

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E
MOLECULAR

Desenho e obtenção de genes sintéticos para a expressão heteróloga do fator de reprogramação celular Oct-4 fusionados a transportana 10 em diferentes linhagens de *Escherichia coli*

RAQUEL AYRES

PORTO ALEGRE, AGOSTO DE 2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E
MOLECULAR

Desenho e obtenção de genes sintéticos para a expressão heteróloga do fator de reprogramação celular Oct-4 fusionados a transportana 10 em diferentes linhagens de *Escherichia coli*

ALUNA: RAQUEL AYRES
ORIENTADOR: PROF. DR. DIEGO BONATTO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular e Celular, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Biologia Molecular e Celular

PORTO ALEGRE, AGOSTO DE 2014

Fontes Financiadoras

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Radiobiologia Celular (Laboratório 219), no Departamento de Biotecnologia e Biologia Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul com o apoio financeiro da CAPES e dos Institutos Nacionais de Ciências e Tecnologias – Processos Redox em Biomedicina (INCT-REDOXOMA).

Agradecimentos

Primeiramente gostaria de agradecer aquelas pessoas que são essenciais para mim que sem os quais eu não estaria aqui hoje realizando mais uma etapa importante na minha vida, meus pais. Quero agradecer a eles por todo amor e carinho que sempre tiveram por mim. Por me aguentarem estressada e achando que nada iria dar certo. Agradeço por sempre acreditarem em mim, mesmo quando eu mesma não acreditava, por me incentivarem quando eu achava que não iria dar certo e por me mostrarem de que eu seria capaz e pela confiança que depositam em mim. Quero que saibam que são a inspiração para a minha vida dessa forma tento absorver o melhor de cada um para me tornar uma mulher tão especial quanto vocês são, AMO VOCÊS.

Não menos importante quero agradecer à aquela pessoa que não nasceu na minha família mas que eu escolhi para ser fazer para dela como meu companheiro, amigo e meu amor, Conrado. Obrigada amor, por me aturar em todas as fases, nos choros, nas angústias, nos medos, nos ensaios (sim, escutava os ensaios das apresentações) nos acertos e nos erros, sempre me motivando, acreditando em mim e me dizendo que eu era capaz. Saiba que és muito importante na minha vida e que se cheguei até aqui foi devido ao teu apoio e compreensão. TE AMO e obrigada por tudo.

Preciso agradecer também aqueles que de alguma forma participaram, não ativamente mas compreendendo o que eu fazia e me ajudando sempre com palavras de carinho e incentivo. Quero agradecer ao meu irmão, Gustavo, que em nossas conversas sempre me mostrava que temos que ser mais compreensivos e que tudo daria certo. Não posso esquecer de agradecer meu sogro Nei e minha

sogra Glória, o Nei nas suas tentativas de me ajudar com o que eu tinha dúvida, só que não né....hahaha, brincadeiras à parte meus sogros compreenderam e me incentivaram a realizar tudo com muita garra e persistência estando sempre ao meu lado.

Então agora, após os agradecimentos para os familiares não poderia deixar de agradecer aqueles que fizeram parte desta história na prática, convivendo cada momento comigo. Dessa forma agradeço ao meu orientador o Prof. Diego Bonatto, pela oportunidade, por sua confiança e dedicação. Obrigada por ter me dado o privilégio de poder aprender ao seu lado, muito do que me tornei durante este período devo ao que vivi no laboratório 219. Falando em laboratório agradeço aos colegas pela convivência, pelos cafés e pelos lanches coletivos que nos proporcionavam alguns momentos de relaxamento nos quais ríamos bastante. Em especial preciso agradecer duas colegas de laboratório que enfim tornaram minhas amigas, Renata e Beatriz. Renata, ou Rê para os íntimos, agradeço a amizade, que começou aos poucos, de forma tímida, mas que como passar do tempo se consolidou. Obrigada por fazer parte nas “noites festivas do laboratório” ficar até tarde fazendo experimento ouvindo música e discutindo os experimentos, isso vai permanecer para sempre. E a Beatriz, ou melhor Bia, me conquistou com esse jeitinho delicado de falar, mas que quando fica braba ela fica mesmo e isso não é difícil né?! Muito obrigada pela força nessa fase final, pelas dicas e pelas conversas. Meninas, Rê e Bia, obrigada pelos momentos que nós passamos juntas, pelas risadas e pela amizade.

Quero agradecer aquelas pessoas que tiveram uma parcela importante na minha formação e na escolha de trabalhar com a pesquisa científica, Dr. Tiago Dalberto e Dr^a Nance Nardi. Tiago, quero agradecer de coração por desde o início,

quando eu quis fazer iniciação científica voluntária, ter me acolhido e me incentivado, obrigada por ter continuado sempre me auxiliando e por ter se tornado um grande amigo. E não poderia deixar de agradecer a Dr^a Nance Nardi, pois juntamente com o Tiago, me acolheu e me cedeu a oportunidade de conhecer o meio científico, principalmente as células-tronco, obrigada pela confiança e pelo ensinamento.

Não posso deixar de agradecer aqueles que me auxiliaram com dicas, protocolos e equipamentos, como o laboratório 210 onde consegui discutir e aprimorar meus experimentos além disso agradeço a paciência do pessoal por estar em sempre dispostos a ajudar. Agradeço também ao pessoal do laboratório de sinalização e plasticidade celular por auxiliarem na técnica de western blot, cedendo os protocolos e alguns reagentes. Deste último laboratório agradeço em especial ao Prof. Guido Lenz, pela confiança e por ceder a bolsa de DTI.

Por fim agradeço a todos aqueles que de alguma forma fizeram parte desta fase importante da minha vida, seja a distância como minhas amigas Tiane, Tais e Thiely ou próximo como meus avós, meus tios e primos. Obrigada por tudo saibam que tudo que vivi e todos que passaram em minha vida estarão para sempre em minha memória de alguma forma.

Sumário

Lista de abreviaturas.....	9
Lista de figuras.....	10
Lista de tabelas.....	18
Resumo.....	19
Abstract.....	21
1. Introdução.....	22
1.1 Visão histórica das células-tronco e a sua caracterização.....	22
1.2 Importância clínica das células-tronco.....	29
1.3 Células-tronco pluripotentes induzidas.....	33
1.4 Peptídeos transdutores de membranas ou peptídeos de penetração celular.....	38
1.4.1 Transportanas.....	41
2. Justificativa.....	43
3. Objetivos.....	44
3.1 Objetivo Geral.....	44
3.2 Objetivos específicos.....	44
4. Procedimentos Experimentais.....	45
4.1 Desenho e síntese de genes sintéticos para a expressão dos fatores de Yamanaka fusionados a transportana 10.....	45
4.2 Linhagens de <i>E. coli</i> usadas neste trabalho.....	47
4.2.1 Indução de competência nas linhagens DH5 α e XL1-Blue de <i>Escherichia</i> <i>coli</i>	49
4.2.2 Transformação e seleção de bactérias recombinantes.....	50

4.3	Estabelecimento das condições de cultivo para expressão dos genes sintéticos.....	51
4.4	Protocolo para extração de proteína heterólogas.....	53
4.5	Avaliação dos extratos proteicos em gel de poliacrilamida.....	54
4.6	Ensaio qualitativo dos extratos proteicos por Western blot.....	54
4.7	Ensaio <i>in vitro</i> de ligação a respectiva sequência de DNA.....	56
4.8	Análise estatística.....	59
5.	Resultados.....	60
5.1	Resultados da padronização da expressão proteica.....	60
5.1.1	Verificação do padrão de bandas dos extratos proteicos das linhagens comerciais de <i>E. coli</i> contendo os diferentes genes sintéticos e sua avaliação da expressão proteica por <i>western blot</i>	60
5.2	Avaliação dos extratos proteicos das linhagens comerciais C3013H e C3016H contendo as quatro diferentes construções sintéticas de OCT4.....	71
5.3	Confirmação da ligação do extrato proteico a respectivas sequências de DNA.....	77
6.	Discussão.....	80
7.	Conclusão.....	87
8.	Perspectivas.....	88
9.	Anexos.....	90
9.1	Mapas vetoriais das construções dos plasmídeos contendo dos fatores transcricionais fusionados a TP10.....	90
10.	Referências Bibliográficas.....	100

Lista de abreviaturas

CPP: do inglês *cell penetrating peptides*

CT: célula-tronco

CTA: célula-tronco adulta

CTE: célula-tronco embrionária

CTM: célula-tronco mesenquimal

iPSC: do inglês *induced pluripotent stem cell*

IPTG: isopropyl- β -D-1-tiogalactopiranosídeo

LB: meio de cultura Luria Bertani

LBA: meio de cultura Luria Bertani suplementado com ampicilina

PTF: do inglês *pluripotency-inducing transcription factors*

SCTN: do inglês *somatic cell nuclear transfer*

TBS: do inglês *Tris Buffered Saline*

TP: transportana

TP10: transportana 10

TTBS: do inglês *Tris Buffered Saline* com Tween 20

Lista de Figuras

Figura 1. Linha do tempo indicando as pesquisas mais importantes realizadas com células-tronco.....	24
Figura 2. Características das células-tronco embrionárias e o seu potencial para a formação de diferentes células e tecidos de um organismo.....	25
Figura 3. Protocolo experimental usado para a transferência nuclear somática.....	27
Figura 4. Desenho experimental para obtenção de células-tronco pluripotentes induzidas (iPSCs) a partir de fibroblastos retirados de um doador humano.....	28
Figura 5. Características das células-tronco mesenquimais (CTMs).....	32
Figura 6. Diferentes procedimentos atualmente empregados para a geração de células-tronco pluripotentes induzidas (iPSCs).....	36
Figura 7. Gene sintético codificante para a proteína TP10-OCT4.....	47

Figura 8. Desenho experimental da padronização para otimização dos parâmetros a fim de obter melhor expressão da proteína OCT4 <i>in vivo</i>	52
Figura 9. Desenho experimental da metodologia do Kit <i>NoShift Transcription Factor Assay</i>	58
Figura 10. Avaliação do extrato bruto de proteínas heterólogas, após a indução das linhagens de <i>E. coli</i> C3013H e C3016H contendo os plasmídeos O e CTO testados com os seguintes parâmetros de indução: temperatura 37 °C, 0,4 mM de IPTG por um período de 3 h.....	61
Figura 11. Avaliação do extrato bruto de proteínas heterólogas, após a indução das linhagens de <i>E. coli</i> C3013H e C3016H testando os seguintes parâmetros de indução: temperatura 37 °C, 0,4 mM de IPTG e por um período de 5 h.....	63
Figura 12. Avaliação do extrato bruto de proteínas heterólogas, após a indução das linhagens de <i>E. coli</i> C3013H e C3016H testados com os parâmetros de indução: temperatura 25 °C, 0,4 mM de IPTG por um período de 3 h.....	65
Figura 13. Avaliação do extrato bruto de proteínas heterólogas, após a indução das linhagens de <i>E. coli</i> C3013H e C3016H testando os seguintes parâmetros de	

indução: temperatura 25 °C, 0,4 mM de IPTG por um período de 18 h.....67

Figura 14. Avaliação em gel de SDS-PAGE 15 %, dos padrões de bandas obtidas após a extração da proteína OCT4 das linhagens C3013H e C3016H contendo os plasmídeos O e TON testados com os parâmetros de indução: temperatura 25 °C, 0,4 mM de IPTG por um período de 5 h.....69

Figura 15. Análise qualitativa da expressão da proteína OCT4 nas linhagens comerciais de *E. coli* contendo o plasmídeo O, visualizado pela presença de marcação de anticorpo anti-Oct3/4 com a banda em 38 kDa.....72

Figura 16. Análise da expressão qualitativa da proteína OCT4 obtida pela ligação do anticorpo anti-Oct3/4 utilizado para o reconhecimento da respectiva proteína através da avaliação dos extratos proteicos das Linhagens C3013H e C3016H, que possui a capacidade de expressão da proteína OCT-4 obtida a partir do plasmídeo TON, mostrado pela marcação da banda na massa de 38 kDa.....73

Figura 17. Análise da expressão qualitativa da proteína OCT-4, mostrado pela banda na massa de 38 kDa.....74

Figura18. Análise da expressão qualitativa da proteína OCT-4, mostrado pela banda na massa de 38 kDa. A amostra apresentada é referente a expressão de OCT-4 na linhagem C3016H contendo o plasmídeo N_TO.....76

Figura 19. Avaliação da ligação dos extratos proteico contendo a proteína OCT-4 com sua respectiva sequência de alvo de DNA.....78

Lista de Tabelas

Tabela 1. Classificação e características dos diferentes peptídeos transdutores.....40

Tabela 2. Descrição dos plasmídeos contendo os fatores TP10-PTFs.....46

Tabela 3. Características das linhagens comerciais utilizadas no trabalho.....48

Resumo

As células-tronco pluripotentes induzidas (iPSCs) são as células reprogramadas com fatores de transcrição, como Oct-4, Sox-2, Klf-4 e c-MYC (OSKM). As iPSCs são geralmente obtidas pela expressão ectópica de vetores retrovirais e lentivirais contendo os fatores transcripcionais OSKM. No entanto, a utilização de sistemas de expressão virais pode levar a mutagênese de inserção e geração de células tumorais. Assim, é preferível que a reprogramação celular ocorra temporariamente por meio de fatores OSKM fusionados com sequências de peptídeos para a transdução de proteínas. Neste sentido, os genes sintéticos codificadores de transdução de péptidos fusionados ao N ou C-terminal de OSKM pode ser obtido por ferramentas da bioinformática específicos e sintetizados utilizando técnicas químicas avançadas. Esses genes sintéticos podem ser aplicados para a síntese de proteínas utilizando tanto técnicas *in vivo* quanto *in vitro*. Assim, o objetivo deste trabalho foi gerar fatores OSKM fusionados a transportana (TP10) usando genes sintéticos e sistema de transcrição e de tradução *in vivo*. Além disso, três genes sintéticos adicionais também foram obtidos para expressão de Oct-4 contendo TP10 fusionado na região N-terminal (N-OCT4-TP10), C-terminal (C-OCT4-TP10), e sem TP10 (Oct-4). A expressão ectópica dos três genes sintéticos para Oct-4 foram testadas *in vivo* em duas diferentes linhagens comerciais de *E. coli* que expressam a enzima de T7 RNA polimerase. Os dados de *Western blot* indicaram que todos os genes sintéticos de Oct-4 foram capazes de produzir proteínas recombinantes. No entanto, a expressão mais elevada foi obtida com a construção N-OCT4-TP10. Além disso, as proteínas do fator de transcrição Oct-4 obtidas foram avaliadas quanto a sua capacidade de ligação a sua respectiva seqüência-alvo de DNA sendo avaliada por meio dos extratos brutos das proteínas de *E. coli* contendo ou não Oct-4 proteínas

ectópica. Os dados do ensaio de ligação demonstraram que todas as sequências de Oct-4 foram capazes de se ligar às suas sequências de reconhecimento. Em conclusão, as proteínas Oct-4 funcionais fusionadas com o peptídeo o transdutor pode ser obtido a partir de genes sintéticos, permitindo potencialmente elaborar protocolos de reprogramação virais livres.

Abstract

Induced pluripotent stem cells (iPSCs) are reprogrammed cells with a transcription factors such as Oct-4, Sox-2, Klf-4, and c-MYC (OSKM). iPSCs are generally obtained by ectopic expression of retroviral and lentiviral vectors containing tOSKM. However, the use of viral expression systems can lead to insertional mutagenesis and generation of tumor cells. Thus, it is preferable to temporarily reprogram cell by means of OSKM factors fused to peptides sequences for protein transduction. In this sense, synthetic genes coding to transduction peptides fused to the N- or C-termini of OSKM can be designed by specific bioinformatics tools and synthesized using advanced chemical techniques. Those synthetic genes can be applied for protein synthesis using both *in vivo* and *in vitro* techniques. Thus, the objective of this work was to generate OSKM factors fused to transportan (TP10) using synthetic genes and *in vivo* transcription and translation systems. Moreover, three additional synthetic genes also were obtained for Oct-4 expression containing TP10 fused to: (i) N-terminus (N-OCT4-TP10), e, (ii) C-terminus (C-OCT4-TP10), and (iii) without TP10 (Oct-4). Ectopic expression of the three synthetic genes for Oct-4 was tested *in vivo* in two different commercial strains of *E. coli* expressing the enzyme T7 RNA polymerase. Western blot data indicated that the all Oct-4 synthetic genes were able to produce the recombinant protein. However, highest expression was obtained with the construction N-OCT4-TP10. Furthermore, the binding capacity of Oct-4 fusion proteins in these respective target DNA sequences was assessed by the evaluation of *E. coli* protein extracts containing or not ectopic Oct-4 fusion proteins. Data from binding assay demonstrated that all Oct-4 sequences are able to bind to its recognition sequences. In conclusion, functional Oct-4 proteins fused to transducer peptides can be obtained from synthetic genes, allowing to potentially design viral-free reprogramming protocols.

1 Introdução

1.1. Visão histórica das células-tronco e a sua caracterização

As primeiras evidências da existência de células-tronco (CTs) foram obtidas a mais de 130 anos durante as pesquisas de Julius Cohnheim (Cohnheim, 1867 apud (Prockop, 1997). Em seu trabalho, Cohnheim levantou a hipótese de que a medula óssea poderia ser uma fonte de células progenitoras (Figura 1), com a capacidade de repovoar uma medula irradiada com radiação ionizante (Cohnheim, 1867 apud (Parekkadan and Milwid, 2010). Entretanto somente em 1961, Till e McCulloch conseguiram demonstrar a existência de células precursoras na medula óssea por meio de formação de nódulos no baço originados de colônias hematopoiéticas (Till e McCulloch, 1961 apud (Weissman, 2000). Estes nódulos continham células de eritroblastos e mieloblastos sugerindo a existência de uma única célula precursora. Essas células precursoras foram capazes de originar todas as células sanguíneas e células do sistema imunológico em modelo murino (Till e McCulloch, 1961 apud (Weissman, 2000). A partir de então, foi proposta a existência das CT hematopoiéticas (Figura 1) (Ford, 1856, Nowel, 1965 apud (Weissman, 2000). A confirmação posterior da existência de CT hematopoiéticas veio com o trabalho pioneiro de Friedensten e colaboradores, em 1980 (Figura 1) (Phinney, 2002). Para tanto, um aspirado de medula óssea foi colocado em contato com uma placa de cultura de plástico onde, após alguns dias de cultivo, a população de células que permaneceram aderidas tornou-se mais homogênea, com a manutenção do formato fibroblastóide (Chamberlain et al., 2007). Por suas características fenotípicas e pela sua capacidade de se diferenciar em células derivadas do tecido mesenquimal,

estas células foram denominadas de células-tronco mesenquimais (CTMs) (Caplan, 1994 apud (Phinney and Prockop, 2007)).

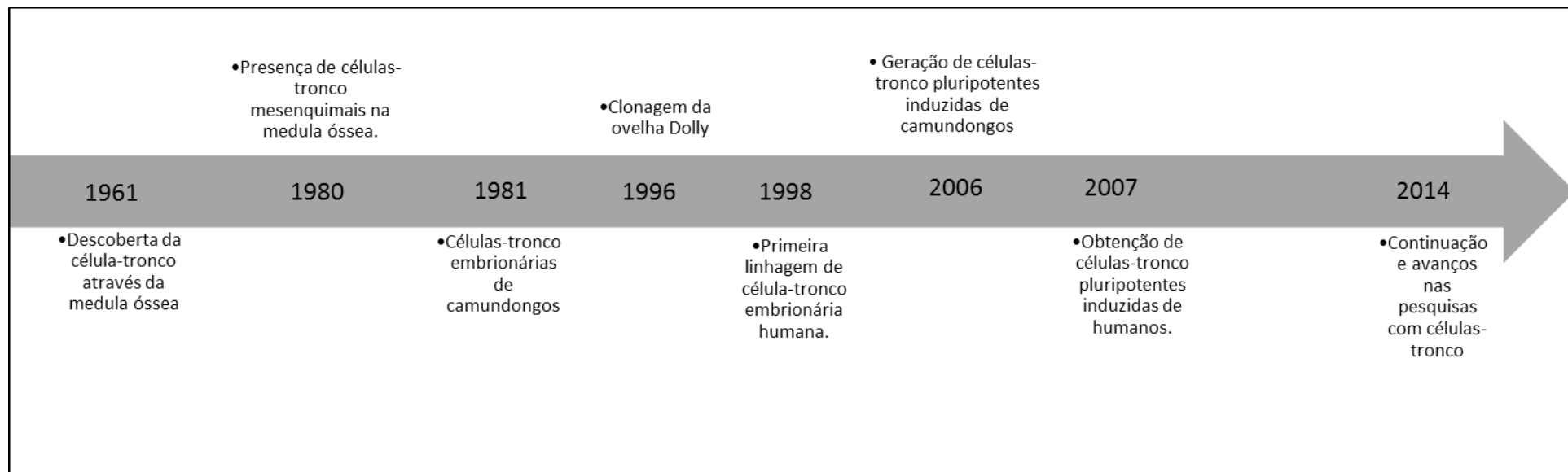


Figura 1. Linha do tempo indicando as pesquisas mais importantes realizadas com células-tronco.

Na mesma época do trabalho desenvolvido por Friedensten, os grupos de Martin e de Evans e Kaufman descreveram a presença das células-tronco embrionárias (CTEs) de camundongos (Evans e Kaufan, 1981; Martin, 1981 apud (Rippon and Bishop, 2004), obtidas inicialmente a partir do isolamento das células da massa interna do blastocisto de camundongos em desenvolvimento (Figura 2) (Evans e Kaufan, 1981; Martin, 1981 apud (Rippon and Bishop, 2004). Desde então, os trabalhos com as CTEs murinas tem demonstrado que estas células indiferenciadas podem ser propagadas indefinidamente (Rippon and Bishop, 2004), além de possuírem a capacidade de se diferenciar em todas as células e tecidos do organismo (Rippon and Bishop, 2004).

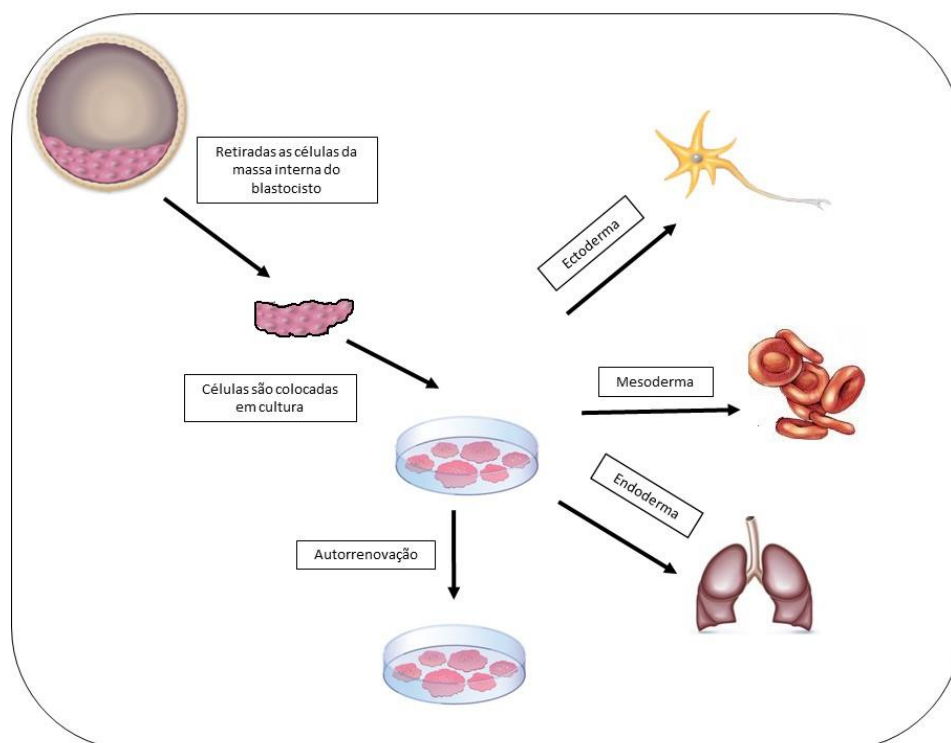


Figura 2. Características das células-tronco embrionárias e o seu potencial para a formação de diferentes células e tecidos de um organismo. A cultura da massa interna de um blastocisto é estabelecida *in vitro*, seguido de sua diferenciação para células dos três folhetos embrionários (ectoderma, mesoderma e endoderma).

Após a descoberta e o isolamento das CTEs murinas vários grupos tentaram caracterizar as CTEs humanas. Em 1998, o pesquisador James Thomson isolou e caracterizou a primeira linhagem de CTEs humanas (Figura 1) (Rippon and Bishop, 2004; Thomson et al., 1998). Uma vez que as CTEs murinas eram capazes de se diferenciar para os diferentes tipos celulares, a obtenção das CTEs humanas teve, como perspectiva inicial, a possibilidade de sua utilização em protocolos clínicos de medicina regenerativa e na engenharia de tecidos (Rippon and Bishop, 2004; Thomson et al., 1998). Contudo, a obtenção de linhagens de CTEs humanas gerou um grande debate ético nos diferentes meios de comunicação, com inúmeras objeções sendo levantadas quanto ao uso de embriões humanos em pesquisas científicas (RIPPON; BISHOP, 2004).

Um método alternativo para a obtenção de CTEs humanas seria por meio da transferência nuclear somática ou clonagem (Figura 3) (Rippon and Bishop, 2004). Nesta técnica não há necessidade de destruir um embrião produzido de forma “natural” e o procedimento se dá pela anucleação de um oócito, seguido pela sua fusão desta célula com um núcleo proveniente de uma célula somática (Campbell et al., 1996).

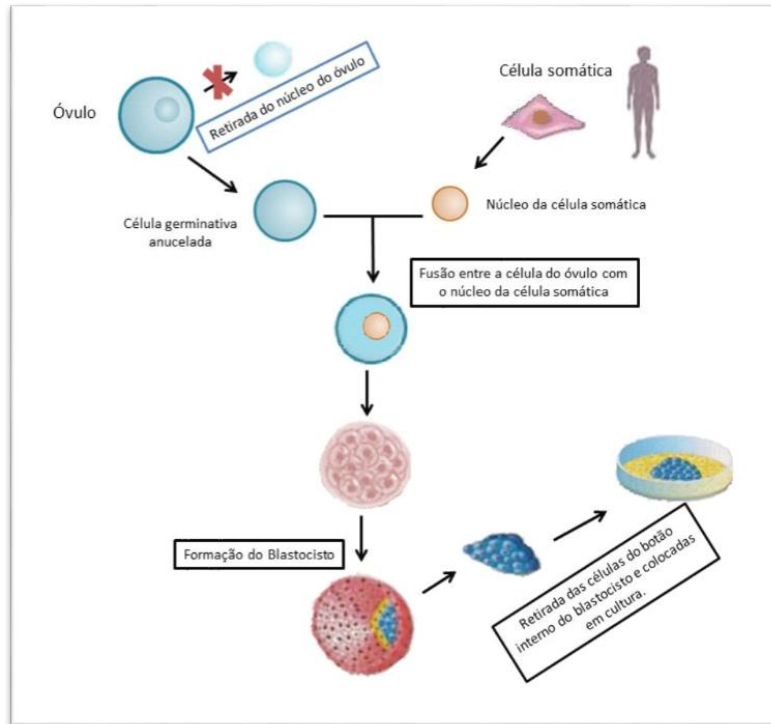


Figura 3. Protocolo experimental usado para a transferência nuclear somática. O núcleo de uma célula somática é isolado e fusionado com um oócito anucleado, originando um zigoto cujo desenvolvimento leva a formação de um blastocisto. A massa de células do botão interno do blastocisto pode ser, então isolada e propagada em cultura para estudos posteriores.

A clonagem da ovelha Dolly (Figura 1), em 1997 por Wilmut e colaboradores (Wilmut, 1997 apud (Yu and Thomson, 2008), demonstrou que a transferência nuclear somática é capaz de originar um organismo completo a partir de um núcleo somático ou mesmo originar CTEs em quantidades suficientes para protocolos de terapias regenerativas (Wilmut, 1997 apud (Yu and Thomson, 2008). Contudo, embora a obtenção de CTEs a partir de protocolos de transferência nuclear somática seja biologicamente possível para os metazoários, ainda há dificuldades práticas e éticas para a clonagem de células de primatas, restringindo esta técnica para alguns organismos específicos (Byrne et al., 2007; Yu and Thomson, 2008).

Em 2006, o grupo de pesquisa liderado por Yamanaka e colaboradores (Takahashi and Yamanaka, 2006) transformou fibroblastos de camundongos em células pluripotentes, com a capacidade de originar os três folhetos germinativos. Estas células ficaram, então, conhecidas como células-tronco pluripotentes induzidas (do inglês *induced pluripotent stem cell* – iPSCs) (Figura 1).

A reprogramação celular dos fibroblastos de camundongos para iPSCs foi realizada por meio da expressão ectópica de fatores transcricionais relacionados com a indução e a manutenção de pluripotência (Takahashi and Yamanaka, 2006; Yu et al., 2007) (Figura 4). Neste trabalho, foram identificados quatro fatores principais e suficientes para reprogramação e manutenção da pluripotência, os quais são o Oct-4, o Sox-2, o Klf-4 e o c-Myc, que, mais tarde, ficaram conhecidos com os “fatores de Yamanaka” (Takahashi and Yamanaka, 2006; Yu and Thomson, 2008).

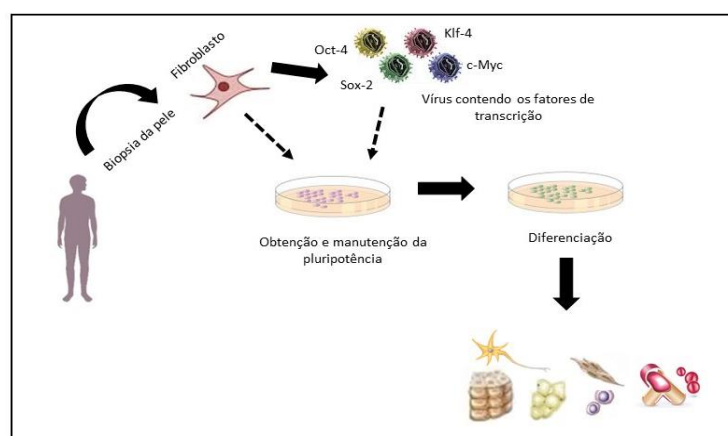


Figura 4. Desenho experimental para obtenção de células-tronco pluripotentes induzidas (iPSCs) a partir de fibroblastos retirados de um doador humano. Após o isolamento dos fibroblastos e a sua expansão *in vitro*, sistemas virais portando os genes codificantes para os fatores transcricionais de reprogramação são transfectados na cultura celular e, desta forma, desdiferenciando as células para iPSCs. As iPSCs podem ser mantidas em culturas ou serem induzidas para diferenciação, formando diferentes tipos celulares.

Em continuidade a estes experimentos, no ano de 2007, o grupo de Yamanaka e colaboradores demonstrou que era possível reprogramar fibroblastos da derme de humanos para iPSCs (Figura 1) (Takahashi et al., 2007) usando os mesmos fatores transcricionais do estado de pluripotência descritos anteriormente (Takahashi et al., 2007). Também em 2007, Thomson e colaboradores reprogramaram células somáticas humanas gerando iPSCs usando, além de Oct-4 e Sox-2, os fatores transcricionais Nanog e Lin28 sendo estes fatores então denominados de “fatores de Thomson” (Yu et al., 2007).

1.2 Importância clínica das células-tronco

Com base no que fora descoberto por meio da realização dos experimentos anteriormente citados, as CTs contribuem para reposição celular de tecidos que sofreram danos devido a lesões ou devido à perda de células pelo processo de senescência (Ren et al., 2012).

Nesse sentido, as CT possuem um número amplo de aplicações, incluindo não somente a medicina regenerativa, mas também a imunoterapia e a terapia genética (Brignier and Gewirtz, 2010; Li and Fu, 2012). Sendo assim, considerando o aumento da expectativa de vida da população humana e, conseqüentemente, a prevalência de doenças associadas com o envelhecimento, a utilização de terapias celulares é uma potencial alternativa para regeneração tecidual (Nelson et al., 2009; Parekkadan and Milwid, 2010).

Os estudos com diferentes modelos animais e utilização de ensaios clínicos em humanos, demonstraram que, o transplante de CT pode tratar, com sucesso, várias patologias agudas e crônicas (Ren et al., 2012; Wegmeyer et al., 2013). É

importante ressaltar que a maioria das pesquisas pré-clínicas inicialmente feitas com CT para finalidades terapêuticas foram baseadas em CTEs (Nelson et al., 2009). Nesse sentido, as patologias comumente selecionadas para essas pesquisas incluem as desordens neurológicas, tais como a doença de Parkinson e da lesão medular (Goldman, 2005), as doenças endócrinas (Kroon et al., 2008; Volarevic et al., 2011) e as doenças cardiovasculares (Passier et al., 2008; Segers and Lee, 2008). Além da substituição estrutural do tecido doente, as CTEs fornecem um suporte trófico para as células hospedeiras e restauram as interações celulares danificadas pelo quadro patológico (Fraidenraich and Benezra, 2006).

Apesar do elevado potencial terapêutico das CTEs, inúmeras barreiras éticas precisam ser superadas (Jiang et al., 2002; Rippon and Bishop, 2004). Outra questão importante que atrapalha o emprego clínico das CTEs é a sua capacidade aumentada em formar teratomas, normalmente observados após o transplante de CTEs (Nelson et al., 2009).

Assim, como alternativa ao uso das CTEs encontra-se as células-tronco adultas (CTAs). Essas células são derivadas de tecidos diferenciados, tal como a medula óssea e o tecido adiposo, sendo classificadas como multipotentes devido seu menor potencial de originar células de outras linhagens (Brignier and Gewirtz, 2010).

Os inúmeros trabalhos utilizando as CTAs levaram a descoberta das células-tronco mesenquimais (CTMs) (Figura 5). No sentido terapêutico, as CTMs têm um potencial de tratamento diferenciado quando comparado com as CTEs, pois são células que podem ser facilmente isoladas e cultivadas *in vitro* a partir de doadores adultos (Chamberlain et al., 2007; Keating, 2012). Diferentemente das CTEs, as CTMs apresentam a capacidade de modular o sistema imunológico devido a

secreções de uma variedade de citocinas pró e anti-inflamatórias e fatores de crescimento (Jacobs et al., 2013; Shi et al., 2010). Sendo assim proporcionando a modulação da resposta inflamatória, neovascularização e reparo tecidual (Rasmusson, 2006; Shi et al., 2012). Além disso, as CTMs humanas não expressam o antígeno leucocitário humano (HLA) de classe II (HLA-II) e as moléculas co-estimulatórias e possuem expressão reduzida do complexo de histocompatibilidade tipo I (MHC I) (Chamberlain et al., 2007). Tal perfil imune é considerado como não imunogênico e um transplante destas células pode não requerer a administração de drogas imunossupressoras (Chamberlain et al., 2007; Nelson et al., 2009). Adicionalmente, a administração intravenosa das CTMs tem mostrado um efeito parácrino benéfico entre as CTMs administradas e as células hospedeiras, resultando na promoção de um efeito trófico promovido pelas CTMs após o seu enxerto em vários tecidos (Chamberlain et al., 2007; Parekkadan and Milwid, 2010).

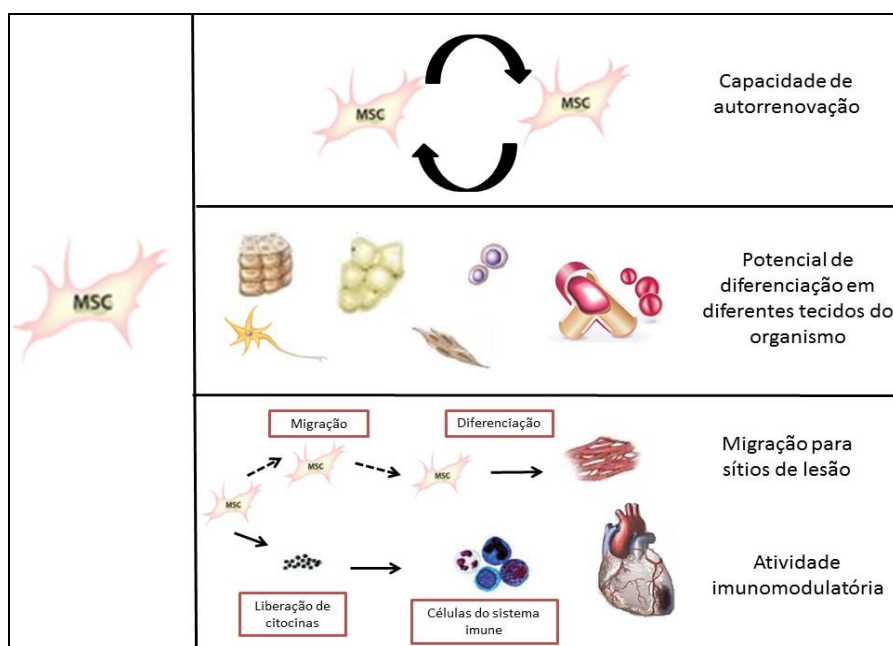


Figura 5. Características das células-tronco mesenquimais (CTMs). As CTMs possuem a capacidade de autorrenovação, sendo mantidas em culturas *in vitro* por

um longo período de tempo. Além disso, as CTMs podem ser induzidas à diferenciação, formando inúmeros tipos celulares, tanto *in vitro* quanto *in vivo*.

Apesar do potencial clínico das CTMs, estas células estão normalmente comprometidas com a formação de um tipo celular específico, especialmente relacionado com o tecido da qual a mesma foi isolada (Nelson et al., 2009).

Assim, uma forma para contornar a limitação biológica das CTMs para a formação de diferentes tecidos, bem como as limitações éticas existentes em relação as CTEs, as iPSCs surgem como uma alternativa única, com amplo potencial clínico para a regeneração tecidual, além de eliminar as barreiras éticas, visto que as iPSCs são geradas a partir das próprias células somáticas do doador (Inoue et al., 2014; Ren et al., 2012).

1.3 Células-tronco pluripotentes induzidas

A geração de iPSCs se dá, convencionalmente, por meio da expressão ectópica dos fatores de Yamanaka e Thomson (Takahashi and Yamanaka, 2006; Yu et al., 2007). No protocolo convencional para a geração de iPSCs, os genes codificantes para os fatores de Yamanaka ou de Thomson são clonados em sistemas de expressão viral, tanto retrovirais quanto lentivirais, normalmente sob o controle de promotores fortes e constitutivos (Takahashi and Yamanaka, 2006; Yu et al., 2007). Uma vez gerados e empacotados *in vitro*, esses sistemas virais são transduzidos em células de fibroblastos com a finalidade de originar iPSCs (Gonzalez et al., 2011; Takahashi et al., 2007; Takahashi and Yamanaka, 2006).

A reprogramação celular por sistemas virais foi considerada adequada somente para estudos *in vitro* das iPSCs, sendo o protocolo de reprogramação mais eficiente até o momento (Hirschi et al., 2013). No entanto, a integração destes

sistemas virais no genoma da célula hospedeira, para a geração de iPSCs, pode resultar em mutagênese insercional no genoma da célula hospedeira e, conseqüentemente, aumentando as chances de geração de tumores (Gonzalez et al., 2011; Hirschi et al., 2013; Takahashi and Yamanaka, 2006; Yu et al., 2007). A fim de amenizar os efeitos secundários indesejados resultantes da integração viral outros métodos de reprogramação foram sugeridos com o intuito de minimizar ou evitar a mutagênese insercional, por meio de metodologias que não utilizam sistemas virais (Nemes et al., 2014).

Dentre as metodologias alternativas para obtenção de iPSC estão: i) o uso do sistema de não integração de adenovírus (Stadtfeld et al., 2008) o qual baseia-se no uso de uma adenovírus com falha na sua replicação, sendo clonado os fatores OSKM com os fatores individuais em pHIHG-Ad2 originando iPSCs sem o transgene após a infecção de hepatócitos murinos com partículas adenovirais (Stadtfeld et al., 2008); ii) a utilização de mRNA sintéticos os quais codificam os fatores de transcrição (Okita et al., 2010); iii) o sistema piggyBac transposons (Woltjen et al., 2009) o qual inclui o piggyBac (PB) transposase que intermedia a transferência do gene e um transposon contendo a sequência de interesse flanqueada por repetidos 5' e 3' terminal requeridas para transposição, o sistema é composto por um plasmídeo doador contendo o transposon co-transfectado com um plasmídeo auxiliar expressando a transposase (Fraser et al., 1996); e iv) os vetores episomais (Yu et al., 2009), cuja transfecção de um único plasmídeo expressando OSKM, resulta na geração de iPSCs sem sinal de integração do plasmídeo nas células assim utilizadas (Gonzalez et al., 2009). Embora estes métodos reduzam a integração no genoma ainda assim é preferível que a reprogramação ocorra de forma temporária e que, uma vez geradas as iPSCs, as mesmas possam ser

direcionadas para gerações de diversos tipos celulares de forma segura e com baixa tumorigênese (Gonzalez et al., 2011; Pan et al., 2010). Sendo assim, diferentes metodologias têm estabelecido novas estratégias para a obtenção de iPSCs que sejam clinicamente mais seguras e confiáveis (Chen et al., 2014; Gonzalez et al., 2011).

Atualmente, a principal desvantagem dos métodos alternativos aos sistemas virais é sua baixa eficiência de reprogramação celular (Chen et al., 2014; Gonzalez et al., 2011). Por exemplo, a instabilidade de alguns sistemas não integrativos, como a transformação de mRNAs e de plasmídeos, assim como a utilização de vetores episomais, todos codificantes para os fatores de Yamanaka ou Thomson, torna a geração de iPSCs pouco eficiente e tecnicamente ineficiente para o desenho de protocolos de medicina regenerativa (Kim et al., 2009a; Nemes et al., 2014; Okita and Yamanaka, 2011).

Considerando os diferentes métodos existentes de reprogramação não viral (Figura 6), o uso de fatores de Yamanka ou de Thomson fusionados a peptídeos de penetração celular (CPP) é uma alternativa interessante (Beerens et al., 2003; Gonzalez et al., 2011). Neste sentido, as proteínas podem ser entregues nas células *in vivo* e *in vitro* se forem acopladas aos peptídeos ou proteínas contendo um domínio de transdução de bicamada lipídica (Beerens et al., 2003). Assim, a reprogramação celular pode ser realizada de forma livre de ácidos nucleicos, evitando a ativação de mecanismos mutagênicos de manutenção e /ou integração de transgenes (Gonzalez et al., 2011; Nemes et al., 2014).

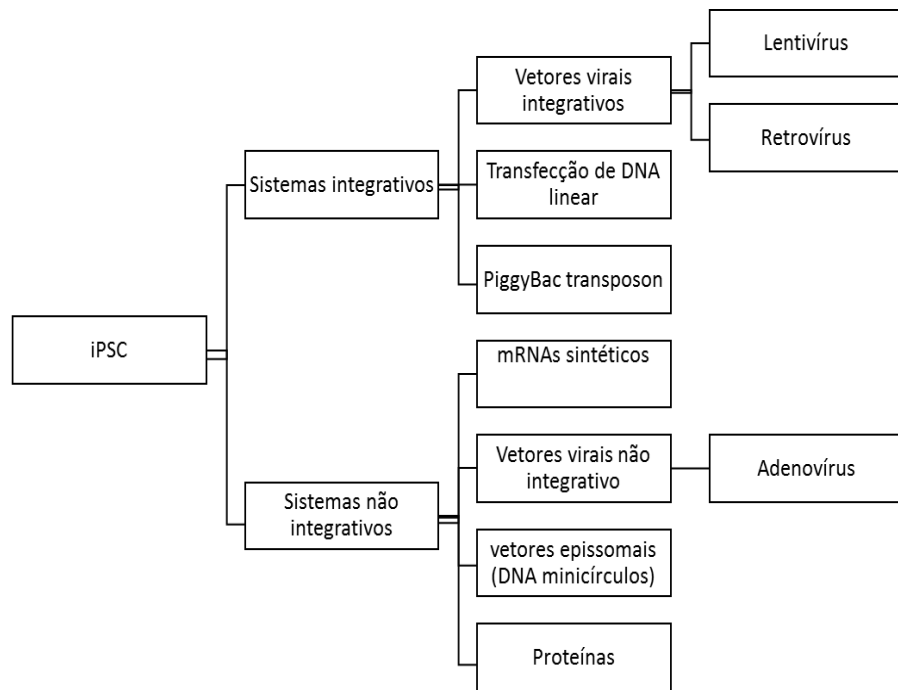


Figura 6. Diferentes procedimentos atualmente empregados para a geração de células-tronco pluripotentes induzidas (iPSCs). De uma forma geral, os procedimentos são divididos em sistemas integrativos e não integrativos. Os sistemas integrativos, os quais incluem lentivirus, retrovírus, moléculas de DNA lineares ou transposons, são capazes de se integrar no genoma do hospedeiro de forma inespecífica, resultando em mutagênese insercional. Os sistemas não integrativos incluem mRNAs sintéticos, adenovirus, vetores virais não integrativos ou epissomais, bem como proteínas geradas por protocolos de tradução *in vitro*. Apesar de mais seguros, os sistemas não integrativos são os menos eficientes para a geração de iPSCs.

1.4 Peptídeos transdutores de membranas ou peptídeos de penetração celular

A distribuição intracelular de moléculas terapêuticas é um dos principais problemas na internalização de droga para fins terapêuticos (Milletti, 2012; Torchilin, 2008). Muitos agentes farmacêuticos devem ser entregues intracelularmente para exercer a sua ação terapêutica no citoplasma ou em organelas específicas, tais como núcleo, lisossomos e mitocôndrias (Torchilin, 2008). No entanto, as membranas celulares evitam a internalização celular de proteínas, peptídeos e nanopartículas transportadoras de drogas, a menos que um mecanismo de transporte ativo esteja envolvido (Torchilin, 2008). No entanto, qualquer molécula ou partícula que entrar na célula através da via endocítica pode tornar-se aprisionada no endossomo e eventualmente chegam no lisossomo, onde os processos de degradação ativos ocorrem sob a ação de inúmeras enzimas lisossomais (Torchilin, 2008). Nesse sentido, inúmeras técnicas foram desenvolvidas para proporcionar a entrada de moléculas terapêuticas no ambiente intracelular. Contudo, a maioria destas técnicas de entrega intracelular são invasivas como, por exemplo, a eletroporação e a micronejeção (Torchilin, 2008). A encapsulação do lipossomo e a endocitose mediada por receptores são métodos mais suaves, mas também sofrem graves inconvenientes, estas técnicas têm sido usadas com eficiência bastante limitada (Lindgren et al., 2000; Torchilin, 2008).

O potencial terapêutico de algumas drogas à base de ácidos nucleicos, proteínas e peptídeos é frequentemente comprometido por sua limitada capacidade para atravessar a membrana plasmática de células de mamíferos, resultando em uma baixa eficácia terapêutica (Foerg and Merkle, 2008). Para contornar este

problema, a utilização de peptídeos carreadores de pequenas moléculas emerge como uma importante alternativa técnica e terapêutica (Lee et al., 2013; Milletti, 2012).

Considerando os diferentes peptídeos carreadores de pequenas moléculas existentes, os chamados “peptídeos de penetração” ou “peptídeos transdutores de membrana” (*cell penetrating peptides* ou CPPs) são capazes de atingir alvos intracelulares, possibilitando a entrega *in loco* da carga terapêutica, que podem ser: (i) peptídeos (Heitz et al., 2009), (ii) siRNAs (Eguchi and Dowdy, 2009), (iii) pequenas moléculas ou (iv) proteínas (Jarver et al., 2010). A internalização dos CPPs foi mostrada em diversos tipos celulares, incluindo osteoclastos e células mononucleares de sangue periférico que, geralmente, não são permissivas as transfecções virais (Kerkis et al., 2006).

Os CPPs possuem de 5 a 30 resíduos de aminoácidos, que formam estruturas lineares e hidrofóbicas (Foerg and Merkle, 2008; Milletti, 2012). Estas estruturas definem a capacidade de transdução dos CPPs onde, normalmente, a presença de 6 a 8 resíduos de arginina nestes peptídeos estimulam os mecanismos celulares de translocação (Kerkis et al., 2006). Nesse sentido, os mecanismos de translocação utilizados pelas CPPs são, a indução de endocitose e/ou penetração direta através da membrana celular (Islam et al., 2014; Lee et al., 2013).

Os CPPs podem ser classificados em diferentes grupos funcionais, a partir da função do peptídeo ou da proteína do qual os CPPs são derivados (Tabela 1) (Lindgren et al., 2000; Milletti, 2012).

Tabela 1. Classificação e características dos diferentes peptídeos transdutores.

Grupos	Classificação	Origem	Referência
Peptídeos de penetração celular derivados de proteínas	Penetrinas	Derivados de homeodomínios da Antenapedia	(Lindgren et al., 2000)
	Tat	Peptídeos derivados da proteína Tat do HIV	(Lindgren et al., 2000)
	Peptídeos baseados na sequência de sinal	Sequências de sinais ou translocações de membranas (MTSS)	(Lindgren et al., 2000)
Peptídeos de penetração celular sintéticos ou quiméricos	Transportana	Encontrado em proteínas ligantes receptoras de galaninas	(Lindgren et al., 2000)
	Modelo de peptídeos anfipáticos	Originado de polipeptídeos catiônicos e substância P	(Lindgren et al., 2000)

1.4.1 Transportanas

As transportanas (TPs) são peptídeos quiméricos da classe das galaninas contendo 27 resíduos de aminoácidos (Carter et al., 2013; Lindgren et al., 2000; Pooga et al., 1998). Os treze primeiros resíduos de aminoácidos das TPs são derivados da sequência amino-terminal da galanina, enquanto os últimos 14 resíduos são derivados do peptídeo mastoparana, uma toxina encontrada em vespas (Carter et al., 2013; Lindgren et al., 2000). Em altas concentrações, a mastoparana é citotóxica por induzir perturbações na membrana e lise celular (Pooga et al., 1998), a qual ocorre, principalmente, pela formação de poros na bicamada lipídica, pela inibição do transporte de vesículas de Golgi e pela abertura de poros de transição de permeabilidade na mitocôndria (Foerg and Merkle, 2008). Diferente das outras famílias de CPPs, as TPs não são inibidas pela baixa temperatura e são capazes de ativar fortemente GTPases de membrana citoplasmática (Pooga et al., 1998). Do mesmo modo, inibidores de endocitose, como óxido de fenilarsina ou soluções hipertônicas de sacarose não são capazes de inibir a internalização de TPs, sendo a concentração máxima intracelular atingida após 20 minutos de exposição das células (Pooga et al., 1998). Além disto, as TPs escapam mais eficientemente de estruturas vesiculares quando comparadas com outras CPPs, como penetrinas e Tat (Pooga et al., 1998).

Em concentrações não citotóxicas, as TPs são eficientes carreadores de conjugados de ácido nucléicos-peptídeos (PNAs), de peptídeos marcados com fluoróforos e também proteínas (Padari et al., 2005). Diversas TPs sintéticas já foram geradas *in vitro* com diferentes capacidades de transdução, dentre elas, destaca-se a TP10 cuja característica principal é a não ativação das GTPases de membrana citoplasmática e também por sua ampla capacidade de transduzir diferentes tipos

celulares de diferentes organismos, tais como fungos, plantas e células de metazoários (Lee et al., 2013; Padari et al., 2005).

2 Justificativa

O uso de sistemas virais e/ou retrovirais para a transdução dos fatores Yamanaka possui uma série de vantagens, como a eficiência e a estabilidade de expressão dos constructos. Entretanto, as desvantagens que este sistema apresenta impõe uma série de barreiras para o seu uso na geração segura de iPSCs. Tem sido mostrado que iPSCs transduzidas com sistemas virais/retrovirais possuem um potencial de transformação tumoral mais alto, inviabilizando o seu uso *in vivo*.

Sendo o objetivo principal das pesquisas com iPSCs que estas possam ser usadas em ensaio clínicos, essas células precisam ser aprovadas quanto a sua segurança nas aplicações e quanto sua eficiência. Conseqüentemente a geração de iPSCs que não integrem no genoma, evitando assim mutações insercionais seriam mais atraentes para aplicação em clínica. Desse modo o uso de fatores indutores de pluripotência acoplados a peptídeos transdutores de proteínas (CPPs) seriam uma alternativa mais segura para a reprogramação celular e geração de iPSCs.

Além disso a disponibilização de técnicas de síntese de genes completos (biologia sintética) e de sistemas de tradução procariótica e eucariótica *in vivo* e *in vitro* com componentes purificados, possibilita a obtenção destas proteínas em larga escala e com um grau de pureza adequado para experimentos de transdução celular.

3 Objetivos

3.1 Objetivo Geral

Estabelecer e padronizar diferentes protocolos para a geração de fatores de Yamanaka (Oct-4, Sox-2, Klf-4, c-Myc) fusionados a transportana 10 (TP10) para reprogramação celular não viral.

3.2 Objetivos específicos

a) Desenhar *in silico* genes sintéticos para a expressão heteróloga dos fatores de Yamanaka fusionados a transportana 10 (FY-TP10) em diferentes linhagens de *Escherichia coli*;

b) Padronizar as condições necessárias para a síntese otimizada de TP10-OCT4 *in vivo* em linhagens de *E. coli* expressando constitutivamente a enzima T7 RNA polimerase;

c) Avaliar a geração de TP10-OCT4 a partir de extratos celulares de *E. coli* por meio da técnica de *Western Blot* (WB) utilizando anticorpos específicos contra a proteína em estudo;

d) Avaliar a capacidade de ligação de TP10-OCT4 presentes em extratos proteicos de *E. coli* em suas respectivas-sequências alvo de DNA.

4 Procedimentos experimentais

4.1 Desenho e síntese de genes sintéticos para a expressão dos fatores de Yamanaka fusionados a transportana 10

Para o desenho dos genes sintéticos (TP10-PTFs), usados para a expressão dos fatores transcricionais indutores de pluripotência (*pluripotency-inducing transcription factors*; PTFs) que contem fusionados na região N- ou C-terminal a transportana 10 (TP10), foi utilizado o programa Gene Designer 2.0 (Villalobos et *al.*, 2006). Este programa encontra-se disponível gratuitamente na página <https://www.dna20.com/resources/genedesigner>. Para isso, todas as sequências FASTA referentes às estruturas primárias dos fatores de Yamanaka foram inicialmente obtidas do *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), tal como seguem: OCT-4 (GenBank número de acesso AAI17436.1), SOX-2 (GenBank número de acesso NP_003097.1), KLF-4 (número de acesso AAH30811.1) e c-MYC (GenBank número de acesso NP_002458.2). A sequência AGYLLGKINLKALAALAKKIL, a qual representa a estrutura primária da transportana 10, foi obtida de Yandek et *al.* (2007). Uma vez obtidas as sequências, as mesmas foram processadas no programa Gene Designer 2.0, inicialmente realizando a tradução reversa das sequências utilizando a função “*Back Translator*” e os códons preferenciais de *Escherichia coli*. A estas sequências foram adicionadas as sequências promotoras e terminadoras para a enzima T7 RNA polimerase, bem como a sequência otimizada para a ligação do ribossomo pRBS-SD1+8^a, ambas disponibilizadas no programa Gene Designer 2.0 (Tabela 2; Figura 7). As sequências assim geradas foram

sintetizadas pela empresa *GenScript Corporation* (Piscataway, USA) e clonadas em vetor pUC57.

Tabela 2. Descrição dos plasmídeos contendo os fatores TP10-PTFs.

Plasmídeos	Características	Abreviaturas utilizadas no trabalho
pTP10-hSOX-2*	Contém o quadro aberto de leitura do gene SOX2 humano fusionado com a sequência codificante para o peptídeo transportana 10 na região N-terminal.	TSN
pTP10-hOCT4*	Contém o quadro aberto de leitura do gene OCT4 humano fusionado com a sequência codificante para o peptídeo transportana 10 N-terminal.	TON
pTP10-hKLF4*	Contém o quadro aberto de leitura do gene KLF4 humano fusionado com a sequência codificante para o peptídeo transportana 10 N-terminal.	TKN
pTP10-hMYC*	Contém o quadro aberto de leitura do gene MYC humano fusionado com a sequência codificante para o peptídeo transportana 10 N-terminal	TMN
pTP10-_hOCT4**	Contém o quadro aberto de leitura do gene OCT4 humano fusionado com a sequência codificante para o peptídeo transportana 10 N-terminal e a sequência completa do promotor T7 RNA polimerase	N_TO
hOCT-4-pTP10*	Contém o quadro aberto de leitura do gene OCT4 humano fusionado com a sequência codificante para o peptídeo transportana 10 C-terminal.	CTO
OCT-4*	Contém somente a sequência codificante para OCT4	O

*constructos que contêm a sequência parcial do promotor T7 RNA polimerase

**constructo que contêm a sequência completa do promotor T7 RNA polimerase

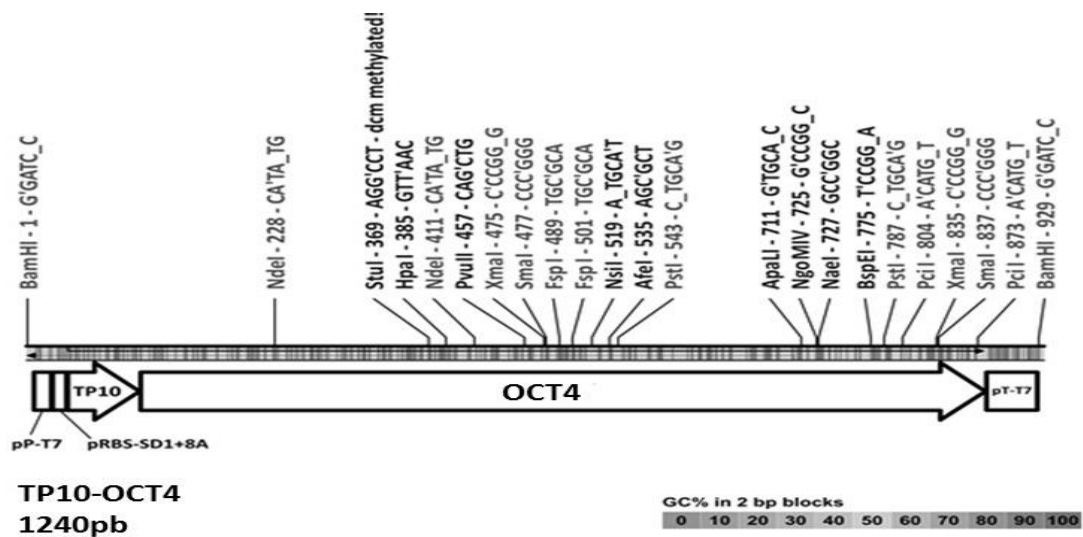


Figura 7. Gene sintético codificante para a proteína TP10-OCT4 contendo o quadro aberto de leitura para o fator transcricional OCT-4 fusionado com a sequência codificante para o peptídeo carreador TP10. O cassete de expressão *in vitro* contém a sequência promotora e terminadora do fago T7 mais a sequência otimizada para a ligação do ribossomo (pRBS-SD1+8A). Todas as construções do tipo TP10-PTFs possuem os seus códons otimizados para tradução em *E. coli*.

4.2 Linhagens de *E. coli* usadas neste trabalho

Para manipulação e amplificação *in vivo* dos plasmídeos contendo os genes sintéticos para a expressão dos fatores de Yamanaka fusionados a TP10 (FY-TP10) foram utilizadas as linhagens de *E. coli* DH5 α (BioLabs; Ipswich, MA) (Tabela 3) e XL1-Blue (Stratagene; San Diego, Califórnia) (Tabela 3). Os diferentes plasmídeos contendo os genes sintéticos para expressão da proteína OCT-4 foram transformados em linhagens diferentes de bactérias *E. coli*, sendo elas duas linhagens comerciais C3013H e C3016H (Tabela 3) adquiridas da empresa BioLabs (Ipswich, MA). Com o objetivo de confirmar qual das diferentes linhagens de *E. coli*

eram capazes de transcrever e traduzir as diferentes construções sintéticas *in vivo* e com isso verificar qual dos constructos de TP10-OCT4 eram mais eficazes para obtenção da proteína.

Tabela 3. Características das linhagens comerciais utilizadas no trabalho.

Linhagem	Genótipo	Fonte
DH5α	<i>fhuA2</i> $\Delta(\text{argF-lacZ})$ U169 <i>phoA</i> <i>glnV44</i> Φ 80 $\Delta(\text{lacZ})$ M15 <i>gyrA96</i> <i>recA1</i> <i>relA1</i> <i>endA1</i> <i>thi-1</i> <i>hsdR17</i>	BioLabs (Ipswich, MA)
XL1-Blue	<i>fhuA2</i> $\Delta(\text{argF-lacZ})$ U169 <i>phoA</i> <i>glnV44</i> Φ 80 $\Delta(\text{lacZ})$ M15 <i>gyrA96</i> <i>recA1</i> <i>relA1</i> <i>endA1</i> <i>thi-1</i> <i>hsdR17</i>	Stratagene (San Diego, Califórnia)
C3013H	MiniF <i>lysY</i> <i>lacI^q</i> (Cam ^R) / <i>fhuA2</i> <i>lacZ::T7gene1</i> [lon] <i>ompT</i> <i>gla</i> <i>suA11</i> <i>R(mcr-73::miniTn10—Tet^S)2</i> [dcm] <i>R(zgb-210::Tn10—Tet^S)</i> <i>endA1</i> $\Delta(\text{mcrC-mrr})$ 114::IS10	BioLabs (Ipswich, MA)
C3016H	MiniF <i>lacI^q</i> (Cam ^R) / <i>fhuA2</i> <i>lacZ::T7gene1</i> [lon] <i>ompT</i> <i>gla</i> <i>suA11</i> <i>R(mcr-73::miniTn10—Tet^S)2</i> [dcm] <i>R(zgb-210::Tn10—Tet^S)</i> <i>endA1</i> $\Delta(\text{mcrC-mrr})$ 114::IS10	BioLabs (Ipswich, MA)

4.2.1 Indução de competência nas linhagens DH5 α e XL1-Blue de *Escherichia coli*

As duas linhagens utilizadas, DH5 α e XL1-Blue, foram tornadas competentes através do método de CaCl₂ (cloreto de cálcio) segundo o protocolo de Ausubel *et al.* (2006). Para isso, foram realizadas pré-culturas de *E. coli* inoculando uma única colônia de cada linhagem utilizada em 12,5 mL de meio Luria Bertani (LB), composto de 10 g/L de triptona, 5 g/L de extrato de levedura e 10 g/L de NaCl. Para o cultivo destas pré-culturas, estas foram incubadas de 12 a 18 h a 37° C sob agitação de 200 rpm. Após este período, 4 mL destas pré-culturas foram retirados e novamente inoculados em 400 mL de meio LB para a realização das culturas das linhagens de *E. coli*. Para o cultivo das células, estas foram então incubadas a 37° C sob agitação de 200 rpm, em densidade óptica de 590 nm (OD₅₉₀) de 0,375. Após a cultura atingir a densidade óptica desejada, alíquotas destas culturas foram preparadas utilizando frascos de centrifuga de 250 mL, previamente esterilizados, e estas alíquotas foram, então, colocados no gelo por 5 a 10 min. Quando retiradas do gelo, as alíquotas da cultura foram imediatamente centrifugadas por 7 min a uma rotação de 4.000 rpm a 4° C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuscitado em 10 mL de solução gelada de CaCl₂, composta por 60 mM de CaCl₂ e 15% (v/v) de glicerol. Após suspenso o *pellet*, a cultura foi centrifugada por 5 min a 3.500 rpm a 4° C. O sobrenadante foi então descartado e o *pellet* foi novamente ressuscitado em 10 mL de solução de CaCl₂ gelada. Em seguida, a suspensão celular foi incubada no gelo por 30 min, seguida por nova centrifugação de 5 min a 3.500 rpm a 4° C. O sobrenadante foi então descartado e o *pellet* ressuscitado em 2 mL de solução gelada de CaCl₂, descrita anteriormente, com a adição de 5% (v/v) de DMSO. A partir da suspensão celular obtida, foram feitas

alíquotas de 100 µL da cultura em tubos de microcentrífuga de 1,5 mL, previamente esterilizados e gelados, e mantidas a -80° C em ultra freezer.

4.2.2 Transformação e seleção de bactérias recombinantes

Para a transformação das linhagens citadas anteriormente, com os vetores contendo os genes sintéticos para os FY-TP10, foi utilizado a técnica de choque térmico segundo o protocolo de Ausubel *et al.* (2006). Para tanto, as alíquotas das linhagens DH5α e XL1-Blue competentes, obtidas conforme descrito anteriormente, foram misturadas com 10 ng de DNA plasmidial, seguido de incubação no gelo por 10 min. Em seguida as alíquotas foram submetidas ao choque térmico sendo colocadas em banho-maria a 42° C por 2 min. Logo após, foi adicionado 1 mL de meio LB em cada uma das alíquotas e as mesmas foram incubadas por 1 h a 37° C sob agitação de 300 rpm. Após esta etapa cada alíquota foi semeada em uma placa de *Petri* contendo meio LBA (meio LB suplementado com ampicilina a uma concentração final de 100 µg/mL). Para o crescimento das colônias, contendo os vetores de interesse, as placas semeadas foram colocadas em estufa a 37° C de 12 h a 18 h.

As linhagens comerciais de *E. coli* C3013H e C3016H (Tabela 3) usadas para a expressão heteróloga das proteínas, foram transformadas pela técnica de choque térmico conforme o protocolo do próprio fabricante. Para tanto, foi adicionado de 1 a 5 µL de DNA plasmidial (contendo de 1 pg - 100 ng do mesmo) em alíquotas das linhagens C3013H e C3016H. A suspensão foi incubada no gelo por 30 min, seguido de indução de choque térmico a 42° C por 10 segundos e resfriamento em gelo por 5 min. Em seguida adicionou-se 950 µL de meio SOC contendo 2% tripitona, 0,5% de extrato de levedura, 10 mM de NaCl 2,5 mM de KCl, 10 mM de MgCl₂, 10 mM de

MgSO₄ e 20 mM de glicose. Esta suspensão celular foi incubada por 1 h a 37° C sob agitação de 300 rpm. A suspensão celular foi então plaqueada em placas de *Petri* contendo o meio de cultura LBA (contendo ampicilina a uma concentração final de 100 µg/mL) e mantidas de 12 h a 18 h a 37° C para obtenção das colônias recombinantes.

4.3 Estabelecimento das condições de cultivo para expressão dos genes sintéticos

Com o objetivo de otimizar a expressão dos genes codificantes para as proteínas FY-TP10, foram realizados diferentes ensaios com variação de temperatura, tempo e concentração de isopropil-β-D-1tiogalactopiranosídeo (IPTG) para as linhagens C3013H e C3016H transformadas conforme o protocolo descrito anteriormente.

Inicialmente, para alcançar este objetivo, pré-culturas das linhagens de *E. coli* foram obtidas em 5 mL de meio LBA e incubação por 12 h a 18 h a 37° C em agitação de 200 rpm. A partir das pré-culturas foram realizadas as culturas para a indução da expressão proteica. Para tanto, 1 mL da pré-cultura foi acrescida em 10 mL de meio LBA e a suspensão obtida foi incubada até atingir a OD₆₀₀ entre 0,8 - 1.

Depois de atingido a OD₆₀₀ das culturas, foram feitas alíquotas de 1 mL das mesmas que foram então denominadas como células não induzidas e o restante da cultura foi induzida com IPTG e submetida a padronização.

Conseqüentemente os parâmetros citados previamente foram testados a fim de obter melhor expressão e geração da proteína (Figura 8). Desse modo para cada um dos parâmetros testados, foram realizados experimentos independentes. Sendo assim foi testada a concentração final de IPTG nas seguintes concentrações: 0,1

mM, 0,4 mM ou 1 mM. Depois de acrescentado as respectivas concentrações de IPTG, as células foram incubadas a 37° C ou 25° C, por uma variação de tempo de 3 h, 5 h ou 18 h.

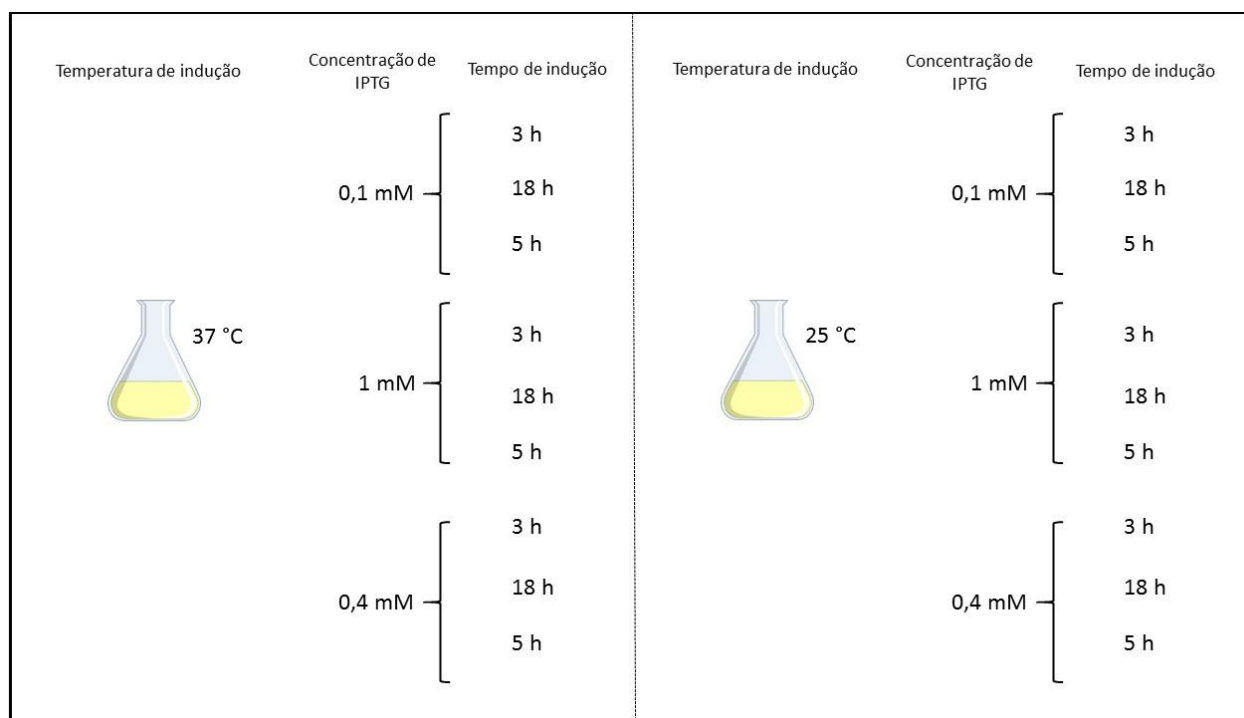


Figura 8. Desenho experimental da padronização e otimização dos parâmetros a fim de obter melhor expressão da proteína Oct-4 *in vivo*. Para cada linhagem, C3013H e C3016H, bem como para cada construção sintética de Oct-4 foi realizado os testes para a padronização. Primeiramente utilizando a temperatura para indução de 37° C, variando não só a concentração de IPTG como também o tempo que as mesmas foram induzidas, ou seja, concentração de IPTG 0,1 mM por 3 h, 5 h e 18 h. Concentração de IPTG 0,4 mM por 3 h, 5 h e 18 h e concentração de IPTG 1 mM por 3 h, 5 h e 18 h. Posteriormente foram testados os mesmos parâmetros, conforme descrito anteriormente, porém com a temperatura de indução de 25° C.

Para realização da padronização dos parâmetros de obtenção do extrato bruto de proteína heteróloga foi selecionado apenas um dos genes sintéticos FY-TP10, sendo este o OCT4-TP10. Ainda com o intuito de otimizar a obtenção do extrato proteico foram utilizados quatro diferentes plasmídeos contendo o gene do fator transcricional Oct-4 (Tabela 2).

4.4 Protocolo para extração de proteína heterólogas

Para fim da extração das proteínas a partir das linhagens de *E. coli* C3013H e C3016H, as alíquotas de 1 mL das células não induzidas foram, então, centrifugadas por 5 min a 5.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuscitado em 100 µL de PBS (1,4 mM de NaCl, 27 mM de KCl, 18 mM de KH₂PO₄ e 100 mM de Na₂HPO₄) e armazenadas a -20° C para posterior avaliação. Já as células induzidas com IPTG, transcorridas as 5 h de indução, foram centrifugadas 5 min a 5.000 rpm a 4° C. O sobrenadante foi então descartado e o *pellet* foi congelado a -20° C para sua posterior avaliação em gel de poliacrilamida 15% em presença de SDS (SDS-PAGE 15%).

4.5 Avaliação dos extratos proteicos em gel de poliacrilamida

A avaliação dos extratos proteicos obtidos a partir das linhagens de *E. coli* não-induzidas (NI), induzidas (I, fração onde encontram-se as proteínas solúveis) e o *pellet* (P, fração onde encontram-se as proteínas insolúveis) foi realizada em eletroforese vertical em gel de SDS-PAGE 15% / 6% (Peterson, 1983), porcentagem do gel de corrida (2,8 mL de Água ultrafiltrada, 3 mL de Acrilamida 40% (m/v), 2 mL de Tris-Base 1,5 M pH 8,8, 80 µL SDS 10% (m/v), 80 µL PSA 10% (m/v) e 8 µL TEMED) e gel de entrada (2,9 mL de Água ultrafiltrada, 750 µL de Acrilamida 40%

(m/v), 1,25 mL de Tris-Base 500 mM pH 6,8, 50 µL de SDS 10%(m/v), 50 µL de PSA 10% (m/v), 5 µL de TEMED), respectivamente.

Assim, os precipitados das células induzidas foram descongelados e ressuspensos em 600 µL de PBS. Em seguida, as amostras foram sonicadas em gelo com quatro pulsos de ultrassom de 30 s com amplitude máxima de 20 W e um intervalo entre os pulsos de 30 s. Logo após, as amostras foram centrifugadas por 5 min a 5.000 rpm, sendo o sobrenadante transferido para outro tubo de microcentrifuga, e o precipitado ressuspensado em 600 µL de PBS 1x.

As proteínas foram separadas por eletroforese em gel de SDS-PAGE 15%. As eletroforeses foram realizadas em tampão de corrida 1 x (Tris-Base 3 g/L, glicina 14,4 g/L, SDS 1 g/L e pH de 8,3), com voltagem inicial de 80 V por 30 min e, em seguida, 90 min a 150 V. As amostras não foram quantificadas sendo assim para aplicação no gel de SDS-PAGE foi utilizado cerca de 40 µL de cada extrato bruto de proteína adicionando 12 µL de tampão de amostra 4x (125 mM de Tris-HCl pH 6,8, glicerol 40% (v/v), 400 mM de β-mercaptoetanol, SDS 4% (m/v), azul de bromofenol 0,002% (v/v)). O volume total de amostras assim preparado foi dividido em duas partes para aplicação simultânea em dois géis de SDS-PAGE, sendo um deles denominado de gel espelho.

As estimativas da massa molecular das proteínas foram feitas por comparação com a migração do marcador de massa molecular (*Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder* -Thermo Scientific) que possui variação de massa entre 260 - 10 kDa e que foi aplicado no gel juntamente com as amostras.

Após a corrida eletroforética, um dos géis-espelho foi corado durante 12 h com uma solução de coomassie blue G (contendo 10% (v/v) de ácido acético glacial, 0,006% (m/v) de coomassie blue G e 90% (v/v) de água destilada) (Welinder and

Ekblad, 2011). Após a coloração, o gel foi descorado com uma solução de 10% (v/v) de ácido acético glacial até o surgimento das bandas referentes a migração das proteínas.

4.6 Ensaio qualitativo dos extratos proteicos por Western blot.

A identificação das proteínas obtidas dos diferentes constructos de TP10-OCT4 foi realizada com a técnica de *Western Blot* (WB). Para isso as proteínas que estavam presentes no gel não corado foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Hybond - ECL Amersham Biosciences) em um sistema semiúmido utilizando o equipamento *Trans-Blot Turbo Blotting System* (BioRad; Ipswich, MA) com a seguinte programação 25 V, 1,3 A e 15 min de transferência.

Para confirmar a eficiência da transferência, a membrana foi corada com uma solução de coomassie blue G (contendo 10% (v/v) de ácido acético glacial, 0,006% (m/v) de coomassie blue G e 90 % (v/v) de água destilada) por 5 min e, em seguida, descorada com uma solução de metanol 45% (v/v), ácido acético glacial 10% (v/v) e água destilada 45% (v/v). Logo após a membrana passou pelo processo de bloqueio de sítios inespecíficos, onde foi utilizado uma solução de leite desnatado a 5% (1g de leite em pó desnatado em 20 mL de tampão TTBS (contendo Tris-Base 2,42 g/L, NaCl 0,80 g/L pH 7,7 e 500 µL Tween 20). A membrana imersa na solução foi incubada por 1 h a temperatura ambiente. Após a incubação, a membrana foi lavada três vezes por 5 min com TTBS.

O anticorpo monoclonal anti-Oct3/4 ((C - 10) : sc 5279, Santa Cruz Biotechnology; Texas, USA) foi usado para a identificação de Oct-4 heteróloga. Para

tanto, a membrana foi incubada com o anticorpo de interesse por 12 a 18 h a 4° C, sendo o anticorpo diluído em TTBS na proporção de 1:800 (solução hibridizadora). Durante o tempo de incubação a solução de hibridização foi constantemente homogeneizada em um sistema como movimentos de gangorra. Em seguida, a membrana foi lavada com TTBS, sendo três lavagens de 5 min cada.

Para a detecção da formação dos complexos antígeno-anticorpo foi utilizado o anticorpo secundário conjugado com HRP (Cell Signaling Technology; Danvers, MA) diluído em TTBS na proporção de 1:2000. Esta diluição era então adicionada a membrana e incubada por 2 h em temperatura ambiente sendo homogeneizada constantemente em um homogeneizador com movimentos de gangorra. Logo após a membrana foi lavada duas vezes com TBS (Tris-Base 2,42 g/L, NaCl 0,80 g/L pH 7,7). Por fim, a membrana foi submetida ao processo de revelação através do uso de ECL para detecção (Bio-Rad; Hercules, CA) e a quimiluminescência detectada em filme fotográfico (Kodak; New York, USA) e soluções de revelação e fixação (Kodak; New York, USA) para o filme.

4.7 Ensaio *in vitro* de ligação a respectiva sequência de DNA

Para avaliar os extratos proteicos brutos obtidos das culturas de *E. coli* induzidas, contendo os diferentes constructos capazes de expressar a proteína Oct-4 (N-TP10-OCT4, C-TP10-OCT4, TP10-OCT4-N e OCT4), se possuíam a capacidade de se ligar em sua sequência canônica de DNA, usou-se o kit *NoShift Transcription Factor Assay* (Merck, Alemanha). O método de avaliação desta ligação dá-se por espectrofluorimetria usando oligonucleotídeos marcados com biotina (Figura 9). Para tanto, desenhou-se, com base em dados de literatura (Chew et al.,

2005), a sequência-alvo de DNA (5'-GCAGAGAGATGCATGTGCCGT-3') reconhecida pelo fator transcricional Oct-4.

O protocolo foi realizado de acordo com as instruções do fabricante. Para realização do ensaio, primeiramente preparou-se uma mistura reacional composta por 5 µL do reagente 4 × *NoShift Bind Buffer*, 1 µL de Poly(dI-dC).Poly(dI-dC), sequência de DNA biotinizada (sintetizado pelo empresa IDT), 5 µL de extrato proteico e 7 µL de água *nuclease-free*, obtendo como volume final para reação 20 µL. Como controle negativo da reação, utilizou-se a mesma mistura reacional sem a presença de extrato proteico. A mistura reacional foi então incubada no gelo durante 30 min.

Durante o período de espera as placas contendo estreptavidina foram preparadas da seguinte maneira: o número de poços necessários foram selecionados e foram lavados por três vezes durante 5 min com 200 µL de *NoShift Wash Buffer*. Estas lavagens, assim como as demais mencionadas nessa metodologia, foram realizadas sob agitação.

No passo seguinte foram adicionados 80 µL de *NoShift Bind Buffer* na solução, obtendo uma solução final de 100 µL. Essa solução foi então dispensada nos poços que seriam utilizados e a placa foi selada com uma tampa de alumínio, fornecido juntamente com o *kit*. A placa foi então incubada por 60 min a 37° C sem agitação. Em seguida os poços foram lavados com 200 µL de *NoShift Wash Buffer* por três vezes de 5 min. Posteriormente foram adicionados 100 µL do anticorpo primário, sendo utilizado o mesmo anticorpo descrito anteriormente para a técnica de WB. As diluições dos anticorpos, tanto para o anticorpo primário quanto para o secundário, foram realizadas com *NoShift Antibody Dilution Buffer*. A placa foi selada novamente e incubada por 60 min a 37° C. Após o período de incubação foi

realizada três lavagens de 5 min com 200 μ L de *NoShift Wash Buffer*. Foi então adicionado 100 μ L do anticorpo secundário conjugado com HRP em uma diluição de 1:1000. A placa foi mais uma vez selada e incubada por 30 min a 37° C. Logo após os poços foram lavados por três vezes de 5 min com 200 μ L de *NoShift Wash Buffer*. Então foi adicionado 100 μ L do substrato TMB a temperatura ambiente e deixado no escuro até o surgimento de uma coloração azul. A reação foi parada pela adição de 100 μ L de HCl a 1 M. Neste passo a coloração deve alterar-se de azul para amarelo, indicando que a reação foi parada. Por fim a absorbância foi medida por espectrofotometria no comprimento de onda de 450 nm, sendo que esta leitura não ultrapassou de 30 min após a adição do HCl a 1 M.

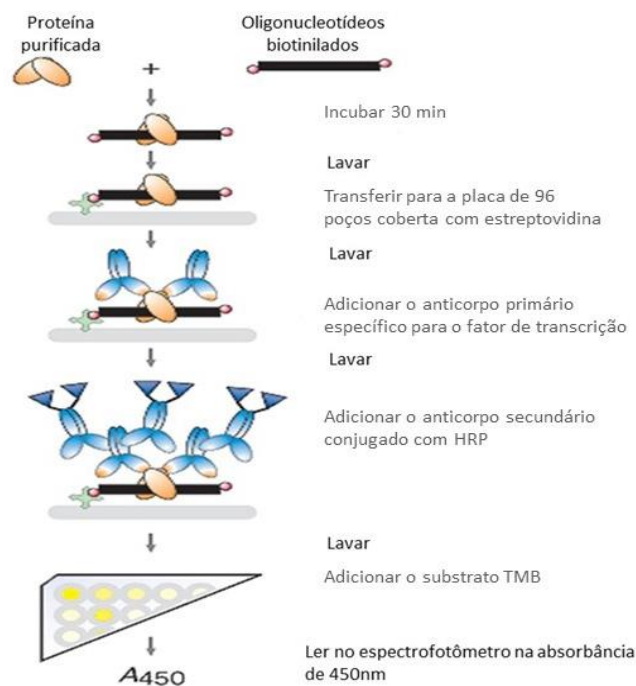


Figura 9. Desenho experimental do Kit *NoShift Transcription Factor Assay*.

Inicialmente a mistura reacional contendo a proteína de interesse e os oligonucleotídeos biotinizados permanece incubada por 30 min. Em seguida são transferidos para a placa contendo os poços cobertos com estreptavidina, sendo então incubados por 1 h. Logo em seguida os poços são lavados e é adicionado aos poços o anticorpo primário específico, que permanece incubado por 1 h. Após o período de incubação os poços são novamente lavados para posterior adição do anticorpo secundário conjugado com HRP sendo incubados por mais 30 min. Após uma nova lavagem é adicionado o substrato TMB que ao reagir com a mistura fica com uma coloração azul, em até 30 min para parar a reação é então adicionado HCl 1 M, a coloração irá alterar de azul para amarelo. E a intensidade de cor será avaliada em espectrofotômetro em um comprimento de onda de 450 nm

4.8 Análise estatística

Para analisar o gráfico obtido com o método de *NoShift Transcription Factor Assay* foi utilizado o teste de *Kruskal-Wallis*, um método estatístico não paramétrico, no qual as amostras são comparadas umas com as outras. Foi considerado valor significativo quando $p < 0,05$.

5 Resultados

5.1 Resultados da padronização da expressão proteica

Inicialmente foi realizado uma padronização dos parâmetros necessários para a indução da produção das proteínas de interesse, sendo estes: temperatura de indução, concentração de IPTG e tempo de indução. Além disso foram testados os diferentes constructos de TP10-OCT4. Dessa forma os resultados iniciais são referentes aos resultados obtidos durante a padronização a fim de obter a melhor expressão e obtenção da proteína Oct-4.

5.1.1 Verificação do padrão de bandas dos extratos proteicos das linhagens comerciais de *E. coli* contendo os diferentes genes sintéticos e sua avaliação da expressão proteica por *Western blot*

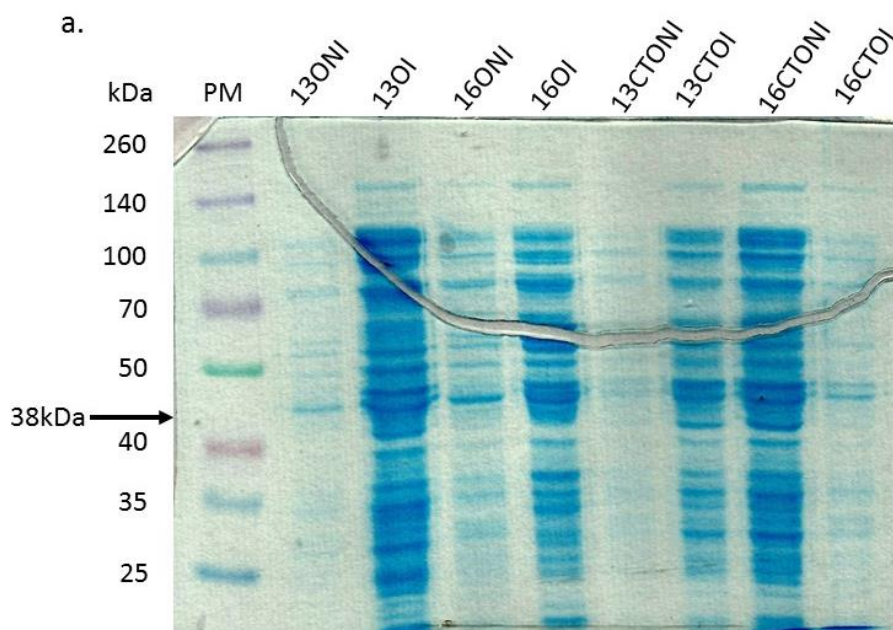
A fim de otimizar a expressão proteica de Oct-4 foram testados parâmetros que poderiam influenciar o processo de indução. Esses testes foram realizados com os quatro diferentes constructos plasmidiais utilizados para a expressão de Oct-4, sendo testados com cada um deles a concentração de IPTG, tempo de indução e temperatura. Esses testes foram realizados com as linhagens comerciais de *E. coli* C3013H e C3016H.

Para a confirmação da presença da proteína Oct-4 obtida nos extratos proteicos foi realizado eletroforese vertical por SDS-PAGE 15% e avaliação qualitativa por WB. Essa análise foi realizada em células não induzidas e em células induzidas.

Ao realizar os testes de padronização foi observado que não obtivemos diferenças no padrão de bandas proteicas bem como nos resultados obtidos pelo WB ao alterar a concentração de IPTG (dados não mostrados). Dessa forma foi

escolhida a concentração de 0,4 mM, já que esta é a concentração indicada no protocolo fornecido pela empresa BioLabs, da qual foram adquiridas as linhagens.

Os constructos contendo somente o gene de expressão para Oct-4 (O), bem como a C-TP10-OCT4 (CTO, plasmídeo em que a TP10 encontra-se fusionada a região C-terminal) foram testados a 37° C utilizando a concentração final de IPTG 0,4 mM, por 3 h de indução sob agitação de 200 rpm, em ambas as linhagens comerciais C3013H e C3016H, como mostram as Figuras 10 a e 10 b.



b.

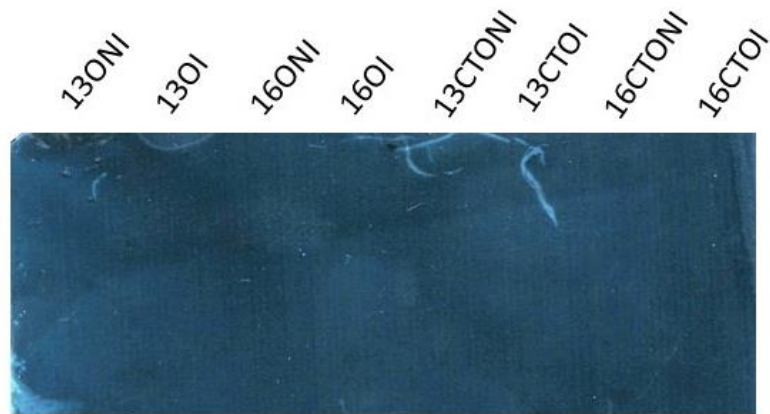
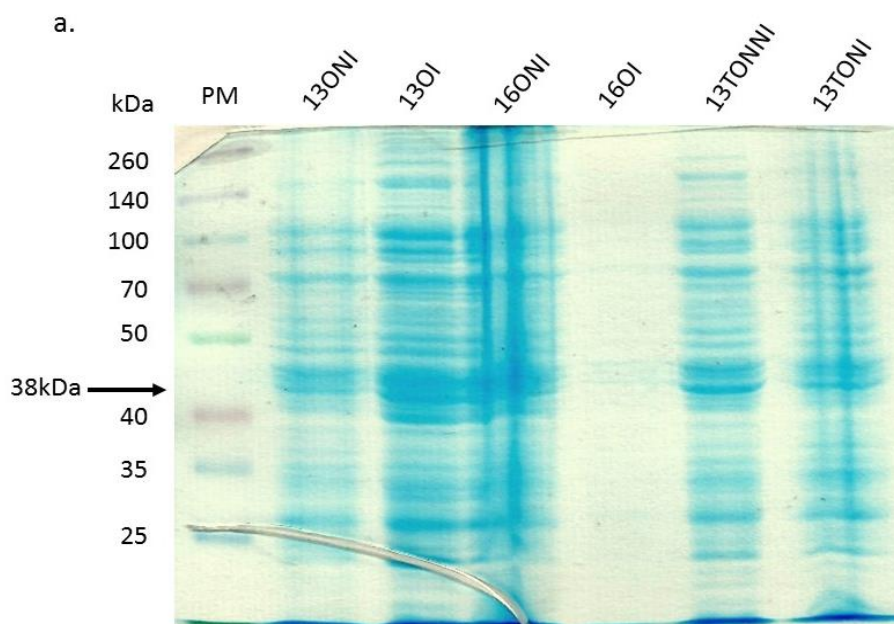


Figura 10. Avaliação do extrato bruto de proteínas heterólogas, após a indução das linhagens de *E. coli* C3013H e C3016H contendo os plasmídeos O e CTO testados com os seguintes parâmetros de indução: temperatura 37° C, 0,4 mM de IPTG por um período de 3 h. Sendo que 13 e 16 representam respectivamente as linhagens de *E. Coli* C3013H e C3016H, O e CTO os constructos que estão sendo testados e por fim I representa as culturas induzidas e NI as culturas não induzidas. **a)** Verificação dos padrões de bandas proteicas em gel de SDS-PAGE 15% após a extração da proteína Oct-4. **b)** Análise da expressão qualitativa da proteína Oct-4 utilizando do método de WB. A utilização dos parâmetros acima citados não originou a expressão da proteína Oct-4.

Os resultados representados na Figura 10 b, referentes aos parâmetros testados sugere que não foi possível verificar a presença da proteína Oct-4 nos extratos proteico obtidos das linhagens C3013H e C3016H contendo os plasmídeos O e CTO. Resultados semelhantes foram obtidos quando testado os plasmídeos contendo os constructos N-TP10-OCT4 (TON, plasmídeo que contém TP10 fusionada na região N-terminal) e TP10-OCT4-N (N_TO, plasmídeo que contém TP10 fusionada na região N-terminal e a sequência completa do promotor da T7

RNA polimerase) utilizando os mesmos parâmetros citados anteriormente (dados não mostrados).

Com o objetivo de obter a expressão das proteínas novos parâmetros foram testados a 37° C utilizando a concentração final de IPTG 0,4 mM, por 5 h de indução sob agitação de 200 rpm, em ambas as linhagens comerciais. Para isso foi utilizado as construções contendo somente o gene de expressão para Oct-4 (O), em ambas as linhagens comerciais, C3013H e C3016H e a construção N-TP10-OCT4 (TON, constructo em que a TP10 encontra-se fusionada a região N-terminal) somente na linhagem comercial C3013H como mostram as Figuras 11 a e 11 b.



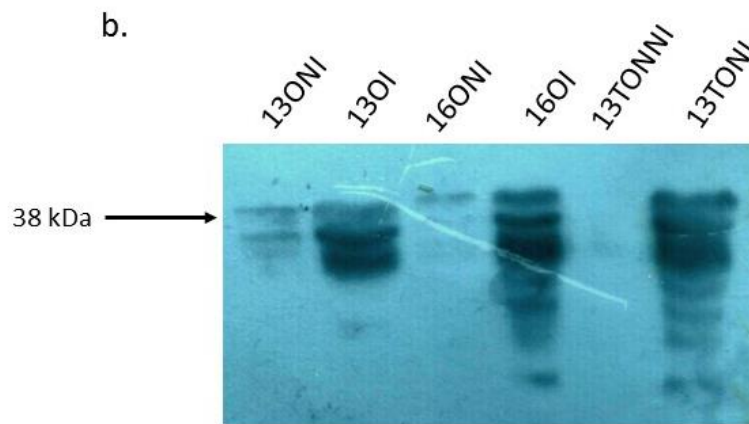


Figura 11. Avaliação do extrato bruto de proteínas heterólogas, após a indução das linhagens de *E. coli* C3013H e C3016H testando os seguintes parâmetros de indução: temperatura 37° C, 0,4 mM de IPTG e por um período de 5 h. Sendo que 13 e 16 representam respectivamente as linhagens de *E. Coli* C3013H e C3016H, O e TON os constructos que estão sendo testados e por fim I representa as culturas induzidas e NI as culturas não induzidas. **a)** Verificação dos padrões de bandas proteicas em gel de SDS-PAGE 15% após a extração da proteína Oct-4. **b)** Avaliação qualitativa da expressão proteica de Oct-4 usando o método de WB. Esta expressão proteica é observada a partir da ligação de um anticorpo anti-Oct3/4 a respectiva proteína. A utilização dos parâmetros acima citados originou a expressão da proteína Oct-4.

Conforme foi observado na Figura 11 b, é possível visualizar a expressão da proteína Oct-4, representada pelas bandas obtidas com peso molecular aproximada de 38 kDa, a qual refere-se ao tamanho da proteína Oct-4. O arraste presente na Figura 11 b provavelmente esteja relacionado com degradação de proteína, por este motivo foi realizado outro teste para padronizar os parâmetros, visto que não seria desejável a obtenção de proteínas degradadas. Resultados semelhantes foram

observados quando testado os plasmídeos contendo os constructos C-TP10-OCT4 (CTO, plasmídeo em que a TP10 encontra-se fusionada a região C-terminal) e quando testado o constructo TP10-OCT4-N (N_TO, plasmídeo que contém TP10 fusionada na região N-terminal e a sequência completa do promotor da T7 RNA polimerase) não foi possível observar expressão da proteína Oct-4 (dados não mostrados).

Como os resultados obtidos utilizando os parâmetros anteriores não foram satisfatórios, realizou-se novos experimentos com variações nos parâmetros de indução das células. A padronização foi realizada com ambas as linhagens comerciais C3013H e C3016H contendo os seguintes constructos plasmidiais OCT4 (O, construção contendo somente o gene codificante para OCT-4) e C-TP10-OCT4 (CTO, constructo em que a TP10 encontra-se fusionada a região C-terminal). Os novos parâmetros testados foram temperatura de cultivo a 25° C com concentração final de IPTG 0,4 mM, por um período de 3 h sob agitação de 200 rpm. Os resultados obtidos podem ser observados nas Figura 12 a e 12 b.

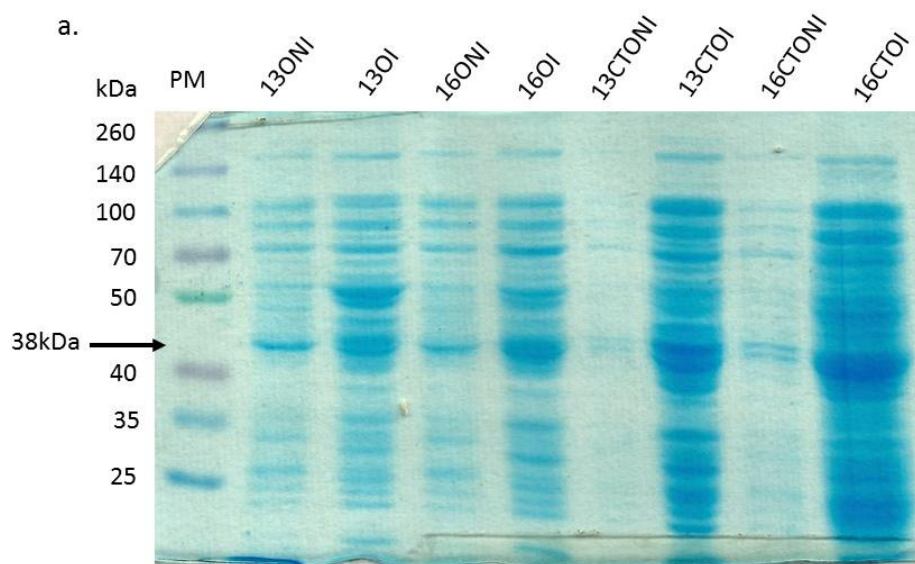
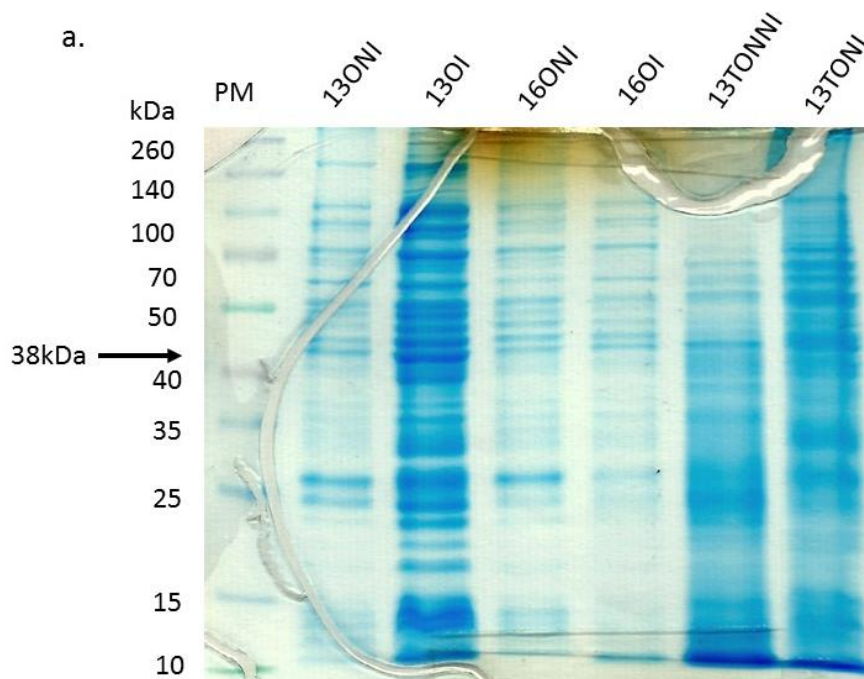




Figura 12. Avaliação do extrato bruto de proteínas heterólogas, após a indução das linhagens de *E. coli* C3013H e C3016H testados com os parâmetros de indução: temperatura 25° C, 0,4 mM de IPTG por um período de 3 h. Onde 13 e 16 representam respectivamente as linhagens de *E. Coli* C3013H e C3016H, O e TON os constructos que estão sendo testados e por fim I representa as culturas induzidas e NI as culturas não induzidas. **a)** Verificação dos padrões de bandas proteicas em gel de SDS-PAGE 15% após a extração da proteína Oct-4. **b)** Avaliação qualitativa da expressão proteica de Oct-4 usando o método de WB. Esta expressão proteica é observada a partir da ligação de um anticorpo anti-Oct3/4 a respectiva proteína. A utilização dos parâmetros acima citados não originou a expressão da proteína Oct-4.

Como podemos visualizar na Figura 12 b, não foi possível observar a expressão da proteína Oct-4 nos extratos proteicos obtidos nas diferentes linhagens testadas com os diferentes plasmídeos. Resultados semelhantes foram observados quando testado os plasmídeos contendo os constructos N-TP10-OCT4 (TON, plasmídeo em que a TP10 encontra-se fusionada a região N-terminal) e TP10-OCT4-N (N_TO, plasmídeo que contém TP10 fusionada na região N-terminal e a sequência completa do promotor da T7 RNA polimerase)

Os resultados obtidos não foram satisfatórios quando utilizado os parâmetros anteriormente citados, portanto a realização de novos experimentos utilizando diferentes parâmetros fez-se necessário. Sendo assim os novos parâmetros de indução usados foram temperatura de cultivo a 25° C, período de incubação de 18 h sob agitação de 200 rpm, com a concentração final de IPTG já estabelecida de 0,4 mM. Esses novos experimentos foram testados utilizando ambas as linhagens C3013H e C3016H, contendo as construções plasmidiais Oct-4 (O, construção contendo somente o gene codificante para Oct-4) e N-TP10-OCT4 (TON, constructo em que a TP10 encontra-se fusionada a região N-terminal). Os resultados obtidos estão representados nas Figuras 13 a e 13 b.



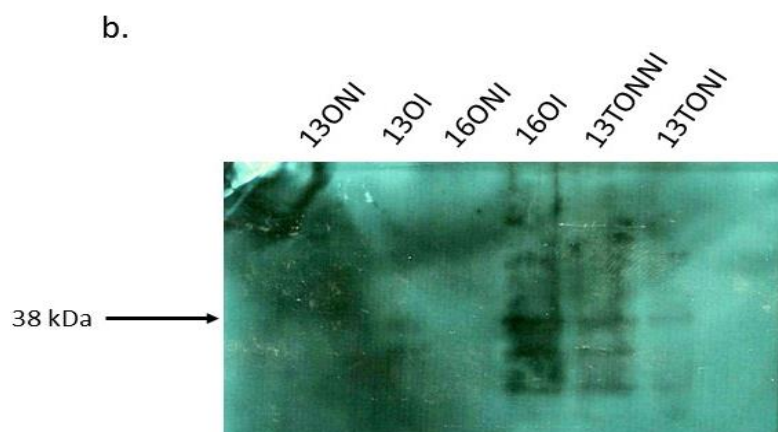


Figura 13. Avaliação do extrato bruto de proteínas heterólogas, após a indução das linhagens de *E. coli* C3013H e C3016H testando os seguintes parâmetros de indução: temperatura 25° C, 0,4 mM de IPTG por um período de 18 h. Onde 13 e 16 representam respectivamente as linhagens de *E. Coli* C3013H e C3016H, O e TON os constructos que estão sendo testados e por fim I representa as culturas induzidas e NI as culturas não induzidas. **a)** Verificação dos padrões de bandas proteicas em gel de SDS-PAGE 15% após a extração da proteína Oct-4. **b)** Avaliação qualitativa da expressão proteica de Oct-4 usando o método de WB. Esta expressão proteica é observada a partir da ligação de um anticorpo anti-Oct3/4 a respectiva proteína. A utilização dos parâmetros acima citados originou a expressão da proteína Oct-4.

Ao realizar a indução das linhagens com os parâmetros descritos anteriormente obtivemos a expressão da proteína Oct-4. Essa expressão pode ser observada pela banda obtida na altura do gel correspondente o peso molecular de 38 kDa (Figura 13 b). O arraste presente na figura provavelmente esteja relacionado com a degradação da proteína. Devido a esta possibilidade foram realizados novos testes de padronização.

Resultados semelhantes foram observados quando testado os plasmídeos contendo os constructos C-TP10-OCT4 (CTO, plasmídeo em que a TP10 encontra-

se fusionada a região C-terminal) e quando testado o constructo TP10-OCT4-N (N_TO, plasmídeo que contém TP10 fusionada na região N-terminal e a sequência completa do promotor da T7 RNA polimerase) não foi possível observar expressão da proteína Oct-4 (dados não mostrados).

Com o intuito de obter a expressão proteica mais adequada, e tendo em vista os resultados insatisfatórios obtidos com os parâmetros anteriormente testados, conforme pode ser observado nas figuras 10 b, 11 b, 12 b e 13 b, novos parâmetros foram testados. Estes foram estabelecidos em temperatura de cultivo a 25° C, por um período de indução de 5 h, sob agitação de 200 rpm, utilizando a concentração final de IPTG já estabelecida de 0,4 mM. Esses testes foram realizados com o constructo contendo somente o gene de expressão para Oct-4 (O), e com o constructo N-TP10-OCT4 (TON, plasmídeo em que a TP10 encontra-se na região N-terminal), testados em ambas as linhagens comerciais de *E. coli* C3013H e C3016H (Figuras 14 a e 14 b).

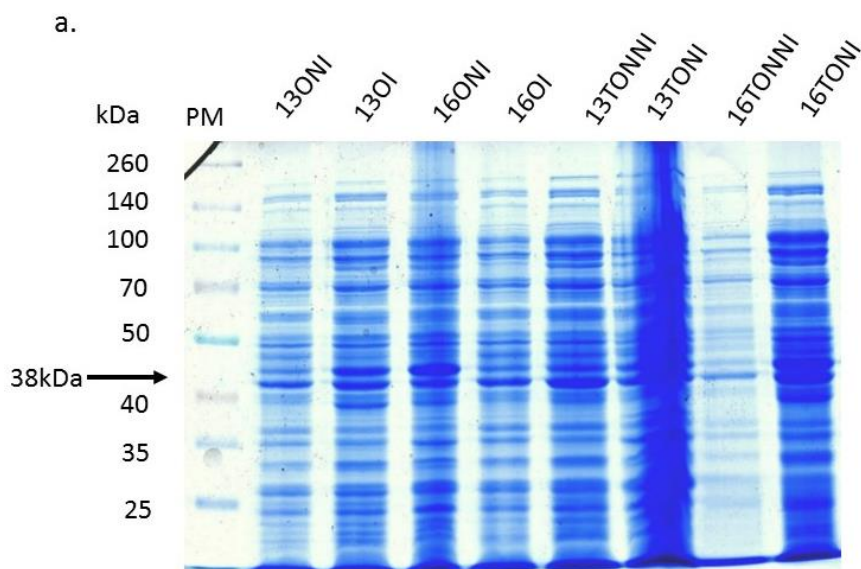




Figura 14. Avaliação em gel de SDS-PAGE 15%, dos padrões de bandas obtidas após a extração da proteína Oct-4 das linhagens de *E. coli* C3013H e C3016H contendo os plasmídeos O e TON testados com os parâmetros de indução: temperatura 25° C, 0,4 mM de IPTG por um período de 5 h. Onde 13 e 16 representam respectivamente as linhagens de *E. Coli* C3013H e C3016H, O e TON os constructos que estão sendo testados e por fim I representa as culturas induzidas e NI as culturas não induzidas. **a)** Verificação dos padrões de bandas proteicas em gel de SDS-PAGE 15% após a extração da proteína Oct-4. **b)** Avaliação qualitativa da expressão proteica de Oct-4 usando o método de WB. Esta expressão proteica é obtida a partir da ligação do anticorpo anti-Oct3/4 e respectiva proteína. A utilização dos parâmetros acima citados originou a expressão da proteína Oct-4.

Como podemos observar na Figura 14 b a expressão da proteína Oct-4 foi obtida ao ser realizado a indução de ambas as linhagens comerciais de *E. coli* com os parâmetros previamente descritos. Os extratos proteicos foram obtidos das diferentes linhagens comerciais de *E. coli* e as mesmas testadas com os plasmídeos contendo diferentes constructos. Esta expressão pode ser observada pela banda obtida correspondente o peso molecular de 38 kDa, a partir da ligação do anticorpo anti-Oct3/4 e respectiva proteína. Com base nos resultados obtidos da expressão da

proteína Oct-4 mostrado pela Figura 14 b foi definido que os parâmetros assim utilizados foram os mais adequados, pois a partir destes parâmetros obtivemos uma adequada expressão proteica, como observado nas figuras 11 b e 13 b.

Resultados semelhantes foram observados quando testado os plasmídeos contendo os constructos C-TP10-OCT4 (CTO, plasmídeo em que a TP10 encontra-se fusionada a região C-terminal) e quando testado o constructo TP10-OCT4-N (N_TO, plasmídeo que contém TP10 fusionada na região N-terminal e a sequência completa do promotor da T7 RNA polimerase) foi possível observar uma pequena expressão da proteína Oct-4 (dados não mostrados).

Após a realização dos testes e análise dos resultados a fim de padronizar os parâmetros de indução, nos quais obtivemos a expressão da proteína heteróloga mais satisfatória quando as células foram induzidas a temperatura de 25 °C, com concentração final de IPTG 0,4 mM por um período de tempo de 5 h, como observado na figura 14 b. Sendo estes parâmetros os utilizados para a realização dos experimentos posteriores.

Com base nos dados obtidos por meio da expressão de proteína heteróloga das construções sintéticas N-TP10-OCT4, C-TP10-OCT4, TP10-OCT4-N e OCT4 indicaram que a concentração 0,4 mM de IPTG (dados não mostrados) foi suficiente para induzir a expressão desses genes (Figura 14 a e 14 b) sendo assim escolhida a concentração de 0,4 mM.

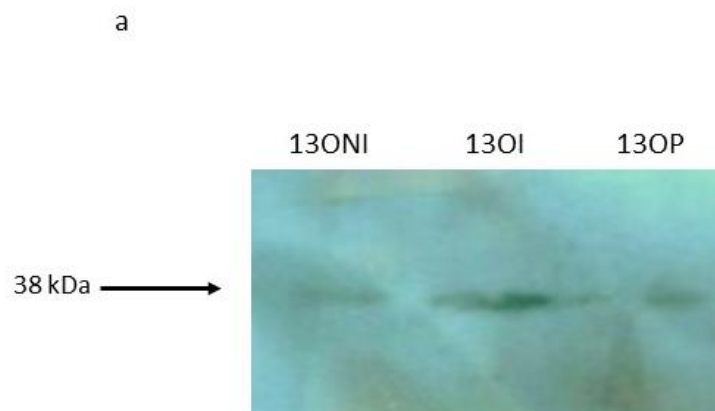
Conseqüentemente após o estabelecimento dos parâmetros de indução mais adequados para obtenção e expressão da proteína Oct-4 *in vivo*, foram realizados os experimentos propriamente ditos. Sendo assim, foram realizadas as extrações dos extratos proteicos brutos e analisado quanto a expressão proteica de interesse.

5.2 Avaliação dos extratos proteicos das linhagens comerciais C3013H e C3016H contendo as quatro diferentes construções sintéticas de Oct-4

Os extratos proteicos totais foram extraídos e analisado qualitativamente quanto a expressão proteica de interesse pelo ensaio de WB.

As quatro diferentes construções plasmidiais, contendo o gene para Oct-4 foram testadas nas duas diferentes linhagens comerciais de *E. coli* (Tabela 3). Para fins de comprovação os resultados foram confirmados após a obtenção de triplicatas, sendo elas tanto biológicas quanto experimentais.

O plasmídeo contendo apenas o gene para Oct-4 (O, contendo somente o gene para Oct-4) foi avaliado quanto a sua capacidade de expressar qualitativamente a proteína Oct-4 em ambas as linhagens testadas C3013H e C3016H, utilizando os parâmetros pré-estabelecidos (Figura 15).



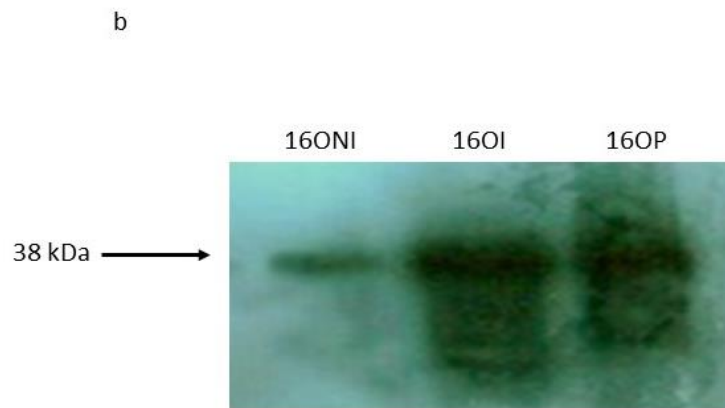


Figura 15. Análise qualitativa da expressão da proteína Oct-4 nas linhagens comerciais de *E. coli* contendo o plasmídeo O, visualizado pela presença de marcação de anticorpo anti-Oct3/4 com a banda correspondente a massa de 38 kDa. **a)** Linhagem C3013H, expressando a proteína Oct-4 nas células não induzidas (NI), induzidas (I) e no *pellet* das células induzidas (P) **b)** Linhagem C3016H, expressando a proteína Oct-4 nas células não induzidas (NI), células induzidas (I) e no *pellet* (P). A indução proteica ocorreu com concentração final de IPTG 0,4 mM a 25° C por 5 h sob agitação de 200 rpm.

Como podemos observar nas Figuras 15 a e 15 b, a expressão qualitativa da proteína Oct-4 foi obtida nas duas linhagens C3013H e C3016H. Essa pode ser comprovada através da visualização da banda correspondente a massa molecular de 38 kDa. A expressão da proteína foi observada tanto nas células não induzidas, como nas induzidas e nos *pellets* das induzidas. A fim de avaliar a capacidade de expressão da proteína Oct-4 o constructo TP10-OCT4-N (TON, contendo a sequência da transportana fusionada a região N-terminal) foi testado em ambas as linhagens C3013H e C3016H como pode ser observado na figura 16. Para a indução das linhagens de *E. coli*, e assim a obtenção da proteína Oct-4, foram utilizados os parâmetros padronizados anteriormente.

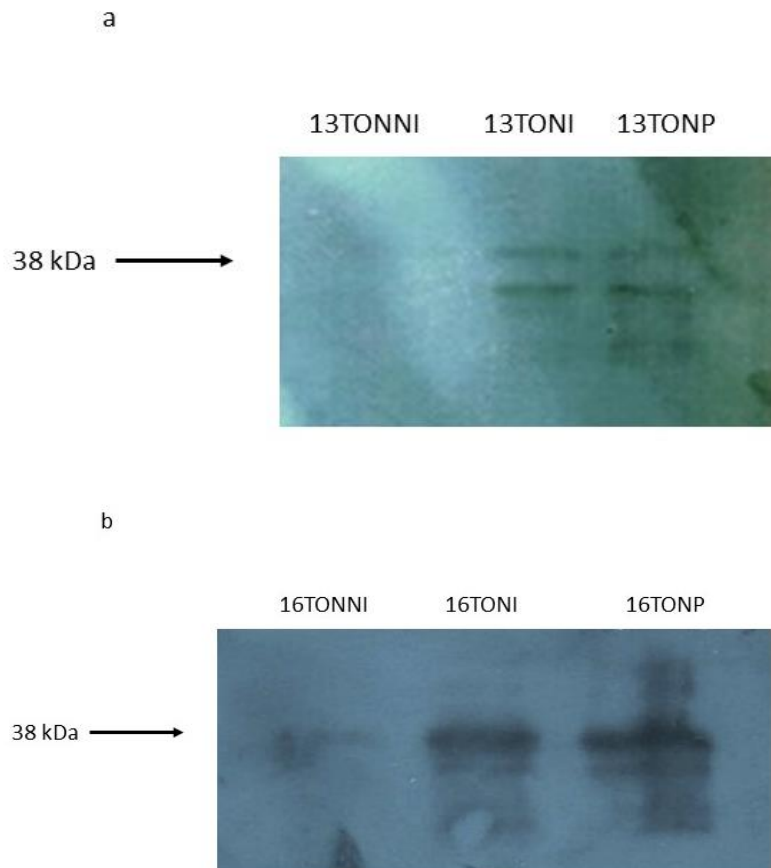


Figura 16. Análise da expressão qualitativa da proteína Oct-4 obtida pela ligação do anticorpo anti-Oct3/4 utilizado para o reconhecimento da respectiva proteína através da avaliação dos extratos proteicos das linhagens C3013H e C3016H, que possui a capacidade de expressão da proteína Oct-4 obtida a partir do plasmídeo TON, mostrado pela marcação da banda correspondente a 38 kDa. **a)** Linhagem C3013H, expressando a proteína Oct-4 contendo as células não induzidas (NI), induzidas (I) e no *pellet* das células induzidas (P), sendo que houve expressão nas células I e P. **b)** Linhagem C3016H, expressando a proteína Oct-4. A indução proteica ocorreu com concentração final de IPTG 0,4 mM a 25° C por 5 h sob agitação de 200 rpm

De acordo com as Figuras 16 a e 16 b foi obtida a expressão qualitativa da proteína Oct-4, que possui massa molecular de 38 kDa, como sugerida nas figuras. As duas linhagens C3013H e C3016H obtiveram a expressão proteica ao expressarem o plasmídeo TON (contém a sequência da TP10 fusionada a sequência N-terminal da Oct-4). A expressão da proteína foi observada tanto nas células não induzidas, como nas induzidas e nos *pellets* das induzidas.

Com o objetivo de avaliar a expressão qualitativa da proteína Oct-4 do plasmídeo contendo o constructo C-TP10-OCT4 (CTO, contendo a sequência da transportana fusionada a região C-terminal de OCT4) o mesmo foi induzido em ambas as linhagens de *E. coli*, C3013H e C3016H, como observado na Figura 17. Para a indução das linhagens de *E. coli*, e assim a obtenção da proteína Oct-4, foram utilizados os parâmetros determinados anteriormente.

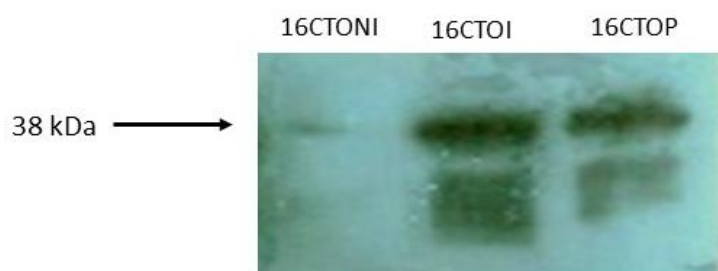


Figura 17. Análise da expressão qualitativa da proteína Oct-4, mostrado pela banda correspondente o peso de 38 kDa. A amostra apresentada é referente a expressão de Oct-4 na linhagem C3016H contendo o plasmídeo CTO, apresentando o padrão de bandas nas células não induzidas (NI), células induzidas (I) e no *pellet* das células induzidas (P). Sob as condições de indução sendo concentração final de IPTG 0,4 mM a 25° C por 5 h sob agitação de 200 rpm.

De acordo com os resultados obtidos a expressão qualitativa da proteína Oct-4 foi obtida como observado na Figura 17, sendo então comprovada através da presença da banda correspondente ao peso molecular de 38 kDa. A expressão foi obtida somente na linhagem C3016H, não se obteve a expressão da proteína Oct-4 com o respectivo constructo quando expresso na linhagem C3013H (dados não mostrados). A Figura 17 referente ao plasmídeo CTO, apresenta a expressão proteica nas células não induzidas (NI), nas células induzidas (I) e nos *pellets* das células induzidas (P).

A fim de avaliar a expressão qualitativa da proteína Oct-4 através da expressão do constructo contendo a sequência N-TP10-OCT4 (N_TO, contendo a sequência da transportana fusionada com a região N-terminal de OCT4), foi testado em ambas as linhagens de *E. coli*, C3013H e C3016H como pode ser observado na Figura 18. Para tanto, a indução das linhagens de *E. coli* e assim a obtenção da proteína Oct-4 foram utilizados os parâmetros determinados anteriormente.



Figura18. Análise da expressão qualitativa da proteína Oct-4, mostrado pela banda correspondente a massa de 38 kDa. A amostra apresentada é referente a expressão de Oct-4 na linhagem C3016H contendo o plasmídeo N_TO, apresentando o padrão de bandas nas células induzidas (I). Sob as seguintes condições de indução, concentração final de IPTG 0,4 mM a 25° C por 5 h sob agitação de 200 rpm.

De acordo com a Figura 18 foi obtida a provável expressão qualitativa da proteína Oct-4, devido a utilização de anticorpo monoclonal para Oct-3/4 a fim de detectar da proteína em estudo. Apenas a linhagem C3016H obteve a expressão proteica ao expressarem o plasmídeo N_TO (contém a sequência da TP10 fusionada a sequência N-terminal da OCT-4). A expressão da proteína foi observada somente nas células induzidas. As amostras foram obtidas sob as condições de indução sendo concentração final de IPTG 0,4 mM a 25° C por 5 h sob agitação de 200 rpm.

Sendo assim, presença da banda correspondente ao peso molecular de 38 kDa mostrado nas figuras representa a presença da proteína de interesse, como observado em todas as figuras acima. As bandas nas células não induzidas provavelmente refere-se a expressão basal da enzima T7 RNA polimerase (Equbal et al., 2013; Studier and Moffatt, 1986). Os arrastes que aparecem nas Figuras 13 b, 15 a, 15 b e 16 b provavelmente estão relacionados a produtos de degradação de proteína.

5.3 Confirmação da ligação do extrato proteico a respectiva sequencias de DNA

Com propósito de avaliar se as proteínas obtidas eram capazes de reconhecer a sua respectiva sequência-alvo de DNA foi realizado o método espectrocolorimético Para tanto os extratos de proteínas brutos obtidos por intermédio da indução das linhagens celulares contendo as diferentes construções

de OCT-4 foram testadas utilizando oligonucleotídeos marcados com biotina. O resultado é baseado na intensidade de cor obtida por cada amostra, ou seja, quando a mesma reconhece a sequência correta do DNA a coloração torna-se mais intensa. Sendo assim, quanto maior a absorbância lida no espectrofotômetro mais eficaz é o reconhecimento da amostra sua respectiva sequência de DNA.

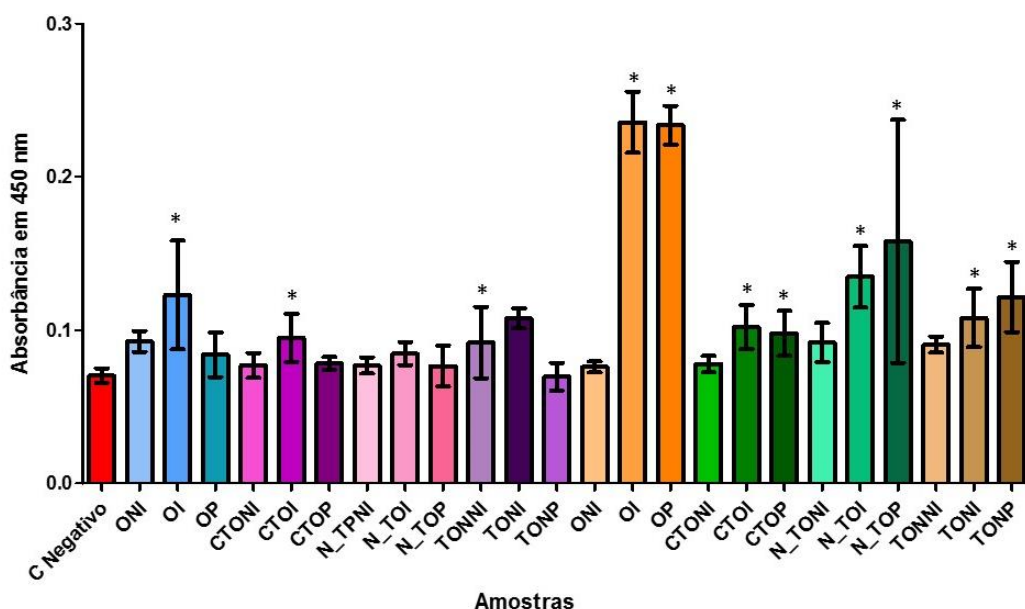


Figura 19. Avaliação da ligação dos extratos proteico contendo a proteína OCT-4 com sua respectiva sequência de alvo de DNA. No eixo y está relacionada a fluorescência emitida em um comprimento de onda de 450 nm e no eixo x as amostras testadas. O controle negativo está representado pelo C negativo. As primeiras amostras, de ONI até TONP representam a linhagem C3013H, as demais, iniciando do segundo ONI até TONP representam a linhagem C3016H. * amostras que apresentam diferença estatísticas quando comparado com o controle negativo com o $p < 0,05$ (utilizando o teste estatístico não paramétrico de *Kruskal-Wallis*).

O controle negativo apresentado no gráfico da Figura 19, foi feito como descrito nos procedimentos experimentais porém sem a adição de proteína, e não foi utilizado controle positivo devido à falta de proteína Oct-4 purificada para realização do experimento. As amostras proteicas testadas não foram quantificadas.

Como pode-se observar no gráfico (Figura 19) as amostras OI, CTOI e TONI da linhagem C3013H apresentam diferença estatística quando comparado com o controle negativo apresentando $p < 0,05$. Assim como as amostras OI, OP, CTOI, CTOP e N_TOI, N_TOP, TONI e TONP da linhagem C3016H também apresentam diferença estatística quando comparado com o controle negativo, apresentando $p < 0,05$.

Por fim, as amostras que obtiveram maior expressão da proteína, conseqüentemente são aquelas com maior reconhecimento da sequência-alvo de DNA. Por conseguinte as amostras O e TON em ambas as linhagens, C3013H e C3016H, tiveram maior reconhecimento com a sua respectiva sequência de DNA, corroborando com os resultados obtidos pelo WB onde foi visto uma maior obtenção de proteínas quando induzida as culturas em ambas as linhagens comerciais contendo os plasmídeos O e TON. Desta forma os dados gerados indicam que a proteína Oct-4 presente no extrato proteico total de C3016H parece se ligar eficientemente a sequência de DNA reconhecida por Oct-4 em comparação com a linhagem não induzida e ao controle negativo (Figura 9).

Discussão

A utilização de genes sintéticos tem sido de grande importância para fins biotecnológicos (Ellis et al., 2011) assim como a utilização de peptídeos de penetração celular (CPPs) (Foerg and Merkle, 2008). Estes formam uma classe de peptídeos que têm, em princípio, a capacidade de transportar uma grande diversidade de cargas através das células, incluindo macromoléculas (por exemplo, proteínas e ácido nucleicos) que de outra forma não seriam internalizados (Lee et al., 2013).

Uma abordagem promissora para superação da barreira celular para entrega de moléculas intracelular baseia-se na utilização de certas proteínas ou peptídeos, as CPPs, capazes de se translocar através da membrana plasmática e entregar sua carga no meio intracelular (Lindgren et al., 2000). Dos mecanismos propostos recentemente para explicar como CPPs conjugadas a grandes cargas conseguem passar pela membrana plasmática sendo assim a internalização destas estruturas ocorre via endocitose independente de clatrina (EIC) ou macropinocitose e endocitose dependente de clatrina (EDC). A macropinocitose é uma forma inespecífica de captação celular, provocada por vesículas grandes, conhecidas como macropinosomos, que são geradas a partir de filamentos de actina (Torchilin, 2008). Na EDC, os domínios citoplasmáticos das proteínas da membrana plasmática são reconhecidos por proteínas adaptadoras e são empacotados em vesículas revertidas por clatrina e levadas para dentro da célula (Mayor and Pagano, 2007; Milletti, 2012). Já na EIC pode ocorrer de diferentes formas tal como macropinocitose e cavolar (Mayor and Pagano, 2007; Milletti, 2012).

A primeira geração de CPPs surgiu a partir da observação de homeodomínios, de proteína capaz de se translocar pelas células (penetratina) (Lee

et al., 2013), e as proteínas do envelope viral envolvidas na replicação do HIV (TAT) (Lee et al., 2013). Posteriormente surgiu a transportana (TP), um CPP sintético composto da galanina e mastoparana (Islam et al., 2014; Pooga et al., 1998).

A TP pode se translocar através da membrana plasmática das células por um mecanismo independente de receptor. Um dos análogos a TP, a TP10, foi desenhado a partir da deleção de seis resíduos de aminoácidos na região N-terminal da TP (Islam et al., 2014; Pooga et al., 1998). A TP10 tem atividade celular penetrante e não se liga a receptores galanina, possuindo a capacidade de ultrapassar a bicamada lipídica da membrana plasmática (Islam et al., 2014). Além disso, a TP e a TP10 proporcionam a translocação intraorganelar de proteínas com peso molecular elevado (Islam et al., 2014).

A aplicação de TP e TP10 para a entrega de proteínas é particularmente importante no campo das células-tronco pluripotentes induzidas (iPSCs). A obtenção de iPSCs geralmente está baseada por métodos virais, retroviral ou lentiviral, de entrega dos quatro fatores de transcrição (Oct-4, Sox-2, Klf-4 e c-Myc). Com o potencial clínico das iPSCs, há a necessidade de desenhar protocolos livres de vírus para a geração de iPSCs por entrega direta de proteínas destes quatro fatores de transcrição. Desta maneira, e de forma inédita neste trabalho, fez-se a utilização de genes sintéticos codificantes para os fatores de Yamanaka acoplados a TP10 (Tabela 2).

A escolha do peptídeo TP10 deu-se devido a suas características anteriormente citadas e por ainda não ter sido utilizada em reprogramação celular. Além disso por, também, possuir como característica principal de não afetar na atividade da GTPase (Padari et al., 2005) dessa forma não afetando algumas

funções básicas desempenhadas pelas GTPases como transdução de sinal no domínio intracelular de receptores, biossíntese de proteínas nos ribossomos, translocação de proteínas através da membrana celular e transporte de vesículas intracelular (Mizuno-Yamasaki et al., 2012). Outra característica importante das TP10 é a sua ampla capacidade em transduzir diferentes tipos celulares de diferentes organismos, tais como fungos, plantas e células de metazoários (Padari et al., 2005). Desta maneira fusionar as sequências dos peptídeos a sequências dos fatores de reprogramação poderia representar uma proposta interessante para o acesso das proteínas de interesse no ambiente intracelular.

O principal obstáculo na entrega de proteína até o momento é a baixa biodisponibilidade destas moléculas (El-Andaloussi et al., 2005). Os CPPs tem sido utilizados em vários estudos para carrear proteínas bioativas para o interior das células. Na maioria dos casos, os peptídeos têm sido expressos a partir de plasmídeos contendo uma fusão com a proteína, resultando em um conjugado de um peptídeo por proteína. As TP10 e penetratina são as candidatas em potencial por serem os vetores mais eficientes para entrega de proteína (El-Andaloussi et al., 2007).

As sequências de transdução das CPPs podem ser fusionadas de forma eficiente e rápida as sequências N- ou C-terminal dos fatores transcricionais de Yamanka por meio do desenho de genes sintéticos, cuja transcrição e tradução podem ser feitas tanto *in vitro* quanto *in vivo*. (Gonzalez et al., 2011). Por este motivo, no presente trabalho foram utilizadas três diferentes construções plasmidiais contendo o gene codificador do fator de transcrição Oct-4 e a sequência da TP10 fusionada tanto nas sequências N-terminal quanto na sequência C-terminal de Oct-4 (Tabela 2). Além disso, foi utilizado um plasmídeo contendo somente o gene para

Oct-4 (Tabela 2) para verificar o efeito da presença de TP10 no potencial de ligação a sequência alvo de DNA da Oct-4.

O fator Oct-4 foi selecionado neste projeto por ser fator de transcrição normalmente expresso em células embrionárias com a função de mantê-las em um estado indiferenciado (Grinnell et al., 2007; Pesce and Scholer, 2001) tendo um papel importante na manutenção e regulação da pluripotência bem como sendo um fator central na reprogramação nuclear (Radziskeuskaya and Silva, 2014). Além disso, em alguns artigos como de Kim *et al* (2009), Wu *et al* (2011) e Zhu *et al* (2010) conseguiram reprogramar células somáticas utilizando a superexpressão de Oct-4, combinadas com algumas pequenas moléculas (Zhu et al., 2010) ou com a expressão endógena de outros fatores transcricionais importantes como Sox-2 (Kim et al., 2009b; Wu et al., 2011). Dessa forma, diante das características importantes do fator transcricional Oct-4 juntamente com os dados da literatura afirmando sua eficácia para a reprogramação celular este trabalho iniciou a padronização e obtenção da devida proteína deste fator transcricional.

A fim de saber qual construção teria maior expressão proteica os diferentes constructos foram transformados em duas diferentes linhagens comerciais de *E. coli*, C3013H e C3016H (BioLabs; Ipswich, MA). Estas linhagens comerciais expressam a enzima T7 RNA polimerase sob controle do regulador *Lac I^q*, que possibilita a expressão regulada de genes tóxicos (<https://www.neb.com/>). Além disso, a linhagem de *E. coli* C3013H possui a construção *LysY / I^q*, a qual codifica uma variante da lisozima do fago T7 sem a atividade amidase, possibilitando uma diminuição da taxa de lise celular em condição de indução de síntese proteica ectópica (<https://www.neb.com/>). É importante ressaltar que trabalhos prévios de outros grupos

de pesquisas têm indicado a importância da escolha da linhagem correta de *E. coli* para a expressão dos fatores de Yamanaka de forma ectópica.

Após a indução das células *in vivo* e a extração da proteína Oct-4 foi possível observar qual das construções é, provavelmente, a mais eficiente para obtenção da proteína Oct-4. De acordo com os resultados obtidos na figura 16a e 16b, o plasmídeo contendo a N-TP10-OCT4 (TON, constructo que contém a TP10 fusionada na região N-terminal do gene codificante para Oct-4) é o que melhor expressa a proteína Oct-4. Este resultado é similar ao mostrado nos trabalhos de Kim *et al.* (2009), Pan *et al.* (2010), Zhang *et al.* (2012) e Nemes *et al.* (2014), onde os fatores transcricionais OSKM foram fusionados a sequência N-terminal do peptídeo transportador TAT, e cujos produtos purificados foram capazes de gerar iPSCs.

Deve ser ressaltado que observou-se a expressão destes constructos sintéticos também nas linhagens de *E. coli* não induzidas, provavelmente relacionado com uma baixa expressão, mas basal, da enzima T7 RNA polimerase, como já relatado na literatura (Equbal *et al.*, 2013; Studier and Moffatt, 1986).

Em nossos experimentos também foi empregado um método que avalia a capacidade de ligação das proteínas obtidas a sua respectiva sequência-alvo de DNA. Esse método foi realizado por meio da utilização do kit *NoShift Transcription Factor Assay* (Figura 9), sendo uma técnica inovadora deste trabalho. O resultado obtido pelo *NoShift Transcription Factor Assay* (Figura 19), por meio da avaliação dos extratos proteicos brutos, demonstrou que as amostras obtidas pelo constructo contendo somente a sequência codificadora para Oct-4, bem como o constructo que contém a TP10 fusionada a sequência N-terminal do Oct-4 são os mais eficientes quanto sua ligação a sua sequência-alvo de DNA. Pode-se também perceber que

houve diferença entre as linhagens comerciais de *E. coli* utilizadas sendo a C3016H aquela que apresentou maior capacidade de ligação, corroborando, assim, com os resultados obtidos pelo WB. Os dados gerados indicam que a proteína Oct-4 presente no extrato proteico total de C3016H parece se ligar eficientemente a sequência de DNA reconhecida por Oct-4 em comparação com a linhagem não induzida e ao controle negativo (Figura 19). Estes dados demonstram que as proteínas que foram geradas reconhecem a sequência de DNA compatível, tornando-a uma candidata para obtenção de iPSC.

A obtenção de iPSCs humanas podem ser estabelecidos com uma variedade de métodos. Os métodos de não-integração de geração de iPSCs têm sido relatados, mas ainda possuem uma eficiência de reprogramação muito baixa e podem dar origem a uma reprogramação insuficiente. Estes métodos livres de integração podem ser melhorados através da utilização de melhores combinações de fatores de reprogramação, melhores fontes de células parentais e melhores condições de cultura. O estabelecimento de métodos de geração de iPSCs para aplicações clínicas é um processo contínuo e o conhecimento mais abrangente do processo de reprogramação é, portanto, crucial para futuras aplicações clínicas de iPSCs.

6 Conclusão

Com base dos resultados obtidos pode ser observado que há a presença de proteína de reprogramação celular do fator transcricional Oct-4 e que a mesma possui a capacidade de ligar-se a sequência de DNA sugerindo que a proteína teria o potencial de favorecer a reprogramação celular. Além disso a utilização de diferentes linhagens de *E. coli*, a fim de obtenção da melhor expressão proteica sugere que a linhagem de *E. coli* C3016H, que não contém a mutação para diminuição da atividade amidase, conferiu uma melhor expressão das proteínas obtidas dos diferentes constructos e ainda uma maior capacidade de ligação a sua sequência DNA.

Com os dados obtidos podemos concluir que existe a possibilidade de realizar a produção e extração de proteínas de fatores de transcrição *in vivo*.

Apesar disso, ainda existe a necessidade de aprofundamento quanto à execução de protocolos bem como aprimoramento tanto das técnicas quanto a respeito da melhor construção plasmidial para cada fator transcricional. O uso de proteínas para reprogramação celular reduziria o risco de mutações insercionais bem como o potencial tumorigênico das células. Como dito anteriormente a realização de uma reprogramação não integrativa e que ocorra temporariamente seria a melhor estratégia para obter iPSCs que possam ser utilizadas na clínica.

Esta abordagem elimina os potenciais riscos associados ao uso de vírus, a transfecção de DNA, assim como o potencial prejudicial da utilização de produtos químicos e, no futuro, poderia fornecer uma fonte segura de células específicas do paciente para a medicina regenerativa. Apesar disso, ainda há a necessidade de experimentos para aumentar a eficiência e reprodutibilidade desta abordagem.

7 Perspectivas

Este trabalho tem como perspectivas:

- a) Estabelecer protocolo para expressão de proteína heteróloga para os outros fatores transcricionais de Yamanaka;
- b) Realizar protocolo de transcrição e tradução *in vitro* e fazer Western Blot para confirmação da síntese proteica;
- c) Transduzir culturas *in vitro* de células-tronco mesenquimais (CTMs) com as proteínas TP10-PTFs em diferentes intervalos de tempo.
- d) Avaliar a capacidade das células transduzidas em gerar corpos embrióides (CEs) em condições de cultura adequadas *in vitro*.
- e) Avaliar a capacidade dos CEs em diferenciarem-se espontaneamente para as linhagens mesodermis, ectodermis e endodermis *in vitro*.
- f) Avaliar a capacidade dos CEs de formar teratomas *in vivo* e diferenciar-se em células derivadas da endoderme, mesoderme e ectoderme.

8 Anexos

8.1 Mapas das construções plasmidiais contendo dos fatores transcricionais fusionados a TP10

O desenho dos genes sintéticos (TP10-PTFs), usados para a expressão dos fatores transcricionais indutores de pluripotência (*pluripotency-inducing transcription factors*; PTFs) que contem fusionados na região N- ou C-terminal a transportana 10 (TP10), foram sintetizadas pela empresa *GenScript Corporation* (Piscatway, USA) e clonadas em vetor pUC57.

ANEXO A

A



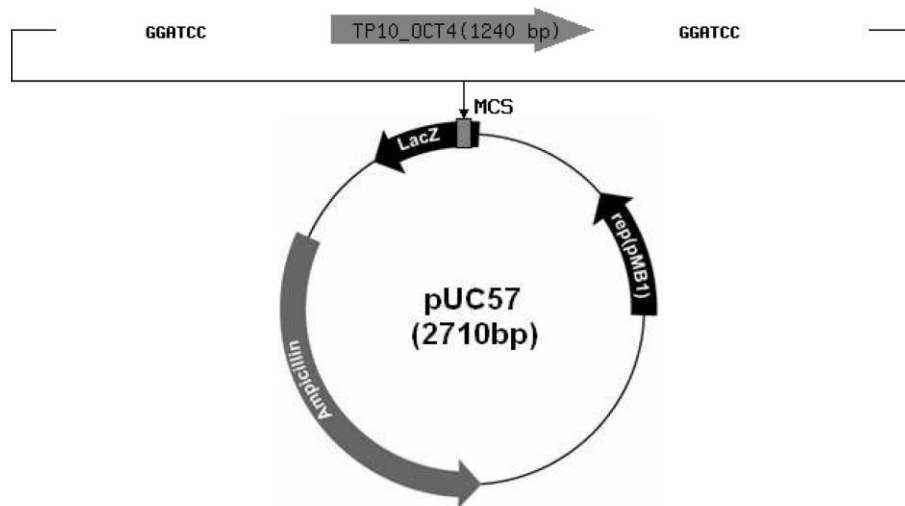
Your Innovation Partner in Drug Discovery!

Plasmid Construct Map

Order ID: 183739-2

Gene Name: TP10 OCT4

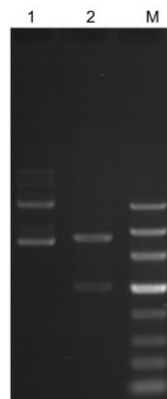
The TP10_OCT4 was cloned in pUC57 by BamHI.



MCS:

M13/pUC sequencing primer (-20), 17-mer → 396 EcoRI XapI Ecl136II SacI Acc65I KpnI Mva1269I Bsp68I Mph1103I XbaI EcoRV BamHI Cfr9I Eco88I SmaI ApaI Bsp120I
 5' G TAA AAC GAC GGC CAG TGA ATT CGA GCT CGG TAC CTC GCG AAT GCA TCT AGA TAT CCG ATC CCG GGC CC
 3' C ATT TTG CTG CCG GTC ACT TAA GCT CGA GCC ATG GAG CGC TTA CGT AGA TCT ATA GCC TAG GGC CCG GG
 HincII SalI XbaI PstI Eco147I PaeI HincIII 476
 G TCG ACT GCA GAG GCC TGC ATG CAA GCT TGG CGT AAT CAT GGT CAT AGC TGT TTC CTG 3'
 C AGC TGA CGT CTC CGG ACG TAC GTT CGA Acc GCA TTA GTA CCA GTA TCG ACA AAG GAC 5'
 M13/pUC reverse sequencing primer (-20), 17-mer

B



Lane M: Marker III
 Lane 1: 183739-2 plasmid
 Lane 2: 183739-2 plasmid dig
 by BamHI

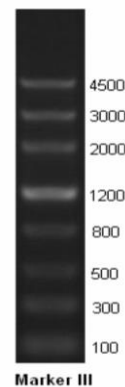


Figura A 1. A) Mapa da construção plasmidial contendo o gene para o fator transcricional Oct-4 contendo fusionada a sua região N-terminal a sequência codificadora da transportana 10. **B)** Análise e verificação da correta inserção do plasmídeo no vetor pUC57 através de eletroforese em gel de agarose 0,8 %. Onde o número 1 representa o plasmídeo inserido no vetor pUC57, o número 2 representada o plasmídeo após a clivagem do plasmídeo com a enzima de restrição BamHI e M representa o marcador de peso molecular, o qual está representado na figura a direita. A construção do plasmídeo bem como as análises realizadas foram efetuadas pela empresa GenScript.

ANEXO B

A



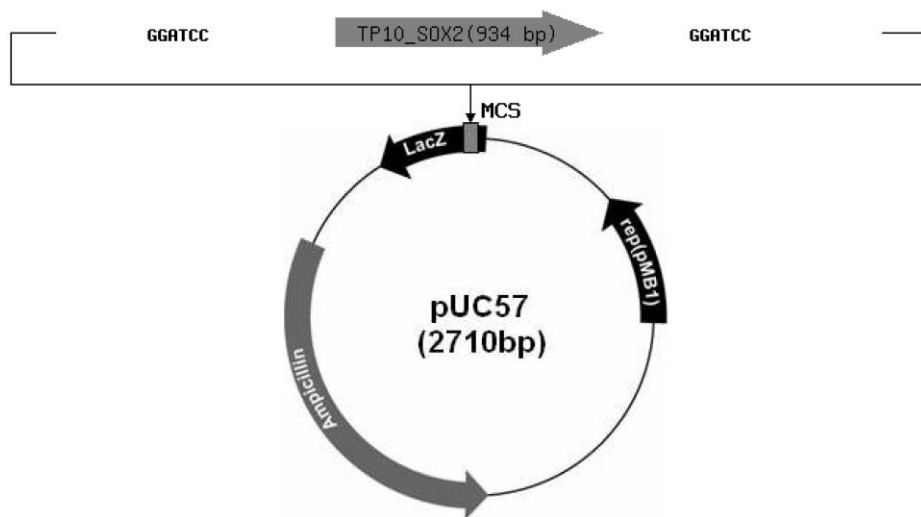
Your Innovation Partner in Drug Discovery!

Plasmid Construct Map

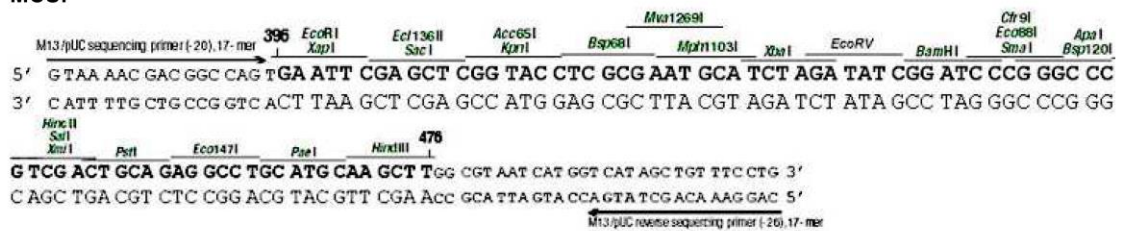
Order ID: 183739-5

Gene Name: TP10_SOX2

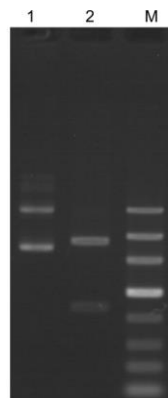
The TP10_SOX2 was cloned in pUC57 by BamHI.



MCS:



B



Lane M: Marker III
Lane 1: 183739-5 plasmid
Lane 2: 183739-5 plasmid digested by BamHI

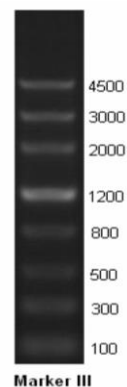


Figura B 1. A) Mapa da construção plasmidial contendo o gene para o fator transcricional Sox-2 contendo fusionada a sua região N-terminal a sequência codificadora da transportana 10. **B)** Análise e verificação da correta inserção do plasmídeo no vetor pUC57 através de eletroforese em gel de agarose 0,8 %. Onde o número 1 representa o plasmídeo inserido no vetor pUC57, o número 2 representada o plasmídeo após a clivagem do plasmídeo com a enzima de restrição BamHI e M representa o marcador de peso molecular, o qual está representado na figura a direita. A construção do plasmídeo bem como as análises realizadas foram efetuadas pela empresa GenScript.

ANEXO C

A



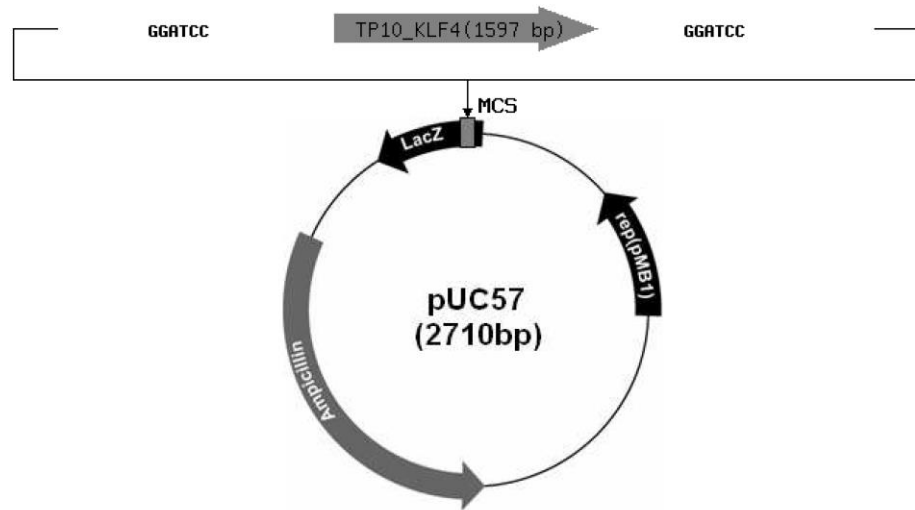
Your Innovation Partner in Drug Discovery!

Plasmid Construct Map

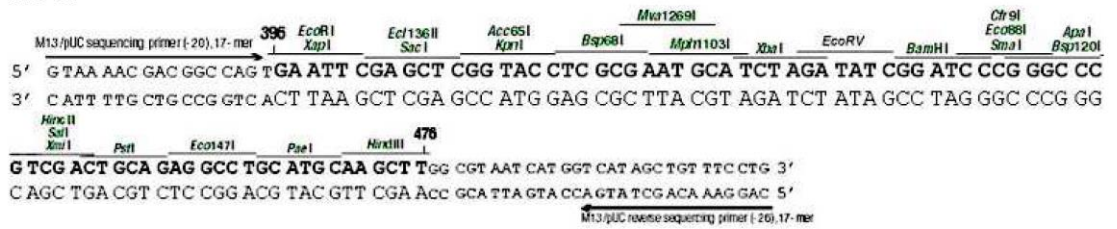
Order ID: 183739-4

Gene Name: TP10_KLF4

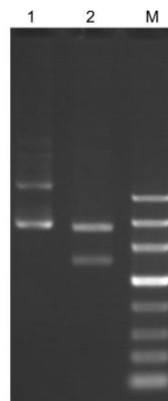
The TP10_KLF4 was cloned in pUC57 by BamHI.



MCS:



B



Lane M: Marker III
 Lane 1: 183739-4 plasmid
 Lane 2: 183739-4 plasmid digested by BamHI

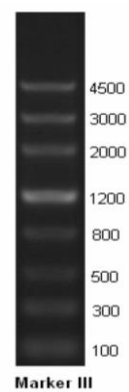


Figura C 1. A) Mapa da construção plasmidial contendo o gene para o fator transcricional Klf-4 contendo fusionada a sua região N-terminal a sequência codificadora da transportana 10. **B)** Análise e verificação da correta inserção do plasmídeo no vetor pUC57 através de eletroforese em gel de agarose 0,8 %. Onde o número 1 representa o plasmídeo inserido no vetor pUC57, o número 2 representada o plasmídeo após a clivagem do plasmídeo com a enzima de restrição BamHI e M representa o marcador de peso molecular, o qual está representado na figura a direita. A construção do plasmídeo bem como as análises realizadas foram efetuadas pela empresa GenScript.

ANEXO D

A



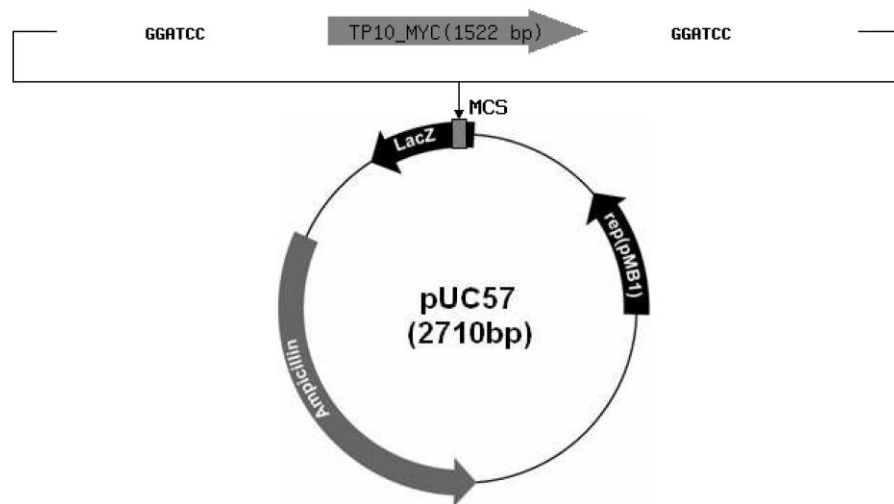
Your Innovation Partner in Drug Discovery!

Plasmid Construct Map

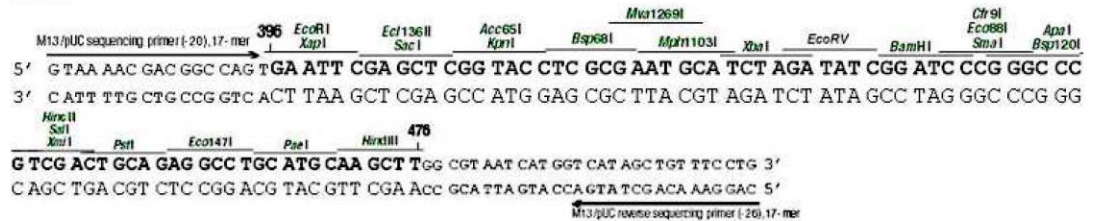
Order ID: 183739-3

Gene Name: TP10_MYC

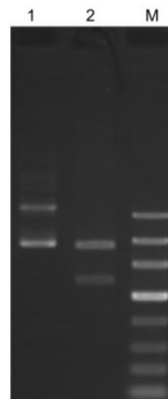
The TP10_MYC was cloned in pUC57 by BamHI.



MCS:



B



Lane M: Marker III
 Lane 1: 183739-3 plasmid
 Lane 2: 183739-3 plasmid digested by BamHI

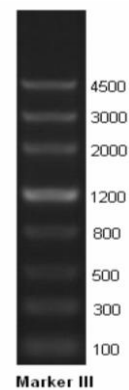


Figura D 1. A) Mapa da construção plasmidial contendo o gene para o fator transcricional c-Myc contendo fusionada a sua região N-terminal a sequência codificadora da transportana 10. **B)** Análise e verificação da correta inserção do plasmídeo no vetor pUC57 através de eletroforese em gel de agarose 0,8 %. Onde o número 1 representa o plasmídeo inserido no vetor pUC57, o número 2 representada o plasmídeo após a clivagem do plasmídeo com a enzima de restrição BamHI e M representa o marcador de peso molecular, o qual está representado na figura a direita. A construção do plasmídeo bem como as análises realizadas foram efetuadas pela empresa GenScript.

Referências Bibliográficas

- Beerens, A.M., Al Hadithy, A.F., Rots, M.G., and Haisma, H.J. (2003). Protein transduction domains and their utility in gene therapy. *Current gene therapy* 3, 486-494.
- Brignier, A.C., and Gewirtz, A.M. (2010). Embryonic and adult stem cell therapy. *The Journal of allergy and clinical immunology* 125, S336-344.
- Byrne, J.A., Pedersen, D.A., Clepper, L.L., Nelson, M., Sanger, W.G., Gokhale, S., Wolf, D.P., and Mitalipov, S.M. (2007). Producing primate embryonic stem cells by somatic cell nuclear transfer. *Nature* 450, 497-502.
- Campbell, K.H., McWhir, J., Ritchie, W.A., and Wilmut, I. (1996). Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. *Nature* 380, 64-66.
- Carter, E., Lau, C.Y., Tosh, D., Ward, S.G., and Mrsny, R.J. (2013). Cell penetrating peptides fail to induce an innate immune response in epithelial cells in vitro: implications for continued therapeutic use. *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik eV* 85, 12-19.
- Chamberlain, G., Fox, J., Ashton, B., and Middleton, J. (2007). Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem cells* 25, 2739-2749.
- Chen, M.J., Lu, Y., Hamazaki, T., Tsai, H.Y., Erger, K., Conlon, T., Elshikha, A.S., Li, H., Srivastava, A., Yao, C., *et al.* (2014). Reprogramming adipose tissue-derived mesenchymal stem cells into pluripotent stem cells by a mutant adeno-associated viral vector. *Human gene therapy methods* 25, 72-82.
- Chew, J.L., Loh, Y.H., Zhang, W., Chen, X., Tam, W.L., Yeap, L.S., Li, P., Ang, Y.S., Lim, B., Robson, P., *et al.* (2005). Reciprocal transcriptional regulation of Pou5f1 and Sox2 via the Oct4/Sox2 complex in embryonic stem cells. *Molecular and cellular biology* 25, 6031-6046.
- Eguchi, A., and Dowdy, S.F. (2009). siRNA delivery using peptide transduction domains. *Trends in pharmacological sciences* 30, 341-345.
- El-Andaloussi, S., Holm, T., and Langel, U. (2005). Cell-penetrating peptides: mechanisms and applications. *Current pharmaceutical design* 11, 3597-3611.
- El-Andaloussi, S., Jarver, P., Johansson, H.J., and Langel, U. (2007). Cargo-dependent cytotoxicity and delivery efficacy of cell-penetrating peptides: a comparative study. *The Biochemical journal* 407, 285-292.
- Ellis, T., Adie, T., and Baldwin, G.S. (2011). DNA assembly for synthetic biology: from parts to pathways and beyond. *Integrative biology : quantitative biosciences from nano to macro* 3, 109-118.
- Equbal, M.J., Srivastava, P., Agarwal, G.P., and Deb, J.K. (2013). Novel expression system for *Corynebacterium acetoacidophilum* and *Escherichia coli* based on the T7 RNA polymerase-dependent promoter. *Applied microbiology and biotechnology* 97, 7755-7766.

Foerg, C., and Merkle, H.P. (2008). On the biomedical promise of cell penetrating peptides: limits versus prospects. *Journal of pharmaceutical sciences* 97, 144-162.

Fraidenraich, D., and Benezra, R. (2006). Embryonic stem cells prevent developmental cardiac defects in mice. *Nature clinical practice Cardiovascular medicine* 3 *Suppl 1*, S14-17.

Fraser, M.J., Ciszczon, T., Elick, T., and Bauser, C. (1996). Precise excision of TTAA-specific lepidopteran transposons piggyBac (IFP2) and tagalong (TFP3) from the baculovirus genome in cell lines from two species of Lepidoptera. *Insect molecular biology* 5, 141-151.

Goldman, S. (2005). Stem and progenitor cell-based therapy of the human central nervous system. *Nature biotechnology* 23, 862-871.

Gonzalez, F., Barragan Monasterio, M., Tiscornia, G., Montserrat Pulido, N., Vassena, R., Batlle Morera, L., Rodriguez Piza, I., and Izpisua Belmonte, J.C. (2009). Generation of mouse-induced pluripotent stem cells by transient expression of a single nonviral polycistronic vector. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 8918-8922.

Gonzalez, F., Boue, S., and Izpisua Belmonte, J.C. (2011). Methods for making induced pluripotent stem cells: reprogramming a la carte. *Nature reviews Genetics* 12, 231-242.

Grinnell, K.L., Yang, B., Eckert, R.L., and Bickenbach, J.R. (2007). De-differentiation of mouse interfollicular keratinocytes by the embryonic transcription factor Oct-4. *The Journal of investigative dermatology* 127, 372-380.

Heitz, F., Morris, M.C., and Divita, G. (2009). Twenty years of cell-penetrating peptides: from molecular mechanisms to therapeutics. *British journal of pharmacology* 157, 195-206.

Hirschi, K.K., Li, S., and Roy, K. (2013). Induced Pluripotent Stem Cells for Regenerative Medicine. *Annual review of biomedical engineering*.

Inoue, H., Nagata, N., Kurokawa, H., and Yamanaka, S. (2014). iPS cells: a game changer for future medicine. *The EMBO journal* 33, 409-417.

Islam, M.Z., Ariyama, H., Alam, J.M., and Yamazaki, M. (2014). Entry of cell-penetrating peptide transportan 10 into a single vesicle by translocating across lipid membrane and its induced pores. *Biochemistry* 53, 386-396.

Jacobs, S.A., Roobrouck, V.D., Verfaillie, C.M., and Van Gool, S.W. (2013). Immunological characteristics of human mesenchymal stem cells and multipotent adult progenitor cells. *Immunology and cell biology* 91, 32-39.

Jarver, P., Mager, I., and Langel, U. (2010). In vivo biodistribution and efficacy of peptide mediated delivery. *Trends in pharmacological sciences* 31, 528-535.

Jiang, Y., Jahagirdar, B.N., Reinhardt, R.L., Schwartz, R.E., Keene, C.D., Ortiz-Gonzalez, X.R., Reyes, M., Lenvik, T., Lund, T., Blackstad, M., *et al.* (2002). Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 418, 41-49.

- Keating, A. (2012). Mesenchymal stromal cells: new directions. *Cell stem cell* *10*, 709-716.
- Kerkis, A., Hayashi, M.A., Yamane, T., and Kerkis, I. (2006). Properties of cell penetrating peptides (CPPs). *IUBMB life* *58*, 7-13.
- Kim, D., Kim, C.H., Moon, J.I., Chung, Y.G., Chang, M.Y., Han, B.S., Ko, S., Yang, E., Cha, K.Y., Lanza, R., *et al.* (2009a). Generation of human induced pluripotent stem cells by direct delivery of reprogramming proteins. *Cell stem cell* *4*, 472-476.
- Kim, J.B., Sebastiano, V., Wu, G., Arauzo-Bravo, M.J., Sasse, P., Gentile, L., Ko, K., Ruau, D., Ehrich, M., van den Boom, D., *et al.* (2009b). Oct4-induced pluripotency in adult neural stem cells. *Cell* *136*, 411-419.
- Kroon, E., Martinson, L.A., Kadoya, K., Bang, A.G., Kelly, O.G., Eliazar, S., Young, H., Richardson, M., Smart, N.G., Cunningham, J., *et al.* (2008). Pancreatic endoderm derived from human embryonic stem cells generates glucose-responsive insulin-secreting cells in vivo. *Nature biotechnology* *26*, 443-452.
- Lee, S.H., Castagner, B., and Leroux, J.C. (2013). Is there a future for cell-penetrating peptides in oligonucleotide delivery? *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik eV* *85*, 5-11.
- Li, H., and Fu, X. (2012). Mechanisms of action of mesenchymal stem cells in cutaneous wound repair and regeneration. *Cell Tissue Res* *348*, 371-377.
- Lindgren, M., Hallbrink, M., Prochiantz, A., and Langel, U. (2000). Cell-penetrating peptides. *Trends in pharmacological sciences* *21*, 99-103.
- Mayor, S., and Pagano, R.E. (2007). Pathways of clathrin-independent endocytosis. *Nature reviews Molecular cell biology* *8*, 603-612.
- Milletti, F. (2012). Cell-penetrating peptides: classes, origin, and current landscape. *Drug discovery today* *17*, 850-860.
- Mizuno-Yamasaki, E., Rivera-Molina, F., and Novick, P. (2012). GTPase networks in membrane traffic. *Annual review of biochemistry* *81*, 637-659.
- Nelson, T.J., Behfar, A., Yamada, S., Martinez-Fernandez, A., and Terzic, A. (2009). Stem cell platforms for regenerative medicine. *Clinical and translational science* *2*, 222-227.
- Nemes, C., Varga, E., Polgar, Z., Klincumhom, N., Purity, M.K., and Dinnyes, A. (2014). Generation of mouse induced pluripotent stem cells by protein transduction. *Tissue engineering Part C, Methods* *20*, 383-392.
- Okita, K., Hong, H., Takahashi, K., and Yamanaka, S. (2010). Generation of mouse-induced pluripotent stem cells with plasmid vectors. *Nature protocols* *5*, 418-428.
- Okita, K., and Yamanaka, S. (2011). Induced pluripotent stem cells: opportunities and challenges. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences* *366*, 2198-2207.
- Padari, K., Saalik, P., Hansen, M., Koppel, K., Raid, R., Langel, U., and Pooga, M. (2005). Cell transduction pathways of transportans. *Bioconjugate chemistry* *16*, 1399-1410.

- Pan, C., Lu, B., Chen, H., and Bishop, C.E. (2010). Reprogramming human fibroblasts using HIV-1 TAT recombinant proteins OCT4, SOX2, KLF4 and c-MYC. *Molecular biology reports* 37, 2117-2124.
- Parekkadan, B., and Milwid, J.M. (2010). Mesenchymal stem cells as therapeutics. *Annual review of biomedical engineering* 12, 87-117.
- Passier, R., van Laake, L.W., and Mummery, C.L. (2008). Stem-cell-based therapy and lessons from the heart. *Nature* 453, 322-329.
- Pesce, M., and Scholer, H.R. (2001). Oct-4: gatekeeper in the beginnings of mammalian development. *Stem cells* 19, 271-278.
- Peterson, G.L. (1983). Determination of total protein. *Methods in enzymology* 91, 95-119.
- Phinney, D.G. (2002). Building a consensus regarding the nature and origin of mesenchymal stem cells. *Journal of cellular biochemistry Supplement* 38, 7-12.
- Phinney, D.G., and Prockop, D.J. (2007). Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair--current views. *Stem cells* 25, 2896-2902.
- Pooga, M., Hallbrink, M., Zorko, M., and Langel, U. (1998). Cell penetration by transportan. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 12, 67-77.
- Prockop, D.J. (1997). Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science* 276, 71-74.
- Radzishewska, A., and Silva, J.C. (2014). Do all roads lead to Oct4? the emerging concepts of induced pluripotency. *Trends in cell biology* 24, 275-284.
- Rasmusson, I. (2006). Immune modulation by mesenchymal stem cells. *Exp Cell Res* 312, 2169-2179.
- Ren, G., Chen, X., Dong, F., Li, W., Ren, X., Zhang, Y., and Shi, Y. (2012). Concise review: mesenchymal stem cells and translational medicine: emerging issues. *Stem cells translational medicine* 1, 51-58.
- Rippon, H.J., and Bishop, A.E. (2004). Embryonic stem cells. *Cell proliferation* 37, 23-34.
- Segers, V.F., and Lee, R.T. (2008). Stem-cell therapy for cardiac disease. *Nature* 451, 937-942.
- Shi, Y., Hu, G., Su, J., Li, W., Chen, Q., Shou, P., Xu, C., Chen, X., Huang, Y., Zhu, Z., *et al.* (2010). Mesenchymal stem cells: a new strategy for immunosuppression and tissue repair. *Cell Res* 20, 510-518.
- Shi, Y., Su, J., Roberts, A.I., Shou, P., Rabson, A.B., and Ren, G. (2012). How mesenchymal stem cells interact with tissue immune responses. *Trends Immunol* 33, 136-143.
- Stadtfeld, M., Nagaya, M., Utikal, J., Weir, G., and Hochedlinger, K. (2008). Induced pluripotent stem cells generated without viral integration. *Science* 322, 945-949.

- Studier, F.W., and Moffatt, B.A. (1986). Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *Journal of molecular biology* *189*, 113-130.
- Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., and Yamanaka, S. (2007). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* *131*, 861-872.
- Takahashi, K., and Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* *126*, 663-676.
- Thomson, J.A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S.S., Waknitz, M.A., Swiergiel, J.J., Marshall, V.S., and Jones, J.M. (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* *282*, 1145-1147.
- Torchilin, V.P. (2008). Cell penetrating peptide-modified pharmaceutical nanocarriers for intracellular drug and gene delivery. *Biopolymers* *90*, 604-610.
- Volarevic, V., Arsenijevic, N., Lukic, M.L., and Stojkovic, M. (2011). Concise review: Mesenchymal stem cell treatment of the complications of diabetes mellitus. *Stem cells* *29*, 5-10.
- Wegmeyer, H., Broske, A.M., Leddin, M., Kuentzer, K., Nisslbeck, A.K., Hupfeld, J., Wiechmann, K., Kuhlen, J., von Schwerin, C., Stein, C., *et al.* (2013). Mesenchymal stromal cell characteristics vary depending on their origin. *Stem cells and development* *22*, 2606-2618.
- Weissman, I.L. (2000). Translating stem and progenitor cell biology to the clinic: barriers and opportunities. *Science* *287*, 1442-1446.
- Welinder, C., and Ekblad, L. (2011). Coomassie staining as loading control in Western blot analysis. *Journal of proteome research* *10*, 1416-1419.
- Woltjen, K., Michael, I.P., Mohseni, P., Desai, R., Mileikovsky, M., Hamalainen, R., Cowling, R., Wang, W., Liu, P., Gertsenstein, M., *et al.* (2009). piggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Nature* *458*, 766-770.
- Wu, T., Wang, H., He, J., Kang, L., Jiang, Y., Liu, J., Zhang, Y., Kou, Z., Liu, L., Zhang, X., *et al.* (2011). Reprogramming of trophoblast stem cells into pluripotent stem cells by Oct4. *Stem cells* *29*, 755-763.
- Yu, J., Hu, K., Smuga-Otto, K., Tian, S., Stewart, R., Slukvin, II, and Thomson, J.A. (2009). Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences. *Science* *324*, 797-801.
- Yu, J., and Thomson, J.A. (2008). Pluripotent stem cell lines. *Genes & development* *22*, 1987-1997.
- Yu, J., Vodyanik, M.A., Smuga-Otto, K., Antosiewicz-Bourget, J., Frane, J.L., Tian, S., Nie, J., Jonsdottir, G.A., Ruotti, V., Stewart, R., *et al.* (2007). Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* *318*, 1917-1920.
- Zhu, S., Li, W., Zhou, H., Wei, W., Ambasudhan, R., Lin, T., Kim, J., Zhang, K., and Ding, S. (2010). Reprogramming of human primary somatic cells by OCT4 and chemical compounds. *Cell stem cell* *7*, 651-655.