

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
– FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA –  
CAMPUS BOTUCATU

SEQÜENCIAMENTO E EXPRESSÃO DA  
TROMBOPOIETINA CANINA

CAMILO BULLA

Botucatu – São Paulo – Outubro / 2005

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
– FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA –  
CAMPUS BOTUCATU

# SEQÜENCIAMENTO E EXPRESSÃO DA TROMBOPOIETINA CANINA

CAMILO BULLA

Orientador: Profa. Ass. Dra. Regina Kiomi  
Takahira  
Co-orientador: Prof. Ass. Dr. João Pessoa  
Araújo Júnior

Tese apresentada no programa de pos-  
graduação em Medicina Veterinária, para a  
obtenção do grau de Doutor em Medicina  
Veterinária.

Botucatu – São Paulo – Outubro / 2005

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO  
DA INFORMAÇÃO  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: SELMA MARIA DE JESUS

Bulla, Camilo.

Seqüenciamento e expressão da trombopoietina canina / Camilo Bulla. –  
2005.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de  
Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2005.

Orientador: Regina Kiomi Takahira

Co-orientador: João Pessoa Araújo Junior

Assunto CAPES: 20801017

1. Proteínas - Biotecnologia 2. Biotecnologia 3. Cão  
CDD 574.19296  
CDD 636.7089

Palavras-chave: Cão; CHO DHFR-; Proteína recombinante; RcTPO; Trombo-  
poietina;

## Composição da Banca Examinadora

Autor:

---

Camilo Bulla.

Banca Examinadora:

---

Profa. Ass. Dra. Regina Kiomi Takahira.

---

Profa. Adjunta Sheila Canavese Rahal

---

Prof. Ass. Dr. Luis Artur Loyola Chardulo

---

Prof. Adjunto Luis Fernando Pita Gondim

---

Prof. Dr. Paulo Ricardo Oliveira Paes

*Dedico essa tese ao meu pai, cada vez mais meu herói.  
Dedico essa tese à minha filha, luz da minha vida.*

Agradecimentos especiais:

À minha irmã, que me deu tudo o que eu precisava na hora que eu mais precisava.

À minha mãe, que sempre se fez presente.

Agradecimentos.

Agradeço,

À Luciane Regina Chemin, por ter passado por tanta dificuldade para ver essa tese sair do forno.

À minha amiga e orientadora Regina Kiomi Takahira, pela confiança, pela educação que me proporcionou, pelo modelo profissional e pelo carinho com que me orientou durante esses anos.

Ao meu amigo e co-orientador, Prof. Dr. João Pessoa Araújo Jr, a amizade, o carinho, e o modelo de cientista e profissional que me inspirou durante esse caminho.

Ao meu amigo, Prof. Dr. Mike Scott, pela confiança, paciência e modelo de cientista e profissional que também me inspirou durante esse trabalho.

Ao meu amigo Marcelo da Costa Domingues, pelas madrugadas de trabalho e aprendizado, e pelas horas de descontração que passamos durante essa fase.

À minha amiga Telma Paparotto, pelo trabalho árduo e sério, que fazem dela a grande profissional que é.

À amiga Viviane von Ah Lopes, pelo apoio nos momentos difíceis e pelo companheirismo nos momentos agradáveis.

Ao amigo Willian Vitor de Oliveira, por ter me apresentado essa profissão de forma tão eloqüente, e ter me ensinado tanto sobre tanto.

Ao amigo Paulo Ricardo Paes, pelo incentivo á ciência, ao pensamento, e á indagação.

À Prof. Dra. Joanne Messick, por ter me deixado de cara para o gol.

Ao Prof. Dr. Alexander Biondo, por ter aberto a porta da sua casa.

À Denise, Maria, Carmem e Marlene, que me ajudaram tantas vezes.

Ao amigo Tom Goodwill, pelas aulas de inglês e pelo natal maravilhoso que me proporcionou.

A amiga Rosi, pelos papos sem-pé-nem-cabeça.

Ao amigo e colega Adam Aulbach, pelo apoio e ensinamentos que tanto me ajudaram a atingir os meus objetivos.

Às Professoras Julia Stickle, Cheryl Swenson e Jennifer Thomas, pelo carinho e confiança que tanto significam para mim.

Às amigas Carla, Lilian e Vanessa, que compartilharam de etapas importantes nesse percurso.

Aos amigos Rui e Ana, que compartilharam oportunidades muito importantes para mim.

A Silvia Regina Rogatto e a Cláudia Aparecida Rainho pela gentileza com que me auxiliaram nos meus problemas técnicos.

A todos os funcionários da FMVZ, que tornaram possível a minha formação, as minhas metas atingidas, a minha profissão...



## Lista de quadros, tabelas, figuras e abreviações.

µL	Microlitro
Asn	Asparagina
BFU	Unidade de Formadora de Explosão
CAMT	Trombocitopenia Congênita Megacariocítica
cDNA	DNA complementar
CFU	Unidade Formadora de Colônia
cm <sup>2</sup>	Centímetros quadrados
c-mpl	Receptor da Trombopoietina
CMV	Citomegalovírus
cPLA2	Fosfolipase Citoplasmática A2
DHFR	Di-hidro-folato-redutase
DMSO	Dimetil-sulfóxido
DNA	Acido Desoxirribonucleico
Dnase	Enzima que lisa DNA
dNTP	Dinucleotídeo-tri-fosfato
ELISA	Ensaio Imunoenzimático
EPO	Eritropoietina
ETs	Da família dos oncogenes <i>ets</i>
FGF	Fator de Crescimento de Fibroblastos
GATA 1	Proteína inibidora tipo dedo de zinco
G-CSF	Fator Estimulante de Colônia – Granulocítica
GW395058	Trombopoietina recombinante humana modificada
HEPES	Ácido 4-(2-hydroxiethyl)-1-piperazineetanesulfônico
HOXB4	Homeobox protein Hox-B4
IFN	Interferon
IgG4	Imunoglobulina G 4
IgM	Imunoglobulina M

IL	Interleucina
JAK	Janus kinase
KCL	Cloreto de Potássio
kD	Kilo Dalton
KMS	Síndrome Kasabach-Merritt
LEC	Células Hepáticas não Hematopoiéticas de Camundongo EC
MGDF	Fator de Crescimento e Desenvolvimento de Megacariócitos
MK	Megacariócitos
mM	Milimolar
MPLV	Vírus da Leucemia Proliferativa Murina
MTX	Metrotexato
PA	Região indutora de poliadenilação
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PDGF	Fator de Crescimento e Desenvolvimento de Plaquetas
PEG-rHuMGDF	Trombopoietina Recombinante Humana Peglicada
poli-A	Cauda de poli-adenina
RhTPO	Trombopoietina Recombinante Humana
RNA <sub>m</sub>	RNA mensageiro
Rnase	Enzima que lisa RNA
Rpm	Rotações por minuto
SCF	Fator Estimulante de Colônia
STAT	Transdutores de Sinal e Ativadores de Transcrição
SV40	Vírus Símio 40
TBE	Tampão Tris-Boro-EDTA
TNF	Fator de Necrose Tumoral
TPO	Trombopoietina
U	Unidades
v/v	Volume/Volume
v-mpl	Oncogene do Vírus da Leucemia Proliferativa Murina
µg	Microgramas

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE QUADROS, TABELAS, FIGURAS E ABREVIACÕES. ....</b>	<b>IX</b>
<b>SUMÁRIO .....</b>	<b>XI</b>
<b>RESUMO. ....</b>	<b>XVI</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>XVIII</b>
<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>2</b>
<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>2</b>
SINONÍMIA .....	2
DESCOBRIMENTO DA TPO .....	2
EXPRESSÃO. ....	3
BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR. ....	4
REGULAÇÃO DA PRODUÇÃO. ....	5
COMUNICAÇÃO CELULAR. ....	6
MEGACARIOCITOPOIESE E PRODUÇÃO PLAQUETÁRIA. ....	6
OUTRAS LINHAGENS HEMATOPOIÉTICAS. ....	7
LINHAGENS CELULARES NÃO HEMATOPOIÉTICAS. ....	8
APLICAÇÕES. ....	8
<i>Ferramenta diagnóstica. ....</i>	<i>8</i>
<i>Terapêutica. ....</i>	<i>9</i>
FARMACOCINÉTICA. ....	11
POSSÍVEIS PROBLEMAS. ....	11
<b>OBJETIVOS. ....</b>	<b>14</b>
<b>MATERIAL E MÉTODOS. ....</b>	<b>16</b>
REALIZAÇÃO DO PROJETO. ....	17
ANIMAL E TECIDOS ANIMAIS. ....	17
EXTRAÇÃO DE RNA.....	17
BIBLIOTECAS DE CDNA. ....	17

SEQÜÊNCIAS DE NUCLEOTÍDEOS UTILIZADAS. ....	18
OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES (PRIMERS). ....	18
AMPLIFICAÇÕES POR PCR OU “NESTED” PCR. ....	19
CLONAGEM DOS PRODUTOS DA NESTED PCR PARA AMPLIFICAÇÃO DO cDNA DA TPO CANINA. ....	20
SEQÜENCIAMENTOS .....	21
AMPLIFICAÇÃO DO cDNA DA TPO CANINA. ....	22
CLONAGEM DOS PRODUTOS DA NESTED PCR PARA AMPLIFICAÇÃO DO cDNA DA TPO CANINA. ....	22
SEQÜENCIAMENTO DOS CLONES COM OS PRODUTOS DA “NESTED” PCR PARA AMPLIFICAÇÃO DO cDNA DA TPO CANINA. ....	22
ADIÇÃO DA CITOSINA NA POSIÇÃO –3 E ADIÇÃO DA REGIÃO DE RECONHECIMENTO DA ENTEROKINASE. ....	22
CLONAGEM DOS PRODUTOS DA PCR CONTENDO A CITOSINA NA POSIÇÃO –3 E A REGIÃO DE RECONHECIMENTO DA ENTEROKINASE. ....	23
SEQÜENCIAMENTO DOS PRODUTOS DA PCR CLONADOS, CONTENDO A CITOSINA NA POSIÇÃO –3 E A REGIÃO DE RECONHECIMENTO DA ENTEROKINASE. ....	23
GATEWAY REACTION (INVITROGEN LIFE TECHNOLOGIES INC.) .....	23
OBTENÇÃO DO CONJUNTO PROMOTOR+TPO+SEQÜÊNCIA ESTIMULADORA DA CAUDA DE POLI-A (PROM+TPO+PA). ....	24
CLONAGEM DOS PRODUTOS DA PCR CONTENDO O CONJUNTO PROM+TPO+PA. .....	24
SEQÜENCIAMENTO DOS CLONES CONTENDO O CONJUNTO PROM+TPO+PA. ....	25
OBTENÇÃO DO cDNA QUE CODIFICA A DI-HIDRO-FOLATO-REDUTASE MURINA (DHFR). ....	25
CLONAGEM DOS PRODUTOS DA PCR CONTENDO O cDNA QUE CODIFICA A DHFR MURINA. ....	25
SEQÜENCIAMENTO DOS CLONES COM OS PRODUTOS DA PCR CONTENDO O cDNA QUE CODIFICA A DHFR MURINA. ....	25
GATEWAY REACTION (INVITROGEN LIFE TECHNOLOGIES INC.) .....	26

OBTENÇÃO DO CONJUNTO PROMOTOR+DHFR+SEQÜÊNCIA ESTIMULADORA DA CAUDA DE POLI-A (PROM+DHFR+PA). .....	26
CLONAGEM DOS PRODUTOS DA PCR CONTENDO O CONJUNTO PROM+DHFR+PA. ....	26
SEQÜENCIAMENTO DOS CLONES COM OS PRODUTOS DA PCR CONTENDO O CONJUNTO PROM+DHFR+PA. ....	26
OBTENÇÃO DE GRANDE QUANTIDADE DE PLASMÍDEOS CONTENDO PROM+TPO+PA E PROM+DHFR+PA. ....	26
OBTENÇÃO DOS FRAGMENTOS CONTENDO PROM+TPO+PA E PROM+DHFR+PA COM UMA EXTREMIDADE COESIVA E UMA NÃO COESIVA. ....	27
OBTENÇÃO DO PRODUTO CONTENDO OS DOIS FRAGMENTOS: PROM+TPO+PA E PROM+DHFR+PA. ....	28
DESFOSFORILAÇÃO DAS EXTREMIDADES NÃO COESIVAS DO PRODUTO LIGADO. ...	28
ADIÇÃO DA ADENINA NA EXTREMIDADE 3' DO FRAGMENTO PROM+TPO+PA COM PROM+DHFR+PA. ....	29
CLONAGEM DO FRAGMENTO PROM+TPO+PA COM PROM+DHFR+PA. ....	29
OBTENÇÃO DE GRANDE QUANTIDADE DE PLASMÍDEOS CONTENDO PROM+TPO+PA COM PROM+DHFR+PA. ....	29
OBTENÇÃO DA LINHAGEM CELULAR UTILIZADA. ....	30
CULTIVO E PROPAGAÇÃO DA CHO/DHFR-.....	30
PREPARAÇÃO DAS PLACAS PARA TRANSFECCÃO. ....	30
TRANSFECCÃO DAS CHO/DHFR- COM OS PLASMÍDEOS CONTENDO PROM+TPO+PA E PROM+DHFR+PA. ....	30
TRATAMENTO DOS CLONES TRANSFECTADOS COM METROTEXATO. ....	31
TESTE DA OCORRÊNCIA DE EXPRESSÃO DA TPO NAS CHO TRANSFECTADAS.....	31
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>33</b>
<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>51</b>
<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>59</b>

<b>TRABALHO A SER ENVIADO PARA A REVISTA: “VETERINARY CLINICAL PATHOLOGY - AN INTERNATIONAL JOURNAL OF LABORATORY MEDICINE” .....</b>	<b>69</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>84</b>
SEQÜÊNCIAS DOS VETORES UTILIZADOS: .....	84
<i>pCR8/GW/TOPO</i> .....	84
<i>pcDNA-DEST40</i> .....	86
<i>pCR2.1-TOPO</i> .....	89

# **Resumo / Abstract**

## Resumo.

Camilo Bulla

Seqüenciamento e Expressão da Trombopoietina Canina, Botucatu, 2005, pp126, tese de Doutorado, Universidade Estadual Paulista – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – campus Botucatu.

A trombopoietina (TPO) é o principal hormônio estimulador da maturação de megacariócitos e produção plaquetária. O nível sérico da TPO pode ser utilizado como um marcador de produção plaquetária, e a TPO recombinante humana tem sido testada na recuperação de tratamentos que causam mielossupressão e na estimulação da produção plaquetária em doadores de plaquetas. O objetivo do presente trabalho é obter a seqüência do cDNA da TPO canina, e criar um modelo de expressão da TPO recombinante canina (rcTPO) em células de ovário de hamster (CHO) deficientes em di-hidrofolato-redutase (DHFR) (CHO DHFR-). Bibliotecas de cDNA hepático e renal canino foram utilizadas para amplificação da seqüência da TPO canina por meio de uma “nested” PCR, e um produto de 1293 bp contendo a seqüência do cDNA da TPO canina foi clonado e seqüenciado. Esse produto e o produto amplificado por PCR, de uma biblioteca de cDNA esplênico murino, contendo a seqüência do cDNA que codifica a DHFR murina, foram utilizadas para a construção de um plasmídeo para expressão em células mamíferas contendo as seqüências do cDNA da TPO canina e da DHFR murina. CHO DHFR- foram transfectadas com o plasmídeo gerado e então tratadas com metrotexato para estimular a multiplicação da seqüência do plasmídeo introduzido. A expressão da rcTPO foi constatada pela amplificação, por “nested” PCR usando primers específicos para a TPO canina, de um fragmento da TPO canina a partir de uma amostra RNAm obtido das CHO transfectadas. Podemos concluir que



apesar de termos encontrado diferença entre a seqüência protéica deduzida a partir da seqüência do cDNA que obtivemos, e a seqüência deduzida anteriormente que está disponível na literatura, a nossa seqüência de nucleotídeos é semelhante à publicada no projeto genoma do cão. Essa é a primeira vez que a seqüência de nucleotídeos do cDNA que codifica a TPO canina é publicada e essa seqüência completa um intervalo de 427 pb não disponível no projeto genoma do cão. Por final, podemos também concluir que a estimulação da amplificação do material transfectado com metrotexato foi efetiva, e que os clones demonstraram estarem produzindo a rcTPO.

## **Abstract**

Camilo Bulla

Canine Thrombopoietin Sequencing and Expression, Botucatu, 2005, pp126, Ph.D. Dissertation, Universidade Estadual Paulista – Faculdade de Medicina e Zootecnia – campus Botucatu.

Thrombopoietin (TPO) is the major hormone in megakaryocyte maturation and platelet production. TPO serum levels showed to be a good marker to platelet production. Also, recombinant TPO has been used to minimize the recovery time from myelosuppressive treatment; and to induce platelet production in platelet donors. The objectives of the present study is sequencing the canine TPO cDNA and create a recombinant canine TPO (rcTPO) expression model using hamster ovary cells (CHO) di-hydro-folato-reductase negative (DHFR-). Hepatic and renal canine cDNA were used as template in a nested PCR to amplify the canine cDNA TPO sequence, which generated a 1293 bp product with the sequence of canine cDNA TPO. The fragment was cloned, sequenced and compared with the available canine genome sequence and a deduced amino acid sequence. This product and a fragment amplified from a murine splenic cDNA library containing the murine DHFR cDNA sequence were used to build an expression plasmid used to transfect CHO DHFR-. Transfected cells were methotrexate treated, in order to amplify the inserted sequence, and then tested for TPO expression by a nested PCR using cDNA produced from transfected cells as template, showing that rcTPO expression is present. In conclusion, although we found a different amino acid between our deduced protein sequence and a previous available one, our nucleotide sequence is similar to the published in the dog genome. This is the first time the canine TPO cDNA nucleotide sequence is published and it fills a large gap of 427 bp present in the canine genome. Finally, we were

able to prove that transfection and methotexate treatment worked in generating a cell colony capable to express canine recombinant TPO.

# **Introdução**

## **Introdução**

Estados trombocitopênicos são comuns nos cães. Trombocitopenias podem ser provenientes de qualquer causa de consumo plaquetário, deficiência de produção, aumento de destruição ou simplesmente por mobilização para órgãos onde ocorre estocagem de plaquetas. Ultimamente doenças endêmicas como a Ehrlichiose Monocítica Canina, ou Babesiose têm aumentado muito o número de animais trombocitopênicos presentes no dia-a-dia da clínica de pequenos animais; outras causas recentes para esse aumento são as novas possibilidades terapêuticas como as usadas no tratamento anticâncer; e por fim, o aumento do diagnóstico devido ao aumento dos pedidos de avaliação plaquetária. Um tratamento para as trombocitopenias, bem como testes que possibilitem a avaliação da etiopatogenia desses processos seriam muito bem vindos na prática da Clínica Veterinária de pequenos animais.

## **Revisão Bibliográfica**

### **Sinonímia**

A Trombopoietina (TPO), também conhecida como Fator de Desenvolvimento e Crescimento de Megacariócitos (MGDF) e ligante do c-mpl, é a principal citocina no processo de maturação dos megacariócitos (MK)s e no aumento do número de plaquetas circulantes.

### **Descobrimto da TPO**

A existência de um fator específico para o desenvolvimento de MK era reconhecida desde 1958, o fator era considerado como sendo o regulador primário da produção plaquetária (CSERHATI & KELEMEN, 1958; KELEMEN, et al., 1958), porém as tentativas de purificação durante a década de 70 e 80 não foram bem sucedidas (DASSIN, et al., 1983; EVATT, et al., 1979; HILL & LEVIN, 1986; MCDONALD & NOLAN, 1979; VANNUCCHI, et al., 1986). Apenas em 1992 o proto-oncogene c-mpl foi clonado, possibilitando a purificação da TPO (VIGON, et al., 1992). O v-mpl é um oncogene murino que

faz parte do genoma do vírus da leucemia proliferativa (MPLV) (SOUYRI, et al., 1990), e o gene celular homólogo c-mpl codifica o receptor para a citocina hematopoiética restrita a diferenciação da linhagem megacariocítica. Usando a o receptor Mpl, cDNAs que correspondiam ao ligante foram isolados em humanos, porcos, cães e camundongos (METHIA, et al., 1995). O estudo do c-mpl, demonstrou tratar-se de um receptor de citocina hematopoiética, e a sua distribuição sugeriu que se tratava do receptor da TPO. Em 1994, cinco grupos foram capazes de purificar ou clonar a TPO (BARTLEY, et al., 1994; DE SAUVAGE, et al., 1994; KUTER, et al., 1994; LOK, et al., 1994; WENDLING, et al., 1994).

Bartley et al., em 1994 referem em seu trabalho o seqüenciamento do cDNA da TPO canina. No entanto o trabalho apenas mostra a seqüência protéica da TPO canina deduzida a partir da seqüência do cDNA. Em outro trabalho, duas formas de TPO canino, com pesos moleculares de 25 kD 31 kD e dividindo uma seqüência similar de aminoácidos na região N-terminal, foram isolados em 1994 (HUNT, et al., 1995).

### **Expressão.**

A TPO é expressa em vários tecidos: abundantemente no fígado, rins, músculo, cólon, cérebro, e intestinos; e moderadamente na medula óssea, baço, pulmões, estômago, coração, timo, ovário, linhagens celulares endoteliais e leucêmicas. Os níveis de TPO transcritos nos órgãos de maior produção, fígado e rins; e nos locais de produção plaquetária, medula óssea e baço, são constantes, mesmo durante trombocitopenia aguda induzida por administração de anticorpos monoclonais anti-plaquetas em camundongos ou durante trombocitose pós-injeção de TPO (NAGATA, et al., 1997). No entanto, aparentemente, em humanos, o fígado é único órgão cuja falência causa trombocitopenia por diminuição dos níveis séricos de TPO, o que demonstra a sua importância em manter as concentrações séricas de TPO (ESPANOL, et al., 2000; FAEH, et al., 2001; GOULIS, et al., 1999).

### **Bioquímica e Biologia Molecular.**

O gene humano da TPO se encontra no cromossomo três, nas regiões 3q26-28. A estrutura genômica tem 68 Kb, sete exons e seis introns, e a proteína é codificada pelos exons três ao sete (BARTLEY, et al., 1994). Já no cão, o gene da TPO se encontra no cromossomo 34. A análise da região promotora demonstrou receptores para vários fatores importantes, incluindo GATA 1 e membros da família ETs (DEVEAUX, et al., 1996). A presença do fator de transcrição GATA-1 pode significar que existe a estimulação da expressão da TPO causada por cortisol, já que GATA-1 é uma proteína que inibe a transcrição do DNA, e que é estruturalmente relacionada com o módulo de zinco do receptor de cortisol (LUISI, et al., 1991). Já família dos ETs são proteínas codificadas por um oncogene, o *Hu-ets* (ROVIGATTI, et al., 1986).

A TPO codificada pelo cDNA humano é um polipeptídeo de 35 kD e 353 aminoácidos, e tem 31 kD e 332 aminoácidos após a clivagem do peptídeo sinal (BARTLEY, et al., 1994). A TPO é um polipeptídeo de 352, 349, 356, 326 aminoácidos no cão, gato, camundongo e rato, respectivamente (BARTLEY, et al., 1994; MATSUSHIRO, et al., 1998). O domínio amino-terminal da TPO é altamente conservado entre as espécies, e mantém alguma similaridade com a eritropoietina (EPO). A seqüência de aminoácidos da TPO tem 20% de identidade e 25% de similaridade com a EPO (GEDDIS, et al., 2002). Esse domínio tem quatro cisteínas conservadas, que são responsáveis pela formação de duas cistinas (pontes dissulfídicas) necessárias para atividade biológica da TPO. O domínio carboxi-terminal é menos conservado e contém várias cadeias de carboidratos ligadas a si, que são importantes na estabilidade molecular e para o mecanismo de secreção da TPO (KATO, et al., 1998; KAUSHANSKY, 1999; MUTO, et al., 2000), aumentando a meia-vida na corrente sanguínea. Dentre as seis glicosilações ligadas ao nitrogênio do domínio C-terminal, duas [Asparagina na posição 213 da proteína (Asn 213) e Asn 234] são sabidamente críticas para a secreção da TPO e duas outras (Asn 319 e Asn 327) não afetam a secreção (MUTO, et al., 2000). O peso de uma

TPO recombinante humana glicosilada secretada por células de ovário de hamster é por volta de 80 a 100 kD (KATO, et al., 1998; KAUSHANSKY, 2002) mostrando que a glicosilação pode responder por metade do peso molecular da TPO.

### **Regulação da Produção.**

Apesar de já ter sido postulado que a regulação da concentração sérica da TPO é feita pela produção e ligação da TPO em MKs e plaquetas, aparentemente a principal fonte de receptores provém dos MKs, pois a diminuição do número de MKs pode aumentar os níveis séricos de TPO mais que a diminuição da massa plaquetária (NAGASAWA, et al., 1998). Além disso, foi proposto que a contagem plaquetária não é exatamente inversamente proporcional ao nível sérico de TPO. Durante trombocitopenia aguda, os níveis de TPO sérica aumentaram transientemente poucas horas após a injeção de anticorpos anti-plaquetas, e retornaram aos níveis basais tão logo os MKs maduros se acumularam na medula óssea e no baço, ainda que a contagem plaquetária se mantivesse baixa. MKs maduros na medula óssea aumentaram quando os níveis séricos de TPO diminuíram, e diminuíram quando as contagens plaquetárias retomaram os níveis normais. Assim, já que a TPO é constitutivamente expressa em vários órgãos, os níveis de TPO não são regulados por alteração na expressão, mas pela massa plaquetária e, de forma mais intensa, pela contagem de MKs na medula óssea e no baço (NAGATA, et al., 1997). Porém, apesar de menos intenso, o papel das plaquetas pode ser considerado importante na regulação dos níveis séricos da TPO, já que reduções estatisticamente significativas na mediana da concentração de TPO foram observadas como resposta a transfusões plaquetárias (MOLLER, et al., 2000). A TPO é reconhecidamente produzida constitutivamente no fígado e rins, porém nas células do estroma da medula óssea a produção pode ser regulada. Um estudo testando o papel das proteínas dos  $\alpha$ -grânulos demonstrou que o Fator de Crescimento derivado de Plaquetas (PDGF) BB e o Fator de crescimento Fibroblástico (FGF)-2 estimularam a expressão do RNAm



tanto de uma forma dose dependente quanto ligada ao tempo, mostrando que um mecanismo de retroalimentação positiva é estimulado para regular a produção de TPO nas células do estroma da medula óssea (SUNGARAN, et al., 2000).

O aumento de produção de RNAm da TPO na inflamação aguda hepática trouxe evidências de que a TPO pode responder como uma proteína de fase aguda da inflamação (WOLBER, et al., 2001). Corroborando com essa teoria, foi proposto que IL-6 pode aumentar a expressão de TPO no fígado e, conseqüentemente, a sua concentração sérica (KASER, et al., 2001). Existem também indícios de que o cortisol tenha a capacidade de aumentar a produção de TPO, o que poderia sugerir um comportamento de proteína inflamatória crônica da TPO (GEDDIS, et al., 2002).

#### **Comunicação Celular.**

A ligação da TPO no receptor c-mpl presente nos MKs estimula a via de sinalização celular JAK/STAT. O receptor c-mpl ligado a TPO fosforila JAK2, que faz o mesmo com STAT3 e STAT5. Os STATs então translocam ao núcleo e ativam genes como ciclina D1, p27, p21, e Bcl-xL estimulando a maturação dos MKs (GEDDIS, et al., 2002).

#### **Megacariocitopoiese e Produção Plaquetária.**

Mesmo que a TPO sozinha não consiga aumentar o número de progenitores da linhagem megacariocítica, ela pode causar o aumento de interleucina (IL)-3 que, por sua vez, é um estimulante das fases mais remotas da linhagem megacariocítica capaz de induzir a proliferação e diferenciação de progenitores dos Mks das células tronco hematopoiéticas (CARDIER, et al., 1996), aumentar a ploidia e o tamanho dos MKs, e promover o crescimento da unidade formadora de colônia megacariocítica (CFU-MK) *in vitro*, e ainda mais, estimular a formação de pseudópodes e a liberação de plaquetas funcionais (KAUSHANSKY, et al., 1994). A IL-6, IL-11, o ligante do kit e o ligante do Flt-3 mostraram ser capazes de estimular o desenvolvimento dos MKs a partir de

células mielóides CD-34+ (KU, et al., 1996; ZEIGLER, et al., 1994). A trombocitose observada em pacientes em tratamento com heparina sugere que a heparina pode funcionar também como agonista da TPO *in vivo* (CHEN, et al., 1999).

A administração de TPO em animais saudáveis causa o aumento de plaquetas circulantes e, o aumento do número de CFU-MKs e do tamanho e ploidia dos MKs (KAUSHANSKY, et al., 1994). Em cães, a TPO recombinante humana pode aumentar o número de plaquetas circulantes, mas não aumenta a função plaquetária (PENG, et al., 1996). A falta de TPO em camundongos “Knockout” causa uma diminuição de 80 a 90% do número de plaquetas na circulação periférica e diminuição do número de células progenitoras (MURONE, et al., 1998).

#### **Outras Linhagens Hematopoiéticas.**

A TPO também pode aumentar os números de CFU-granulócito/eritrócito/macrófago/megacariócito (GEMM) e BFU-GEMM, CFU-megacariócito, CFU-granulócito/macrófago e BFU-eritrócito, mas o efeito na circulação periférica está limitado a intensos aumentos da contagem de plaquetas. A razão dos números de leucócitos e eritrócitos manterem-se estáveis mesmo após os efeitos generalizados da TPO está provavelmente ligada ao efeito regulatório predominante do G-CSF e da EPO. Assim, na ausência do aumento dos reguladores dominantes de cada linhagem, a expansão dos progenitores não causa o aumento da série em questão na circulação periférica. No entanto, nos casos de aumento de demanda de células sanguíneas, como após terapia mielossupressiva, o aumento da EPO e do G-CSF permitem que os efeitos da TPO na eritropoiese e na mielopoiese se manifestem (KAUSHANSKY, et al., 1996). Resultados *in vitro* sugerem que é necessário também um receptor de EPO para que ocorra a atividade eritróide da TPO (ROULEAU, et al., 2004). Quando comparadas a várias outras citocinas testadas em um estudo, o ligante do Kit e a TPO foram as citocinas mínimas necessárias para induzir divisão celular de células tronco

hematopoiéticas de forma eficiente, e a atividade de repopulação multilinhagem foi percebida em células derivadas de uma porção significativa isoladas após cultura na presença de TPO e ligante do Kit (NAKAUCHI, et al., 2001).

Este papel da TPO tanto na regulação da megacariocitopoiese quanto na hematopoiese primitiva parece ser a explicação do defeito de hematopoiese em Trombocitopenia Congênita Megacariocítica (CAMT) em humanos, levando ao aparecimento de um estado pancitopênico (GERMESHUSEN, et al., 2001a; GERMESHUSEN, et al., 2001b).

### **Linhagens celulares não hematopoiéticas.**

A estimulação com TPO das células hepáticas não hematopoiéticas de camundongo EC (LEC-1) localizadas nos sinusóides que co-expressam TPO e c-mpl, induziu a secreção de citocinas pró-inflamatórias (i.e., IL-1  $\beta$ , IL6, TNF- $\alpha$ ). A proliferação das LEC-1 foi induzida pela TPO na presença de TNF- $\alpha$ , e na presença de IFN- $\gamma$ , que sozinho tinha uma ação inibitória no crescimento dessas células (CARDIER, 1999).

### **Aplicações.**

#### Ferramenta diagnóstica.

A TPO pode ter um papel importante para aplicação em diagnóstico. Durante estados trombocitopênicos em humanos, a diferenciação entre as etiologias relacionadas das não relacionadas à diminuição dos números de MKs na medula óssea pode ser feita quantificando os níveis séricos da TPO. Os níveis séricos de TPO aumentam em trombocitopenias relacionadas à hipoplasia ou aplasia megacariocíticas, mas não em casos de hiperplasias (PORCELIJN, et al., 1998).

Os níveis séricos da TPO aumentam em pacientes com sepsis e em pacientes em choque septicêmico o aumento é ainda maior. Em casos de sepsis ou de choque septicêmico as mudanças nos níveis séricos da TPO não são proporcionais às alterações nas concentrações plaquetárias. Baseando-se nesses achados, acredita-se que a intensidade da sepsis seja uma

determinante importante dos níveis séricos de TPO, e que a contagem plaquetária se apresentem como um determinante secundário. Por isso, a quantificação da TPO pode funcionar também como um marcador para severidade de sepsis. (ZAKYNTHINOS, et al., 2004).

A combinação da contagem de plaquetas reticuladas e dos níveis séricos da TPO pode também ser útil para diferenciar algumas causas de trombocitopenias crônicas em pacientes pediátricos, evitando, a realização de exames invasivos, ao menos em parte dos pacientes. (RAJANTIE, et al., 2004).

Um caso atípico de trombocitemia essencial, no qual a trombocitose resultou da estimulação da TPO e não apenas de proliferação clonal, foi relatada levando-se a conclusão de que a mensuração da concentração sérica da TPO pode ser valiosa para crianças com trombocitose extrema sem explicações (HANKINS, et al., 2004).

#### Terapêutica.

Várias aplicações para o uso da TPO como um agente terapêutico foram estudadas até a presente data. Uma das mais importantes é no auxílio da recuperação dos pacientes com câncer submetidos ao transplante de medula óssea, quando a TPO aumenta durante o momento do transplante, mas diminui drasticamente após três semanas (YOSHIMURA, et al., 2000). A TPO foi avaliada como suporte terapêutico nesses pacientes submetidos a terapias mielossupressivas, onde se demonstrou, não apenas importante ao melhorar a recuperação do estado trombocitopênico, mas também acelerou a recuperação das linhagens eritróide e neutrofílica (STEFANICH, et al., 2001). A expressão exacerbada de HOXB4 aumenta o número de progenitoras de colônias mistas eritróide/mielóide *in vitro* (HELGASON, et al., 1996), e a TPO aumenta a expressão de HOXB4, que dessa forma, aumenta a recuperação das células tronco sanguíneas (KIRITO, et al., 2003).

A administração de TPO imediatamente após quimioterapia ou regimes preparatórios para transplante autólogo da medula óssea pode prevenir apoptose dependente de p53, diminuir mielossupressão e reduzir a necessidade de transfusões de plaquetas (PESTINA, et al., 2001). A TPO

modificada, GW395058, um peptídeo tratado com polietileno glicol foi também testado em cães em tratamento quimioterápico reduzindo os efeitos trombocitopênicos da carboplatina sem ser observado nenhum efeito adverso (CASE, et al., 2000). Além de em cães, em primatas não humanos, o uso de TPO recombinante humana (rhTPO) também ajudou na recuperação do número de plaquetas após quimioterapia de uma forma dose dependente (HARKER, et al., 1996).

Uma forma recombinante da molécula completa humana, um fragmento contendo apenas a região N-terminal, onde o sítio ativo se encontra, ligada a polietileno glicol (PEG-rHuMGDF), é expressa a por *Escherichia coli*. Essa molécula é capaz de aumentar as contagens plaquetárias e pode ser útil em um grande número de situações clínicas (BEGLEY & BASSER, 2000; ROULEAU, et al., 2004). Além da modificada PEG-rHuMGDF, a rhTPO também foi testada em camundongos, ratos, cães, primatas não humanos, pacientes com câncer e voluntários saudáveis não causando forma alguma de dano hepático, toxicidade renal ou pulmonar, lesão capilar, coagulopatia, toxicidade hematopoiéticas ou resposta de fase aguda. Pacientes trombocitopênicos transfundidos com doações de plaquetas de doadores tratados com TPO mantêm contagem plaquetárias mais altas e por maiores períodos sem necessidade de novas transfusões que os que recebem transfusões de doadores não tratados com TPO (GOODNOUGH, et al., 2001).

O uso de TPO é possivelmente o tratamento de escolha para as trombocitopenias em pacientes cirróticos, já que a produção diminuída de plaquetas pelos megacariócitos ocorre devido à diminuição da concentração de TPO (PANASIUK, et al., 2004). Apesar de trombocitopenia ser comum em hepatopátas com e sem cirrose, a diminuição dos níveis séricos de TPO é observada mais freqüentemente em pacientes cirróticos (PECK-RADOSAVLJEVIC, et al., 1998). O uso de rhTPO pode possivelmente ajudar também pacientes com trombocitopenias intensas em tratamento com interferon (IFN). O tratamento com IFN é utilizado em pacientes com hepatite C crônica e comumente causa trombocitopenia devido à inibição da medula

óssea. Apesar de ser esperado um aumento nos níveis séricos de TPO após o tratamento com IFN, apenas um aumento moderado foi visto nos pacientes não cirróticos.

O tratamento com TPO pode ser valioso na prevenção das complicações que põem em risco a vida dos pacientes com Kasabach-Merritt (KMS). A síndrome KMS é vista em crianças com grandes tumores vasculares e é caracterizada por contagens plaquetárias muito baixas e consumo dos fatores de coagulação. Foi proposto que trombocitopenia nesses pacientes seria causada por ligação intratumoral das plaquetas, baseando-se no efeito anti-tumoral da ligação plaquetária ao tumor, observado em um modelo de KMS, onde há aumento de produção plaquetária (VERHEUL, et al., 1999).

Camundongos tratados com rhTPO, após o transplante de sangue do cordão umbilical, demonstraram ter de duas a seis vezes mais células CD45 (precursores de leucócitos) do que os não tratados, com aumento proporcional das células sanguíneas (VERSTEGEN, et al., 2003).

Apesar de diretamente a TPO não ter um efeito pró-coagulatório a TPO pode aumentar a ativação da fosfolipase A2 pela via extracelular regulada por sinal Kinase 2 – cPLA2 citoplasmática (cPLA2) sensibilizando a  $\alpha$ -trombina (VAN, et al., 2000), no entanto a IL-6 é capaz de ativar as plaquetas por essa via de forma mais intensa (BURSTEIN, et al., 1996).

### **Farmacocinética.**

A excreção da rhTPO após o tratamento é feita principalmente pelo sistema renal, mas concentrações altas também foram vistas na medula óssea. Já no pulmão, tecido adiposo e nas adrenais as concentrações eram similares a plasmática, a menor concentração foi encontrada no cérebro (LIU, et al., 2001).

### **Possíveis problemas.**

A utilização de doses consecutivas da PEGrhMGDF em voluntários saudáveis de plaquetofereze causou, em 1% dos indivíduos (três doadores), o

desenvolvimento de intensa trombocitopenia. A análise detalhada do quadro demonstrou que, a não ser pela facilidade de formar hematomas, nenhuma dessas pessoas teve episódio hemorrágico mais importante; nenhuma respondeu a imunoglobulina ou prednisona endovenosa, e no exame da medula óssea, foi observada uma intensa diminuição do número de MKs. Todos os três pacientes trombocitopênicos apresentaram auto-anticorpos que reagiram também com a TPO endógena neutralizando sua atividade biológica. Todos os anticorpos anti-TPO eram IgG, com aumento da fração IgG4, e sem a presença de IgM em momento algum (LI, et al., 2001).

Existem evidências de que a TPO pode colaborar na etiopatogenia da hipertensão. Pacientes com hipertensão têm aumento da concentração de TPO nas artérias pulmonares, e nos ventrículos direito e esquerdo, o que pode sugerir um papel importante da TPO (HAZNEDAROGLU, et al., 2002).

A TPO pode também ter um papel importante na etiopatogenia da mielofibrose. Foi demonstrado, que a liberação de TPO dos MKs e TGF- $\beta$  dos polimorfonucleares, pode levar à ativação fibroblástica (SCHMITT, et al., 2002).

O tratamento de curto prazo (até cinco dias) com PEG-rHuMGDF em ratos causou discreta diminuição do número de hemáceas devido, principalmente, ao aumento no volume plasmático e sanguíneo. Porém, esses eventos foram explicados como alterações secundárias à regulação da produção excessiva de plaquetas e de MKs na medula óssea (HARADA, et al., 1999).

# Objetivos



**Objetivos.**

Pelos motivos abordados na introdução e na revisão bibliográfica, os objetivos primários do presente estudo são obter a seqüência do cDNA que codifica a TPO canina e comparar a seqüência obtida com as disponíveis na literatura; e criar uma série celular mamífera estável capaz de produzir a TPO recombinante canina.

# Material e Métodos

## Material e Métodos.

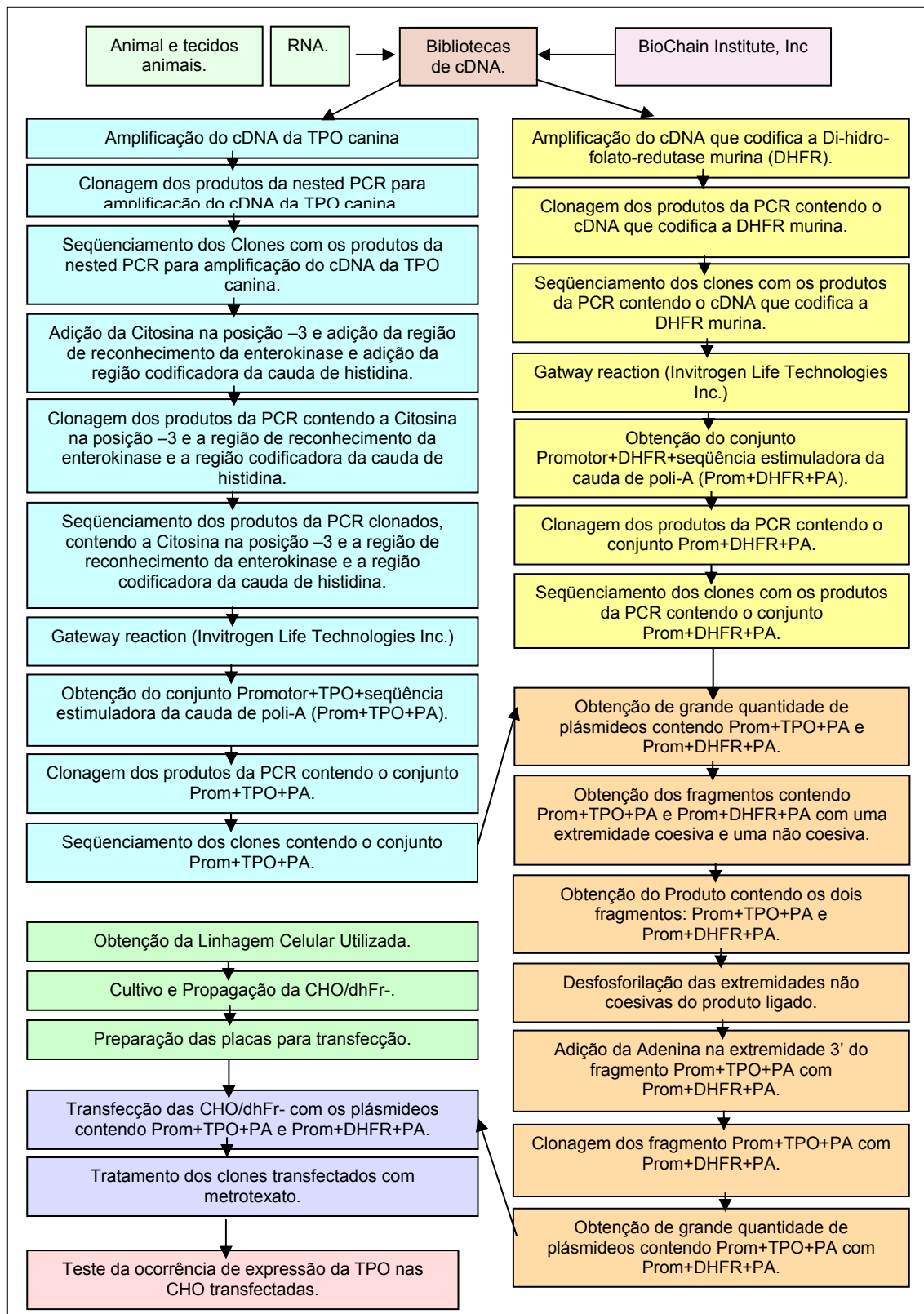


FIGURA 1. Desenho experimental.

**Realização do projeto.**

O projeto foi iniciado no Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biociências da Unesp campus Botucatu. O conhecimento produzido durante essa primeira fase foi utilizado mais tarde para o reinício do projeto na Michigan State University. Assim, aqui estão sendo relatados apenas os dados e protocolos produzidos no Department of Pathobiology and Diagnostic Investigation do College of Veterinary Medicine, na Michigan State University.

**Animal e tecidos animais.**

Um cão saudável da raça Beagle, parte de um outro projeto de pesquisa, foi eutanasiado com o aval do “All-University-Committee for Animal Use and Care of Michigan State University” (comitê de ética no uso e manejo animal). Amostras de tecido hepático e renal foram colhidas com lâmina de bisturi logo após a parada cardíaca do animal. Os tecidos foram acondicionados imediatamente em microtubos livres de RNase e DNase e congelados em gelo seco. Toda manipulação dos tecidos foi feita utilizando-se luvas de vicril.

**Extração de RNA.**

A extração do RNA foi feita usando o reagente Trizol (Invitrogen Life Technologies) e seguindo as recomendações do fabricante. A concentração e a qualidade do RNA foram avaliadas após a extração com o uso de um espectrofotômetro. A concentração de RNA foi estimada pela fórmula: “concentração do RNA = absorvância medida X 40 ug/mL” e a qualidade foi avaliada pela relação de leituras OD260/OD280 considerando uma amostra de boa qualidade a que apresentava relação acima de 1,7. As amostras de RNA hepático e renal foram então combinadas formando um pool.

**Bibliotecas de cDNA.**

Uma biblioteca de cDNA renal foi adquirida da BioChain Institute, Inc. e uma outra foi gerada a partir do RNA extraído. O cDNA adquirido foi utilizado numa primeira fase da padronização da PCR para amplificar a TPO canina, e

pool o obtido a partir do RNA extraído (descrito no item anterior) foi utilizado para a reação final. A biblioteca de cDNA esplênico murina utilizada para amplificação do cDNA que codifica a di-hidro-folato-redutase também foi adquirida da BioChain Institute, Inc.

### **Seqüências de nucleotídeos utilizadas.**

Comparando-se as seqüências já publicadas da TPO humana (Gene Bank: NM\_000460) com o genoma do cão recém publicado no “Gene Bank”, foram selecionadas regiões anteriores ao “start códon” e posteriores ao “stop códon”. Essa comparação foi feita no “website” da University of Califórnia at Santa Cruz (<http://genome.ucsc.edu/>).

A seqüência utilizada do RNAm que codifica o DHFR foi obtida no “Gene Bank” (código de referência: NM\_010049).

As seqüências dos vetores utilizados (pCR8/GW/TOPO números no catálogo: K250020 e K252020, pcDNA-DEST40 número no catálogo: 12274015, pCR2.1-TOPO números no catálogo: K450001, K450040, K451020, K452001, K452040, K455001, K455040, K456001, K456040) foram obtidas no “website” da Invitrogen Life Technologies ([www.Invitrogen.com](http://www.Invitrogen.com)).

### **Oligonucleotídeos iniciadores (primers).**

As seqüências dos primers utilizados foram todas desenhadas usando a ferramenta “on line” do “website” <http://scitools.idtdna.com/Primerquest/> e escolhidas baseadas na posição de fusão, e nos possíveis problemas como formação de “hairpins”, dímeros com primers semelhantes ou com outros. A partir dessa metodologia foram desenhados primers para amplificação e seqüenciamento do cDNA que codifica a TPO canina, para a amplificação e seqüenciamento do conjunto promotor+TPO+seqüência estimuladora da cauda de poli-A, para amplificação do cDNA que codifica a DHFR murina e para a amplificação e seqüenciamento do segmento promotor+DHFR+seqüência estimuladora da cauda de poli-A. Utilizando-se como base as seqüências obtidas a partir da comparação do RNAm da TPO humana com a do genoma

do cão, a seqüência do RNAm do DHFR murino, a seqüência dos vetores de transporte utilizados e a seqüência do vetor de expressão utilizado, os seguintes primers foram desenhados (Tabela 1):

Tabela 1. Nome e seqüência dos primers utilizados.

Nome	Seqüência 5' → 3'
TPO 4 For	TACCAGACAGCCAGGCCAGAAT
TPO 2 Rev	GAGCATGTAGAGAATTAGTAAGCTGT
TPO 2For	ATGGAGCTGACTGAATTGCT
TPO 4 Rev	CCAAAGATAACTAGCTGCTCTGGTGA
TPO INI	GTTATGGAGCTGACTGAATTGCTCCTC
Ek tpo rev I	TCATCGTCCTCCTCCTGAGACAGATTCTGGAAGTGAGG
Ek tpo rev II	C TTATCGTCATCGTCCTCCTCCTGAGACAGATTCTGGA
dhfr forw	ACTTGACGGCAATCCTAGCGTGAA
dhfr rev	GGGAGCAGAGAACTTGAAAGCATC
Cmv for	CTCGAGTTGTGTGTTGGAGGTCGCTGAGTA
Tag rev	AGCTGGTTCTTTCCGCCTCAGAA
GW for	GTTGCAACAAATTGATGAGCAATGC
GW rev	TAATTGCTCATCAATTTGTTGCAAC
Ia for	TCTTCCCTTCTGGGACAGCTTTCTG
Ib for	AGGACACATGGACCCTTGAATGGA
Ic rev	GGCCCTCTAGATCAACCACTTTGT
Ia for	TCTTCCCTTCTGGGACAGCTTTCTG
Ib for	AGGACACATGGACCCTTGAATGGA
IIIa for	GTGTATCATATGCCAAGTACGCCC
IIIb for	TAGAGAACCCACTGCTTACTGGCT
IIIc rev	AAATGAGCTCCTCGTGGTGGTTCT

### Amplificações por PCR ou “nested” PCR.

Cada PCR continha tampão de reação 1X (50mM KCl, 20mM tris-HCl (pH 8,4), 0,1% Triton X-100), 1,75mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2mM dNTPs, 1µM de primers específicos para a TPO canina (TPO 4 For e TPO 2 Ver), 0,625U DNA polymerase High Fidelity (Roche) e água ultrapura autoclavada trazendo para um volume final de 25 µL. A reação se desenvolveu em uma etapa inicial de desnaturação a 94<sup>o</sup>C por 10 minutos seguida de 40 ciclos de 94<sup>o</sup>C para

desnaturação por 60 segundos, ligação dos primers na temperatura ideal, por 60 segundos e então extensão a 72<sup>o</sup>C por um tempo ideal para o tamanho da região a ser amplificada. A última etapa consistia de extensão do oligonucleotídeo iniciador a 72<sup>o</sup>C por 4 minutos e então a reação era mantida a 4<sup>o</sup>C.

Em se tratando de um “nested” PCR, as reações eram então levadas a uma segunda amplificação. As segundas reações ocorreram nas mesmas condições da primeira reação com exceção dos oligonucleotídeos e amostras utilizadas. As amostras utilizadas eram 2 $\mu$ L da primeira reação e os oligonucleotídeos utilizados eram os específicos para cada reação. Após completa a segunda PCR, 10 $\mu$ l das reações eram separadas em gel de agarose (a concentração dependia dos tamanhos dos fragmentos a serem separados. Como uma regra geral, para fragmentos > 500 pb gel a 1,5%, entre 500 – 1000 bp gel a 1,0%, >1000 pb gel a 0.7%) com 1,0% de brometo de etídeo adicionado em tampão Tris acetato EDTA (TEA) a 90 volts e por aproximadamente 1 hora ou até que as bandas pudessem ser apropriadamente observadas em visualizador UV e comparadas com a escala.

### **Clonagem dos produtos da nested PCR para amplificação do cDNA da TPO canina.**

As reações que geraram produtos do tamanho desejado foram clonadas utilizando-se kits de clonagem (Invitrogen Life Technologies) seguindo-se as recomendações do fabricante. Foram utilizados 2 $\mu$ L de cada reação e tempos que variavam com o tamanho do produto para ligação com o vetor. A identificação dos clones foi feita primeiramente pelo meio seletivo contendo o antibiótico específico para cada Kit e então com extração de DNA plasmideal utilizando-se QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen Inc.) de acordo com recomendação dos fabricantes, seguido de digestão com Eco RI (New England Biolabs Inc.) também seguindo-se as recomendações do fabricante. Depois de completa a digestão, 10 $\mu$ l da reação foram separados em um gel de agarose a 0,7% com 1,0% brometo de etídeo adicionado em tampão Tris Acetato EDTA

(TAE) a 90 volts por aproximadamente 1 hora ou até que as bandas pudessem ser apropriadamente observadas em visualizador UV e comparadas com a escala.

### Seqüenciamentos

Todos os seqüenciamentos foram feitos com cinco clones dos DNAs plasmídeos selecionados. O material foi mandado para o serviço de seqüenciamento da Michigan State University conjuntamente com os primers específicos para cada seqüência. As seqüências obtidas foram comparadas entre si utilizando-se o “software” Lasergene 5 Suite, DNASTar Inc. ver. 5.0.6 (Win, MacOS) (Figura 2). Os clones que não continham erros foram selecionados e congelados em freezer  $-80^{\circ}\text{C}$ .

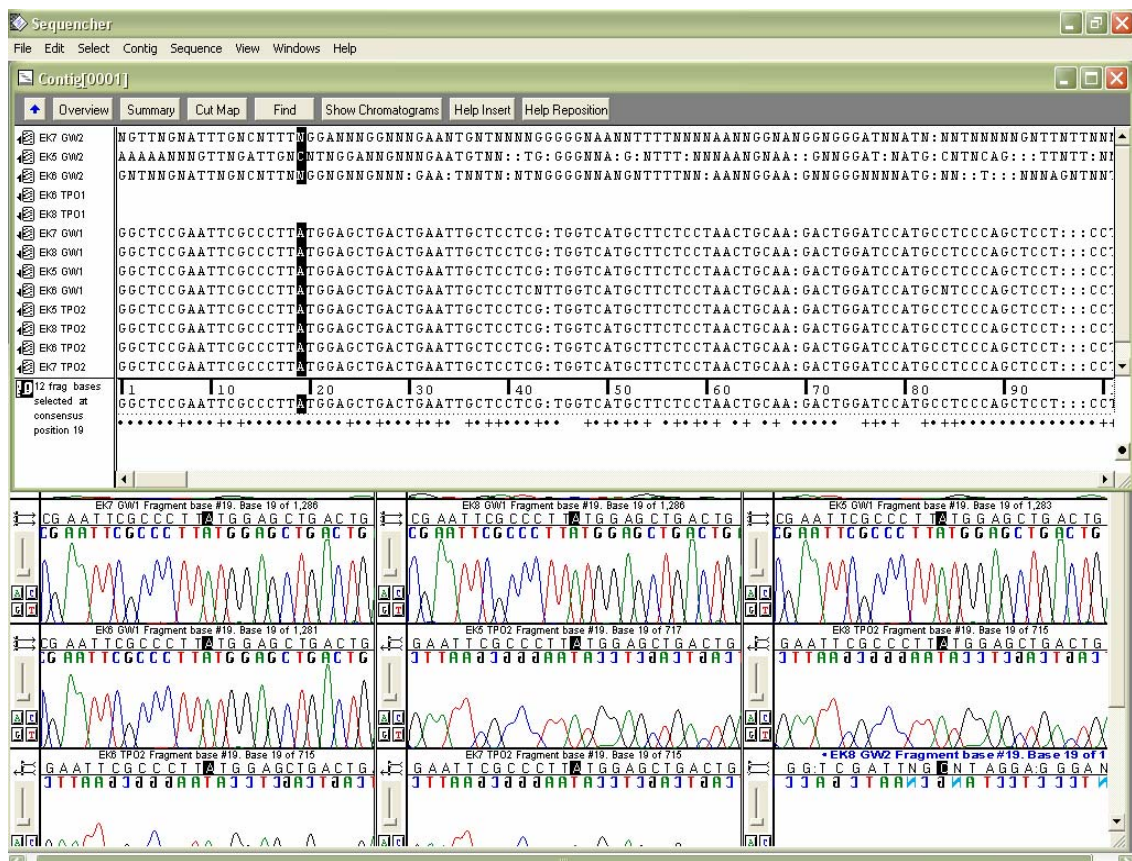


FIGURA 2. Figura ilustrativa de “software” fazendo pareamento das seqüências obtidas do seqüenciamento da TPO.



### **Amplificação do cDNA da TPO canina.**

O cDNA da TPO canina foi amplificado em uma “nested” PCR. A primeira reação utilizou-se aproximadamente 0,5 a 1,0 µg de cDNA como amostra para amplificar a seqüência da TPO canina. Os primers utilizados foram: TPO 4 For e TPO 2 Rev. A ligação desses primers foi realizada a 53<sup>o</sup>C por 60 segundos e então extensão por 60 segundos.

Os primers utilizados para a segunda reação foram TPO 2 For e TPO 4 Rev. Para a visualização do produto foi utilizado um gel de agarose a 1,5% e 1Kb DNA Ladder, New England Biolabs Inc.

### **Clonagem dos produtos da nested PCR para amplificação do cDNA da TPO canina.**

As reações que geraram produtos do tamanho desejado (1293bp) foram clonadas utilizando-se o pCR<sup>®</sup>8/GW/TOPO<sup>®</sup> TA Cloning Kit with One Shot<sup>®</sup> TOP10 Chemically Competent *E. coli* (Invitrogen Life Technologies). Foram utilizados 30 minutos para ligação do produto com o vetor. O antibiótico utilizado no meio seletivo foi espectinomicina. A escala utilizada foi (1Kb DNA Ladder, New England Biolabs Inc.) sendo considerado um clone positivo o que continha um inserto de aproximadamente 1300 bp.

### **Seqüenciamento dos Clones com os produtos da “nested” PCR para amplificação do cDNA da TPO canina.**

Os primers GW for, GW rev, tpo seq I for e tpo seq II rev foram utilizados para o seqüenciamento.

### **Adição da Citosina na posição –3 e adição da região de reconhecimento da enterokinase.**

Utilizando-se o clone selecionado como amostra para a primeira reação, três PCRs se seguiram com o objetivo de adicionar uma citosina na região –3 (CXXATG), e para a retirada do “stop códon” e adição da região de reconhecimento da enterokinase. As reações foram feitas utilizando-se o

mesmo protocolo, variando-se apenas os primers e as amostras utilizadas, sendo que o produto de cada etapa anterior era usado como amostra para a seguinte.

O primer “forward” utilizado foi sempre o mesmo: TPO INI e os “reverses” foram utilizados nessa ordem: Stop codon TPO rev, Ek tpo rev I, Ek tpo rev II.

Na primeira reação utilizou-se aproximadamente 1,0 µL do DNA plasmideal do clone selecionado como amostra e nas próximas foram utilizadas 2 µL da etapa anterior. A temperatura para a ligação dos primers foi 43<sup>o</sup>C e a extensão foi feita por 90 segundos em cada ciclo.

### **Clonagem dos produtos da PCR contendo a Citosina na posição –3 e a região de reconhecimento da enterokinase.**

O produto obtido no final da série de reações tinha 1071 bp. Esse produto foi então clonado utilizando-se o pCR<sup>®</sup>8/GW/TOPO<sup>®</sup> TA Cloning Kit with One Shot<sup>®</sup> TOP10 Chemically Competent *E. coli* (Invitrogen Life Technologies) e foram esperados 30 minutos para ligação do produto com o vetor. O meio seletivo contendo espectinomicina foi utilizado. Para visualização em gel usou-se a escala 1Kb DNA Ladder, New England Biolabs Inc. sendo considerado um clone positivo o que continha um inserto de aproximadamente 1100 bp.

### **Seqüenciamento dos produtos da PCR clonados, contendo a Citosina na posição –3 e a região de reconhecimento da enterokinase.**

Os primers GW for, GW rev, tpo seq I for e tpo seq II rev foram utilizados para o seqüenciamento.

### **Gateway reaction (Invitrogen Life Technologies Inc.)**

A passagem do inserto do vetor de transporte pCR<sup>®</sup>8/GW/TOPO<sup>®</sup> (Invitrogen Life Technologies Inc.) para o vetor de expressão pcDNA-DEST40 (Invitrogen Life Technologies Inc.) foi feita utilizando-se Gateway<sup>®</sup> LR

Clonase™ II enzyme mix (Invitrogen Life Technologies Inc.) seguindo as recomendações do fabricante. A identificação dos clones foi feita primeiramente pelo meio seletivo contendo ampicilina e então com extração de DNA plasmideal utilizando-se QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen Inc.) de acordo com recomendação dos fabricantes, seguido de digestão com Eco RI (New England Biolabs Inc.) também seguindo as recomendações do fabricante. Depois de completa a digestão, 10 $\mu$ l da reação foram separados em um gel a 1,5% de agarose com 1,0% de brometo de etídeo adicionado em tampão Tris acetato EDTA (TAE) a 90 volts por aproximadamente 1 hora ou até que as bandas pudessem ser apropriadamente visualizadas e comparadas com a escala (1Kb DNA Ladder, New England Biolabs Inc.) sendo selecionado o clone que continha o inserto do tamanho esperado.

#### **Obtenção do conjunto Promotor+TPO+seqüência estimuladora da cauda de poli-A (Prom+TPO+PA).**

Para se obter o conjunto Prom+TPO+PA foi realizada uma nova PCR utilizando o DNA plasmideal do clone selecionado na etapa anterior como amostra e os primers Cmv for e Tag rev.

A temperatura de ligação foi 50<sup>0</sup>C e a extensão foi feita por 120 segundos. O produto foi comparado com a escala 1Kb DNA Ladder, New England Biolabs Inc.

#### **Clonagem dos produtos da PCR contendo o conjunto Prom+TPO+PA.**

Os produtos de 2510 bp foram clonados utilizando-se o TOPO TA Cloning® for Sequencing with One Shot® Mach1™ T1 Phage-Resistant Chemically Competent *E. coli* (Invitrogen Life Technologies). A ligação do produto com o vetor foi feita durante a noite (aproximadamente 12 horas) e o meio seletivo continha Ampicilina.

Para a visualização utilizou-se gel de agarose 0,7% até que as bandas pudessem ser apropriadamente visualizadas e comparadas com a escala 1Kb

DNA Ladder, New England Biolabs Inc. sendo considerado um clone positivo o que continha as bandas de aproximadamente 2500 bp.

#### **Seqüenciamento dos clones contendo o conjunto Prom+TPO+PA.**

Os primers GW for, la for, lb for, lc rev e GW rev que foram utilizados para o seqüenciamento.

#### **Obtenção do cDNA que codifica a Di-hidro-folato-redutase murina (DHFR).**

O cDNA da DHFR murina foi amplificado por uma PCR. A reação utilizou aproximadamente 0.5 a 1.0 µg do cDNA esplênico murino adquirido (BioChain Institute, Inc.) como amostra para amplificar a seqüência da DHFR murina. A temperatura utilizada para ligação do oligonucleotídeo iniciador foi 55<sup>o</sup>C e a extensão foi feita por 45 segundos.

Os produtos foram comparados com a escala 100 bp DNA Ladder, New England Biolabs Inc. gerando um produto de 641 bp.

#### **Clonagem dos produtos da PCR contendo o cDNA que codifica a DHFR murina.**

Os produtos de 641 bp foram clonados utilizando-se o pCR<sup>®</sup>8/GW/TOPO<sup>®</sup> TA Cloning Kit with One Shot<sup>®</sup> TOP10 Chemically Competent *E. coli* (Invitrogen Life Technologies) como descrito anteriormente. Nessa etapa, foram utilizados 30 minutos para ligação do produto com o vetor.

Foram considerados positivos clones com inserto de aproximadamente 650 bp.

#### **Seqüenciamento dos clones com os produtos da PCR contendo o cDNA que codifica a DHFR murina.**

Os primers Gw for e Gw rev foram utilizados para o seqüenciamento.

**Gateway reaction (Invitrogen Life Technologies Inc.)**

A reação foi feita como descrita anteriormente.

**Obtenção do conjunto Promotor+DHFR+seqüência estimuladora da cauda de poli-A (Prom+DHFR+PA).**

Para se obter o conjunto Prom+DHFR+PA foi realizada uma nova PCR utilizando-se o DNA plasmideal do clone selecionado na etapa anterior como amostra e os primers Cmv for e Tag rev.

Foi utilizada uma temperatura de ligação do oligonucleotídeo iniciador de 50°C e a extensão por 120 segundos.

A escala utilizada para a comparação do tamanho do produto da reação foi 1Kb DNA Ladder, New England Biolabs Inc.

**Clonagem dos produtos da PCR contendo o conjunto Prom+DHFR+PA.**

A clonagem foi efetuada como descrita no item “Obtenção do conjunto Promotor+TPO+seqüência estimuladora da cauda de poli-A (Prom+TPO+PA)”.

Foi considerado um clone positivo o que continha inserto de aproximadamente 2100 bp.

**Seqüenciamento dos clones com os produtos da PCR contendo o conjunto Prom+DHFR+PA.**

Os primers GW for, IIIa for, IIIb for, IIIc rev, GW rev foram utilizados para o seqüenciamento.

**Obtenção de grande quantidade de plasmídeos contendo Prom+TPO+PA e Prom+DHFR+PA.**

Os clones selecionados foram cultivados por 12 horas em 400mL de meio Luria-Bertani líquido contendo 50 mM de Ampicilina em uma estufa a 37°C com movimento orbital de 300 rpm, e então o DNA plasmideal foi extraído

utilizando-se QIAGEN INC. Plasmid Maxi Kit (Qiagen Inc.) de acordo com recomendação do fabricante.

### **Obtenção dos fragmentos contendo Prom+TPO+PA e Prom+DHFR+PA com uma extremidade coesiva e uma não coesiva.**

Por meio da seqüência conhecida dos insertos e dos plasmídeos e o uso do “software” Lasergene 5 Suite, DNASTar Inc. ver. 5.0.6 (Win, MacOS) foi construído um mapa de restrição, e foram encontradas enzimas capazes de fazer a digestão separando os fragmentos do vetor de forma a deixar uma extremidade coesiva e outra não coesiva.

Foi realizada uma digestão com três enzimas para se obter o fragmento Prom+TPO+PA. Em um microtubo foram adicionados 25 µg do plasmídeo contendo Prom+TPO+PA, 120.000U Ava I (New England Biolabs Inc.), 240.000U Eco RV (New England Biolabs Inc.), 120.000U Hind III (Invitrogen Life Technologies Inc.), tampão REact® 2 (Invitrogen Life Technologies Inc.) levando a uma solução final 50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM NaCl e 1 µg/ml Albumina sérica Bovina (New England Biolabs Inc.), água ultra-pura autoclavada foi adicionada para completar 90 µL. A reação foi mantida a 37°C por 90 minutos.

Para se obter o fragmento Prom+DHFR+PA. Em um microtubo foram adicionados 25 µg do plasmídeo contendo Prom+DHFR+PA, 240.000U Eco RV (New England Biolabs Inc.), 120.000U Hind III (Invitrogen Life Technologies Inc.), tampão REact® 2 (Invitrogen Life Technologies Inc.) levando a uma solução final 50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM NaCl e 1 µg/ml Albumina sérica Bovina (New England Biolabs Inc.), água ultra-pura autoclavada foi adicionada para completar 90 µL. A reação foi mantida a 37°C por 90 minutos.

Os produtos obtidos foram separados em gel de agarose a 0,7% com brometo de etídeo. A banda maior da reação para se obter Prom+TPO+PA e a banda menor da reação para se obter Prom+DHFR+PA foram recortadas, e o DNA extraído com QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen Inc.) seguindo as

recomendações do fabricante. Os dois fragmentos foram então misturados em uma única solução.

#### **Obtenção do Produto contendo os dois fragmentos: Prom+TPO+PA e Prom+DHFR+PA.**

Para se ligar os dois fragmentos obtidos e purificados foi padronizada uma reação de ligação usando T4 DNA Ligase (Invitrogen Life Technologies). A reação foi padronizada utilizando 15 $\mu$ L da solução contendo os dois fragmentos, 1U de T4 DNA Ligase (Invitrogen Life Technologies), nas seguintes condições: 50 mM Tris-HCl (pH 7,6), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM ATP, 1 mM DTT, 25% (w/v) polyethylene glicol-8000. A reação ocorreu a 16<sup>o</sup>C por 12 horas.

Os produtos obtidos foram separados em gel de agarose a 0,7% com brometo de etídeo. A banda do meio continha a ligação do fragmento Prom+TPO+PA com Prom+DHFR+PA e por isso foi recortada, o DNA extraído com QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen Inc.) seguindo as recomendações do fabricante.

#### **Desfosforilação das extremidades não coesivas do produto ligado.**

A retirada do radical fosfato da extremidade 3' dos fragmentos cortados com Eco RV se faz necessária para que o tratamento com Taq polimerase seja efetivo.

Essa desfosforilação foi obtida por um tratamento do produto ligado com fosfatase alcalina intestinal de bezerro (Calf Intestinal Alkaline Phosphatase, Invitrogen Life Technologies). A reação foi padronizada utilizando-se 35  $\mu$ L do fragmento Prom+TPO+PA com Prom+DHFR+PA, 10U fosfatase alcalina intestinal de bezerro nas seguintes condições: 50 mM Tris-HCl (pH 8,5), 0,1 mM EDTA. A reação foi mantida a 37<sup>o</sup>C por 60 minutos. O DNA foi então purificado utilizando-se QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen Inc.) seguindo as recomendações do fabricante.

### **Adição da Adenina na extremidade 3' do fragmento Prom+TPO+PA com Prom+DHFR+PA.**

A enzima Taq polimerase tem a propriedade de adicionar uma adenina na extremidade 3' de fragmentos de DNA. Essa adenina é necessária para a clonagem utilizando-se a enzima Topoisomerase.

Para se adicionar a adenina na extremidade 3' dos fragmentos foi padronizado o tratamento com Taq Polimerase. Em um microtubo foram adicionados 5U de Taq DNA Polymerase (New England Biolabs Inc.), 0,2  $\mu$ M dNTP, e a solução de DNA purificado na etapa anterior para completar 25 $\mu$ L. A reação foi mantida por 20 minutos a 72<sup>o</sup>C.

### **Clonagem do fragmento Prom+TPO+PA com Prom+DHFR+PA.**

O fragmento Prom+TPO+PA com Prom+DHFR+PA tratados com Taq DNA Polymerase (New England Biolabs Inc.) foram clonados utilizando-se o TOPO TA Cloning® for Sequencing with One Shot® Mach1™ T1 Phage-Resistant Chemically Competent *E. coli* (Invitrogen Life Technologies). A ligação do produto com o vetor foi feita durante a noite (aproximadamente 12 horas). A identificação dos clones foi feita como descrito anteriormente.

Foi utilizado 1Kb DNA Ladder, New England Biolabs Inc. para a comparação dos produtos da reação de digestão, sendo coletado o clone com o padrão de bandas esperado.

### **Obtenção de grande quantidade de plasmídeos contendo Prom+TPO+PA com Prom+DHFR+PA.**

O clone selecionado foi cultivado por 12 horas em 400 mL de meio Luria-Bertani líquido contendo 50 mM de Ampicilina em uma estufa a 37<sup>o</sup>C com movimento orbital de 300 rpm, e então o DNA plasmideal foi extraído utilizando-se QIAGEN Plasmid Maxi Kit (Qiagen Inc.) de acordo com recomendação do fabricante.



### **Obtenção da Linhagem Celular Utilizada.**

Células de ovário de hamster sem o gene que codifica a enzima di-hidrofolato redutase ativo, foram obtidas de American Type Culture Collection (ATCC) Manassas, VA – USA. A série celular obtida foi: CHO/dhFr- [CHO duk-; NOTE: dhfr refers to dihydrofolate reductase] (ATCC® Number: CRL-9096™).

### **Cultivo e Propagação da CHO/dhFr-.**

As CHO/dhFr- foram propagadas seguindo as recomendações do ATCC®. As células foram propagadas até obter-se 10 garrafas de 75 cm<sup>3</sup> que foram mantidas até que atingissem 90% de confluência. As células foram tripsinizadas, eluídas no meio de cultivo contendo 5% de dimetil-sulfóxido (DMSO), e então, congeladas lentamente até -80°C e, posteriormente, estocadas em nitrogênio líquido.

### **Preparação das placas para transfecção.**

As células foram subcultivadas em placas para cultivo celular de 100 mm de diâmetro, segundo as recomendações do ATCC®. Uma densidade de  $1 \times 10^5$  a  $4 \times 10^5$  de células/cm<sup>2</sup> foram plaqueadas 24 horas antes da transfecção. Uma hora antes da transfecção o meio de cultivo foi trocado.

### **Transfecção das CHO/dhFr- com os plasmídeos contendo Prom+TPO+PA e Prom+DHFR+PA.**

Aproximadamente 25 µg de plasmídeo foram adicionados a um tubo de 5 mL estéril e 100 µL de 2,5 M CaCl<sub>2</sub> e o volume final foi completado até atingir 1 mL com 0.1x TE (pH 7,6). Essa solução foi mantida a 37°C. Em um outro tubo de 5 mL estéril foi adicionado um volume de 1mL de 2X HEPES tamponado (140 mM NaCl; 1,5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>•2H<sub>2</sub>O; 50 mM HEPES) e também foi mantido a 37°C. As soluções foram então misturadas 1:1 (v/v), e a mistura foi mantida a 37°C por 30 segundos.

Imediatamente após os 30 segundos 0,5 mL do precipitado de DNA foi gotejado em cada placa preparada previamente para transfecção. As culturas

celulares voltaram para estufa a 37<sup>0</sup>C, 90% de umidade e 5% de CO<sub>2</sub> por 6 horas quando o meio foi então trocado novamente pelo mesmo meio utilizado na propagação celular. Seis dias após a transfecção o meio foi então trocado por Iscove's modified Dulbecco's medium (ATCC®) apenas com os antibióticos e com o antifúngico.

Esta placa permaneceu na estufa durante 10 dias, quando segundo o protocolo utilizado, deveriam ser visíveis colônias de células individualizadas. Porém isso não ocorrendo, as células foram tripsinizadas como indicado pelo ATCC® e então foram subcultivadas em novas placas, utilizando Iscove's modified Dulbecco's medium (ATCC®) apenas com os antibióticos e com o antifúngico. Aproximadamente sete dias após a mudança de placa, foi possível visualizar as colônias individualizadas, que foram transferidas para uma placa com seis poços para cultura celular com o auxílio de uma alça microbiológica estéril e descartável.

#### **Tratamento dos clones transfectados com metrotexato.**

Para a amplificação do material genético transfectado, foi feito tratamento com Metrotexato (MTX). Foram feitas soluções de MTX dissolvido no Iscove's modified Dulbecco's medium (ATCC®) com os antibióticos e com o antifúngico com concentrações de 20 mM, 50 mM, 200 mM e 1000 mM de MTX.

As células começaram a ser tratadas um dia após serem transferidas com a solução com menor concentração de MTX, que foram sendo substituídas de forma crescente a cada dez dias.

#### **Teste da ocorrência de expressão da TPO nas CHO transfectadas.**

RNA das células transfectadas e não transfectadas foi extraído utilizando-se TRIzol® LS Reagent (Invitrogen Life Technologies) de acordo com a recomendação do fabricante. Após as extrações a concentração e a qualidade do RNA foi avaliada utilizando-se um espectrofotômetro. A fórmula utilizada para a quantificação foi: “concentração do RNA = absorção medida X

40 ug/ml” e a qualidade foi avaliada pela relação de leituras OD260/OD280 aceitando-se amostras com relação acima de 1,7.

As soluções de RNA obtidas foram utilizadas para a produção de cDNA com o kit SuperScript II (Invitrogen Life Technologies) seguindo as recomendações do fabricante.

Os cDNAs foram então utilizados como amostras para uma “nested” PCR com o objetivo de demonstrar a presença de cDNA que codifica a TPO canina nas células transfectadas e a ausência deste nas células não transfectadas. Para tal a seguinte reação foi padronizada: a primeira reação utilizou aproximadamente 0,5 a 1,0 µg of cDNA como amostra para amplificar a seqüência da TPO canina. Cada PCR continha tampão de reação 1X (50 mM KCl, 20 mM tris-HCl (pH 8,4), 0,1% Triton X-100), 1,75 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM dNTPs, 1µM de primers TPO 2 For e TPO 4 Rev, 1U Taq DNA Polymerase (New England Biolabs Inc.) e água ultrapura autoclavada trazendo para um volume final de 25 µL. O ciclo do termociclador incluía uma etapa inicial de desnaturação a 94<sup>o</sup>C por 10 minutos seguida de 40 ciclos de 94<sup>o</sup>C para desnaturação por 60 segundos, ligação do oligonucleotídeo iniciador a 55<sup>o</sup>C por 60 segundos e então extensão a 72<sup>o</sup>C por 60 segundos. A última etapa consistia de extensão do oligonucleotídeo iniciador a 72<sup>o</sup>C por 4 minutos e então a reação era mantida a 4<sup>o</sup>C.

A segunda reação ocorria nas mesmas condições da primeira, com exceção dos primers e amostras utilizadas. A amostra utilizada era 1µL da primeira reação e os primers utilizados foram Ia For e Ic rev. Após completa a segunda PCR, 10µl da reação foram separados em um gel a 1,5% de agarose com 1,0% de brometo de etídeo adicionado em tampão Tris acetato EDTA (TBE) a 90 volts por aproximadamente 1 hora ou até que as bandas de 693 pudessem ser visualizadas e comparadas com a escala (100 bp DNA Ladder, New England Biolabs Inc.).

# Resultados

## Resultados.

A seqüência encontrada para o DNA que codifica a TPO canina foi:

**ATG**GAGCTGACTGAATTGCTCCTCGTGGTCATGCTTCTCCTAACTGCAAGACTG  
 GATCCATGCCTCCCAGCTCCTCCTGCCTGTGACCCCCGTCTCCTAAATAAAATGCTTCG  
 TGACTCCCATGTACTTACACAGCAGATTGAGCCAGTGTCCAGACATTTACCCTTTGTCCA  
 CACCCGTCTGCTGCCTGCTGTGGACTTTAGCTTGGGAGAATGGAAAACCCAGAAGGAG  
 CAGACCAAGGCACAGGACGTTTTGGGAGCTGTAGCCCTTCTGCTAGATGGCGTCCTGGC  
 AGCGCGGGGACAACCTGGGACCCTCCTGCCTCTCTTCCCTTCTGGGACAGCTTTCTGGAC  
 AGGTCCGCCTCCTCCTTGGGGCCCTGCAGGGCCTCCTTGGAAACCCAGCTTCTCCACAG  
 GGCAGGACCACAACCTCACAAGGATCCCAATGCCATATTCCTGAGCTTCCAACAACCTGCT  
 CCGAGGAAAGGTGCGCTTCCTGCTGCTTGTAGCAGGGCCACCCTCTGTGCCAAGCAGA  
 GCCAACCCACTACAGCTGTCCAACCAATACCTCCCTATTCTCACACTGCGCAAGCTC  
 CCAAACAGGACTTCTGGGTGTTGGAGACAACTCCAGCATCTCAGCCAGAACTACTGG  
 CTCTGGACTTCTGAAGAGGCTGCAGGGATTAGAGCCAAGATTCCTGGTCTGCTGAACC  
 AAACCTCCAGGTCCCTAAACCAAACCCCTGGACACCTGAGCAGGACACATGGACCCTTG  
 AATGGAACTCATGGACTCCTTCTGGACTCTCACTCACGGCCCTAGGAGCCCCAGACAT  
 CCCTCCAGGAACTTCAGATATGGACGCCCTGCCACCCAACCTCTGGCCCAGATACTCTC  
 CTTCCCAATCCATCCTCCTCCTGGGCAATACACACTCTTCTCCCCTTTACCCACCTCG  
 CCCACCCCCCAGAACCCGCTCCAACCTCCACCTCCTGACCCCTCCGCGACAGCCAACCTC  
 TACCAGTCCTCTTCTAATTGCAGCCCACCCTCACTTCCAGAATCTGTCTCAGGAGGAGT  
**AA**GGTACTCTAGCCCTGCCACCATCAGCACTGTCTCCATTGCAAAGTTCCCTTTCCAGG  
 AGGGGAGGCCCTGGGAGTCAAGTTATAACCAGATTTCTTTTACCTGAAACCCAAAGCCC  
 TGCTAAAGGGGGATACACGGGACAGAAAAGGGGATTTTTCCTGTATATTGTAAACTT  
 CAGAAGCTATTTTTTTTAAAGCTATCAATAATATTCACCAGAGCAGCTAGTTATCTTTGG

Em negrito foram marcados o “start códon” e o “stop códon” respectivamente.

A seqüência de aminoácidos da proteína codificada pelo DNA que codifica a TPO canina seqüenciado é:

MELTELLLLVMLLLTARLDPCLPAPPACDPRLLNKMLRDSHVLHSRLSQCPDIY  
 PLSTPVLLPAVDFSLGEWKTQKEQTKAQDVLGAVALLLDGVLAARGQLGPSCLSSLLGQ  
 LSGQVRLLLGALQGLLGTQLPPQGRTTTTHKDPNAIFLSFQQLLRGKVRFLLLVAGPTLC  
 AKQSQPTTAVPTNTSLFLTLRKLPNRTSGLLETNSSISARTTGSGLLKRLQGFRAKIPG

LLNQTSRSLNQTPGHLRSRTHGPLNGTHGLLPGLSLTALGAPDIPPGTSDMDALPPNLWP  
 RYSPSPIHPPPGQYTLFSPLPTSPTPQNPLQPPPPDPSATANSTSPLLIAAHPHFQNL  
 QEE

Após a adição da citosina na posição –3 e da seqüência que codifica a região de ação da Enterokinase, a seqüência passou a ser:

**CTT**ATGGAGCTGACTGAATTGCTCCTCGTGGTCATGCTTCTCCTAACTGCAAGA  
 CTGGATCCATGCCTCCCAGCTCCTCCTGCCTGTGACCCCGTCTCCTAAATAAAATGCT  
 TCGTGACTCCCATGTACTTCACAGCAGATTGAGCCAGTGTCCAGACATTTACCCTTTGT  
 CCACACCCGTCCTGCTGCCTGCTGTGGACTTTAGCTTGGGAGAATGGAAAACCCAGAAG  
 GAGCAGACCAAGGCACAGGACGTTTTGGGAGCTGTAGCCCTTCTGCTAGATGGCGTCTCT  
 GGCAGCGCGGGGACAACCTGGGACCCTCCTGCCTCTCTTCCCTTCTGGGACAGCTTTCTG  
 GACAGGTCCGCCTCCTCCTTGGGGCCCTGCAGGGCCTCCTTGGAAACCAGCTTCCTCCA  
 CAGGGCAGGACCACAACCTCACAAGGATCCCAATGCCATATTCTGAGCTTCCAACAACCT  
 GCTCCGAGGAAAGGTGCGCTTCTGCTGCTTGTAGCAGGGCCCACCCTCTGTGCCAAGC  
 AGAGCCAACCCACTACAGCTGTCCAACCAATACCTCCCTATTCCTCACACTGCGCAAG  
 CTCCCAAACAGGACTTCTGGGTTGTTGGAGACAACTCCAGCATCTCAGCCAGAACTAC  
 TGGCTCTGGACTTCTGAAGAGGCTGCAGGGATTGAGAGCCAAGATTCTGGTCTGCTGA  
 ACCAAACCTCCAGGTCCCTAAACCAAACCCCTGGACACCTGAGCAGGACACATGGACCC  
 TTGAATGGAACCTCATGGACTCCTCCTGGACTCTCACTCACGGCCCTAGGAGCCCCAGA  
 CATCCCTCCAGGAACCTCAGATATGGACGCCCTGCCACCCAACCTCTGGCCAGATACT  
 CTCCTTCCCAATCCATCCTCCTCCTGGGCAATACACACTCTTCTCCCCTTTACCCACC  
 TCGCCACCCCCAGAACCCGCTCCAACCTCCACCTCCTGACCCCTCCGCGACAGCCAA  
 CTCTACCAGTCCTCTTCTAATTGCAGCCACCCTCACTTCCAGAATCTGTCTCAGGAGG  
**ACGATGACGATAAG**

Em negrito as bases inseridas na seqüência nativa da TPO canina.

E a seqüência da proteína codificada passou a ser:

MELTELLLLVMLLLLTARLDPCLPAPPACDPRLLNKMLRDSHVLHSRLSQCPDIY  
 PLSTPVLLPAVDFSLGEWKTQKEQTKAQDVLGAVALLLDGVLAARGQLGPSCLSSLLGQ  
 LSGQVRLLLGALQGLLGTQLPPQGRTTTHKDPNAIFLSFQQLLRGKVRFLLLVAGPTLC  
 AKQSQPTTAVPTNTSLFLTLRKLPNRTSGLLETNSSISARTTGSGLLKRLQGFRAKIPG  
 LLNQTSRSLNQTPGHLRSRTHGPLNGTHGLLPGLSLTALGAPDIPPGTSDMDALPPNLWP

RYSPIHPPPGQYTLFSPLPTSPTPQNPLQPPPPDPSATANSTSPLLIAAHPHFQNL  
 QEEDDDDKKGE

Sublinhada a seqüência de aminoácidos codificada pelas bases inseridas na seqüência nativa da TPO canina. Em vermelho a seqüência de reconhecimento da enterokinase.

A seqüência obtida após a inserção do DNA modificado da TPO canina no vetor de expressão e a amplificação do conjunto promotor+TPO+região estimuladora de formação da cauda de poli-adenina foi:

**TTGTGTGTTGGAGGTCGCTGAGTAGTGC GCGAGCAAATTTAAGCTACAACAAG  
 GCAAGGCTTGACCGACAATTGCATGAAGAATCTGCTTAGGGTTAGGCGTTTTGCGCTGC  
 TTCGCGATGTACGGGCCAGATATACGCGTTGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAG  
 TAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCGCGTTACATAACT  
 TACGGTAAATGGCCGCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCATTGACGTCAATAA  
 TGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCATTGACGTCAATGGGTGGAG  
 TATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCC  
 CCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCGCTGGCATTATGCCAGTACATGACCT  
 TATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTG  
 ATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGACTCACGGGGATTTCC  
 AAGTCTCCACCCATTGACGTCAATGGGAGTTTGTTTTGGCACCAAATCAACGGGACT  
 TTCAAATGTGTAACAACCTCCGCCCATTTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGG  
 TGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCTCTGGCTAACTAGAGAACCCTGCTTACTGGCT  
 TATCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCCAAGCTGGCTAGTTAAGCTATCAAC  
 AAGTTCCAAATAATGATTTTTATTTTACTGATAGTGACCTGTTTCGTTGCAACAAATTGA  
 TGAGCAATGCTTTTTTATAATGCCAACTTTGTACAAAAAGCAGGCTCCGAATTCGCC  
 TTGTTATGGAGCTGACTGAATTGCTCCTCGTGGTCATGCTTCTCCTAACTGCAAGACTG  
 GATCCATGCCTCCAGCTCCTCCTGCCTGTGACCCCCGTCTCCTAAATAAAATGCTTCG  
 TGA CTCCCATGTACTTACAGCAGATTGAGCCAGTGTCCAGACATTTACCCTTTGTCCA  
 CACCCGTCCTGCTGCCTGCTGTGGACTTTAGCTTGGGAGAATGGAAAACCCAGAAGGAG  
 CAGACCAAGGCACAGGACGTTTTGGGAGCTGTAGCCCTTCTGCTAGATGGCGTCCTGGC  
 AGCGCGGGACAACCTGGGACCCTCCTGCCTCTCTTCCCTTCTGGGACAGCTTCTGGAC  
 AGGTCCGCCTCCTCCTTGGGGCCCTGCAGGGCCTCCTTGAACCCAGCTTCTCCACAG  
 GGCAGGACCACAACCTCACAAGGATCCAATGCCATATTCCTGAGCTTCCAACAACCTGCT**

CCGAGGAAAGGTGCGCTTCCTGCTGCTTGTAGCAGGGCCACCCTCTGTGCCAAGCAGA  
 GCCAACCCACTACAGCTGTCCCAACCAATACCTCCCTATTCTCACACTGCGCAAGCTC  
 CCAAACAGGACTTCTGGGTTGTTGGAGACAAACTCCAGCATCTCAGCCAGAACTACTGG  
 CTCTGGACTTCTGAAGAGGCTGCAGGGATTAGAGCCAAGATTCTGGTCTGCTGAACC  
 AAACCTCCAGGTCCCTAAACCAAACCCCTGGACACCTGAGCAGGACACATGGACCCTTG  
 AATGGAACCTCATGGACTCCTTCTGGACTCTCACTCACGGCCCTAGGAGCCCCAGACAT  
 CCCTCCAGGAACCTCAGATATGGACGCCCTGCCACCCAACCTCTGGCCAGATACTCTC  
 CTTCCCAATCCATCCTCCTCCTGGGCAATACACACTCTTCTCCCTTTACCCACCTCG  
 CCCACCCCCAGAACCCGCTCCAACCTCCACCTCCTGACCCCTCCGCGACAGCCAACCTC  
 TACCAGTCTCTTCTAATTGCAGCCCACCCTCACTTCCAGAATCTGTCTCAGGAGGACG  
 ATGACGATAAGAAGGGCGAATTCGACCCAGCTTTCTTGTACAAAGTTGGCATTATAAAA  
 AATAATTGCTCATCAATTTGTTGCAACGAACAGGTCATATCAGTCAAATAAAAATCAT  
 TATTTGTTGTACAAAGTGGTTGATCTAGAGGGCCCGCGGTTCAAGGTAAGCCTATCCC  
 TAACCTCTCCTCGGTCTCGATTCTACGCGTACCGGTCATCATCACCATCACCAT**TGAG**  
**TTTAAACCCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGC**  
**CCCTCCCCGCTGCCTTCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCACTGTCCTTTCCTAATA**  
**AAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGG**  
**TGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCG**  
**GTGGGCTCTATGGCTTCTGAGGCGGAAAGAACCAGCT**

Em azul a seqüência do promotor do citomegalovírus (CMV), em preto a seqüência da TPO canina modificada e em vermelho a seqüência da região estimuladora de formação da cauda de poli-adenina do BGH. As outras seqüências em verde são seqüências do vetor.

A seqüência do DNA amplificado que codifica o gene da di-hidro-folato-redutase murino é igual à publicada no “Gene Bank”:

ACTTGACGGCAATCCTAGCGTGAAGGCTGGTAGGATTTTATCCCCGCTGCCATC  
**ATG**GTTCGACCATTGAACTGCATCGTCGCCGTGCCCAAATATGGGGATTGGCAAGAA  
 CGGAGACCTACCCTGGCCTCCGCTCAGGAACGAGTTCAAGTACTTCCAAAGAATGACCA  
 CAACCTCTTCAGTGGAAGGTAAACAGAATCTGGTGATTATGGGTAGGAAAACCTGGTTC  
 TCCATTCTGAGAAGAATCGACCTTTAAAGGACAGAATTAATATAGTTCTCAGTAGAGA  
 ACTCAAAGAACCACCACGAGGAGCTCATTTTCTTGCCAAAAGTTTGGATGATGCCTTAA  
 GACTTATTGAACAACCGGAATTGGCAAGTAAAGTAGACATGGTTTGGATAGTCGGAGGC



AGTTCTGTTTACCAGGAAGCCATGAATCAACCAGGCCACCTCAGACTCTTTGTGACAAG  
 GATCATGCAGGAATTTGAAAGTGACACGTTTTTCCCAGAAATTGATTTGGGGAAATATA  
 AACTTCTCCCAGAATACCCAGGCGTCCTCTCTGAGGTCCAGGAGGAAAAAGGCATCAAG  
 TATAAGTTTGAAGTCTACGAGAAGAAAGACT**TAAC**CAGGAAGATGCTTTCAAGTTCTCTGC  
 TCCC

Em negrito o “start códon” e o “stop códon” do DNA que codifica a DHFR murina.

A seqüência obtida após a inserção do DNA da DHFR murina no vetor de expressão e a amplificação do conjunto promotor+DHFR+região estimuladora de formação da cauda de poli-adenina foi:

**TTGTGTGTTGGAGTTCGCTGAGTAGTGC****CGAGCAA****AATTTAAGCTACAACAAG**  
**GCAAGGCTTGACCGACAATTGCATGAAGAATCTGCTTAGGGTTAGGCGTTTTGCGCTGC**  
**TTCGCGATGTACGGGCCAGATATACGCGTTGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAG**  
**TAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTC****CGCGTTACATAACT**  
**TACGGTAAATGGCCCGCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCGCCATTGACGTCAATAA**  
**TGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCATTGACGTCAATGGGTGGAG**  
**TATTTACGGTAAACTGCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCC**  
**CCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCT**  
**TATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTG**  
**ATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTTGACTCACGGGGATTTCC**  
**AAGTCTCCACCCATTGACGTCAATGGGAGTTTGTTTTGGCACCAAATCAACGGGACT**  
**TTCCAAAATGTCGTAACAACCTCCGCCCATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGG**  
**TGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCTCTGGCTAACTAGAGAACC****ACTGCTTACTGGCT**  
**TATCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCCAAGCTGGCTAGTTAAGCTATCAAC**  
**AAGTTCCAAATAATGATTTTTATTTTACTGATAGTGACCTGTTTCGTTGCAACAAATTGA**  
**TGAGCAATGCTTTTTTATAATGCCAACTTTGTACAAAAAGCAGGCTCCGAATTCGCC**  
**TTACTTGACGGCAATCCTAGCGTGAAGGCTGGTAGGATTTTATCCCCGCTGCCATCATG**  
**GTTTCGACCATTGAACTGCATCGTCGCCGTGTCCCAAATATGGGGATTGGCAAGAACGG**  
**AGACCTACCCTGGCCTCCGCTCAGGAACGAGTTCAAGTACTTCAAAGAATGACCACAA**  
**CCTCTTCAGTGGAAGGTAAACAGAATCTGGTGATTATGGGTAGGAAAACCTGGTTCTCC**  
**ATTCCTGAGAAGAATCGACCTTTAAAGGACAGAATTAATATAGTTCTCAGTAGAGAACT**  
**CAAAGAACCACCACGAGGAGCTCATTTTCTTGCCAAAAGTTTGGATGATGCCTTAAGAC**

TTATTGAACAACCGGAATTGGCAAGTAAAGTAGACATGGTTTGGATAGTCGGAGGCAGT  
 TCTGTTTACCAGGAAGCCATGAATCAACCAGGCCACCTCAGACTCTTTGTGACAAGGAT  
 CATGCAGGAATTTGAAAGTGACACGTTTTTCCAGAAATTGATTTGGGAAATATAAAC  
 TTCTCCAGAATACCAGGCGTCCTCTCTGAGGTCAGGAGGAAAAGGCATCAAGTAT  
 AAGTTTGAAGTCTACGAGAAGAAAGACTAACAGGAAGATGCTTTCAGTTCTCTGCTCC  
 CAAGGGCGAATTCGACCCAGCTTTCTTGTAACAAGTTGGCATTATAAAAAATAATTGCT  
 CATCAATTTGTTGCAACGAACAGGTCACCTATCAGTCAAATAAAATCATTTTGTACAAA  
 GTGGTTGATCTAGAGGGCCCGCGTTTGAAGGTAAGCCTATCCCTAACCTCTCCTCGG  
 TCTCGATTCTACGCGTACCGGTCATCATCACCATCACCATTGAGTTTAAACCCGCTGAT  
 CAGCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCCCTCCCCGTCCT  
 TCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCCTGTCCTTTCCTAATAAAATGAGGAAATTGC  
 ATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCA  
 AGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGCT  
 TCTGAGGCGGAAAGAACCAGCT

Em azul a seqüência do promotor do citomegalovírus (CMV), em preto a seqüência da DHFR murina modificada e em vermelho a seqüência da região estimuladora de formação da cauda de poli-adenina do BGH. As outras seqüências em verde são seqüências do vetor.

Essas seqüências (promotor+TPO+região estimuladora de formação da cauda de poli-adenina e promotor+DHFR+região estimuladora de formação da cauda de poli-adenina) foram clonadas no vetor pCR2.1-TOPO (Invitrogen Life Technologies) que foram digeridos com Hind III e EcoR V.

Restando então os dois fragmentos com um lado coesivo (digerido pela enzima Hind III, e um lado não coesivo digerido pela enzima Eco RV).

As seqüências obtidas se encontram abaixo:

Hind III CMV-TPO-PA EcoR V

TGGTACCGAGCTCGGATCCACTAGTAACGGCCGCCAGTGTGCTGGAATTCGCCC  
 TTTTGTGTGTTGGAGGTCGCTGAGTAGTGCGCGAGCAAAATTTAAGCTACAACAAGGCA  
 AGGCTTGACCGACAATTGCATGAAGAATCTGCTTAGGGTTAGGCGTTTTGCGCTGCTTC  
 GCGATGTACGGCCAGATATACGCGTTGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAA  
 TCAATTACGGGGTCATTAGTTTCATAGCCCATATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTAC

GGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCGCCCATTTGACGTCAATAATGA  
CGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCATTGACGTCAATGGGTGGAGTAT  
TTACGGTAAACTGCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCC  
TATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTAT  
GGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATG  
CGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGACTCACGGGGATTTCCAAG  
TCTCCACCCCATTTGACGTCAATGGGAGTTTTGTTTTGGCACCAAATCAACGGGACTTTC  
CAAATGTCGTAACAACCTCCGCCCCATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGG  
GAGGTCTATATAAGCAGAGCTCTCTGGCTAACTAGAGAACCCACTGCTTACTGGCTTAT  
CGAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCCAAGCTGGCTAGTTAAGCTATCAACAAG  
TTCCAAATAATGATTTTTATTTGACTGATAGTGACCTGTTTCGTTGCAACAAATTGATGA  
GCAATGCTTTTTTATAATGCCAACTTTGTACAAAAAGCAGGCTCCGAATTCGCCCTTC  
TTATGGAGCTGACTGAATTGCTCCTCGTGGTCATGCTTCTCCTAACTGCAAGACTGGAT  
CCATGCCTCCAGCTCCTCCTGCCTGTGACCCCGTCTCCTAAATAAAATGCTTCGTGA  
CTCCCATGTACTTCACAGCAGATTGAGCCAGTGTCCAGACATTTACCCTTTGTCCACAC  
CCGTCCTGCTGCCTGCTGTGGACTTTAGCTTGGGAGAATGGAAAACCCAGAAGGAGCAG  
ACCAAGGCACAGGACGTTTTGGGAGCTGTAGCCCTTCTGCTAGATGGCGTCTTGGCAGC  
GCGGGGACAACCTGGGACCCTCCTGCCTCTCTTCCCTTCTGGGACAGCTTTCTGGACAGG  
TCCGCCTCCTCCTTGGGGCCCTGCAGGGCCTCCTTGGAAACCCAGCTTCTCCACAGGGC  
AGGACCACAACCTCACAAGGATCCCAATGCCATATTCCTGAGCTTCCAACAACCTGCTCCG  
AGGAAAGGTGCGCTTCTGCTGCTTGTAGCAGGGCCACCCTCTGTGCCAAGCAGAGCC  
AACCCACTACAGCTGTCCCAACCAATACCTCCCTATTCCTCACACTGCGCAAGCTCCCA  
AACAGGACTTCTGGGTTGTTGGAGACAACTCCAGCATCTCAGCCAGAACTACTGGCTC  
TGGACTTCTGAAGAGGCTGCAGGGATTCAGAGCCAAGATTCCTGGTCTGCTGAACCAAA  
CCTCCAGGTCCCTAAACCAAACCCCTGGACACCTGAGCAGGACACATGGACCCTTGAAT  
GGAATCATGGACTCCTTCCTGGACTCTCACTCACGGCCCTAGGAGCCCCAGACATCCC  
TCCAGGAACTTCAGATATGGACGCCCTGCCACCCAACCTCTGGCCAGATACTCTCCTT  
CCCCAATCCATCCTCCTCCTGGGCAATACACACTCTTCTCCCCTTTACCCACCTCGCCC  
ACCCCCCAGAACCCGCTCCAACCTCCACCTCCTGACCCCTCCGCGACAGCCAACCTCTAC  
CAGTCCTCTTCTAATTGCAGCCCACCCTCACTTCCAGAATCTGTCTCAGGAGGACGATG  
ACGATAAGAAGGGCGAATTCGACCCAGCTTTCTTGTACAAAGTTGGCATTATAAAAAAT  
AATTGCTCATCAATTTGTTGCAACGAACAGGTCCTATCAGTCAAATAAAATCATTAT

TTGTTGTACAAAGTGGTTGATCTAGAGGGCCCGCGGTTCGAAGGTAAGCCTATCCCTAA  
 CCCTCTCCTCGGTCTCGATTCTACGCGTACCGGTCATCATCACCATCACCATTGAGTTT  
 AAACCCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCC  
 TCCCCCGTGCCCTTCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCACTGTCCTTTCTAATAAAAA  
 TGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGG  
 GGCAGGACAGCAAGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTG  
 GGCTCTATGGCTTCTGAGGCGGAAAGAACCAGCTAAGGGCGAATTCTGCAGAT

### Hind III CMV-DHFR-PA EcoR V

AGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCACTAGTAACGGCCGCCAGTGTGCTGGAATTC  
 GCCCTTTTGTGTGTTGGAGGTCGCTGAGTAGTGCGCGAGCAAAATTTAAGCTACAACAA  
 GGCAAGGCTTGACCGACAATTGCATGAAGAATCTGCTTAGGGTTAGGCGTTTTGCGCTG  
 CTTTCGCGATGTACGGGCCAGATATACGCGTTGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATA  
 GTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCGCGTTACATAAC  
 TTACGGTAAATGGCCCCGCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCATTGACGTCAATA  
 ATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCATTGACGTCAATGGGTGGA  
 GTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGC  
 CCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCCGCTGGCATTATGCCCAGTACATGACC  
 TTATGGGACTTTTCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGT  
 GATGCGGTTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTTGACTCACGGGGATTTT  
 CAAGTCTCCACCCATTGACGTCAATGGGAGTTTTGTTTTTGGCACCAAAATCAACGGGAC  
 TTTCCAAAATGTCGTAACAACCTCCGCCCATTTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACG  
 GTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCTCTGGCTAACTAGAGAACCCACTGCTTACTGGC  
 TTATCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCCAAGCTGGCTAGTTAAGCTATCAA  
 CAAGTTCCAAATAATGATTTTTATTTTTGACTGATAGTGACCTGTTTCGTTGCAACAAATTG  
 ATGAGCAATGCTTTTTTTATAATGCCAACTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCCGAATTTCGCC  
 CTTACTTGACGGCAATCCTAGCGTGAAGGCTGGTAGGATTTTTATCCCCGCTGCCATCAT  
 GGTTCGACCATTGAACTGCATCGTCGCCGTGTCCAAAATATGGGGATTGGCAAGAACG  
 GAGACCTACCCTGGCCTCCGCTCAGGAACGAGTTCAAGTACTTCCAAAGAATGACCACA  
 ACCTCTTCAGTGGAAAGGTAACAGAATCTGGTGATTATGGGTAGGAAAACCTGGTTCTC  
 CATTCTGAGAAGAATCGACCTTTAAAGGACAGAATTAATATAGTTCTCAGTAGAGAAC

TCAAAGAACCACCACGAGGAGCTCATTTTCTTGCCAAAAGTTTGGATGATGCCTTAAGA  
 CTTATTGAACAACCGGAATTGGCAAGTAAAGTAGACATGGTTTGGATAGTCGGAGGCAG  
 TTCTGTTTACCAGGAAGCCATGAATCAACCAGGCCACCTCAGACTCTTTGTGACAAGGA  
 TCATGCAGGAATTTGAAAGTGACACGTTTTTCCAGAAATTGATTTGGGGAAATATAAA  
 CTTCTCCCAGAATACCCAGGCGTCCTCTCTGAGGTCCAGGAGGAAAAAGGCATCAAGTA  
 TAAGTTTGAAGTCTACGAGAAGAAAGACTAACAGGAAGATGCTTTCAAGTTCTCTGCTC  
 CCAAGGGCGAATTCGACCCAGCTTTCTTGTACAAAGTTGGCATTATAAAAAATAATTGC  
 TCATCAATTTGTTGCAACGAACAGGTCACTATCAGTCAAATAAAAATCATTTTGTACAA  
 AGTGGTTGATCTAGAGGGCCCGCGGTTTGAAGGTAAGCCTATCCCTAACCTCTCCTCG  
 GTCTCGATTCTACGCGTACCGGTCATCATCACCATCACCATTGAGTTTAAACCCGCTGA  
 TCAGCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGGCCCTCCCCCGTGCC  
 TTCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCCTGTCTTTCTTAATAAAAATGAGGAAATTG  
 CATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGC  
 AAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGC  
 TTCTGAGGCGGAAAGAACCAGCTAAGGGCGAATTCTGCAGAT

A reação com T4 DNA Ligase produziu três bandas em gel de agarose a 0,7% corado com brometo de etídeo; uma menor onde o fragmento contendo DHFR formou dímeros ligados pela região coesiva, uma maior onde os fragmentos contendo TPO modificada formou dímeros também ligados pela região coesiva, e por fim uma terceira banda de tamanho médio foi formada pela ligação entre os fragmentos contendo TPO modificada e DHFR pelas extremidades coesivas, exibindo duas extremidades não coesivas digeridas pela Eco RV:

#### EcoR V PA-TPO-CMV-CMV-DHFR-PA EcoR V

ATCTGCAGAATTCGCCCTTAGCTGGTTCTTTCCGCCTCAGAAGCCATAGAGCCC  
 ACCGCATCCCCAGCATGCCTGCTATTGTCTTCCCAATCCTCCCCCTTGCTGTCCTGCC  
 CACCCACCCCCAGAATAGAATGACACCTACTCAGACAATGCGATGCAATTTCTCAT  
 TTTATTAGGAAAGGACAGTGGGAGTGGCACCTTCCAGGGTCAAGGAAGGCACGGGGGAG  
 GGGCAAACAACAGATGGCTGGCAACTAGAAGGCACAGTCGAGGCTGATCAGCGGGTTTA  
 AACTCAATGGTGATGGTGATGATGACCGGTACGCGTAGAATCGAGACCGAGGAGAGGGT  
 TAGGGATAGGCTTACCTTCGAACCGCGGGCCCTCTAGATCAACCACTTTGTACAACAAA

TAATGATTTTATTTTACTGATAGTGACCTGTTTCGTTGCAACAAATTGATGAGCAATTA  
TTTTTTATAATGCCAACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTCGAATTCGCCCTTCTTATCGTC  
ATCGTCCTCCTGAGACAGATTCTGGAAGTGAGGGTGGGCTGCAATTAGAAGAGGACTGG  
TAGAGTTGGCTGTCGCGGAGGGGTTCAGGAGGTGGAGGTTGGAGCGGGTTCTGGGGGGTG  
GGCGAGGTGGGTAAAGGGGAGAAGAGTGTGTATTGCCAGGAGGAGGATGGATTGGGGA  
AGGAGAGTATCTGGGCCAGAGGTTGGGTGGCAGGGCGTCCATATCTGAAGTTCCTGGAG  
GGATGTCTGGGGCTCCTAGGGCCGTGAGTGAGAGTCCAGGAAGGAGTCCATGAGTTCCA  
TTCAAGGGTCCATGTGTCTGCTCAGGTGTCCAGGGGTTTGGTTTAGGGACCTGGAGGT  
TTGGTTCAGCAGACCAGGAATCTTGGCTCTGAATCCCTGCAGCCTCTTCAGAAGTCCAG  
AGCCAGTAGTTCTGGCTGAGATGCTGGAGTTTGTCTCCAACAACCCAGAAGTCTGTTT  
GGGAGCTTGCGCAGTGTGAGGAATAGGGAGGTATTGGTTGGGACAGCTGTAGTGGGTTG  
GCTCTGCTTGGCACAGAGGGTGGGCCCTGCTACAAGCAGCAGGAAGCGCACCTTTCTC  
GGAGCAGTTGTTGGAAGCTCAGGAATATGGCATTGGGATCCTTGTGAGTTGTGGTCTG  
CCCTGTGGAGGAAGCTGGGTTCCAAGGAGGCCCTGCAGGGCCCCAAGGAGGAGGCGGAC  
CTGTCCAGAAAGCTGTCCAGAAGGGAAGAGAGGCAGGAGGGTCCCAGTTGTCCCCGCG  
CTGCCAGGACGCCATCTAGCAGAAGGGCTACAGCTCCCAAACGTCCTGTGCCCTTGGTC  
TGCTCCTTCTGGGTTTTCCATTCTCCCAAGCTAAAGTCCACAGCAGGCAGCAGGACGGG  
TGTGGACAAAGGGTAAATGTCTGGACACTGGCTCAATCTGCTGTGAAGTACATGGGAGT  
CACGAAGCATTTTATTTAGGAGACGGGGTTCACAGGCAGGAGGAGCTGGGAGGCATGGA  
TCCAGTCTTGCAGTTAGGAGAAGCATGACCACGAGGAGCAATTCAGTCAGCTCCATAAG  
AAGGGCGAATTCGGAGCCTGCTTTTTTTGTACAAAGTTGGCATTATAAAAAAGCATTGCT  
CATCAATTTGTTGCAACGAACAGGTCCTATCAGTCAAATAAAATCATTATTTGGAAC  
TTGTTGATAGCTTAACTAGCCAGCTTGGGTCTCCCTATAGTGAGTTCGTATTAATTTGCA  
TAAGCCAGTAAGCAGTGGGTTCTCTAGTTAGCCAGAGAGCTCTGCTTATATAGACCTCC  
CACCGTACACGCCTACCGCCATTTGCGTCAATGGGGCGGAGTTGTTACGACATTTTGG  
AAAGTCCCCTTGATTTTGGTGCCAAAACAACTCCCATTTGACGTCAATGGGGTGGAGAC  
TTGGAAATCCCCGTGAGTCAAACCGCTATCCACGCCCATTTGATGTACTGCCAAAACCGC  
ATCACCATGGTAATAGCGATGACTAATACGTAGATGTACTGCCAAGTAGGAAAGTCCCA  
TAAGGTCATGTACTGGGCATAATGCCAGGCGGGCCATTTACCGTCATTGACGTCAATAG  
GGGGCGTACTTGGCATATGATACACTTGATGTACTGCCAAGTGGGCAGTTTACCGTAAA  
TACTCCACCCATTGACGTCAATGGAAAGTCCCTATTGGCGTTACTATGGGAACATACGT  
CATTATTGACGTCAATGGGCGGGGGTTCGTTGGGCGGTTCAGCCAGGCGGGCCATTTACCG

TAAGTTATGTAACGCGGAACCTCCATATATGGGCTATGAACTAATGACCCCGTAATTGAT  
TACTATTAATAACTAGTCAATAATCAATGTCAACGCGTATATCTGGCCCGTACATCGCG  
AAGCAGCGCAAAACGCCTAACCCTAAGCAGATTCTTCATGCAATTGTCGGTCAAGCCTT  
GCCTTGTGTAGCTTAAATTTTGCTCGCGCACTACTCAGCGACCTCCAACACACAAAAG  
GGCGAATTCCAGCACACTGGCGGCCGTTACTAGTGGATCCGAGCTCGGTACCAAGCTTG  
GTACCGAGCTCGGATCCACTAGTAACGGCCGCCAGTGTGCTGGAATTCGCCCTTTTGTG  
TGTTGGAGGTCGCTGAGTAGTGC GCGAGCAAAATTTAAGCTACAACAAGGCAAGGCTTG  
ACCGACAATTGCATGAAGAATCTGCTTAGGGTTAGGCGTTTTGCGCTGCTTCGCGATGT  
ACGGGCCAGATATACGCGTTGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTA  
CGGGTCAATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCGCGTTACATAACTTACGGTAAAT  
GGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGT  
TCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGT  
AAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGAC  
GTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTT  
TCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTT  
GGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCAC  
CCCATTGACGTCAATGGGAGTTTTGTTTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATG  
TCGTAACAACCTCCGCCCCATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCT  
ATATAAGCAGAGCTCTCTGGCTAACTAGAGAACCCTGCTTACTGGCTTATCGAAATT  
AATACGACTCACTATAGGGAGACCCAAGCTGGCTAGTTAAGCTATCAACAAGTTCCAAA  
TAATGATTTTTATTTTGACTGATAGTGACCTGTTTCGTTGCAACAAATTGATGAGCAATGC  
TTTTTTATAATGCCAACTTTGTACAAAAAGCAGGCTCCGAATTCGCCCTTACTTGACG  
GCAATCCTAGCGTGAAGGCTGGTAGGATTTTATCCCCGCTGCCATCATGGTTCGACCAT  
TGAACCTGCATCGTCGCCGTGTCCCAAAATATGGGGATTGGCAAGAACGGAGACCTACCC  
TGGCCTCCGCTCAGGAACGAGTTCAAGTACTTCCAAAGAATGACCACAACCTCTTCAGT  
GGAAGGTAAACAGAATCTGGTGATTATGGGTAGGAAAACCTGGTTCTCCATTCCCTGAGA  
AGAATCGACCTTTAAAGGACAGAATTAATATAGTTCTCAGTAGAGAACTCAAAGAACCA  
CCACGAGGAGCTCATTTTCTTGCCAAAAGTTTGGATGATGCCTTAAGACTTATTGAACA  
ACCGGAATTGGCAAGTAAAGTAGACATGGTTTTGGATAGTCGGAGGCAGTTCTGTTTTACC  
AGGAAGCCATGAATCAACCAGGCCACCTCAGACTCTTTGTGACAAGGATCATGCAGGAA  
TTTGAAAGTGACACGTTTTTCCCAGAAAATTGATTTGGGGAAATATAAACTTCTCCCAGA  
ATACCCAGGCGTCCTCTCTGAGGTCCAGGAGGAAAAGGCATCAAGTATAAGTTTTGAAG

TCTACGAGAAGAAAGACTAACAGGAAGATGCTTTCAAGTTCTCTGCTCCCAAGGGCGAA  
 TTCGACCCAGCTTTCTTGTACAAAGTTGGCATTATAAAAAATAATTGCTCATCAATTTG  
 TTGCAACGAACAGGTCACACTATCAGTCAAAAATAAAATCATTTTGTACAAAGTGGTTGATC  
 TAGAGGGCCCGCGGTTTGAAGGTAAGCCTATCCCTAACCTCTCCTCGGTCTCGATTCT  
 ACGCGTACCGGTCATCATCACCATCACCATTGAGTTTAAACCCGCTGATCAGCCTCGAC  
 TGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCCCTCCCCGTGCCTTCTTGACCC  
 TGGAAGGTGCCACTCCCCTGTCCTTTTCTAATAAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGT  
 CTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGA  
 TTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGCTTCTGAGGCGG  
 AAAGAACCAGCTAAGGGCGAATTCTGCAGAT

O tratamento com fosfatase alcalina de intestino de bezerro seguido pelo tratamento com Taq DNA polimerase, tornou possível a clonagem utilizando a enzima Topoisomerase no vetor pCR8/GW/TOPO. A clonagem bem sucedida gerou a seguinte construção contendo os genes da TPO e da DHFR:

pCR8/GW/TOPO EcoR V PA-TPO-CMV-CMV-DHFR-PA EcoR V

CTTTCCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTG  
 AGCTGATAACCGCTCGCCGCAGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAG  
 CGGAAGAGCGCCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCCGCGCGTTGGCCGATTCATTAATGC  
 AGCTGGCACGACAGGTTTCCCCTGACTGGAAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATAC  
 GCGTACCGCTAGCCAGGAAGAGTTTGTAGAAACGAAAAAGGCCATCCGTCAGGATGGC  
 CTTCTGCTTAGTTTGTATGCCTGGCAGTTTATGGCGGGCGTCCTGCCCGCCACCCTCCGG  
 GCCGTTGCTTCACAACGTTCAAATCCGCTCCCAGCGGATTTGTCCTACTCAGGAGAGCG  
 TTCACCGACAAACAACAGATAAAAACGAAAGGCCAGTCTTCCGACTGAGCCTTTTCGTTT  
 TATTTGATGCCTGGCAGTTCCTACTCTCGCGTTAACGCTAGCATGGATGTTTTCCAG  
 TCACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTCTTAAGCTCGGGCCCCAAATAATGATTTTTATT  
 TTGACTGATAGTGACCTGTTTCGTTGCAACAAATTGATGAGCAATGCTTTTTTTATAATGC  
 CAACTTTGTACAAAAAGCAGGCTCCGAATTCGCCCTTATCTGCAGAATTCGCCCTTAG  
 CTGGTTCTTTCCGCCTCAGAAGCCATAGAGCCCACCGCATCCCCAGCATGCCTGCTATT  
 GTCTTCCCAATCCTCCCCCTTGTGTCTGCCCCACCCACCCCCAGAATAGAATGAC  
 ACCTACTCAGACAATGCGATGCAATTTCTCATTTTTATTAGGAAAGGACAGTGGGAGTG  
 GCACCTTCCAGGGTCAAGGAAGGCACGGGGGAGGGGCAAACAACAGATGGCTGGCAACT  
 AGAAGGCACAGTCGAGGCTGATCAGCGGGTTTAAACTCAATGGTGATGGTGATGATGAC



CGGTACGCGTAGAATCGAGACCGAGGAGAGGGTTAGGGATAGGCTTACCTTCGAACCGC  
GGGCCCTCTAGATCAACCACTTTGTACAACAAATAATGATTTTATTTTACTGATAGTG  
ACCTGTTTCGTTGCAACAAATTGATGAGCAATTATTTTTTATAATGCCAACTTTGTACAA  
GAAAGCTGGGTGCAATTCGCCCTTCTTATCGTCATCGTCCTCCTGAGACAGATTCTGGA  
AGTGAGGGTGGGCTGCAATTAGAAGAGGACTGGTAGAGTTGGCTGTGCGGAGGGGTCA  
GGAGGTGGAGGTTGGAGCGGGTTCTGGGGGGTGGGCGAGGTGGGTAAAGGGGAGAAGAG  
TGTGTATTGCCAGGAGGAGGATGGATTGGGGAAGGAGAGTATCTGGGCCAGAGGTTGG  
GTGGCAGGGCGTCCATATCTGAAGTTCCTGGAGGGATGTCTGGGGCTCCTAGGGCCGTG  
AGTGAGAGTCCAGGAAGGAGTCCATGAGTTCATTCAAGGGTCCATGTGTCTGCTCAG  
GTGTCCAGGGGTTTGGTTTAGGGACCTGGAGGTTTGGTTCAGCAGACCAGGAATCTTGG  
CTCTGAATCCCTGCAGCCTCTTCAGAAGTCCAGAGCCAGTAGTTCTGGCTGAGATGCTG  
GAGTTTGTCTCCAACAACCCAGAAGTCTGTTTGGGAGCTTGCGCAGTGTGAGGAATAG  
GGAGGTATTGGTTGGGACAGCTGTAGTGGGTTGGCTCTGCTTGGCACAGAGGGTGGGCC  
CTGCTACAAGCAGCAGGAAGCGCACCTTTCCTCGGAGCAGTTGTTGGAAGCTCAGGAAT  
ATGGCATTGGGATCCTTGTGAGTTGTGGTCTGCCCTGTGGAGGAAGCTGGGTTC AAG  
GAGGCCCTGCAGGGCCCCAAGGAGGAGGCGGACCTGTCCAGAAAGCTGTCCAGAAGGG  
AAGAGAGGCAGGAGGGTCCCAGTTGTCCCCGCGCTGCCAGGACGCCATCTAGCAGAAGG  
GCTACAGCTCCAAAACGTCCTGTGCCTTGGTCTGCTCCTTCTGGGTTTTCCATTCTCC  
CAAGCTAAAGTCCACAGCAGGCAGCAGGACGGGTGTGGACAAAGGGTAAATGTCTGGAC  
ACTGGCTCAATCTGCTGTGAAGTACATGGGAGTCACGAAGCATTTTATTTAGGAGACGG  
GGGTCACAGGCAGGAGGAGCTGGGAGGCATGGATCCAGTCTTGCAGTTAGGAGAAGCAT  
GACCACGAGGAGCAATTCAGTCAGCTCCATAAGAAGGGCGAATTCGGAGCCTGCTTTTT  
TGTACAAAGTTGGCATTATAAAAAAGCATTGCTCATCAATTTGTTGCAACGAACAGGTC  
ACTATCAGTCAAATAAAAATCATTATTTGGAAC TTGTTGATAGCTTAACTAGCCAGCTT  
GGGTCTCCCTATAGTGAGTCGTATTAATTTGATAAGCCAGTAAGCAGTGGGTCTCTA  
GTTAGCCAGAGAGCTCTGCTTATATAGACCTCCACCGTACACGCCTACCGCCATTTG  
CGTCAATGGGGCGGAGTTGTTACGACATTTTGAAAGTCCCGTTGATTTTGGTGCCAAA  
ACAACTCCCATTGACGTCAATGGGGTGGAGACTTGGAATCCCGTGAGTCAAACCGC  
TATCCACGCCCATTTGATGTACTGCCAAAACCGCATCACCATGGTAATAGCGATGACTAA  
TACGTAGATGTACTGCCAAGTAGGAAAGTCCATAAGGTCATGTACTGGGCATAATGCC  
AGGCGGGCCATTTACCGTCATTGACGTCAATAGGGGGCGTACTTGGCATATGATACT  
TGATGTACTGCCAAGTGGGCAGTTTACCGTAAATACTCCACCCATTGACGTCAATGGAA

AGTCCCTATTGGCGTTACTATGGGAACATACGTCATTATTGACGTCAATGGGCGGGGGT  
CGTTGGGCGGTCAGCCAGGCGGGCCATTTACCGTAAGTTATGTAACGCGGAACTCCATA  
TATGGGCTATGAACTAATGACCCCGTAATTGATTACTATTAATAACTAGTCAATAATCA  
ATGTCAACGCGTATATCTGGCCCGTACATCGCGAAGCAGCGCAAACGCCTAACCCCTAA  
GCAGATTCTTCATGCAATTGTCTGGTCAAGCCTTGCCTTGTGTAGCTTAAATTTTGCTC  
GCGCACTACTCAGCGACCTCCAACACACAAAAGGGCGAATTCCAGCACACTGGCGGCCG  
TACTAGTGGATCCGAGCTCGGTACCAAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCACTAGTAAC  
GGCCGCCAGTGTGCTGGAATTCGCCCTTTTGTGTGTTGGAGGTCGCTGAGTAGTGCGCG  
AGCAAATTTAAGCTACAACAAGGCAAGGCTTGACCGACAATTGCATGAAGAATCTGCT  
TAGGGTTAGCGTTTTTGCCTGCTTCGCGATGTACGGGCCAGATATACGCGTTGACATT  
GATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATAT  
ATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGA  
CCCCGCCCATTTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTT  
TCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAA  
GTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTG  
GCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTAT  
TAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGTTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAG  
CGGTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCATTTGACGTCAATGGGAGTTTGT  
TTGGCACCAAATCAACGGGACTTTCCAAATGTCGTAACAACCTCCGCCCATTTGACGC  
AAATGGGCGGTAGGCGGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCTCTGGCTAACT  
AGAGAACCCACTGCTTACTGGCTTATCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCCA  
AGCTGGCTAGTTAAGCTATCAACAAGTTCCAAATAATGATTTTATTTTGACTGATAGTG  
ACCTGTTCTGTTGCAACAAATTGATGAGCAATGCTTTTTTATAATGCCAACTTTGTACAA  
AAAAGCAGGCTCCGAATTCGCCCTTACTTGACGGCAATCCTAGCGTGAAGGCTGGTAGG  
ATTTTATCCCCGCTGCCATCATGGTTCGACCATTGAACCTGCATCGTCGCCGTGTCCCAA  
AATATGGGGATTGGCAAGAACGGAGACCTACCCCTGGCTCCGCTCAGGAACGAGTTCAA  
GTACTTCCAAAGAATGACCACAACCTCTTCAGTGGAAGGTAAACAGAATCTGGTGATTA  
TGGGTAGGAAAACCTGGTTCTCCATTCTGAGAAGAATCGACCTTTAAAGGACAGAATT  
AATATAGTTCTCAGTAGAGAACTCAAAGAACCACCACGAGGAGCTCATTTTCTTGCCAA  
AAGTTTGGATGATGCCTTAAGACTTATTGAACAACCGGAATTGGCAAGTAAAGTAGACA  
TGGTTTGGATAGTCGGAGGCAGTTCTGTTTACCAGGAAGCCATGAATCAACCAGGCCAC  
CTCAGACTCTTTGTGACAAGGATCATGCAGGAATTTGAAAGTGACACGTTTTTCCCAGA

AATTGATTTGGGGAAATATAAACTTCTCCCAGAATACCCAGGCGTCCTCTCTGAGGTCC  
AGGAGGAAAAAGGCATCAAGTATAAGTTTGAAGTCTACGAGAAGAAAGACTAACAGGAA  
GATGCTTTCAAGTTCTCTGCTCCCAAGGGCGAATTTCGACCCAGCTTTCTTGTACAAAGT  
TGGCATTATAAAAAATAATTGCTCATCAATTTGTTGCAACGAACAGGTCACTATCAGTC  
AAAATAAAATCATTTTGTACAAAGTGGTTGATCTAGAGGGCCCGCGGTTTGAAGGTAAG  
CCTATCCCTAACCTCTCCTCGGTCTCGATTCTACGCGTACCGGTCATCATCACCATCA  
CCATTGAGTTTAAACCCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTG  
TTGTTTGGCCCTCCCCGTCCTTCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCCTGTCTT  
TCCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGG  
GGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTG  
GGGATGCGGTGGGCTCTATGGCTTCTGAGGCGGAAAGAACCAGCTAAGGGCGAATTCTG  
CAGATAAGGGCGAATTCGACCCAGCTTTCTTGTACAAAGTTGGCATTATAAAAAATAAT  
TGCTCATCAATTTGTTGCAACGAACAGGTCACTATCAGTCAAATAAAATCATTATTTG  
CCATCCAGCTGATATCCCCTATAGTGAGTCGTATTACATGGTCATAGCTGTTTCTTGGC  
AGCTCTGGCCCGTGTCTCAAATCTCTGATGTTACATTGCACAAGATAAAAAATATATCA  
TCATGCCTCCTCTAGACCAGCCAGGACAGAAATGCCTCGACTTCGCTGCTGCCCAAGGT  
TGCCGGGTGACGCACACCGTGGAAACGGATGAAGGCACGAACCCAGTGGACATAAGCCT  
GTTTCGGTTCGTAAGCTGTAATGCAAGTAGCGTATGCGCTCACGCAACTGGTCCAGAACC  
TTGACCGAACGCAGCGGTGGTAACGGCGCAGTGGCGGTTTTTCATGGCTTGTATGACTG  
TTTTTTTTGGGGTACAGTCTATGCCTCGGGCATCCAAGCAGCAAGCGGTTACGCCGTGG  
GTCGATGTTTGATGTTATGGAGCAGCAACGATGTTACGCAGCAGGGCAGTCGCCCTAAA  
ACAAAGTTAAACATCATGAGGGAAGCGGTGATCGCCGAAGTATCGACTCAACTATCAGA  
GGTAGTTGGCGTCATCGAGCGCCATCTCGAACCGACGTTGCTGGCCGTACATTTGTACG  
GCTCCGCAGTGGATGGCGCCTGAAGCCACACAGTGATATTGATTTGCTGGTTACGGTG  
ACCGTAAGGCTTGATGAAACAACGCGGCGAGCTTTGATCAACGACCTTTTGGAACTTC  
GGCTTCCCCTGGAGAGAGCGAGATTCTCCGCGCTGTAGAAGTCACCATTTGTTGTGCACG  
ACGACATCATTCCGTGGCGTTATCCAGCTAAGCGCGAACTGCAATTTGGAGAATGGCAG  
CGCAATGACATTTCTTGCAGGTATCTTCGAGCCAGCCACGATCGACATTGATCTGGCTAT  
CTTGCTGACAAAAGCAAGAGAACATAGCGTTGCCTTGGTAGGTCCAGCGGCGGAGGAAC  
TCTTTGATCCGGTTCCTGAACAGGATCTATTTGAGGCGCTAAATGAAACCTTAACGCTA  
TGGAACCTCGCCGCCCGACTGGGCTGGCGATGAGCGAAATGTAGTGCTTACGTTGTCCCG  
CATTTGGTACAGCGCAGTAACCGGCAAATCGCGCCGAAGGATGTCGCTGCCGACTGGG

CAATGGAGCGCCTGCCGGCCAGTATCAGCCCGTCATACTTGAAGCTAGACAGGCTTAT  
CTTGGACAAGAAGAAGATCGCTTGGCCTCGCGCGCAGATCAGTTGGAAGAATTTGTCCA  
CTACGTGAAAGGCGAGATCACCAAGGTAGTTCGGCAAATAACCCCTCGAGCCACCCATGAC  
CAAAATCCCTTAACGTGAGTTACGCGTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAG  
ATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAA  
AAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTTGTTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTTC  
CGAAGGTAAC TGGCTTCAGCAGAGCGCAGATAACCAAATACTGTCCTTCTAGTGTAGCCG  
TAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAAT  
CCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAA  
GACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTTCGGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAG  
CCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACTTACAGCGTGAGCATTGAGA  
AAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCG  
GAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCT  
GTCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGCG  
GAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGCTGGC  
CTTTTGCTCACATGTT

Após a digestão com EcoR I, pode ser visualizado em um gel de agarose a 0,7% os fragmentos com os tamanhos previstos: 19bp, 98bp e 2799bp contendo seqüências do vetor, 1089bp contendo a seqüência da TPO canina modificada, 941bp contendo a seqüência do promotor cmv, 666bp contendo a seqüência da DHFR murina e por fim 498bp e 493bp contendo a seqüência do PA (Figura 3).

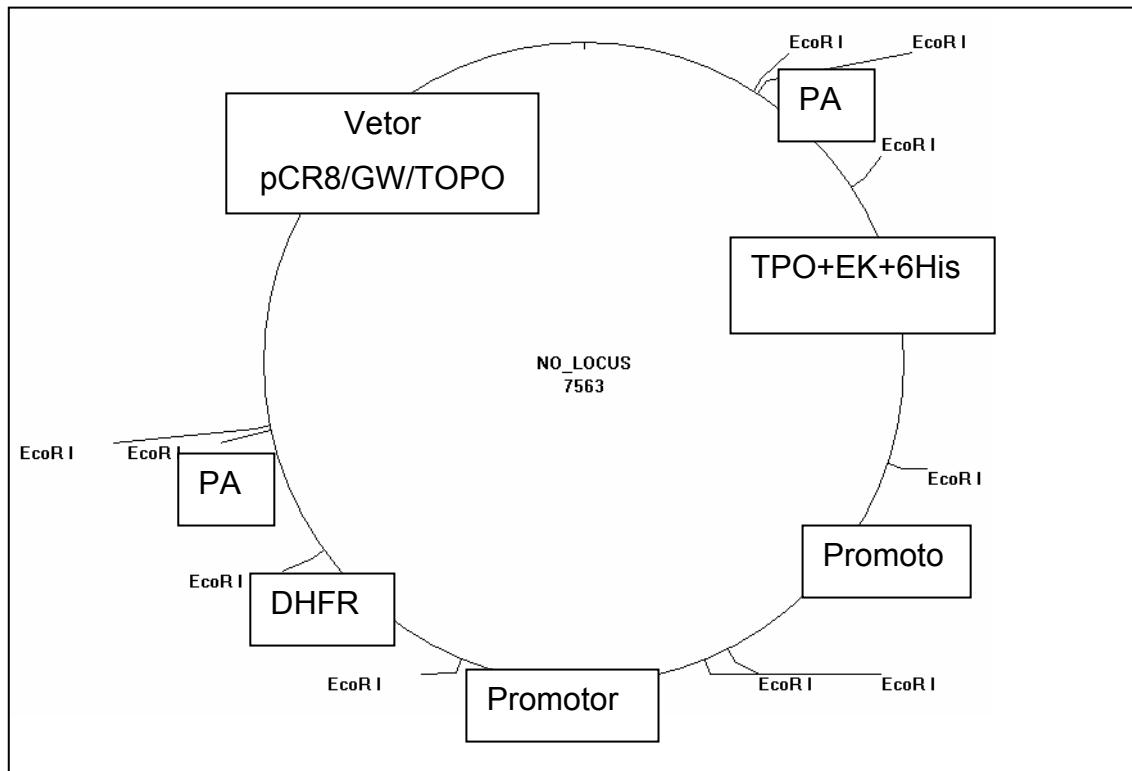


FIGURA 3. Figura ilustrativa mostrando os locais de digestão da EcoRI e as seqüências contidas em cada fragmento no vetor pCR8/GW/TOPO clonado com o segmento EcoR V PA-TPO-CMV-CMV-DHFR-PA EcoRV

A transfecção gerou sete colônias que puderam ser individualizadas. Uma delas foi testada por uma “nested” PCR como descrito no material e métodos e demonstrou estar expressando a TPO modificada.

# Discussão

## Discussão.

A seqüência protéica deduzida a partir do seqüenciamento do cDNA da TPO canina foi comparada com a seqüência publicada por Bartley et al. em 1994

```
cDNA : 61 LLPAVDFSLGEWKTQKEQTKAQDVLGAVALLLDGVLAARGQLGPSCLSSLLGQLSGQVRL 120
Publ : 61 LLPAVDFSLGEWKTQKEQTKAQDVLGAVALLLDGVLAARGQLGPSCLSSLLGQLSGQVRL 120
```

No alinhamento demonstrado acima a única diferença entre as duas seqüências de TPO está ressaltada. A seqüência deduzida a partir do nosso seqüenciamento do cDNA apresentou uma leucina na posição 85, enquanto o seqüenciamento disponível na literatura refere um triptofano na mesma posição.

Quando comparadas as seqüência dos nucleotídeos responsável pela tradução dessa leucina obtida no presente trabalho com disponibilizada do genoma canino, temos:

```
cDNA      gagcagaccaaggcacaggacgttttgaggagctgtagcccttctgctaga
Genoma    gagcagaccaaggcacaggacgttttgaggagctgtagcccttctgctaga

CDNA      tggcgtcctggcagcgcggggacaactgggaccctcctgcctctcttccc
Genoma    tggcgtcctggcagcgcggggacaactgggaccctcctgcctctcttccc

CDNA      ttctgggacagcttttctggacaggtccgcctcctccttggggccctgcag
Genoma    ttctgggacagcttttctggacaggtccgcctcctccttggggccctgcag

CDNA      ggctccttgaaccag
Genoma    ggctccttgaaccag
```

Podemos então perceber uma concordância da seqüência obtida pelo presente trabalho com a do cromossomo 34 canino, obtida no genoma do cão.

Apesar da diferença entre os códons que codificam a leucina e o triptofano ser pequena (Leucina: T~~T~~G e Triptofano: T~~T~~G~~G~~), a diferença estrutural é uma diferença importante, já que, além de se encontrar no domínio N-terminal da TPO, onde se encontra o sítio ativo da proteína, as diferenças entre os dois aminoácidos são grandes: a leucina é um aminoácido hidrofóbico enquanto o triptofano é um aminoácido polar não carregado. Essas diferenças poderiam ou não conferir diferentes estruturas secundárias para as proteínas, mudando a propriedade biológica da proteína ou a imunogenicidade.

A diferença encontrada poderia ter sido encontrada por se tratar de variantes diferentes. No entanto, é pouco provável já que, alinhamentos entre três variantes diferentes de TPO humana mostram que existe uma diferença muito mais acentuada entre as seqüências de variante diferentes:

```

Vari1: 16  ARLTLSSPAPPACDLRVLSKLLRDSHVLHSRLSQCEVHPLPTPVLLPAVDFSLGEWKTQ 75
          ARLTLSSPAPPACDLRVLSKLLRDSHVLHSRLSQCEVHPLPTPVLLPAVDFSLGEWKTQ
Vari2: 16  ARLTLSSPAPPACDLRVLSKLLRDSHVLHSRLSQCEVHPLPTPVLLPAVDFSLGEWKTQ 75

Vari1: 76  MEETKAQDILGAVTLLLEGVMAARGQLGPTCXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXPP 135
          MEETKAQDILGAVTLLLEGVMAARGQLGPTC
Vari2: 76  MEETKAQDILGAVTLLLEGVMAARGQLGPTCLSLLGQLSGQVRLLLGALQSLGT---- 131

Vari1: 136 QGRTTAHKDPNAIFLSFQHLLRGKVRFLMLVGGSTLCVRRAPPTTAVPSRTSLVLTNLNEL 195
          QGRTTAHKDPNAIFLSFQHLLRGKVRFLMLVGGSTLCVRRAPPTTAVPSRTSLVLTNLNEL
Vari2: 132 QGRTTAHKDPNAIFLSFQHLLRGKVRFLMLVGGSTLCVRRAPPTTAVPSRTSLVLTNLNEL 191

Vari1: 196 PNRTSGLLETNFTASARTTGSGLLKWQQGFRAKIPGLLNQTSRSLDQIPGYLNRIHELLN 255
          PNRTSGLLETNFTASARTTGSGLLKWQQGFRAKIPGLLNQTSRSLDQIPGYLNRIHELLN
Vari2: 192 PNRTSGLLETNFTASARTTGSGLLKWQQGFRAKIPGLLNQTSRSLDQIPGYLNRIHELLN 251

Vari1: 256 GTRGLFPGPSRRTLGA PDISSGTS DTGSLPPNLQPGYSPSPHPPTGQYXXXXXXXXXXXX 315
          GTRGLFPGPSRRTLGA PDISSGTS DTGSLPPNLQPGYSPSPHPPTGQY
Vari2: 252 GTRGLFPGPSRRTLGA PDISSGTS DTGSLPPNLQPGYSPSPHPPTGQYTLFPLPPTLPT 311

Vari1: 316 XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXYTHSQNLSQEG 353
          YTHSQNLSQEG
Vari2: 312 PVVQLHPLLPDPSAPTPTPTSPLLNTSYTHSQNLSQEG 349

Vari1: 16  ARLTLSSPAPPACDLRVLSKLLRDSHVLHSRLSQCEVHPLPTPVLLPAVDFSLGEWKTQ 75
          ARLTLSSPAPPACDLRVLSKLLRDSHVLHSRLSQCEVHPLPTPVLLPAVDFSLGEWKTQ
Vari3: 16  ARLTLSSPAPPACDLRVLSKLLRDSHVLHSRLSQCEVHPLPTPVLLPAVDFSLGEWKTQ 75

```



Vari1: 76 MEETKAQDILGAVTLLLEGVMAARGQLGPTCXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXPP 135  
 MEETKAQDILGAVTLLLEGVMAARGQLGPTC PP

Vari3: 76 MEETKAQDILGAVTLLLEGVMAARGQLGPTCLSSLLGQLSGQVRRLLGALQSLGTLQPP 135

Vari1: 136 QGRRTAHKDPNAIFLSFQHLLRGKVRFLMLVGGSTLCVRRAPPTTAVPSRTSLVLTNL 195  
 QGRRTAHKDPNAIFLSFQHLLRGK

Vari3: 136 QGRRTAHKDPNAIFLSFQHLLRGK----- 159

Vari1: 196 PNRTSGLLETNFTASARTTGSGLLKWQQGFRAKIPGLLNQTSRSLDQIPGYLNRIHELLN 255  
 TSGLETNFTASARTTGSGLLKWQQGFRAKIPGLLNQTSRSLDQIPGYLNRIHELLN

Vari3: 160 ---TSGLETNFTASARTTGSGLLKWQQGFRAKIPGLLNQTSRSLDQIPGYLNRIHELLN 216

Vari1: 256 GTRGLFPGPSRRTLGA PDISSGTS DTGSLPPNLQPGYSPSPHPTGQYXXXXXXXXXXXX 315  
 GTRGLFPGPSRRTLGA PDISSGTS DTGSLPPNLQPGYSPSPHPTGQY

Vari3: 217 GTRGLFPGPSRRTLGA PDISSGTS DTGSLPPNLQPGYSPSPHPTGQYTLFPLPPTLPT 276

Vari1: 316 XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXYTHSQNLSQEG 353  
 YTHSQNLSQEG

Vari3: 277 PVVQLHPLLPDPSAPTPTPTSPLNNTSYTHSQNLSQEG 314

Vari2: 16 ARLTLSSPAPPACDLRVLSKLLRDSHVLHSRLSQCEVHPLPTPVLLPAVDFSLGEWKTQ 75  
 ARLTLSSPAPPACDLRVLSKLLRDSHVLHSRLSQCEVHPLPTPVLLPAVDFSLGEWKTQ

Vari3: 16 ARLTLSSPAPPACDLRVLSKLLRDSHVLHSRLSQCEVHPLPTPVLLPAVDFSLGEWKTQ 75

Vari2: 76 MEETKAQDILGAVTLLLEGVMAARGQLGPTCXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-- 133  
 MEETKAQDILGAVTLLLEGVMAARGQLGPTC

Vari3: 76 MEETKAQDILGAVTLLLEGVMAARGQLGPTCLSSLLGQLSGQVRRLLGALQSLGTLQPP 135

Vari2: 134 --RTAHKDPNAIFLSFQHLLRGKVRFLMLVGGSTLCVRRAPPTTAVPSRTSLVLTNL 191  
 RTAHKDPNAIFLSFQHLLRGK

Vari3: 136 QGRRTAHKDPNAIFLSFQHLLRGK----- 159

Vari2: 192 PNRTSGLLETNFTASARTTGSGLLKWQQGFRAKIPGLLNQTSRSLDQIPGYLNRIHELLN 251  
 TSGLETNFTASARTTGSGLLKWQQGFRAKIPGLLNQTSRSLDQIPGYLNRIHELLN

Vari3: 160 ---TSGLETNFTASARTTGSGLLKWQQGFRAKIPGLLNQTSRSLDQIPGYLNRIHELLN 216

Vari2: 252 GTRGLFPGPSRRTLGA PDISSGTS DTGSLPPNLQPGYSPSPHPTGQYXXXXXXXXXXXX 311  
 GTRGLFPGPSRRTLGA PDISSGTS DTGSLPPNLQPGYSPSPHPTGQY

Vari3: 217 GTRGLFPGPSRRTLGA PDISSGTS DTGSLPPNLQPGYSPSPHPTGQYTLFPLPPTLPT 276

Vari2: 312 XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXYTHSQNLSQEG 349  
 YTHSQNLSQEG

Vari3: 277 PVVQLHPLLPDPSAPTPTPTSPLNNTSYTHSQNLSQEG 314

Outras duas possíveis explicações para as diferenças encontradas entre as seqüências seriam um erro de técnica, ou uma mutação pontual.

A técnica utilizada é bem sensível. O seqüenciamento de bases baseado no método dideoxinucleotídeos, pode gerar dados pouco confiáveis, mas, no entanto a qualidade desses dados são facilmente acessadas e sabemos que as seqüências obtidas pelo nosso grupo tinham grande qualidade, no entanto não temos como acessar a qualidade dos dados disponíveis na literatura.

A possibilidade de uma mutação pontual do tipo transversão, nome dado à troca entre uma purina (citosina e timina) por uma pirimidina (adenina e guanina), não pode ser deixada de lado. Porém, a necessidade de saber qual a freqüência dessa mutação e das implicações apontariam para um grande inquérito de genética de populações e epidemiologia de alterações plaquetárias.

Apesar dos riscos, o fato de termos encontrado base para a seqüência que encontramos na seqüência publicada no genoma canino, nos deu confiança para continuarmos em frente com o projeto.

A seqüência de nucleotídeos do cDNA da TPO canina que obtivemos resolveu um intervalo não seqüenciado de 427 pb presente na seqüência do genoma do cão. E por isso, se trata da primeira vez que a seqüência do cDNA da TPO canina está sendo publicada.

A escolha do vetor utilizado para expressão da TPO recombinante canina (rcTPO), foi baseada no uso previsto para essa molécula, e assim a definição dos objetivos em médio prazo foi extremamente importante. O entendimento de que a rcTPO seria utilizada não só para a produção de anticorpos anti-rcTPO para a padronização de um teste imunológico para a quantificação dos níveis séricos da TPO em cães, mas também para testes de protocolos terapêuticos, nos remeteu à necessidade de uma molécula extremamente semelhante à nativa.

A capacidade de tradução de uma seqüência de DNA seria igual em qualquer vetor de expressão. Porém, as diferenças se baseiam principalmente

na capacidade de glicosilação da proteína, e na quantidade de proteína que o vetor é capaz de produzir.

A glicosilação presente na molécula de TPO humana compreende cadeias de carboidratos ligadas ao N e ligadas ao O. As N-glicanas são do tipo complexas com estruturas predominantes biantenária disialilada, e triantenária trisialilada. Já as O-glicanas são do tipo mucina com estruturas predominantes monosialiladas e disialiladas. Esses dados são da TPO humana, e a porção C-terminal da TPO é menos conservada entre as espécies do que a N-Terminal, porém a semelhança entre a porção C-terminal da TPO murina e humana é de 62% (HOFFMAN, et al., 1996). A glicosilação em proteínas pode influenciar na biotatividade, farmacocinética, biodistribuição e imunogenicidade da molécula. Células procariontes não conseguem adicionar carboidratos (glicosilar); leveduras ou insetos são capazes de glicosilações mais simples normalmente sem a capacidade de sialização e com baixa capacidade de glicosilação ligada ao O; assim, se forem necessários a adição de carboidratos mais processados, células animais são as de escolha (PAREKH, 1994). A escolha do modelo de expressão da rcTPO foi baseada nos dados citados acima. A necessidade de um modelo com capacidade de fazer glicosilações complexas ligadas ao N e ao O, nos levaram a optar por um modelo animal.

No entanto, quando comparados os modelos animais com os modelos procariontes, leveduras e células de inseto, percebemos claramente uma grande perda de produção.

A enzima di-hidro-folato-redutase (DHFR) é responsável pela formação intracelular de ácido tetra-hidrofólico (forma ativa do ácido fólico), um cofator necessário para transferência de um carbono em várias reações biossintéticas. Mas o papel central do DHFR é a síntese de precursores de ácidos nucleicos. O seu importante papel nas células e a sua sensibilidade ao metrotexato levou a ser um alvo da quimioterapia no tratamento anticâncer. No entanto a resistência ao metrotexato causada pela amplificação gênica do DHFR, leva a formação de uma região homogênea na região cromossômica, e a produção de grandes níveis de DHFR pela célula resistente (URLAUB & CHASIN, 1980). A

transfecção de CHO deficientes de DHFR com minigenes contendo a seqüência do DHFR levou a produção da enzima pela linhagem celular em níveis mais baixos do que a linhagem nativa (não deficiente de DHFR), no entanto após o tratamento com metrotexato, a linhagem passou a produzir várias cópias do gene chegando a 2.000 cópias por genoma. As cópias se arranjaram em tanden ou formando plasmídeos minigenes (CROUSE, et al., 1983). O uso desse conhecimento levou ao aparecimento da tecnologia de expressão dicistrônica, onde a proximidade do gene alvo e o DHFR no plasmídeo transfectado levava não só a amplificação do DHFR como também a do gene alvo após o tratamento com metrotexato. A deficiência da expressão do DHFR inserido em um íntron de um gene alvo foi usada causando uma amplificação ainda maior da seqüência transfectada levando a uma produção protéica ainda maior, chegando a 30 vezes a quantidade expressa na forma convencional (LUCAS, et al., 1996).

O plasmídeo construído para a transfecção da TPO canina foi arranjado em tanden, utilizando tanto para a TPO quanto para a DHFR promotores fortes. Isso sem dúvida pode limitar a amplificação da seqüência transfectada, no entanto, a resposta ao tratamento com metrotexato pode depender do clone testado, e dessa forma, o ideal é testar vários clones, quanto à produtividade.

O nosso teste até o momento, apenas constatou a presença de expressão de TPO nas células selecionadas com o tratamento de metrotexato.

# Conclusões

## Conclusões

A trombopoietina canina foi clonada e seqüenciada e essa é a primeira vez que a seqüência de nucleotídeos do cDNA da TPO canina é publicada.

A transfecção de células de ovário de hamster deficientes em di-hidro-folato-redutase, com plasmídeos contendo os genes da trombopoietina canina e do dhfr murino, seguida de tratamento com metrotexato leva a expressão de trombopoietina canina recombinante por essas células.

A seqüência encontrada completa um intervalo de 427 pb presente na seqüência do genoma do cão.

A seqüência encontrada da TPO canina é semelhante à encontrada no genoma canino, porém é diferente da publicada por Bartley et al., 1994, apresentando no um triptofano no lugar da leucina na posição 85.

# Referências

## Referências

BARTLEY, T.D. et al. Identification and cloning of a megakaryocyte growth and development factor that is a ligand for the cytokine receptor Mpl. **Cell**, v. 77, n.7, p.1117-1124, July 1994.

BEGLEY, C.G.; BASSER, R.L. Biologic and structural differences of thrombopoietic growth factors. **Semin. Hematol.**, v. 37, n.2 suppl 4, p.19-27, Apr. 2000.

BURSTEIN, S.A. et al. Cytokine-induced alteration of platelet and hemostatic function. **Stem Cells**, v. 14 suppl 1, p.154-162, 1996.

CARDIER, J.E. Effects of megakaryocyte growth and development factor (thrombopoietin) on liver endothelial cells in vitro. **Microvasc. Res.**, v. 58, n.2, p.108-113, Sept. 1999.

CARDIER, J.E. et al. Megakaryocytopoiesis in vitro: from the stem cells' perspective. **Stem Cells**, v. 14 suppl 1, p.163-172, 1996.

CASE, B.C. et al. The pharmacokinetics and pharmacodynamics of GW395058, a peptide agonist of the thrombopoietin receptor, in the dog, a large-animal model of chemotherapy-induced thrombocytopenia. **Stem Cells**, v. 18, n.5, p.360-365, 2000.

CHEN, Q.; SHEN, Z.; HAN, Z. [Heparin enhances the stimulating effect of thrombopoietin on megakaryocytopoiesis]. **Zhonghua Xue. Ye. Xue. Za Zhi.**, v. 20, n.9, p.462-464, Sept. 1999.

CROUSE, G.F.; MCEWAN, R.N.; PEARSON, M.L. Expression and amplification of engineered mouse dihydrofolate reductase minigenes. **Mol. Cell Biol.**, v. 3, n.2, p.257-266, Feb. 1983.

CSERHATI, I.; KELEMEN, E. Acute prolonged thrombocytosis in mice induced by thrombocythaemic sera; a possible human thrombopoietin; a preliminary communication. **Acta Med. Acad. Sci. Hung.**, v. 11, n.4, p.473-475, 1958.

DASSIN, E. et al. Partial purification of a thrombocytopoiesis stimulating factor present in the serum of thrombocytopenic rats. **Acta Haematol.**, v. 69, n.4, p.249-253, 1983.



- DE SAUVAGE, F.J. et al. Stimulation of megakaryocytopoiesis and thrombopoiesis by the c-Mpl ligand. **Nature**, v. 369, n.6481, p.533-538, jun. 1994.
- DEVEAUX, S. et al. Analysis of the thrombopoietin receptor (MPL) promoter implicates GATA and Ets proteins in the coregulation of megakaryocyte-specific genes. **Blood**, v. 87, n.11, p.4678-4685, jun. 1996.
- ESPANOL, I. et al. Thrombocytopenia associated with liver cirrhosis and hepatitis C viral infection: role of thrombopoietin. **Hepatogastroenterology**, v. 47, n.35, p.1404-1406, sept. 2000.
- EVATT, B.L.; LEVIN, J.; ALGAZY, K.M. Partial purification of thrombopoietin from the plasma of thrombocytopenic rabbits. **Blood**, v. 54, n.2, p.377-388, aug. 1979.
- FAEH, M.; HAUSER, S.P.; NYDEGGER, U.E. Transient thrombopoietin peak after liver transplantation for end-stage liver disease. **Br. J. Haematol.**, v. 112, n.2, p.493-498, feb. 2001.
- GEDDIS, A.E.; LINDEN, H.M.; KAUSHANSKY, K. Thrombopoietin: a pan-hematopoietic cytokine. **Cytokine Growth Factor Rev.**, v. 13, n.1, p.61-73, feb. 2002.
- GERMESHUSEN, M.; BALLMAIER, M.; WELTE, K. Implications of mutations in hematopoietic growth factor receptor genes in congenital cytopenias. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 938, p.305-320, jun. 2001a.
- GERMESHUSEN, M. et al. [Congenital amegakaryocytic thrombocytopenia (CAMT) - a defect of the thrombopoietin receptor c-Mpl]. **Klin. Padiatr.**, v. 213, n.4, p.155-161, jul. 2001b.
- GOODNOUGH, L.T. et al. Prophylactic platelet transfusions from healthy apheresis platelet donors undergoing treatment with thrombopoietin. **Blood**, v. 98, n.5, p.1346-1351, sept. 2001.
- GOULIS, J. et al. Thrombopoietin concentrations are low in patients with cirrhosis and thrombocytopenia and are restored after orthotopic liver transplantation. **Gut**, v. 44, n.5, p.754-758, may 1999.
- HANKINS, J. et al. Thrombocytosis in an infant with high thrombopoietin concentrations. **J. Pediatr. Hematol. Oncol.**, v. 26, n.2, p.142-145, feb. 2004.

- HARADA, K. et al. A mild transient decrease of peripheral red blood cell counts induced by a suprapharmacological dose of pegylated human megakaryocyte growth and development factor in rats. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 51, n.7, p.841-846, jul. 1999.
- HARKER, L.A. et al. Dose-response effects of pegylated human megakaryocyte growth and development factor on platelet production and function in nonhuman primates. **Blood**, v. 88, n.2, p.511-521, jul. 1996.
- HAZNEDAROGLU, I.C. et al. Thrombopoietin inside the pulmonary vessels in patients with and without pulmonary hypertension. **Platelets.**, v. 13, n.7, p.395-399, nov. 2002.
- HELGASON, C.D. et al. Overexpression of HOXB4 enhances the hematopoietic potential of embryonic stem cells differentiated in vitro. **Blood**, v. 87, n.7, p.2740-2749, apr. 1996.
- HILL, R.; LEVIN, J. Partial purification of thrombopoietin using lectin chromatography. **Exp. Hematol.**, v. 14, n.8, p.752-759, sept. 1986.
- HOFFMAN, R.C. et al. Peptide, disulfide, and glycosylation mapping of recombinant human thrombopoietin from ser1 to Arg246. **Biochemistry**, v. 35, n.47, p.14849-14861, nov. 1996.
- HUNT, P. et al. Purification and biologic characterization of plasma-derived megakaryocyte growth and development factor. **Blood**, v. 86, n.2, p.540-547, jul. 1995.
- KASER, A. et al. Interleukin-6 stimulates thrombopoiesis through thrombopoietin: role in inflammatory thrombocytosis. **Blood**, v. 98, n.9, p.2720-2725, nov. 2001.
- KATO, T. et al. Native thrombopoietin: structure and function. **Stem Cells**, v. 16 suppl 2, p.11-19, 1998.
- KAUSHANSKY, K. Thrombopoietin: from theory to reality. **Int. J. Hematol.**, v. 76 suppl 1, p.343-345, aug. 2002.
- KAUSHANSKY, K. Thrombopoietin: from theory to reality. **Thromb. Haemost.**, v. 82, n.2, p.312-317, aug. 1999.
- KAUSHANSKY, K. et al. Do the preclinical effects of thrombopoietin correlate with its in vitro properties? **Stem Cells**, v. 14 suppl 1, p.108-111, 1996.

KAUSHANSKY, K. et al. Promotion of megakaryocyte progenitor expansion and differentiation by the c-Mpl ligand thrombopoietin. **Nature**, v. 369, n.6481, p.568-571, jun. 1994.

KELEMEN, E.; CSERHATI, I.; TANOS, B. Demonstration and some properties of human thrombopoietin in thrombocythaemic sera. **Acta Haematol.**, v. 20, n.6, p.350-355, dec. 1958.

KIRITO, K.; FOX, N.; KAUSHANSKY, K. Thrombopoietin stimulates Hoxb4 expression: an explanation for the favorable effects of TPO on hematopoietic stem cells. **Blood**, v. 102, n.9, p.3172-3178, nov. 2003.

KU, H. et al. Thrombopoietin, the ligand for the Mpl receptor, synergizes with steel factor and other early acting cytokines in supporting proliferation of primitive hematopoietic progenitors of mice. **Blood**, v. 87, n.11, p.4544-4551, jun. 1996.

KUTER, D.J.; BEELER, D.L.; ROSENBERG, R.D. The purification of megapoietin: a physiological regulator of megakaryocyte growth and platelet production. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A**, v. 91, n.23, p.11104-11108, nov. 1994.

LI, J. et al. Thrombocytopenia caused by the development of antibodies to thrombopoietin. **Blood**, v. 98, n.12, p.3241-3248, dec. 2001.

LIU, X.W. et al. [Metabolism, Distribution and Excretion of Recombinant Human Thrombopoietin in Mice]. **Zhongguo Shi Yan. Xue. Ye. Xue. Za Zhi.**, v. 9, n.4, p.318-322, dec. 2001.

LOK, S. et al. Cloning and expression of murine thrombopoietin cDNA and stimulation of platelet production in vivo. **Nature**, v. 369, n.6481, p.565-568, jun. 1994.

LUCAS, B.K. et al. High-level production of recombinant proteins in CHO cells using a dicistronic DHFR intron expression vector. **Nucleic Acids Res.**, v. 24, n.9, p.1774-1779, may 1996.

LUIZI, B.F. et al. Crystallographic analysis of the interaction of the glucocorticoid receptor with DNA. **Nature**, v. 352, n.6335, p.497-505, aug. 1991.

MATSUSHIRO, H. et al. Molecular cloning and functional expression of feline thrombopoietin. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 66, n.3-4, p.225-236, dec. 1998.

MCDONALD, T.P.; NOLAN, C. Partial purification of a thrombocytopoietic-stimulating factor from kidney cell culture medium. **Biochem. Med.**, v. 21, n.2, p.146-155, apr. 1979.

METHIA, N. et al. From the v-mpl oncogene to thrombopoietin. **C. R. Acad. Sci. III**, v. 318, n.4, p.479-482, apr. 1995.

MOLLER, P. et al. Plasma thrombopoietin concentrations in response to platelet transfusion therapy. **Acta Haematol.**, v. 102, n.3, p.131-134, 2000.

MURONE, M.; CARPENTER, D.A.; DE SAUVAGE, F.J. Hematopoietic deficiencies in c-mpl and TPO knockout mice. **Stem Cells**, v. 16, n.1, p.1-6, 1998.

MUTO, T. et al. Functional analysis of the C-terminal region of recombinant human thrombopoietin. C-terminal region of thrombopoietin is a "shuttle" peptide to help secretion. **J. Biol. Chem.**, v. 275, n.16, p.12090-12094, apr. 2000.

NAGASAWA, T. et al. Serum thrombopoietin level is mainly regulated by megakaryocyte mass rather than platelet mass in human subjects. **Br. J. Haematol.**, v. 101, n.2, p.242-244, may 1998.

NAGATA, Y. et al. Serum thrombopoietin level is not regulated by transcription but by the total counts of both megakaryocytes and platelets during thrombocytopenia and thrombocytosis. **Thromb. Haemost.**, v. 77, n.5, p.808-814, may 1997.

NAKAUCHI, H.; SUDO, K.; EMA, H. Quantitative assessment of the stem cell self-renewal capacity. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 938, p.18-24, jun. 2001.

PANASIUK, A. et al. Reticulated platelets as a marker of megakaryopoiesis in liver cirrhosis; relation to thrombopoietin and hepatocyte growth factor serum concentration. **Hepatogastroenterology**, v. 51, n.58, p.1124-1128, jul. 2004.

PAREKH, R.B. Gene expression--glycosylation. **Biologicals**, v. 22, n.2, p.113-119, jun. 1994.

PECK-RADOSAVLJEVIC, M. et al. Blunted thrombopoietin response to interferon alfa-induced thrombocytopenia during treatment for hepatitis C. **Hepatology**, v. 28, n.5, p.1424-1429, nov. 1998.

PENG, J. et al. Relative reactivity of platelets from thrombopoietin- and interleukin-6-treated dogs. **Blood**, v. 87, n.10, p.4158-4163, may 1996.

PESTINA, T.I. et al. Mpl ligand prevents lethal myelosuppression by inhibiting p53-dependent apoptosis. **Blood**, v. 98, n.7, p.2084-2090, oct. 2001.

PORCELIJN, L. et al. The diagnostic value of thrombopoietin level measurements in thrombocytopenia. **Thromb. Haemost.**, v. 79, n.6, p.1101-1105, jun. 1998.

RAJANTIE, J. et al. Chronic thrombocytopenia of childhood: use of non-invasive methods in clinical evaluation. **Eur. J. Haematol.**, v. 72, n.4, p.268-272, apr. 2004.

ROULEAU, C.; CUI, K.; FELDMAN, L. A functional erythropoietin receptor is necessary for the action of thrombopoietin on erythroid cells lacking c-mpl. **Exp. Hematol.**, v. 32, n.2, p.140-148, feb. 2004.

ROVIGATTI, U.; WATSON, D.K.; YUNIS, J.J. Amplification and rearrangement of Hu-ets-1 in leukemia and lymphoma with involvement of 11q23. **Science**, v. 232, n.4748, p.398-400, apr. 1986.

SCHMITT, A. et al. Polymorphonuclear neutrophil and megakaryocyte mutual involvement in myelofibrosis pathogenesis. **Leuk. Lymphoma**, v. 43, n.4, p.719-724, apr. 2002.

SOUYRI, M. et al. A putative truncated cytokine receptor gene transduced by the myeloproliferative leukemia virus immortalizes hematopoietic progenitors. **Cell**, v. 63, n.6, p.1137-1147, dec. 1990.

STEFANICH, E.G. et al. Dose schedule of recombinant murine thrombopoietin prior to myelosuppressive and myeloablative therapy in mice. **Cancer Chemother. Pharmacol.**, v. 47, n.1, p.70-77, 2001.

SUNGARAN, R. et al. The role of platelet alpha-granular proteins in the regulation of thrombopoietin messenger RNA expression in human bone marrow stromal cells. **Blood**, v. 95, n.10, p.3094-3101, may 2000.

URLAUB, G.; CHASIN, L.A. Isolation of Chinese hamster cell mutants deficient in dihydrofolate reductase activity. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 77, n.7, p.4216-4220, jul. 1980.

VAN, W.G.; GORTER, G.; AKKERMAN, J.W. Thrombopoietin increases platelet sensitivity to alpha-thrombin via activation of the ERK2-cPLA2 pathway. **Thromb. Haemost.**, v. 83, n.4, p.610-616, apr. 2000.

- VANNUCCHI, A.M. et al. Partial purification of a thrombopoietic stimulating activity from human urine. **Prog. Clin. Biol. Res.**, v. 215, p.221-225, 1986.
- VERHEUL, H.M. et al. Treatment of the Kasabach-Merritt syndrome with pegylated recombinant human megakaryocyte growth and development factor in mice: elevated platelet counts, prolonged survival, and tumor growth inhibition. **Pediatr. Res.**, v. 46, n.5, p.562-565, nov. 1999.
- VERSTEGEN, M.M.; WOGNUM, A.W.; WAGEMAKER, G. Thrombopoietin is a major limiting factor for selective outgrowth of human umbilical cord blood cells in non-obese diabetic/severe combined immunodeficient recipient mice. **Br. J. Haematol.**, v. 122, n.5, p.837-846, sept. 2003.
- VIGON, I. et al. Molecular cloning and characterization of MPL, the human homolog of the v-mpl oncogene: identification of a member of the hematopoietic growth factor receptor superfamily. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 89, n.12, p.5640-5644, jun. 1992.
- WENDLING, F. et al. cMpl ligand is a humoral regulator of megakaryocytopoiesis. **Nature**, v. 369, n.6481, p.571-574, jun. 1994.
- WOLBER, E.M. et al. Hepatic thrombopoietin mRNA is increased in acute inflammation. **Thromb. Haemost.**, v. 86, n.6, p.1421-1424, dec. 2001.
- YOSHIMURA, C. et al. Thrombopoietin levels in patients undergoing autologous peripheral blood stem cell transplantation. **Vox Sang.**, v. 78, n.2, p.106-112, 2000.
- ZAKYNTHINOS, S.G. et al. Sepsis severity is the major determinant of circulating thrombopoietin levels in septic patients. **Crit Care Med.**, v. 32, n.4, p.1004-1010, apr. 2004.
- ZEIGLER, F.C. et al. In vitro megakaryocytopoietic and thrombopoietic activity of c-mpl ligand (TPO) on purified murine hematopoietic stem cells. **Blood**, v. 84, n.12, p.4045-4052, dec. 1994.

# **Artigo Científico**

## **Trabalho a ser enviado para a revista: “Veterinary Clinical Pathology - An international journal of laboratory medicine”**

### **Cloning and Sequencing of Canine Thrombopoietin cDNA**

Canine Thrombopoietin

Camilo Bulla<sup>1\*</sup>, Regina K. Takahira<sup>2</sup>, João P. Araujo. Jr.<sup>3</sup>, Patrick Venta<sup>4</sup>, Michael A. Scott<sup>5</sup>

1- Resident/Instructor, Department of Pathobiology and Diagnostic Investigation, Michigan State University.

Corresponding author: MSU Clinical Pathology Laboratory, A215

Veterinary Medical Center, Michigan State University, East Lansing, MI 48824-1314, e-mail: bulla@msu.edu

2- Assistant Professor, Departamento de Clínica Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Unesp at Botucatu.

3- Assistant Professor, Departamento de Microbiologia e Imunologia Instituto de Biociências, Unesp at Botucatu

4- Associate Professor, Department of Small Animal Clinical Sciences, Michigan State University

5- Assistant Professor, Department of Pathobiology and Diagnostic Investigation, Michigan State University



**Abstract:**

**Background:** Thrombocytopenia is a very common state in dogs. Severe thrombocytopenia is life threatening, and must be managed by treating the underlying condition to achieve transient improvements in hemostasis. Thrombopoietin (TPO) has been shown to increase platelet production and megakaryocyte differentiation, proliferation, and maturation. Human plasma TPO concentrations have been measured as an indicator of platelet production status. **Objective:** The objective of this work was to clone and sequence canine TPO in order to generate recombinant canine TPO for diagnostic assays and therapeutic *in vivo* use. **Methods:** Canine TPO was amplified by PCR, cloned, and sequenced. The obtained sequence was compared with sequences from the dog genome, and the predicted TPO protein sequence was compared with previously published data. **Results:** Canine TPO cDNA sequence was obtained; the predicted protein differed from the published one by one amino acid, but the cDNA sequence agreed with the available canine genome sequence and filled in a large gap of 427 bp. **Conclusion:** This is the first publication displaying the entire canine TPO coding sequence. Recombinant canine TPO (rcTPO) should be useful for development of a canine TPO ELISA, and clinically as an injectable stimulant of thrombopoiesis in dogs.

Key words: Thrombopoietin; Dog; Platelet; Megakaryocyte; cDNA

**Introduction**

Although the existence of a major hormone responsible for platelet production was known in the 1950s,<sup>1</sup> it was not until the mid-1990s that thrombopoietin (TPO) protein was purified and sequenced.<sup>2-6</sup> Since then, recombinant human TPO (rhTPO) has been tested as a therapeutic agent in several species<sup>7-9</sup> and human plasma TPO concentrations have

been measured as an indicator of platelet production status.<sup>10,11</sup> Other cytokines including interleukin (IL)-3, IL-6, IL-11, granulocyte-macrophage colony stimulation factor, KIT ligand, FLT3 ligand, stromal cell-derived factor 1, and leukemia inhibitory factor increase platelet production and megakaryocyte differentiation, proliferation, and maturation, but only TPO promotes each step.<sup>12-16</sup>

TPO is produced mainly in liver and kidney, but it is also expressed in lesser amounts in other tissues including brain, lung, spleen and bone marrow stromal cells.<sup>17,18</sup> TPO seems to be mainly constitutively expressed, although there is evidence that it can respond as a positive acute phase protein,<sup>19</sup> and that its expression in bone marrow stromal cells can be induced by platelet-derived growth factor (PDGF) and fibroblast growth factor (FGF).<sup>20</sup> Its blood concentration is regulated by its binding to the c-mpl receptor with subsequent internalization and degradation within megakaryocytes and platelets.<sup>21</sup> Because TPO production is largely constitutive, the c-mpl mass appears to be the primary regulator of blood TPO concentrations.<sup>22,23</sup> When blood TPO concentration is increased because of decreased c-mpl mass, megakaryocytopoiesis and thrombopoiesis are stimulated. Platelet activation and release may also increase blood TPO concentration.

24

Thrombocytopenia is a very common state in dogs.<sup>25</sup> It can be caused by decreased megakaryocytopoiesis or thrombopoiesis, decreased platelet survival from accelerated consumption or destruction, abnormal platelet distribution, or hemodilution. These mechanisms may occur with numerous conditions including infections, immune-mediated disease, neoplasia, toxicants, treatments, and genetic disorders.<sup>25</sup>

Megakaryocytic hypoplasia and aplasia prolong time to recovery of normal platelet concentrations, and currently require bone marrow evaluation for detection. A core bone marrow biopsy is currently the most reliable routine method to assess megakaryocyte numbers, but sampling is invasive and requires experience for collection of optimal

samples. Moreover, the evaluation of core samples requires expertise and is subjective and non-quantitative. In contrast, measurement of plasma concentrations of TPO using an ELISA test has been rapid, non-invasive, quantitative, and helpful in evaluating platelet production in human patients.<sup>26,27</sup> A useful canine ELISA for TPO requires antibodies that react well with canine TPO, and, ideally, a canine standard.

The objective of this work was to clone and sequence canine TPO in order to generate recombinant canine TPO for diagnostic assays and potentially in vivo use. The canine TPO cDNA sequence is reported here, and the predicted amino acid sequence of the protein is compared with what has been published.

### Materials and Methods

*RNA source:* Liver and kidney samples were collected immediately post mortem from a 6-year-old beagle used in a terminal research project approved by the All-University-Committee for Animal Use and Care of Michigan State University. Samples were immediately frozen using dry ice, and RNA was isolated by TRIzol® Reagents (Invitrogen Life Technologies Inc.).

*cDNA:* A canine hepatic cDNA library was purchased (BioChain Institute, Inc), and renal and hepatic cDNA libraries were pooled after generation from the isolated beagle RNA by a reverse transcriptase protocol using SuperScript™ III Reverse Transcriptase (Invitrogen Life Technologies Inc.).

*Primers:* Two sets of primers (Integrated DNA Technologies) were used to amplify the canine TPO cDNA sequence in a nested PCR reaction. Primers were designed based on a comparison between a human TPO cDNA sequence (Gene Bank: NM\_000460) and the available dog genome sequences (<http://genome.ucsc.edu>). The outer forward and reverse primers were 5` TACCAGACAGCCAGGCCAGAAT 3` (TPO-OF) and 5` GAGCATGTAGAGAATTAGTAAGCTGT 3` (TPO-OR), respectively. The inner forward and

reverse primers were 5` ATGGAGCTGACTGAATTGCT 3` (TPO-IF) and 5` CCAAAGATAACTAGCTGCTCTGGTGA 3` (TPO-IR), respectively. These were based on human sequence information because the canine genome sequences were not available at the time. Had the canine sequence been known, TPO-IF would have been 5` ATGGAGCTGACTGAGCTGCT 3`.

*Nested PCR:* 5 µL of cDNA pool were used in a reaction buffer (50 mM KCl, 20 mM Tris-HCl (pH 8.4), 0.1% Triton X-100), with 1.75 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM dNTPs, 1 µM primers for canine TPO (TPO-OF and TPO-OR), 0.625 U of DNA polymerase Expand High Fidelity PCR System (Roche Diagnostics Corporation), and autoclaved ultra pure water to a final volume of 25 µL. Thermal cycler (Eppendorf North America Inc.) cycles included denaturing at 94 °C for 10 min followed by 40 cycles (denaturing for 60 seconds at 94 °C, primer annealing for 60 seconds at 60 °C and extension at 72 °C for 60 seconds) and a last step of primer extension at 72 °C for 4 minutes. The reaction mixture was then maintained at 4 °C.

The second phase of the nested reaction was done under the same conditions using TPO-IF and TPO-IR primers with 2 µL of the first-step PCR product as template. When completed, 10 µL of the reaction mixture were fractioned using agarose gel electrophoresis in a Tris acetate EDTA buffer with 1.0 % ethidium bromide over 60 minutes at 90 volts. Bands were observed with a UV light gel analyzer and compared to 1Kb DNA Ladder (New England Biolabs Inc.).

The amplification product was then cloned using pCR®8/GW/TOPO® TA Cloning Kit with One Shot® TOP10 Chemically Competent *E. coli* (Invitrogen Life Technologies). Clones were tested by PCR for the presence of the correct insert, and the inserts in five clones were sequenced using the dideoxy chain termination method (Research Technology Support Facility at Michigan State University).

The resulting sequences were analyzed using Lasergene 5 Suite, DNASTar Inc. ver. 5.0.6 (Win, MacOS). Using the same software, the final canine TPO cDNA sequence was compared to the dog genome sequence (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/seq/CfaBlast.html>), and the amino acid sequence it predicts was compared to the published <sup>4</sup> canine TPO amino acid sequence.

## Results

The 1059 bp cDNA encoding canine TPO was successfully cloned and sequenced (Fig. 1) from a 1293 bp PCR amplification product. Amplification was successful despite use of primers based on the human TPO sequence. The use of a DNA polymerase with proofreading capability was effective in minimizing amplification mistakes. Even with an 80-cycle amplification protocol, the majority of clones generated sequences with no nucleotide errors. The 1059 bp cDNA encodes a polypeptide differing by one amino acid from the previously published amino acid sequence for canine TPO (Fig. 1); position 85 is a leucine instead of a tryptophan. <sup>4</sup>

## Discussion

The available canine genome sequence has a gap of 427 bp which has been filled by this report. In addition, this work predicts an amino acid sequence for TPO that differs by one amino acid from a previous report. Although a difference in one nucleotide can account for the amino acid difference, the predicted protein sequence exactly matches the sequence predicted by the available canine genome (<http://genome.ucsc.edu/>), and errors in sequencing are unlikely because of the use of a DNA polymerase with proofreading capacity combined with matching sequences for this region for several clones. An error in the previous sequencing is possible, or multiple forms of the protein may exist in dogs.

However, this amino acid is also a leucine in human beings and mice, and is in a highly conserved region of the molecule that includes the receptor binding domain.

The TPO gene is located at chromosome 34 in dogs, and 3 in humans.<sup>4,28</sup> TPO cDNA encodes a 353, 326, 356, 349 and 352 amino acid protein in people, rats, mice, cats and dogs, respectively.<sup>4,29</sup> TPO consists of a highly conserved globular N-terminal domain<sup>29</sup> where the functional site is located, and a less conserved and highly glycosylated carboxy-terminal domain that is important for secretion, bioavailability, and half-life in circulation.<sup>30</sup> Two cystines (2 pairs of disulfide-bound cysteines) shown to be required for biological function of TPO in human beings are conserved in all species for which it has been sequenced.<sup>31</sup> Unfortunately, despite the molecular similarities, the authors could not detect TPO in plasma from thrombocytopenic or nonthrombocytopenic dogs using an available human kit (Human Thrombopoietin Quantikine ELISA Kit, 2nd Generation; R&D Systems, Inc.).

rhTPO has been tested in dogs, and is capable of increasing platelet concentrations. However, immunogenicity may lead to severe thrombocytopenia due to auto-antibodies that cross react with canine TPO. Human clinical trials were stopped because of isolated of cross reactivity of antibodies against recombinant pegylated TPO (rpTPO) and the nativeTPO in platelet donors receiving rpTPO prior to platelet donation in order to increase donated platelet mass and the interval between platelet transfusions.<sup>32</sup>

Severe thrombocytopenia is life threatening, and must be managed by treating the underlying condition, with or without the use of platelet concentrates to achieve transient improvements in hemostasis. Platelet concentrates are not always available, they have short survival, they can be expensive because of the need for multiple transfusions, and patients may become refractory because of their immunogenicity. Lyophilized platelets may prove to be helpful but are not currently available. Recombinant canine TPO may be

helpful in some thrombocytopenic dogs by decreasing the need for multiple transfusions and the risk of immune and non-immune transfusion reactions.

### Conclusion

In conclusion, we have cloned and sequenced canine TPO cDNA and this is the first publication displaying the entire coding sequence. Recombinant canine TPO (rcTPO) may be useful diagnostically as part of a canine TPO ELISA, and clinically as an injectable stimulant of thrombopoiesis in dogs.

### Acknowledgments

This project was funded by Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo and Babe's Fund, Michigan State University. It was developed in a cooperative program by Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Unesp and Michigan State University.

## References

1. Kelemen E, Cserhati I, Tanos B. Demonstration and some properties of human thrombopoietin in thrombocythaemic sera. *Acta Haematol* 1958;20:350-355.
2. Kuter DJ, Beeler DL, Rosenberg RD. The purification of megapoietin: a physiological regulator of megakaryocyte growth and platelet production. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:11104-11108.
3. Sohma Y, Akahori H, Seki N, et al. Molecular cloning and chromosomal localization of the human thrombopoietin gene. *FEBS Lett* 1994;353:57-61.
4. Bartley TD, Bogenberger J, Hunt P, et al. Identification and cloning of a megakaryocyte growth and development factor that is a ligand for the cytokine receptor Mpl. *Cell* 1994;77:1117-1124.
5. Lok S, Kaushansky K, Holly RD, et al. Cloning and expression of murine thrombopoietin cDNA and stimulation of platelet production in vivo. 1994;369:565-568.
6. Nagasawa T, Satoh K, Abe T. Thrombopoietic factor enhances murine megakaryopoiesis induced by recombinant erythropoietin. *Int J Hematol* 1991;54:159-164.
7. Douglas VK, Tallman MS, Cripe LD, Peterson LC. Thrombopoietin administered during induction chemotherapy to patients with acute myeloid leukemia induces transient morphologic changes that may resemble chronic myeloproliferative disorders. *Am J Clin Pathol* 2002;117:844-850.



8. Harker LA, Marzec UM, Hunt P, et al. Dose-response effects of pegylated human megakaryocyte growth and development factor on platelet production and function in nonhuman primates. *Blood* 1996;88:511-521.
9. Stefanich EG, Carlson-Zermeno CC, McEvoy K, Reich M, Fielder PJ. Dose schedule of recombinant murine thrombopoietin prior to myelosuppressive and myeloablative therapy in mice. *Cancer Chemother Pharmacol* 2001;47:70-77.
10. Engel C, Loeffler M, Franke H, Schmitz S. Endogenous thrombopoietin serum levels during multicycle chemotherapy. *Br J Haematol* 1999;105:832-838.
11. Kappers-Klunne MC, de HM, Struijk PC, van Vliet HH. Serum thrombopoietin levels in relation to disease status in patients with immune thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol* 2001;115:1004-1006.
12. Hodohara K, Fujii N, Yamamoto N, Kaushansky K. Stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) acts together with thrombopoietin to enhance the development of megakaryocytic progenitor cells (CFU-MK). *Blood* 2000;95:769-775.
13. Kaser A, Brandacher G, Steurer W, et al. Interleukin-6 stimulates thrombopoiesis through thrombopoietin: role in inflammatory thrombocytosis. *Blood* 2001;98:2720-2725.
14. Ku H, Yonemura Y, Kaushansky K, Ogawa M. Thrombopoietin, the ligand for the Mpl receptor, synergizes with steel factor and other early acting cytokines in supporting proliferation of primitive hematopoietic progenitors of mice. *Blood* 1996;87:4544-4551.
15. Lazzari L, Henschler R, Lecchi L, et al. Interleukin-6 and interleukin-11 act synergistically with thrombopoietin and stem cell factor to modulate ex vivo expansion of human CD41+ and CD61+ megakaryocytic cells. *Haematologica* 2000;85:25-30.

16. Debili N, Masse JM, Katz A, et al. Effects of the recombinant hematopoietic growth factors interleukin-3, interleukin-6, stem cell factor, and leukemia inhibitory factor on the megakaryocytic differentiation of CD34+ cells. *Blood* 1993;82:84-95.
17. Nagahisa H, Nagata Y, Ohnuki T, et al. Bone marrow stromal cells produce thrombopoietin and stimulate megakaryocyte growth and maturation but suppress proplatelet formation. *Blood* 1996;87:1309-1316.
18. Sungaran R, Markovic B, Chong BH. Localization and regulation of thrombopoietin mRNA expression in human kidney, liver, bone marrow, and spleen using in situ hybridization. *Blood* 1997;89:101-107.
19. Cerutti A, Custodi P, Mduranti, Cazzola M, Balduini CL. Circulating thrombopoietin in reactive conditions behaves like an acute phase reactant. *Clin Lab Haematol* 1999;21:271-275.
20. Sungaran R, Chisholm OT, Markovic B, et al. The role of platelet alpha-granular proteins in the regulation of thrombopoietin messenger RNA expression in human bone marrow stromal cells. *Blood* 2000;95:3094-3101.
21. Dahlen DD, Broudy VC, Drachman JG. Internalization of the thrombopoietin receptor is regulated by 2 cytoplasmic motifs. *Blood* 2003;102:102-108.
22. Kuter DJ, Rosenberg RD. The reciprocal relationship of thrombopoietin (c-Mpl ligand) to changes in the platelet mass during busulfan-induced thrombocytopenia in the rabbit. *Blood* 1995;85:2720-2730.
23. Stoffel R, Wiestner A, Skoda RC. Thrombopoietin in thrombocytopenic mice: evidence against regulation at the mRNA level and for a direct regulatory role of platelets. *Blood* 1996;87:567-573.

24. Folman CC, Linthorst GE, van MJ, et al. Platelets release thrombopoietin (Tpo) upon activation: another regulatory loop in thrombocytopoiesis? *Thromb Haemost* 2000;83:923-930.
25. Grindem CB, Breitschwerdt EB, Corbett WT, Jans HE. Epidemiologic survey of thrombocytopenia in dogs: a report on 987 cases. 1991;20:38-43.
26. Porcelijn L, Folman CC, Bossers B, et al. The diagnostic value of thrombopoietin level measurements in thrombocytopenia. *Thromb Haemost* 1998;79:1101-1105.
27. Tahara T, Usuki K, Sato H, et al. A sensitive sandwich ELISA for measuring thrombopoietin in human serum: serum thrombopoietin levels in healthy volunteers and in patients with haemopoietic disorders. *Br J Haematol* 1996;93:783-788.
28. Foster DC, Sprecher CA, Grant FJ, et al. Human thrombopoietin: gene structure, cDNA sequence, expression, and chromosomal localization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:13023-13027.
29. Gurney AL, Kuang WJ, Xie MH, et al. Genomic structure, chromosomal localization, and conserved alternative splice forms of thrombopoietin. *Blood* 1995;85:981-988.
30. Luoh SM, Stefanich E, Solar G, et al. Role of the distal half of the c-Mpl intracellular domain in control of platelet production by thrombopoietin in vivo. *Mol Cell Biol* 2000;20:507-515.
31. Geddis AE, Linden HM, Kaushansky K. Thrombopoietin: a pan-hematopoietic cytokine. *Cytokine Growth Factor Rev* 2002;13:61-73.
32. Li J, Yang C, Xia Y, et al. Thrombocytopenia caused by the development of antibodies to thrombopoietin. *Blood* 2001;98:3241-3248.

## Figure legends

1. Figure 1. Canine TPO cDNA and protein sequence. Start and stop codons are noted in bold. Amino acid 85 is a leucine (line 6 in grey) rather than a tryptophan as was previously reported.

**atg** gag ctg act gag ctg ctc ctc gtg gtc atg ctt ctc cta act gca [ 48]  
**M E L T E L L L V V M L L L T A**  
 aga ctg gat cca tgc ctc cca gct cct cct gcc tgt gac ccc cgt ctc [ 96]  
**R L D P C L P A P P A C D P R L**  
 cta aat aaa atg ctt cgt gac tcc cat gta ctt cac agc aga ttg agc [ 144]  
**L N K M L R D S H V L H S R L S**  
 cag tgt cca gac att tac cct ttg tcc aca ccc gtc ctg ctg cct gct [ 192]  
**Q C P D I Y P L S T P V L L P A**  
 gtg gac ttt agc ttg gga gaa tgg aaa acc cag aag gag cag acc aag [ 240]  
**V D F S L G E W K T Q K E Q T K**  
 gca cag gac gtt ttg gga gct gta gcc ctt ctg cta gat ggc gtc ctg [ 288]  
**A Q D V L G A V A L L L D G V L**  
 gca gcg cgg gga caa ctg gga ccc tcc tgc ctc tct tcc ctt ctg gga [ 336]  
**A A R G Q L G P S C L S S L L G**  
 cag ctt tct gga cag gtc cgc ctc ctc ctt ggg gcc ctg cag ggc ctc [ 384]  
**Q L S G Q V R L L L G A L Q G L**  
 ctt gga acc cag ctt cct cca cag ggc agg acc aca act cac aag gat [ 432]  
**L G T Q L P P Q G R T T T H K D**  
 ccc aat gcc ata ttc ctg agc ttc caa caa ctg ctc cga gga aag gtg [ 480]  
**P N A I F L S F Q Q L L R G K V**  
 cgc ttc ctg ctg ctt gta gca ggg ccc acc ctc tgt gcc aag cag agc [ 528]  
**R F L L L V A G P T L C A K Q S**  
 caa ccc act aca gct gtc cca acc aat acc tcc cta ttc ctc aca ctg [ 576]  
**Q P T T A V P T N T S L F L T L**  
 cgc aag ctc cca aac agg act tct ggg ttg ttg gag aca aac tcc agc [ 624]  
**R K L P N R T S G L L E T N S S**  
 atc tca gcc aga act act ggc tct gga ctt ctg aag agg ctg cag gga [ 672]  
**I S A R T T G S G L L K R L Q G**  
 ttc aga gcc aag att cct ggt ctg ctg aac caa acc tcc agg tcc cta [ 720]  
**F R A K I P G L L N Q T S R S L**  
 aac caa acc cct gga cac ctg agc agg aca cat gga ccc ttg aat gga [ 768]  
**N Q T P G H L S R T H G P L N G**  
 act cat gga ctc ctt cct gga ctc tca ctc acg gcc cta gga gcc cca [ 816]  
**T H G L L P G L S L T A L G A P**  
 gac atc cct cca gga act tca gat atg gac gcc ctg cca ccc aac ctc [ 864]  
**D I P P G T S D M D A L P P N L**  
 tgg ccc aga tac tct cct tcc cca atc cat cct cct cct ggg caa tac [ 912]  
**W P R Y S P S P I H P P P G Q Y**  
 aca ctc ttc tcc cct tta ccc acc tcg ccc acc ccc cag aac ccg ctc [ 960]  
**T L F S P L P T S P T P Q N P L**  
 caa cct cca cct cct gac ccc tcc gcg aca gcc aac tct acc agt cct [1008]  
**Q P P P P D P S A T A N S T S P**  
 ctt cta att gca gcc cac cct cac ttc cag aat ctg tct cag gag gag [1056]  
**L L I A A H P H F Q N L S Q E E**  
**taa** [1059]

# **Anexos**



GATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTCTGGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCCAGCTTGGAGCG  
AACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCATTGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGA  
AAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAA  
ACGCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTCTGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTC  
GTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGCTGG  
CCTTTTGCTCACATGTT



pcDNA-DEST40

GACGGATCGGGAGATCTCCCGATCCCCTATGGTGCACCTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGCATAGTT  
 AAGCCAGTATCTGCTCCCTGCTTGTGTGTTGGAGGTGCGTGAGTAGTGCGCGAGCAAAATTTAAGCTACA  
 ACAAGGCAAGGCTTGACCGACAATTGCATGAAGAATCTGCTTAGGGTTAGGCGTTTTGCGCTGCTTCGCG  
 ATGTACGGGCCAGATATACGCGTTGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTC  
 ATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCCGCTGGCTGACCG  
 CCCAACGACCCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTC  
 ATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCC  
 AAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCCGCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTA  
 TGGGACTTTTCCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTGGC  
 AGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCATTGACGTCAA  
 TGGGAGTTTGTTTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACAACCTCCGCCCATGACG  
 CAAATGGGCGGTAGGCGGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCTCTGGCTAACTAGAGAACCCA  
 CTGCTTACTGGCTTATCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCCAAGCTGGCTAGTTAAGCTATCA  
 ACAAGTTTGTACAAAAAGCTGAACGAGAAACGTAATAATGATATAAATATCAATATATAAATTAGATTT  
 TGCATAAAAAACAGACTACATAACTGTAAAACACAACATATCCAGTCACTATGGCGGCCGCATTAGGC  
 ACCCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATAATGTGTGGATTTTGTAGTTAGGATCCGGCGAGAT  
 TTTTCCAGGACTAAGGAAGCTAAAATGGAGAAAAAATCACTGGATATACCACCGTTGATATATCCCAATG  
 GCATCGTAAAGAACATTTTGGGCATTTTCAAGTCAAGTGTACCTATAACCAGACCGTTTCAAGTGT  
 GATATTACGGCCTTTTTAAAGACCGTAAAGAAAAAATGACACAAGTTTTATCCGGCCTTTATTCACATTC  
 TTGCCCGCCTGATGAATGCTCATCCGGAATTCCTATGGCAATGAAAGACGGTGAGCTGGTGATATGGGA  
 TAGTGTTCACCCCTTGTACACCGTTTTCCATGAGCAAACTGAAACGTTTTTCATCGCTCTGGAGTGAATAC  
 CACGACGATTTCCGGCAGTTTTCTACACATATATTCGCAAGATGTGGCGTGTTACGGTGAAAACCTGGCCT  
 ATTTCCCTAAAGGGTTTATTGAGAATATGTTTTTTCGTCTCAGCCAATCCCTGGGTGAGTTTACCAGTTT  
 TGATTTAAACGTGGCCAATATGGACAACCTCTTCGCCCCCGTTTTTACCATGGGCAAAATATTATACGCAA  
 GGCGACAAGGTGCTGATGCCGCTGGCGATTGAGTTTTCATCATGCCGCTCTGTGATGGCTTCCATGTCGGCA  
 GAATGCTTAATGAATTACAACAGTACTGCGATGAGTGGCAGGGCGGGCGTAAAGATCTGGATCCGGCTT  
 ACTAAAAGCCAGATAACAGTATGCGTATTTGCGCGCTGATTTTTGCGGTATAAGAATATATACTGATATG  
 TATACCCGAAGTATGTCAAAAAGAGGTGTGCTATGAAGCAGCGTATTACAGTGACAGTTGACAGCGACAG  
 CTATCAGTTGCTCAAGGCATATATGATGTCAATATCTCCGGTCTGGTAAGCACAACCATGCAGAATGAAG  
 CCCGTGCTCTGCGTGCCGAACGCTGGAAAGCGGAAAAATCAGGAAGGGATGGCTGAGGTCGCCCGGTTTAT  
 TGAAATGAACGGCTCTTTTGTGACGAGAACAGGGACTGGTGAATGCAGTTTAAAGTTTACACCTATAA  
 AAGAGAGAGCCGTTATCGTCTGTTTTGTGGATGTACAGAGTGATATTATTGACACGCCCGGGCGACGGATG  
 GTGATCCCCCTGGCCAGTGACGCTCTGCTGTGAGATAAAGTCTCCCGTGAACCTTTACCCGGTGGTGATA  
 TCGGGGATGAAAGCTGGCGCATGATGACCACCGATATGGCCAGTGTGCCGGTCTCCGTTATCGGGGAAGA  
 AGTGGCTGATCTCAGCCACCGGAAAATGACATCAAAAACGCCATTAACCTGATGTTCTGGGGAATATAA  
 ATGTCAGGCTCCGTTATACACAGCCAGTCTGCAGGTCGACCATAGTACTGGATATGTTGTGTTTTACAG  
 TATTATGTAGTCTGTTTTTATGCAAAATCTAATTTAATATATTGATATTTATATCATTTTACGTTTCTC  
 GTTCAGCTTTCTTGTACAAAAGTGGTTGATCTAGAGGGCCCGGGTTCGAAGGTAAGCCTATCCCTAACCC  
 TCTCCTCGGTCTCGATTCTACGCGTACCGGTATCATATCACCATCACCATTGAGTTTAAACCCGCTGATCA  
 GCCTCGACTGTGCCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTTGCCCTCCCCCGTGCCTTCCCTGACCCCTGG

AAGGTGCCACTCCCCTGTCTTTCTTAATAAAAATGAGGAAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCA  
TTCTATTCTGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGAGGATTTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCT  
GGGGATGCGGTGGGCTCTATGGCTTCTGAGGCGGAAAGAACCAGCTGGGGCTCTAGGGGTATCCCCACG  
CGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGCGGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAG  
CGCCCTAGCGCCGCTCCTTTTCGCTTTCTTCCCTTCTTTCTCGCCACGTTTCGCCGGCTTTCCCGTCAA  
GCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGATTAGTGTCTTTACGGCACCTCGACCCAAAAAACTTG  
ATTAGGGTGATGGTTCACGTAGTGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTC  
CACGTTCTTTAATAGTGGACTCTTGTTCAAACTGGAACAACACTCAACCCTATCTCGGTCTATTCTTTT  
GATTTATAAGGGATTTTGCCGATTTCCGGCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTTAACG  
CGAATTAATCTGTGGAATGTGTGTGTCAGTTAGGGTGTGGAAAGTCCCAGGCTCCCAGCAGGCAGAAGT  
ATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCAGGTGTGGAAAGTCCCAGGCTCCCAGCAGGCAGAA  
GTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCTAACTCCGCCCATCCCGCCCT  
AACTCCGCCCAGTTCGCCCATTTCTCCGCCCATGGCTGACTAATTTTTTTTATTTATGTCAGAGGCCGAG  
GCCGCTCTGCCTCTGAGCTATTCAGAAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCTAGGCTTTTGCAAAA  
AGCTCCCGGGAGCTTGTATATCCATTTTCGGATCTGATCAAGAGACAGGATGAGGATCGTTTCGCATGAT  
TGAACAAGATGGATTGCACGCAGGTTCTCCGGCCGCTTGGGTGGAGAGGCTATTCGGCTATGACTGGGCA  
CAACAGACAATCGGCTGCTCTGATGCCGCCGTGTTCGGCTGTGAGCGCAGGGGGCGCCGGTCTTTTTTG  
TCAAGACCGACTGTCCGGTGCCTGAATGAACCTGACAGACAGGCAGCGCGGCTATCGTGGCTGGCCAC  
GACGGGCGTTCCTTGCGCAGCTGTGCTCGACGTTGTCACTGAAGCGGGAAGGGACTGGCTGCTATTGGGC  
GAAGTGCCGGGGCAGGATCTCCTGTCATCTCACCTTGCTCCTGCCGAGAAAGTATCCATCATGGCTGATG  
CAATGCGGCGGCTGCATACGCTTGATCCGGCTACCTGCCATTGACCACCAAGCGAAAACATCGCATCGA  
GCGAGCACGTACTCGGATGGAAGCCGGTCTTGTGATCAGGATGATCTGGACGAAGAGCATCAGGGGCTC  
GCGCCAGCCGAATGTTTCGCCAGGCTCAAGGCGCGCATGCCCGACGGCGAGGATCTCGTCTGACCCATG  
GCGATGCTGCTTGCCTGAATATCATGGTGGAAAATGGCCGCTTTTTCTGGATTTCATGACTGTGGCCGGCT  
GGGTGTGGCGGACCGCTATCAGGACATAGCGTTGGCTACCCGTGATATTGCTGAAGAGCTTGGCGGCGAA  
TGGGCTGACCGCTTCCTCGTGCTTTACGGTATCGCCGCTCCCGATTGCGCAGCGCATCGCCTTCTATCGCC  
TTCTTGACGAGTTCTTCTGAGCGGGACTCTGGGGTTCGCGAAATGACCGACCAAGCGACGCCAACCTGC  
CATCACGAGATTTGATTCCACCGCCCTTCTATGAAAGGTTGGGCTTCGGAATCGTTTTCCGGGACGC  
CGGCTGGATGATCCTCCAGCGCGGGATCTCATGTGGAGTTCTTCGCCACCCCACTTGTTTATGCA  
GCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTTACAAATAAAGCATTTTTTTCTACTGCATT  
CTAGTTGTGGTTTGTCCAAACTCATCAATGTATCTTATCATGTCTGTATAACCGTCGACCTCTAGCTAGAG  
CTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCTGTGTGAAAATTGTTATCCGCTCACAAATTCACACAACATA  
CGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGC  
GCTCACTGCCCGCTTTCCAGTCGGGAAACCTGTCTGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACCGCGGG  
GAGAGGCGGTTTGCCTATTGGGCGCTCTTCCGCTTCTCGTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCTGTTCCG  
CTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAG  
GAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAGGCCGCTTGTGGCGTTTTT  
CCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACA  
GGACTATAAAGATAACAGGCGTTTTCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCCTCTCCTGTTCCGACCTGCCGC  
TTACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTA  
TCTCAGTTCCGGTGTAGGTGCTTCCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCGTTCCAGCCGACCGC  
TGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGTAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAG  
CCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAA

CTACGGCTACACTAGAAGAACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGA  
GTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGA  
TTACCGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAA  
CGAAAACCTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAAT  
TAAAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAA  
TCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTCTGTTTCATCCATAGTTGCCCTGACTCCCCGTCGTGTA  
GATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCA  
CCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCCTGCAACTT  
TATCCGCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTT  
GCGCAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTCATTCAGC  
TCCGGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCATGTTGTGCAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCG  
GTCCTCCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCCGAGTGTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAA  
TTCTCTTACTGTGTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGA  
GAATAGTGATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCGCGTCAATACGGGATAATACCGGCCACATAGCA  
GAACTTTAAAAGTGCTCATCATTTGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACCTCTCAAGGATCTTACCGCTGTT  
GAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCCAACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTTACCAGCGTT  
TCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAA  
TACTCATACTCTTCCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACAT  
ATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTGAC  
GTC

pCR2.1-TOPO

AGCGCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCGCGCGTTGGCCGATTCATTAATGCAGCTGGCACGACAGGTT  
 TCCCGACTGGAAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTAGCTCACTCATTAGGCACCCAG  
 GCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAA  
 ACAGCTATGACCATGATTACGCCAAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCACTAGTAACGGCCGCCAGTGTGC  
 TGGAAATTCGCCCTTAAGGGCGAATTTCTGCAGATATCCATCACACTGGCGGCCGCTCGAGCATGCATCTAG  
 AGGGCCAATTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTACAATTCAGTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGG  
 GAAAACCTGGCGTTACCCAACCTAATCGCCTTGACGACATCCCCCTTTCCGACGCTGGCGTAATAGCG  
 AAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGACGCGCCCTGTAGC  
 GGCGCATTAAAGCGCGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGC  
 CCGCTCCTTTTCGCTTTCTTCCCTTCTTTCTCGCCACGTTTCGCCGGCTTTCCCGCTCAAGCTCTAAATCG  
 GGGCTCCCTTTAGGGTTCCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCAAAAAACTTGATTAGGGTGAT  
 GGTTACGTTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTA  
 ATAGTGGACTCTTGTTCAAACTGGAACAACACTCAACCCTATCTCGGCTATTTCTTTGATTTATAAGG  
 GATTTTGCAGTATTCGGCTATTTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTTAACGCGAATTTTAAC  
 AAAATTCAGGGCGCAAGGGCTGCTAAAGGAAGCGGAACACGTAGAAAGCCAGTCCGCAGAAACGGTGCTG  
 ACCCCGGATGAATGTCAGCTACTGGGCTATCTGGACAAGGGAAAACGCAAGCGCAAGAGAAAGCAGGTA  
 GCTTGCAGTGGGCTTACATGGCGATAGCTAGACTGGGCGGTTTTATGGACAGCAAGCAACCGAATTCG  
 CAGCTGGGGCGCCCTCTGGTAAGGTTGGGAAGCCCTGCAAAGTAACTGGATGGCTTTCTTGGCCCAAG  
 GATCTGATGGCGCAGGGGATCAAGATCTGATCAAGAGACAGGATGAGGATCGTTTTCGCATGATTGAACAA  
 GATGGATTGCACGCAGGTTCTCCGGCCGCTTGGGTGGAGAGGCTATTCGGCTATGACTGGGCACAACAGA  
 CAATCGGCTGCTCTGATGCCGCCGTGTTCCGGCTGTGAGCGCAGGGGCGCCCGGTTCTTTTTGTCAAGAC  
 CGACCTGTCCGGTGCCCTGAATGAACTGCAGGACGAGGCAGCGCGGCTATCGTGGCTGGCCACGACGGGC  
 GTTCCTTGGCGAGCTGTGCTCGACGTTGTACTGAAGCGGGAAGGGACTGGCTGCTATTGGGCGAAGTGC  
 CGGGCAGGATCTCCTGTCATCCACCTTGCTCCTGCCGAGAAAGTATCCATCATGGCTGATGCAATGCC  
 GCGGCTGCATACGCTTGGATCCGGCTACCTGCCATTTCGACCACCAAGCGAAACATCGCATCGAGCGAGCA  
 CGTACTCGGATGGAAGCCGGTCTTGTGATCAGGATGATCTGGACGAAGAGCATCAGGGGCTCGGCCAG  
 CCGAACTGTTTCGCCAGGCTCAAGGCGCGCATGCCGACGGCGAGGATCTCGTCTGACCCATGGCGATGC  
 CTGCTTGGCGAATATCATGGTGGAAAATGGCCGCTTTTCTGGATTCACTGACTGTGGCCGGCTGGGTGTG  
 GCGGACCGCTATCAGGACATAGCGTTGGCTACCCGTGATATTGCTGAAGAGCTTGGCGGCGAATGGGCTG  
 ACCGCTTCTCGTGCTTTACGGTATCGCCGCTCCCGATTTCGACGCGCATCGCCTTCTATCGCCTTCTTGA  
 CGAGTTCTTCTGAATTGAAAAGGAAGAGTATGATATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATCCCTTTT  
 TTGGCGCATTTTGCCTTCTGTTTTTGTCTACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAGATGCTGAAGATCA  
 GTTGGGTGCACGAGTGGGTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTTCGCCCC  
 GAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTGACG  
 CCGGCAAGAGCAACTCGGTCGCCGATACACTATTTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACCAGTCAC  
 AGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGTGCCATAACCATGAGTGATAAC  
 ACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTCACACAACATGG  
 GGATCATGTAATCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATAACCAAACGACGAGCGTGA  
 CACCACGATGCCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACATTAAGTGGCGAACTACTTACTCTAGCT  
 TCCCGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTC

CGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACT  
GGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCCTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAA  
CGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAAGTGTGAGACCAAGTTTACT  
CATATATACTTTAGATTGATTTAAAACCTTCATTTTAAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGA  
TAATCTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATC  
AAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAACACCGCTAC  
CAGCGGTGGTTTTGTTGCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAAGTGGCTTCAGCAGAGC  
GCAGATACCAAATACTGTTCTTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCG  
CCTACATACTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGCTTTACCG  
GGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTGCGGCTGAACGGGGGGTTTCGTGCACACA  
GCCAGCTTGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACG  
CTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGG  
AGCTTCCAGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCCTGTCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCG  
ATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTC  
CTGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGTTCTTTCCTGCGTTATCCCTGATTCTGTGGATAACCGTA  
TTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGCAGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGA  
GGAAGCGGAA