



Criação de um plasmídeo para estudo de promotores *in vitro* através do uso de proteínas fluorescentes.

Dias, Lucinara Dadda ¹; Cañedo, Delgado Andrés ¹; Vargas, José Eduardo ^{1,2}

¹ Instituto de Cardiologia do Rio Grande do Sul / IC/FUC

² Universidade Federal Rio Grande do Sul/ Laboratório de Plasticidade e Sinalização Celular. E-mail para contato: lucinaradada@yahoo.com.br

Os promotores são regiões específicas encontradas acima das regiões transcricionais, onde fatores de transcrição interagem com o DNA, iniciando o processo transcricional dos genes. A transcrição é a primeira etapa na expressão gênica e constitui, geralmente, o ponto mais importante no controle desta. Quando a expressão gênica é analisada *in vitro*, a utilização de proteínas fluorescentes é de grande importância. Os genes repórteres fluorescentes, como os que codificam as proteínas verde e vermelha fluorescentes (GFP e DsRed, respectivamente), podem ser observados e quantificados nas células transformadas sem a necessidade de lisá-las, permitindo estudos cinéticos através dos seus sinais. Os ensaios que analisam a atividade de promotores, frequentemente, utilizam dois plasmídeos com genes repórteres (na maioria das vezes são enzimas) sob o controle de diferentes promotores, os quais são co-transfectados. As células devem ser lisadas durante as análises e ensaios cinéticos dão valores indiretos. Por outro lado, a utilização de proteínas fluorescente permite ultrapassar esta barreira permitindo a realização de estudos cinéticos com valores diretos. Como ainda não existe um plasmídeo que permita analisar a atividade de promotores, baseado em proteínas fluorescentes, e sem a necessidade de co-transfecção o objetivo deste trabalho foi: criar um plasmídeo para estudo de promotores *in vitro* através da expressão de duas proteínas fluorescentes, uma delas sob controle de um promotor constitutivo e a outra sob controle do promotor a ser estudado. Como materiais e métodos foram utilizados 3 plasmídeos: pCR2.1 IRES-DsRed, pCR3.1 e pEGFP-N1. O gene DsRed, foi amplificado por PCR, com *primers* específicos, flanqueados por sítios de *BlnI* e clonado no plasmídeo pCR3.1. Para comprovar cada uma das clonagens realizamos as técnicas de PCR de colônia e clivagens com as endonucleases de restrição. Posteriormente à comprovação por PCR da clonagem do gene DsRed no plasmídeo pCR3.1, três clones foram clivados com as endonucleases *PvuII*, *NcoI* ou *BlnI* utilizando-se de controle o plasmídeo pCR3.1 clivado com as mesmas enzimas. Como resultados o padrão de bandas dos três clones analisados mostrou-se diferente ao padrão obtido após clivagem do controle, confirmando a clonagem. Entretanto, unicamente dois clones apresentaram o padrão de bandas esperado para o tipo de clonagem em questão. Para testar a funcionalidade do construto que denominamos pCRed realizamos transfecções dos dois clones que apresentaram o padrão de bandas esperado. Após transfecção dos clones em células da linhagem HEK293 não foi possível determinar a expressão de DsRed em nosso construto, somente nas transfecções dos plasmídeos controles. Após intensa revisão bibliográfica, foi comprovado que o promotor SV40 que regularia o gene DsRed comporta-se como um promotor muito fraco em várias linhagens, entre elas a utilizada como base no nosso projeto. Nossas perspectivas além de atingir o objetivo anteriormente exposto, pretendemos contribuir com uma ferramenta biotecnológica útil para outros pesquisadores.