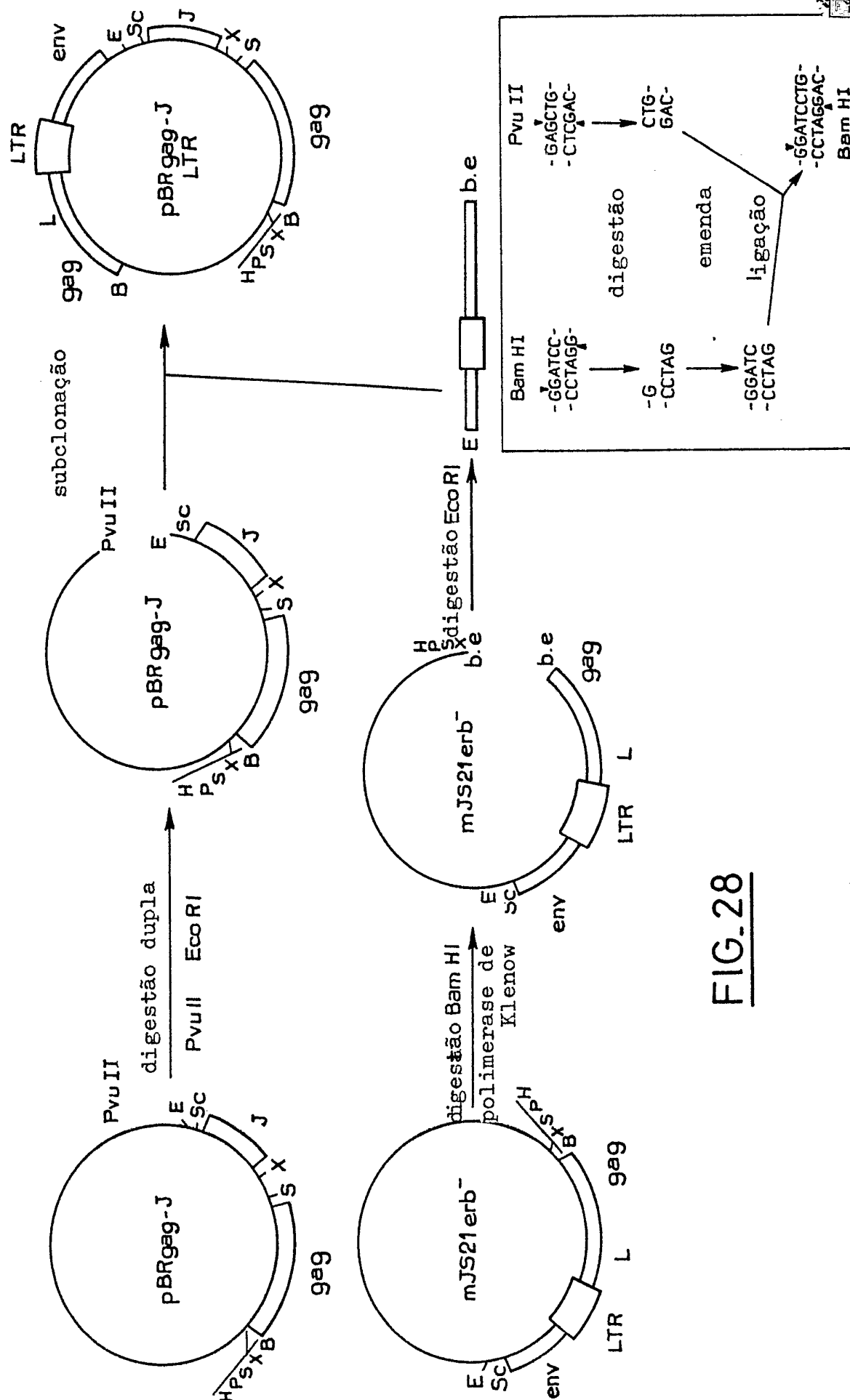


FIG. 28

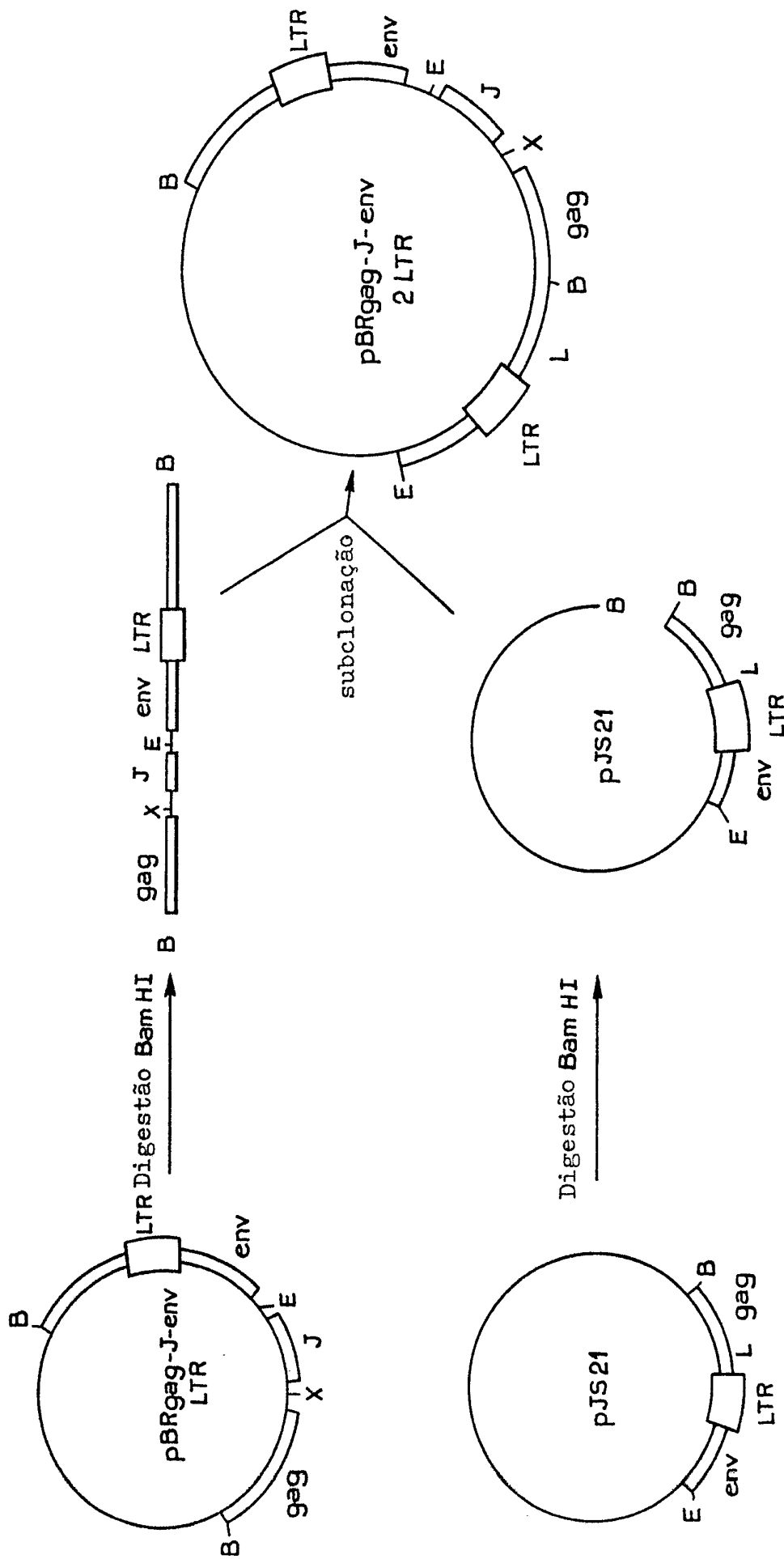


FIG-29



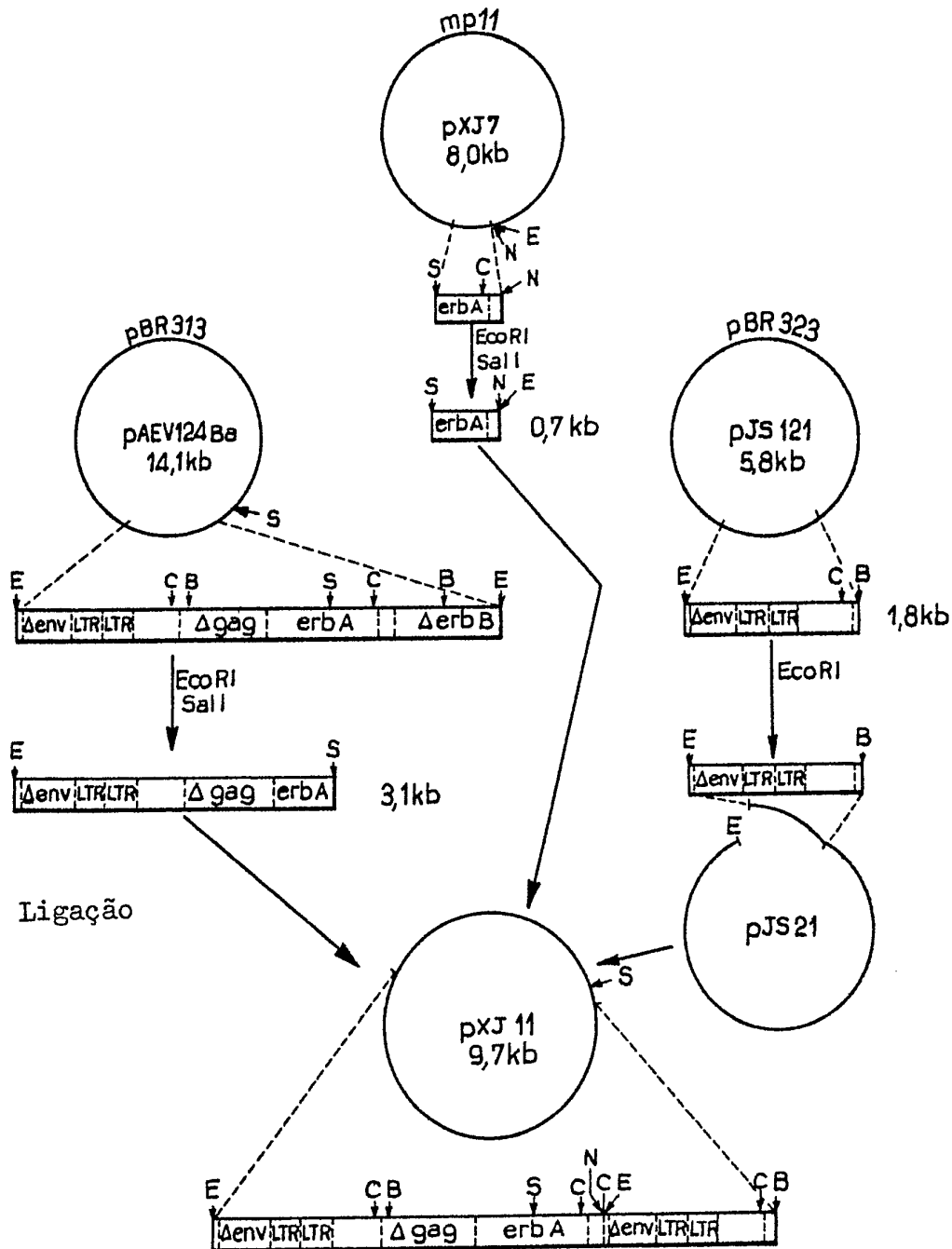


FIG. 30

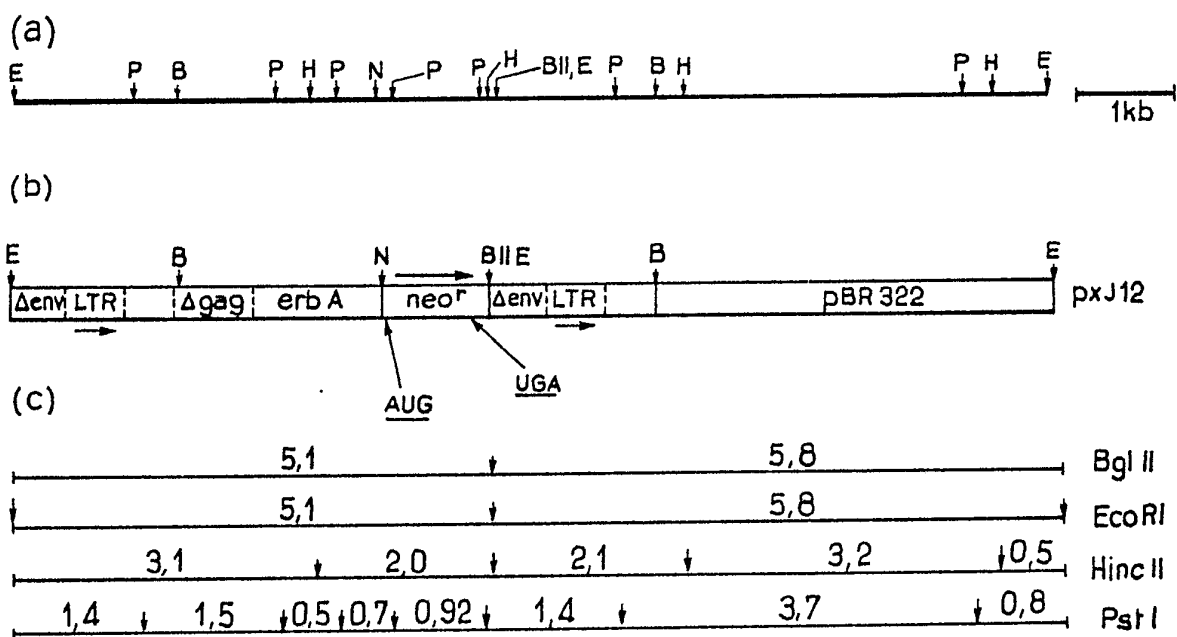


FIG.31