

**UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE
CAMPINAS**

doutorado

BC/46096

IB/ 81665

INSTITUTO DE BIOLOGIA





Expressão de um cDNA da proinsulina humana em sementes de tabaco transgênico

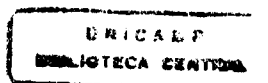
Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato a) <i>Eneida Abreu Parizotto</i> e aprovada pela Comissão Julgadora
--

Adilson Leite

Tese apresentada ao Instituto de Biologia, da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Doutor em Genética e Biologia Molecular, área de concentração Genética Vegetal e Melhoramento.

Aluna: **Eneida Abreu Parizotto**
Orientador: Prof. Dr. Adilson Leite

Campinas/SP
2001



UNIDADE 13/85665
 N.º CHAMADA: 1/UNICAMP
P219e
 V. Ex.
 TOMBO BC/ 46096
 PROC. 16-392/01
 C ☐ D ☒
 PREÇO R\$ 11,00
 DATA 16-08-01
 N.º CPU

CM00158797-6

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

Parizotto, Eneida Abreu

P219e

Expressão de um cDNA da proinsulina humana em sementes de tabaco transgênico/Eneida Abreu Parizotto. - - Campinas, S.P. [s.n.], 2001.
75f: ilus.

Orientador: Adilson Leite

Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia.

1. Plantas transgênicas. 2. Proteínas heterólogas. 3. Proinsulina humana. I. Leite, Adilson. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

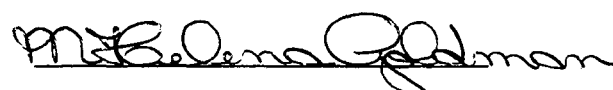
Banca examinadora

Campinas, 14 de Maio de 2001.

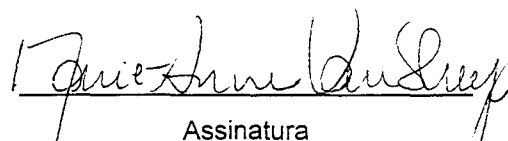
Prof. Dr. Adilson Leite


Assinatura

Profa. Dra. Maria Helena de Souza Goldman


Assinatura

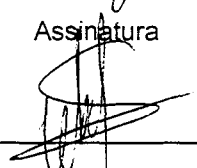
Profa. Dra. Marie-Anne Van Sluys


Assinatura

Prof. Dra. Anete Pereira de Souza


Assinatura

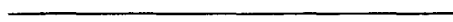
Prof. Dr. Michel Georges Albert Vincentz


Assinatura

Prof. Dr. Antonio Carlos Boschero


Assinatura

Prof. Dr. Jörg Kobarg


Assinatura

“A semente que morre semente,
não viveu,
não realizou a missão que lhe estava reservada:
multiplicar e produzir vida.”

Joanna de Ângelis

Ao 文華,
presença transformadora em minha vida.
Obrigada pelo seu exemplo,
pela sua alegria, pelo seu apoio.
(Era uma vez uma disciplina de Genética...)

Agradecimentos

Ao meu orientador, Adilson, pela oportunidade de trabalhar com Engenharia Genética, e por tudo que pude aprender através deste Doutorado.

Ao CNPq e aos meus pais, pelo apoio financeiro.

Aos doutores Anete P. de Souza, Antonio C. Boschero, Jörg Kobarg, Maria Helena de S. Goldman, Marie-Anne Van Sluys e Michel G. A. Vincentz, membros da banca examinadora.

Aos doutores Celso E. Benedetti, Marcelo Menossi e Michel G. A. Vincentz, pela participação na pré-banca.

À Dra. Heloisa R. T. de Sousa, da Biobrás, pela proinsulina humana que foi utilizada como padrão neste trabalho e pela atenção com que sempre me atendeu.

Aos doutores Antonio C. Boschero e Everardo M. Carneiro, e à Maria Esméria C. Amaral, pela realização dos radioimunoensaios.

Aos colegas André, Édson, Celso, Rodrigo, Fabinho e Alba, que me ajudaram de modo especial com as técnicas novas que aprendi durante o Doutorado.

Ao Mário, pela participação neste projeto e pela continuidade de parte dele, através de sua Iniciação Científica.

Ao Eduardo, pela ajuda em todas as etapas do processo de obtenção das sementes de tabaco transgênico.

Ao seu Chico, pela ajuda no manejo das plantas na casa-de-vegetação.

Aos colegas e técnicos do Laboratório de Biologia Molecular de Plantas, do CBMEG, por todos os nossos bons momentos.

Aos amigos Ed, Dani, Ju, Marcela, Ivy e Eliana, pela convivência gostosa desde os meus tempos de Mestrado.

Às amigas (além de colegas) Luciana, Alba, Adriana, Letícia e Luciane, pelo convívio agradável no laboratório e por nossos almoços, com direito a café e

terapia. À Adriana, agradeço também pela acolhida tão gentil em sua casa, nesta fase de transição.

À amiga Sandrinha, pelo apoio nos momentos muito difíceis, e por sua paz, que sempre me inspirou.

À minha amiga-irmã Stela, pela amizade que nos une há tanto tempo, por nossas conversas intermináveis e pelo apoio constante.

Ao meu irmão Tuco (Sérgio), pelo amor que sempre nos uniu.

À minha irmã-amiga Renata, pela presença tão carinhosa em minha vida.

À minha mãe, Sônia, pelo seu amor, seu carinho, seu zelo, e pela paciência que tem comigo.

Ao meu pai, Sérgio, pelo exemplo de força e discernimento que tem sido em minha vida.

A Deus, pela minha vida, pelas minhas lutas.

Abreviaturas	x
Resumo	1
Abstract	2
Introdução	3
O uso de plantas como biorreatores	4
O uso de plantas transgênicas como biorreatores	9
A insulina humana	14
Objetivos	20
Materiais e métodos	21
Material vegetal	21
Oligonucleotídeos utilizados	21
Construção dos plasmídios	22
Transformação de agrobactérias	28
Minipreparação de DNA plasmidial de agrobactérias	28
Transformação de tabaco	29
Extração de DNA das plantas	30
Amplificação por PCR do DNA das plantas	31
<i>Southern blotting</i>	31
Avaliação da atividade da enzima β -glucoronidase	33
Extração de proteínas solúveis das sementes	34
Radioimunoensaio	35
Imunoensaios para detecção de insulina e peptídio C	35
<i>Western blotting</i>	35
Técnicas cromatográficas	36
Resultados e discussão	38
Obtenção das plantas transgênicas	38
Análise das plantas transformadas	40

Análise da expressão do transgene nas sementes de tabaco	43
Caracterização do produto de expressão do transgene	49
Conclusões	59
Literatura citada	61

ANA	ácido naftalenoacético
BA	benziladenina
CaMV	vírus do mosaico da couve-flor
cpm	cintilações por minuto
DTT	ditiotreitól
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
GUS	enzima β -glucoronidase
<i>gus</i>	gene que codifica a enzima β -glucoronidase
kDa	kilodaltons
pb	pares de bases
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PMSF	<i>phenylmethanesulfonyl fluoride</i>
RIE	radioimunoensaio
SDS	dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS
SSC	<i>salt sodium citrate</i>
rpm	rotações por minuto
tris	tris(hidroximetil)aminometano

As plantas podem ser exploradas como biorreatores para a produção de proteínas, carboidratos e lipídios em larga escala. A produção de proteínas heterólogas é particularmente promissora, principalmente a produção daquelas que apresentam interesse farmacêutico ou industrial.

Visando explorar as plantas como biorreatores para a produção de insulina humana, foram obtidas plantas transgênicas transformadas com a região codificadora da proinsulina humana. O tabaco foi empregado como planta modelo e foi utilizado um cassete de expressão semente-específico.

As plantas foram transformadas com vetores de expressão contendo a região codificadora da proinsulina humana precedida por dois tipos de peptídios-sinais: o nativo da insulina humana, e o peptídio-sinal de uma proteína de reserva de *Coix lacryma-jobi*.

A avaliação das plantas transformadas através de radioimunoensaios para a detecção de insulina, utilizando-se um anticorpo policlonal, revelou a presença de peptídios imunorreativos. Para melhor caracterizar o produto de expressão do transgene, foram realizados imunoensaios mais específicos com uma das plantas transgênicas, transformada com o vetor de expressão contendo o peptídio-sinal humano. Estes ensaios detectaram a presença de proinsulina humana nas sementes. A insulina humana não foi detectada, indicando a ausência de processamento proteolítico tal qual o observado em mamíferos durante a síntese de insulina madura.

As plantas transgênicas obtidas neste trabalho permitirão que o processamento dos dois tipos de preprohormônios recombinantes produzidos seja avaliado em trabalho subsequente.

Advances in biotechnology are enabling plants to be exploited as biorreactors for the production of proteins, carbohydrates and lipids. Plants are also becoming economically important systems for producing heterologous proteins, mainly pharmaceutical polypeptides and industrial enzymes.

To explore plants as biorreactors for the production of human insulin, the cDNA encoding proinsulin under the control of a seed-specific promoter was introduced into tobacco via *Agrobacterium tumefaciens* gene transfer.

The human preproinsulin presequence or the signal sequence from a *Coix lacryma-jobi* prolamin was used to address the recombinant protein to the secretory pathway.

Insulin-related products were detected and measured in the transgenic plants by radioimmunoassays. To characterize the immunoreactive products, one of the transgenic plants was analyzed through more specific immunoassays. These assays detected human proinsulin in tobacco seeds. Human insulin was not detected, suggesting that the expected proteolytic processing of proinsulin did not occur.

Processing of preprotein precursors produced by both types of transgenic plants will be studied in additional experiments.

O grande progresso da biologia molecular de plantas nas últimas duas décadas permitiu que as plantas cultivadas pudessem ser modificadas através de uma nova abordagem. A tecnologia do DNA recombinante veio trazer novas ferramentas para a manipulação genética de plantas, permitindo que algumas das limitações dos métodos clássicos fossem superadas.

Através dos esforços no mundo todo para se estudar a função dos genomas, praticamente qualquer gene de interesse está, ou logo estará disponível. Assim, genes que codificam características de interesse (genes responsáveis pela resistência a um processo fitopatogênico qualquer, por exemplo) podem ser identificados e inseridos em variedades bem estabelecidas, economicamente importantes.

Dentre as aplicações da tecnologia do DNA recombinante, o desenvolvimento de plantas transgênicas, com novas características, é uma das mais importantes. As plantas podem ser alteradas com basicamente duas finalidades: a) modificação fenotípica da planta visando-se ao melhoramento de suas características agrônomicas e de suas qualidades nutricionais, e b) uso destas plantas como biorreatores para produtos terapêuticos e produtos de interesse industrial.

Inicialmente, o desenvolvimento de plantas transgênicas visava apenas ao melhoramento agrônomico, através da introdução de genes capazes de conferir resistência a herbicidas e ao ataque de insetos e microorganismos. Atualmente, as plantas transgênicas estão sendo também exploradas para o desenvolvimento de alimentos que apresentem conteúdo balanceado de aminoácidos, ou ainda, que sejam enriquecidos em óleos insaturados e vitaminas. Alguns grupos têm abordado problemas como a desnutrição, e o exemplo que se tornou mais conhecido neste sentido é o do “arroz dourado”, que foi geneticamente modificado para produzir beta-caroteno, precursor da vitamina A (Ye *et al.*, 2000). Este arroz

ainda não está pronto para ser comercializado, e muitos testes precisam ser realizados (previstos para terminar em 2003), como por exemplo análises para se saber se o corpo humano pode, eficientemente, absorver o beta-caroteno produzido pelo arroz transgênico.

O uso de plantas como biorreatores

As plantas podem ser exploradas como biorreatores para a produção de proteínas, carboidratos e lipídios em larga escala. A produção de proteínas heterólogas é particularmente promissora, principalmente a produção daquelas que apresentam interesse farmacêutico ou industrial. Adicionalmente, alterações genéticas que determinam modificações em vias metabólicas das plantas podem ser empregadas para a produção de polímeros ou compostos orgânicos de baixo peso molecular.

O número de compostos produzidos através dessa abordagem tem aumentado consideravelmente, sendo que a viabilidade do uso das plantas como biorreatores já foi demonstrada para a produção de carboidratos, ácidos graxos, polipeptídeos utilizados como fármacos, enzimas de uso industrial e plásticos biodegradáveis (revisões sobre o assunto podem ser encontradas em Goddijn & Pen, 1995; Hood & Jilka, 1999; Parizotto *et al.*, 2000).

A agricultura é o sistema mais econômico para a produção de proteínas em larga escala. Todas as suas vantagens aplicam-se também à produção de proteínas heterólogas, representando uma alternativa para os sistemas baseados em fermentação microbiana, células animais e animais transgênicos. Algumas destas vantagens estão citadas a seguir:

a) As plantas apresentam órgãos destinados para a função de armazenamento (sementes, tubérculos, raízes especializadas), onde altos níveis de proteínas podem ser estocados. As proteínas produzidas em sementes, particularmente, permitem a redução dos gastos com armazenamento.

b) As plantas, ao contrário dos microorganismos procariotos, são capazes de realizar modificações pós-traducionais de proteínas eucarióticas, muitas vezes essenciais ao seu funcionamento.

c) As plantas apresentam baixos riscos de contaminação por organismos patogênicos aos humanos, e apresentam também vantagens quando se leva em conta a aceitação por parte do consumidor.

d) As plantas são potencialmente uma fonte de produtos recombinantes de baixo custo. Kusnadi *et al.* (1997) estimaram que o custo da produção de proteínas recombinantes em determinadas plantas pode ser de 10 a 50 vezes menor que o custo da produção destas mesmas proteínas em *Escherichia coli*. Harris (1999) comparou diferentes sistemas de expressão para a produção de fragmentos de anticorpos. O custo de produção estimado por massa de fragmento para os sistemas baseados em células de mamíferos transfectadas, leite de animais transgênicos e bactérias recombinantes foi, respectivamente, 1000, 200 e 3,3 vezes superior ao custo de produção estimado para o sistema baseado em plantas transgênicas.

Basicamente, duas diferentes estratégias podem ser utilizadas para a produção de proteínas heterólogas em plantas. Uma delas baseia-se na utilização de vírus contendo RNA de fita simples, que ocorrem naturalmente nas plantas. O gene que codifica a proteína de interesse é inserido no genoma do vírus, geralmente fusionado à região estrutural de um gene que codifica uma proteína da capa viral. Depois de infectar a planta, o vírus promove sua replicação e a expressão de seus genes, incluindo o gene que codifica a proteína heteróloga. A expressão deste gene é transitória, pois ele não é integrado ao genoma da planta. Esta, por sua vez, funciona como um veículo para a amplificação das partículas virais (Figura 1). A proteína recombinante é recuperada através do processamento da proteína da capa viral, que é purificada a partir de extratos dos tecidos infectados. Opcionalmente, as partículas virais quiméricas purificadas podem ser utilizadas diretamente na formulação de vacinas orais e nasais (Beachy *et al.*, 1996).

A outra estratégia para a produção de proteínas heterólogas em plantas consiste na introdução do gene que codifica a proteína de interesse no genoma da planta através de técnicas de transformação genética, envolvendo portanto a obtenção de plantas transgênicas. O desenvolvimento de uma série de técnicas

de transformação permitiu a obtenção de plantas transgênicas da maioria das espécies cultivadas. A integração estável permite a expressão permanente do gene e sua transferência à progênie da planta transformada (Figura 1). Enquanto a estratégia mediada por vírus geralmente determina a expressão apenas em folhas, a integração permanente apresenta maior versatilidade, permitindo que a expressão ocorra especificamente nos diversos órgãos e tecidos das plantas.

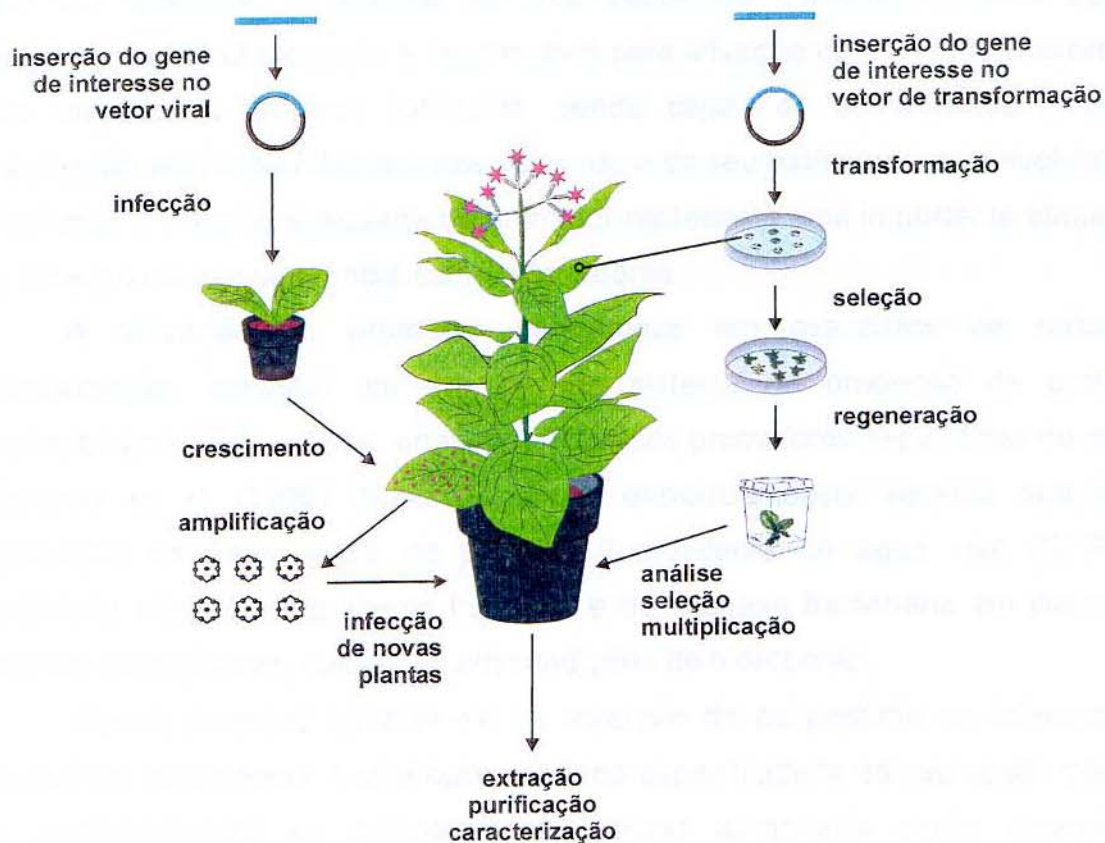


Figura 1. Representação esquemática das diferentes estratégias utilizadas na produção de proteínas heterólogas em plantas. Do lado esquerdo estão representadas as principais etapas envolvidas na produção de proteínas heterólogas em plantas através do emprego de vírus carreadores. Do lado direito estão representadas as principais etapas envolvidas na produção de proteínas heterólogas em plantas transgênicas e transplastômicas.

A tecido-especificidade da expressão nas plantas transgênicas é obtida através da utilização de promotores específicos. O direcionamento para os diversos compartimentos intracelulares, por sua vez, é obtido através da inclusão de peptídios-sinais na proteína recombinante. Estas características têm sido exploradas no desenvolvimento de sistemas de produção capazes de simplificar o armazenamento do material vegetal colhido e os processos de extração e purificação das proteínas recombinantes.

Geralmente, o gene de interesse é incluído em um cassete de expressão que contém a seqüência nucleotídica codificadora da proteína heteróloga precedida por um promotor, e seguida de uma seqüência contendo sinal e sítio de poliadenilação. O promotor é responsável pela ativação ou inibição da expressão em resposta a diversos estímulos, sendo capaz de controlar os níveis de expressão em função da natureza do tecido e do seu estágio de desenvolvimento. Portanto, a escolha adequada do promotor representa uma importante etapa para o sucesso do uso de plantas como biorreatores.

A secreção de proteínas heterólogas em exsudatos de raízes, a rizosecreção, constitui um exemplo de sistema de produção de proteínas recombinantes em plantas, onde são utilizados promotores específicos de raízes. Borisjuk *et al.* (1999) demonstraram a eficiência deste sistema através da produção de altos níveis da proteína fluorescente de água viva (GFP), da fosfatase alcalina de placenta humana, e de xilanase bacteriana em plantas de tabaco transgênicas, cultivadas em condições de hidroponia.

Alguns sistemas baseiam-se na inserção do polipeptídio de interesse em proteínas carreadoras. Neste caso, a tecido-especificidade da expressão gênica e o direcionamento ao compartimento celular apropriado serão controlados, respectivamente, pelo promotor e pelo peptídio-sinal da proteína carreadora. Esta estratégia foi utilizada na produção de encefalina inserida na albumina 2S de *Arabidopsis thaliana* (Vandekerckhove *et al.*, 1989), e do anticoagulante hirudina inserido em oleosina (Parmenter *et al.*, 1995). Os sinais presentes nas proteínas albumina 2S e oleosina endereçam a produção das proteínas recombinantes para corpúsculos proteicos e lipídicos de sementes, respectivamente. A grande

vantagem do sistema baseado no uso de oleosinas reside no fato de que os corpúsculos lipídicos e as proteínas associadas, devido à sua baixa densidade, são facilmente isolados por flotação após centrifugação a baixa rotação. Atualmente, a empresa canadense SemBioSys (www.sembiosys.ca) explora este sistema de expressão para a produção de diversas proteínas recombinantes em canola transgênica.

As proteínas heterólogas podem ainda ser produzidas em cloroplastos, em plantas transformadas através da introdução dos genes codificadores das proteínas de interesse no próprio DNA do cloroplasto, por meio de técnicas de biobalística e posterior integração do cassete de expressão por recombinação homóloga (Figura 1). Para diferenciar estas plantas das plantas transgênicas com inserções no DNA nuclear, as plantas assim obtidas são denominadas de transplastômicas. O grande número de cloroplastos presentes nas células das folhas (aproximadamente 100 por célula) determina grande amplificação gênica, podendo resultar em altos rendimentos na produção da proteína recombinante. A transformação de cloroplastos apresenta, ainda, vantagem em relação à contenção biológica, posto que o genoma plastidial raramente é transmitido via pólen.

Recentemente, Staub *et al.* (2000) descreveram a obtenção de rendimentos superiores a 7% das proteínas solúveis totais para a produção do hormônio de crescimento humano (hGH) em cloroplastos de tabaco. Entretanto, grande parte do hGH recombinante produzido apresentou um resíduo do aminoácido prolina na extremidade amídica, ao invés do resíduo de fenilalanina presente na mesma região do hormônio natural. Este resultado indica que a estratégia utilizada no processamento, catalisado por uma protease específica para ubiquitina, que é produzida simultaneamente com a proteína de fusão ubiquitina-hGH, não apresentou a eficiência desejada em cloroplastos. A fenilalanina que deveria estar presente na extremidade amídica do hGH recombinante foi provavelmente removida durante o processamento da proteína de fusão. Portanto, apesar do alto rendimento descrito para a produção do hGH, o sistema de expressão baseado

em cloroplastos requer aperfeiçoamento na etapa de processamento pós-traducional das proteínas recombinantes.

O uso de plantas transgênicas como biorreatores

A produção de proteínas usadas como fármacos em plantas constitui-se em uma alternativa para processos muitas vezes caros, os quais nem sempre são capazes de suprir a demanda destes produtos. Vandekerckhove *et al.* (1989) realizaram um dos trabalhos pioneiros nesta área de pesquisa, onde o neuropeptídeo leu-encefalina (um analgésico opióide) foi produzido em *Arabidopsis thaliana* e em *Brassica napus* (canola), como parte de uma proteína de reserva da semente, a albumina 2S. Através de clivagens proteolíticas o peptídeo foi isolado e então purificado, com rendimento de 0,1% do total de proteínas extraídas das sementes.

O número de fármacos produzidos em plantas aumentou bastante desde então, e atualmente existem plantas transgênicas capazes de sintetizar as seguintes proteínas humanas: interferon α D, albumina sérica, angiotensina, proteína C, fator de crescimento epidérmico, eritropoietina, glucocerebrosidase, encefalina, hemoglobina, colágeno e α -1-antitripsina, entre outras (conforme revisado por Giddings *et al.*, 2000).

Embora os trabalhos iniciais tenham dado ênfase à produção de polipeptídeos de valor farmacêutico, as plantas têm sido testadas também para a produção de enzimas industriais. Um dos exemplos importantes da viabilidade deste tipo de aplicação está demonstrado no trabalho de Pen *et al.* (1992), onde plantas de tabaco transgênicas produziram a α -amilase de *Bacillus licheniformis*. A enzima produzida foi secretada para o espaço intercelular, atingindo níveis de até 0,3% das proteínas solúveis totais. O mesmo grupo (Pen *et al.*, 1993) desenvolveu sementes de tabaco transgênicas capazes de produzir fitase. A fitase degrada o fitato, que é a principal forma de armazenamento de fósforo em sementes, sendo este, por sua vez, dificilmente aproveitado naquela forma pelos animais monogástricos. A fitase já é produzida por plantas como a soja, que poderão ser

usadas diretamente como suplemento para rações, substituindo o uso de fitases provenientes de fungos, disponíveis no mercado.

Nawrath *et al.* (1994) e Poirier *et al.* (1995) mostraram que plásticos biodegradáveis podem ser produzidos em plantas. Herbers *et al.* (1995) obtiveram tabaco transgênico capaz de sintetizar xilanase, enzima com inúmeras aplicações na indústria de papel, na indústria de alimentos e na agricultura.

As plantas geneticamente modificadas também podem ser aplicadas para a produção de vacinas. Genes de antígenos de patógenos bacterianos ou virais podem ser expressos em plantas, sem a perda de suas propriedades imunogênicas originais. Segundo Moffat (1995), os pesquisadores usam diversas abordagens para produzir antígenos vacinais em plantas, sendo muito promissoras as “vacinas comestíveis”, pela redução nos custos e facilidade de administração, uma vez que simplificariam os processos envolvidos na produção e distribuição das vacinas.

Buscando demonstrar que proteínas heterólogas produzidas em plantas poderiam induzir resposta imune nos animais, Mason *et al.* (1992) introduziram, em tabaco, o gene codificador da proteína de superfície do vírus da hepatite B (HBV), ligado a um promotor constitutivo. Imunoensaios revelaram a presença da proteína viral em extratos das folhas transformadas, indicando a viabilidade da produção de antígenos vacinais em plantas. Thanavala *et al.* (1995) demonstraram que a proteína viral obtida nos extratos das folhas de tabaco transformadas foi capaz de induzir resposta imunogênica *in vivo*, quando utilizada na imunização parenteral de camundongos. Dando prosseguimento a este trabalho, Richter *et al.* (2000) demonstraram a imunogenicidade oral do antígeno de superfície do HBV, produzido em tubérculos de batata transgênica, em ensaios pré-clínicos com camundongos. Uma vez que a apresentação de antígenos pela via oral requer maiores quantidades do imunógeno em relação à via parenteral, estes autores têm trabalhado no desenvolvimento de vetores que permitam elevar os níveis de produção do antígeno de superfície do HBV nas plantas transgênicas.

Trabalhando com a subunidade B da enterotoxina termolábil (LT-B) de *E. coli*, Haq *et al.* (1995) produziram tabaco e batata transgênicos. As duas

espécies de plantas produziram o peptídeo exógeno. Camundongos alimentados com as batatas geneticamente modificadas desenvolveram anticorpos contra a enterotoxina, demonstrando a viabilidade da produção de vacinas comestíveis a partir de plantas transgênicas. Entretanto, devido ao baixo nível de produção do antígeno, os autores desenharam um gene sintético que codifica a LT-B, no qual foram feitas alterações visando aumentar a estabilidade do mRNA e a eficiência do processo de tradução (Mason *et al.*, 1998). Desta forma, aumentaram as taxas de produção do antígeno nas plantas, o que resultou na elevação dos níveis de produção de IgG (no soro) e de IgA (secretada pela mucosa intestinal) nos camundongos testados.

Mason *et al.* (1996), trabalhando também com tabaco e batata, obtiveram plantas transgênicas que produziram a proteína do capsídeo do vírus Norwalk, um calicivírus que causa gastroenterite aguda epidêmica na espécie humana. O antígeno produzido nas folhas do tabaco ou nos tubérculos da batata mostrou-se imunogênico em camundongos. Os camundongos alimentados com batata, bem como aqueles que receberam extratos de folhas de tabaco, desenvolveram imunoglobulinas do tipo IgG que reconheceram especificamente a proteína viral.

Os primeiros testes clínicos realizados com plantas transgênicas, que mostraram sucesso na imunização de seres humanos, foram descritos por Tacket *et al.*, em 1998. Os voluntários submetidos aos testes foram alimentados com batatas transgênicas cruas contendo a toxina LT-B de *E. coli* enterotoxigênica (ETEC). A ingestão destas batatas resultou em resposta imune significativa, tanto sistêmica quanto em mucosas, comprovando que as proteínas produzidas nas plantas transgênicas mantiveram sua imunogenicidade. Este resultado pode estimular o desenvolvimento de estratégias de imunização oral através da utilização de plantas transgênicas, especialmente para doenças do trato gastrointestinal, tais como o cólera e outras enterites de origem viral ou bacteriana.

Com uma estratégia diferente de trabalho, visando à imunização passiva através de plantas transgênicas, Ma *et al.* (1994) obtiveram quatro linhagens de tabaco transgênico, cada uma delas produzindo uma das quatro cadeias

polipeptídicas que compõem um anticorpo monoclonal do tipo IgA, contra a bactéria *Streptococcus mutans*, causadora da cárie. Através de cruzamentos sucessivos entre estas plantas, transformadas com um vetor de expressão constitutiva, obtiveram plantas recombinantes produzindo simultaneamente as quatro cadeias polipeptídicas, que resultaram em uma imunoglobulina do tipo IgA funcional.

As imunoglobulinas do tipo IgA correspondem à principal classe de anticorpos presentes em secreções como a saliva, a lágrima, o leite e secreções do sistema respiratório e intestinal, constituindo-se na primeira barreira contra organismos patogênicos. Devido à sua estrutura complexa, estes anticorpos apresentam maior estabilidade e resistência à proteólise que os anticorpos do tipo IgG e IgM, presentes no soro. Nenhum outro sistema de expressão desenvolvido até o momento foi capaz de produzir uma IgA recombinante funcional. Portanto, o trabalho de Ma *et al.* (1994) mostrou quão promissora é a utilização de plantas transgênicas para a produção de proteínas heterólogas.

Dando continuidade a esse estudo, Ma *et al.* (1998) mostraram que esse anticorpo obtido em planta, contra a proteína de adesão de 185 kDa de *Streptococcus mutans*, foi capaz de impedir que esta bactéria colonizasse dentes e gengivas de voluntários que se submeteram a testes. Nestes voluntários, foram aplicadas soluções contendo os anticorpos recombinantes purificados a partir de folhas das plantas transgênicas. Estes resultados demonstram que a abordagem de imunoterapia passiva preventiva através de anticorpos produzidos em plantas transgênicas também é promissora, podendo servir evidentemente para outros tipos de infecções microbianas de mucosas.

Estudos recentes demonstraram a viabilidade da utilização de plantas comestíveis como veículos para antígenos a serem utilizados em estratégias de obtenção de imunotolerância contra doenças autoimunes mediadas por células T. Arakawa *et al.* (1998) descreveram a proteção de ratos contra o desenvolvimento de diabetes autoimune através da alimentação com batatas transgênicas produzindo uma proteína quimérica constituída pela subunidade B da toxina colérica e pela insulina humana. O mecanismo deste processo ainda não foi

completamente elucidado. Segundo os autores, os autoantígenos possivelmente agem ativando células supressoras do sistema imunológico.

Os exemplos citados demonstram claramente que as plantas transgênicas podem ser exploradas como uma alternativa interessante para a produção de proteínas heterólogas. Entretanto, proteínas recombinantes produzidas na maioria dos tecidos vegetais requerem que estes sejam armazenados em condições especiais, quando não são extraídas imediatamente após a colheita. A produção em sementes, por sua vez, permite o armazenamento por longos períodos, sem que ocorra degradação das proteínas recombinantes. Nas sementes, as proteínas são compartimentalizadas em corpúsculos proteicos, em um ambiente seco e estável, sem atividade enzimática significativa antes da germinação (Tackaberry *et al.*, 1999). Além disso, o uso de promotores semente-específicos impede a produção generalizada da proteína na planta, de modo que seus processos metabólicos básicos não sejam significativamente afetados.

Fiedler & Conrad (1995) mostraram que sementes transgênicas de tabaco, produzindo um anticorpo que reconhece o hapteno oxazolona, puderam ser armazenadas por um ano em temperatura ambiente sem que houvesse degradação do anticorpo ou perda de sua atividade. Tackaberry *et al.* (1999), por sua vez, mostraram a estabilidade de uma glicoproteína (a glicoproteína B do citomegalovírus humano) em sementes de tabaco armazenadas por mais de 18 meses.

Inúmeros promotores específicos de genes de proteínas de reserva de sementes já foram identificados e caracterizados. Os promotores de prolaminas, particularmente, foram bem estudados e caracterizados em nosso laboratório, o que levou nosso grupo a examinar se promotores de prolaminas de cereais poderiam ser usados para a produção de proteínas heterólogas em plantas.

Confirmando a viabilidade da produção de proteínas recombinantes em sementes, através do uso de um promotor de uma prolamina de sorgo (um promotor semente-específico), Leite *et al.* (2000) desenvolveram um sistema de expressão tecido-específico que permitiu a produção do hormônio de crescimento humano (hGH) em sementes de tabaco transgênico. O hormônio recombinante

produzido foi corretamente processado, apresentando propriedades de ligação a receptores similares às da proteína nativa.

As duas primeiras proteínas heterólogas produzidas a partir de plantas transgênicas a serem comercializadas (pela empresa Sigma) foram a avidina, utilizada na produção de reagentes para imunoenaios (Hood *et al.*, 1997), e a β -glucoronidase, usada em ensaios bioquímicos (Witcher *et al.*, 1998). Estas duas proteínas estão sendo produzidas em sementes de milho transgênico desenvolvidas pela empresa ProdiGene Inc (www.prodigene.com), mostrando que o uso de plantas como biorreatores é hoje uma realidade, e abrindo perspectivas para a produção em larga escala de outras proteínas de interesse econômico em plantas.

A insulina humana

Nos animais, a insulina é produzida nas células β do pâncreas e, assim como outros hormônios e proteínas secretadas, é sintetizada como um precursor, a preproinsulina (Figura 2).

O peptídeo-sinal, responsável pelo direcionamento da proteína para o retículo endoplasmático, é clivado simultaneamente com a tradução, produzindo a proinsulina. A proinsulina humana é composta por 86 aminoácidos, que se ligam

Preproinsulina ($M_r=11.982$)



Figura 2. Sequência de aminoácidos da preproinsulina humana. Estão indicadas as seqüências do peptídeo-sinal, cadeias A e B e peptídeo C, bem como as massas moleculares (em kDa) deduzidas para cada um dos peptídeos.

através de 3 pontes de dissulfeto. Este segundo precursor sofre então clivagens proteolíticas internas gerando a insulina madura (Steiner *et al.*, 1996). Este processamento ocorre dentro da própria célula β , em vesículas secretórias formadas na rede trans-Golgi, onde a insulina processada permanece armazenada até que a célula receba estímulo para sua liberação.

As endoproteases responsáveis pelo processamento da proinsulina são proteases da família da furina (Mackin, 1998), sendo as prohormônio-convertases 1 e 2 (PC1 e PC2) as endoproteases envolvidas neste processo (Steiner *et al.*, 1996). Estas enzimas clivam ligações peptídicas internas em dois pares de aminoácidos básicos, liberando o peptídeo C. Posteriormente, estes aminoácidos básicos são removidos pela ação da carboxipeptidase E/H (Figura 3), resultando na insulina madura (Figura 4).

Vários resultados sugeriam que as enzimas endoproteolíticas apresentavam especificidade para os sítios de clivagem. As convertases PC1 e PC2 clivariam nas terminações carboxila dos aminoácidos Arg³² e Arg⁶⁵, respectivamente (Figura 3). Entretanto, trabalhos recentes demonstraram que algumas enzimas são capazes de converter proinsulina em insulina, independentemente da presença de outras. Kaufmann *et al.* (1997) mostraram que tanto a PC1 como a PC2 podem, isoladamente, clivar os dois sítios envolvidos na conversão da proinsulina em insulina. Vollenweider *et al.* (1995), por outro lado, mostraram que a PC1 ou a furina (uma outra convertase) promovem isoladamente as clivagens na proinsulina humana, sendo a PC2, entretanto, incapaz de fazer a conversão nas células testadas (células COS).

Desde o início da década de 20, o *diabetes mellitus* vem sendo tratado com insulina purificada de pâncreas de suínos ou bovinos, que vem sendo substituída gradativamente por insulina recombinante. Em 1981, pesquisadores da Eli Lilly divulgaram em um simpósio americano (*Seventh American Peptide Chemistry Symposium*) a produção de insulina e de proinsulina em bactérias através da tecnologia do DNA recombinante. Visando à proteção dos interesses de propriedade, o protocolo obviamente nunca foi completamente descrito (Cowley & Mackin, 1997). A insulina humana recombinante produzida em *E. coli* chegou ao

mercado pela primeira vez em 1982 (Johnson, 1983), e desde então, muito se tem trabalhado no desenvolvimento de métodos de produção de insulina recombinante economicamente viáveis.

Atualmente, uma parte significativa da insulina recombinante é produzida em sistemas de expressão baseados em bactérias ou leveduras, que envolvem metodologia complexa e cara para o processamento dos precursores de insulina sintetizados e para a purificação da insulina processada.

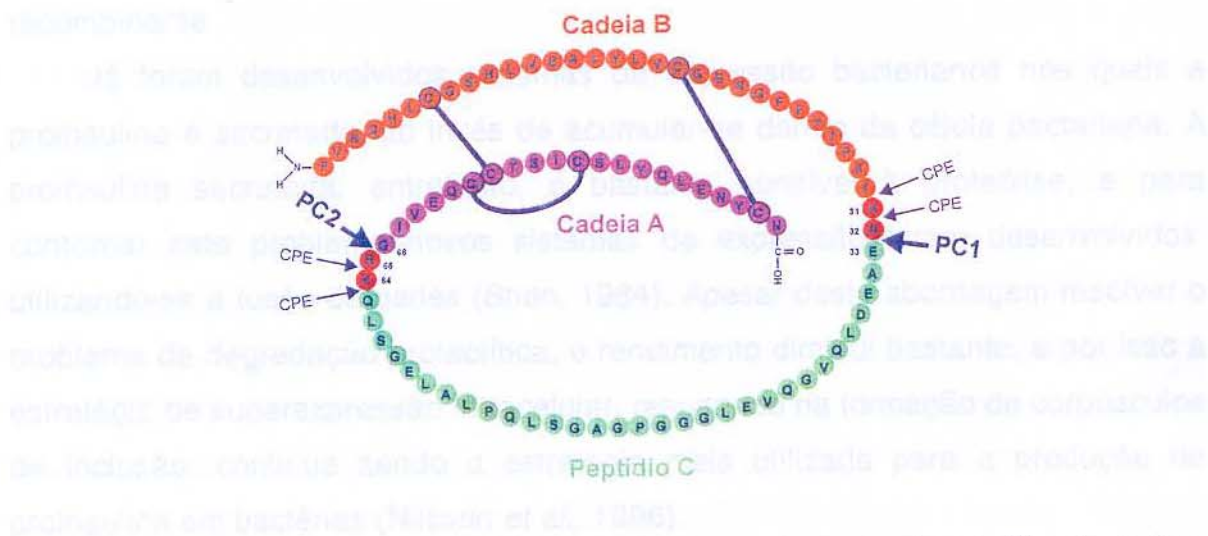


Figura 3. Representação esquemática da proinsulina humana, mostrando os sítios-alvos das convertases PC1 e PC2, envolvidas no processamento. As regiões das cadeias A e B do peptídeo estão indicadas em diferentes cores. Os resíduos de cisteína que participam da formação de pontes de dissulfeto estão destacados. Os resíduos retirados pela carboxipeptidase E/H (CPE) estão representados em vermelho.

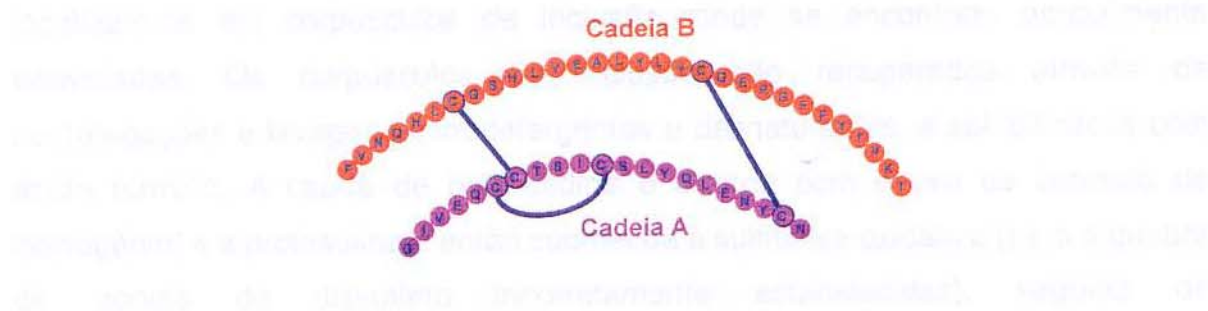


Figura 4. Representação esquemática da insulina humana madura, mostrando as cadeias A e B, e as pontes de dissulfeto presentes em sua estrutura.

A produção de insulina em sistemas bacterianos oferece como vantagens a facilidade de manutenção das culturas bacterianas, e o alto nível de produção da proteína recombinante. Entretanto, as bactérias não apresentam mecanismos de endereçamento intracelular nem mecanismos de empacotamento. A produção de altos níveis de insulina recombinante em *E. coli* resulta na formação de corpúsculos de inclusão, que são agregados constituídos de proteínas desnaturadas. A solubilização dos agregados e a recuperação da estrutura da proteína nativa requerem etapas adicionais no processo de produção de insulina recombinante.

Já foram desenvolvidos sistemas de expressão bacterianos nos quais a proinsulina é secretada, ao invés de acumular-se dentro da célula bacteriana. A proinsulina secretada, entretanto, é bastante sensível à proteólise, e para contornar este problema novos sistemas de expressão foram desenvolvidos, utilizando-se a fusão de genes (Shen, 1984). Apesar desta abordagem resolver o problema da degradação proteolítica, o rendimento diminui bastante, e por isso a estratégia de superexpressão intracelular, resultando na formação de corpúsculos de inclusão, continua sendo a estratégia mais utilizada para a produção de proinsulina em bactérias (Nilsson *et al.*, 1996).

Cowley & Mackin (1997) desenvolveram um sistema de expressão baseado na produção de uma proteína de fusão, consistindo de uma cauda aminoterminal de polihistidina conectada à proinsulina humana através de um resíduo de metionina. As proteínas de fusão produzidas de acordo com este protocolo localizam-se em corpúsculos de inclusão, onde se encontram parcialmente enoveladas. Os corpúsculos de inclusão são recuperados através de centrifugações e lavagens com detergentes e desnaturantes, e solubilizados com ácido fórmico. A cauda de polihistidina é clivada com o uso de brometo de cianogênio, e a proinsulina é então submetida à sulfitólise oxidativa (para a quebra de pontes de dissulfeto incorretamente estabelecidas), seguida do reenovelamento na presença de baixas concentrações de β -mercaptoetanol. A proinsulina corretamente enovelada é finalmente purificada através de cromatografia de fase reversa.

O protocolo desenvolvido por Cowley & Mackin (1997) mostra a complexidade do processo de recuperação da estrutura da proteína nativa, quando a expressão é realizada em sistemas bacterianos. Neste trabalho, entretanto, os autores propuseram um protocolo para a produção de proinsulina recombinante, usada em diversos tipos de ensaios. A obtenção de insulina recombinante prevê, ainda, a clivagem enzimática da proinsulina e subsequente cromatografia, para purificação da insulina obtida (Nilsson *et al.*, 1996).

Parte da insulina recombinante produzida atualmente é obtida através de sistemas de expressão secretória que utilizam a levedura *Saccharomyces cerevisiae*. A via secretória desta levedura lembra a dos mamíferos, em função de sua capacidade de enovelamento, processamento proteolítico, glicosilação e secreção de proteínas, embora esta via seja menos especializada que a das células β do pâncreas de mamíferos. A eficiência da expressão neste sistema vem sendo melhorada com o emprego de peptídios-sinais adequados (Kjeldsen *et al.*, 1999), e através da substituição do peptídio C original por um mini peptídio C. O precursor composto pelas cadeias A e B conectadas pelo mini peptídio C pode ser purificado, e então convertido para insulina humana através da remoção proteolítica do peptídio conector (mini peptídio C). Estes sistemas são tão econômicos quanto os bacterianos, mas as proteínas sintetizadas são freqüentemente hiperglicosiladas e, quando produzidas em altos níveis, são instáveis e insolúveis.

A insulina humana recombinante, administrada através de injeções subcutâneas, não apresenta o mesmo padrão de ação da insulina secretada fisiologicamente. A absorção da insulina injetada é extremamente variável, resultando freqüentemente em hipoglicemia e/ou hiperglicemia noturnas. Para solucionar este problema, muitos análogos da insulina humana foram desenvolvidos, com características farmacocinéticas diferentes da insulina humana. Através da engenharia de proteínas, busca-se desenvolver uma insulina melhorada, que simule, quando injetada subcutaneamente, a secreção fisiológica de insulina. O primeiro destes análogos disponível no mercado foi a insulina LisPro, aprovada para uso clínico na Europa em Abril de 1996, e nos Estados

Unidos em Junho de 1996 (Emilien *et al.*, 1999). Esta insulina é idêntica à insulina humana, exceto pela transposição da prolina e da lisina das posições 28 e 29 na porção C-terminal da cadeia B. A insulina LisPro apresenta um padrão de ação que melhor simula a secreção fisiológica de insulina humana.

Lee *et al.* (2000) desenvolveram um vírus recombinante que expressa um análogo de cadeia única da insulina humana, o qual não requer conversão enzimática para atuar como insulina biologicamente ativa. Este análogo de cadeia única foi construído através da substituição dos 35 aminoácidos do peptídeo conector por um heptapeptídeo, tendo normalizado os níveis de glucose nos animais diabéticos testados durante todo o período avaliado (8 meses), sem aparentes efeitos colaterais. Este vírus poderá ser utilizado para a terapia gênica do diabetes.

A produção de insulina em plantas é uma abordagem nova para a produção de insulina recombinante. Além das vantagens já mencionadas relativas ao uso de plantas como biorreatores, esta proposta pode ser bastante promissora caso a planta escolhida seja capaz de reproduzir os eventos de processamento que ocorrem com a proinsulina humana.

Oliveira *et al.* (1999) mostraram a presença de uma proteína na casca da semente de feijão-de-porco (*Canavalia ensiformis*), com seqüência de aminoácidos idêntica à da insulina bovina. Esta insulina foi injetada em ratos diabéticos, promovendo redução de glicose no sangue dos mesmos até níveis normais. Estes resultados sugerem a existência de mecanismos de processamento da proinsulina em plantas, embora não existam evidências de que estes mecanismos sejam idênticos àqueles que ocorrem nos mamíferos.

Seguindo uma das linhas de pesquisa de nosso laboratório, a produção de proteínas heterólogas em plantas, e com base nos dados de literatura citados acima, decidimos avaliar a viabilidade da produção de insulina humana recombinante em sementes de tabaco transgênico.

Para avaliar a viabilidade da produção de insulina humana madura em sementes de tabaco transgênico, os objetivos deste trabalho foram:

1) A obtenção de plantas transgênicas, transformadas com vetores de expressão semente-específicos contendo a região codificadora da proinsulina humana precedida por dois tipos de peptídios-sinais: o nativo da insulina humana, e o peptídio-sinal de uma proteína de reserva de *Coix lacryma-jobi*.

2) A avaliação quantitativa e qualitativa do produto de expressão dos transgenes nas sementes das plantas transformadas.

Materiais e métodos

Métodos utilizados rotineiramente, tais como minipreparação de DNA plasmidial e transformação de *E. coli*, digestão de DNA com enzimas de restrição, clonagem em plasmídios, SDS-PAGE de proteínas, entre outras, estão descritas em Sambrook *et al.* (1989) e Ausubel *et al.* (1996).

Material vegetal

Foi utilizada, neste trabalho, a cultivar SR1 de tabaco (*Nicotiana tabacum*). As sementes de tabaco foram germinadas *in vitro*, em meio MS (Murashige & Skoog, 1962) modificado (sais MS 2,15 g/l; sacarose 10 g/l e ágar 0,8%). As plântulas resultantes do processo de germinação foram inicialmente cultivadas *in vitro*, em uma sala de crescimento com fotoperíodo de 16 h e temperatura controlada de $27 \pm 1^\circ\text{C}$. Depois de enraizadas, as plantas foram transferidas para a casa de vegetação, onde foram mantidas. As sementes destas plantas foram colhidas e armazenadas a temperatura ambiente.

Oligonucleotídios utilizados

Os oligonucleotídios sintéticos utilizados como iniciadores nas reações de PCR estão mostrados na Tabela 1.

Tabela 1. Oligonucleotídios sintéticos utilizados como iniciadores nas reações de PCR

Oligonucleotídio	Seqüência
CONS5	5' CCCTCGTACGCCTATGCAC 3'
CONS3	5' CTTATCTGGGAAGTACTCACAC 3'
PI5	5' TTTGTGAACCAACACTGTGCGGC 3'
DIR (M13/pUC)	5' GTAAAACGACGGCCAGT 3'

Construção dos plasmídios

Para avaliar a viabilidade da produção de insulina humana em sementes de tabaco, as plantas foram transformadas com as construções pBI-PPIh e pBI-PSC-PIh (detalhadas a seguir). Nestas construções, a região codificadora do prohormônio é precedida, respectivamente, pela região codificadora do peptídio-sinal da proteína nativa, e pela região codificadora do peptídio-sinal de uma proteína de reserva de *Coix lacryma-jobi*.

As regiões codificadoras da preproinsulina humana ou da proinsulina humana (presentes nas construções pBI-PPIh e pBI-PSC-PIh, respectivamente) foram obtidas a partir do plasmídio pchi1-19, contendo o cDNA completo da preproinsulina humana, cedido pelo Dr. Graeme I. Bell, do Instituto Médico Howard Hughes, da Universidade de Chicago (EUA). Este plasmídio é baseado no vetor pBR328, que apresenta baixa eficiência para a produção de DNA plasmidial. O fragmento *EcoR* I do plasmídio pchi1-19 (contendo o cDNA da preproinsulina humana) foi então transferido para o plasmídio pBluescript KS⁺ (Stratagene), resultando no plasmídio pKS-PPIh (Figura 5), que foi utilizado para a construção dos dois plasmídios descritos a seguir.

1) pBI-PPIh

Neste plasmídio, a região codificadora da preproinsulina foi posicionada sob controle do promotor da γ -kafirina (uma prolamina de sorgo), que é semente-específico (Freitas *et al.*, 1994). Inicialmente, a seqüência nucleotídica codificadora da preproinsulina, representada pelo fragmento *Nco* I/*Bam*H I (507 pb) do plasmídio pKS-PPIh, foi transferida para o plasmídio pRT-PGK (Leite *et al.*, 2000), resultando no plasmídio pRT-PGK-PPIh (Figura 6). Posteriormente, o fragmento *Hind* III deste plasmídio, contendo o cDNA da preproinsulina sob controle do promotor da γ -kafirina e do sinal de poliadenilação do transcrito 35S do vírus do mosaico da couve-flor (3'35S CaMV), foi transferido para o vetor binário pBI131 (Clontech), resultando no plasmídio pBI-PPIh (Figura 7).

2) pBI-PSC-PIh

Plasmídio similar ao anterior, onde o peptídeo-sinal nativo da preproinsulina humana foi substituído pelo peptídeo-sinal da α -prolamina de *Coix*, codificado pelo gene pBCX 25.10 (Ottoboni *et al.*, 1993).

Inicialmente obtivemos o fragmento PSC (Figura 8), através do anelamento dos oligonucleotídios sintéticos PS1 e PS2.

O anelamento foi realizado incubando-se 500 pmoles de cada um dos oligonucleotídios nas seguintes temperaturas: 94°C por 4 min, 65°C por 15 min, 37°C por 15 min, 25°C por 15 min e 0°C por 15 min. O fragmento resultante (PSC) apresenta a extremidade 5' protuberante e complementar àquela gerada pela enzima *Nco* I. Fosforilamos o oligonucleotídio PS2 previamente, já que os oligonucleotídios sintéticos utilizados apresentam a extremidade 5' defosforilada, inviabilizando reações de ligação posteriores.

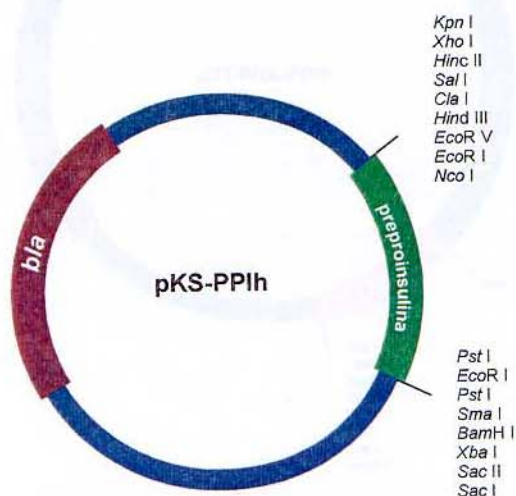


Figura 5. Representação esquemática do plasmídeo pKS-PPIh. Estão mostrados o cDNA da preproinsulina humana e o gene da β -lactamase, que confere resistência ao antibiótico ampicilina. Estão indicadas também as posições relativas de alguns dos sítios únicos de restrição.

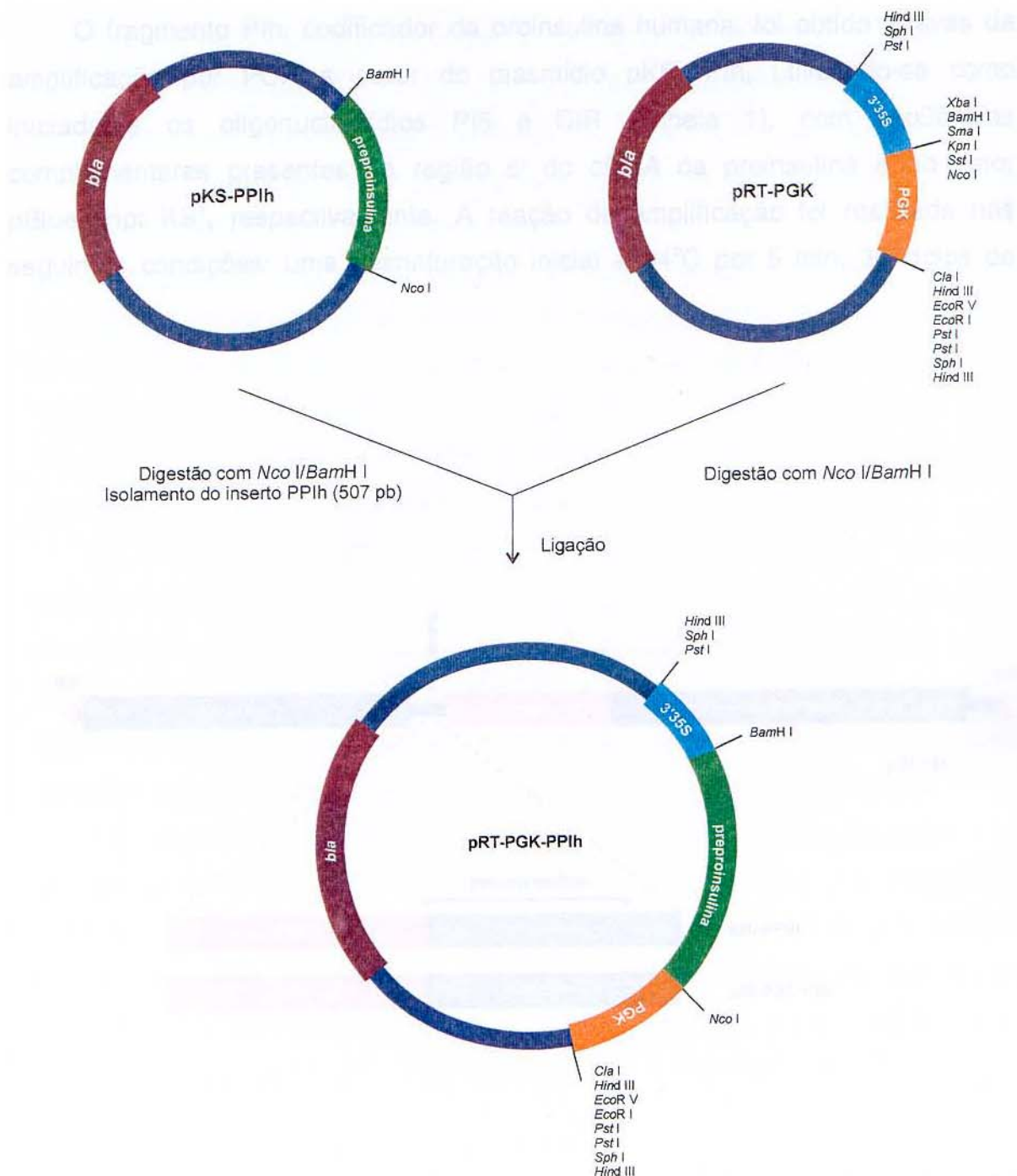


Figura 6. Representação esquemática da construção do plasmídio pRT-PGK-PPIh. O plasmídio pRT-PGK contém o promotor da γ -kafirina (PGK), e o sinal de poliadenilação do transcrito 35S do CaMV (3'35S). Também é mostrado neste vetor o gene da β -lactamase, que confere resistência ao antibiótico ampicilina. A posição relativa de alguns dos sítios únicos de restrição está indicada, bem como os sítios de restrição envolvidos na construção do pRT-PGK-PPIh.

O fragmento PIh, codificador da proinsulina humana, foi obtido através de amplificação por PCR a partir do plasmídio pKS-PPIh, utilizando-se como iniciadores os oligonucleotídeos PI5 e DIR (Tabela 1), com seqüências complementares presentes na região 5' do cDNA da proinsulina e no vetor pBluescript KS⁺, respectivamente. A reação de amplificação foi realizada nas seguintes condições: uma desnaturação inicial a 94°C por 5 min, 30 ciclos de

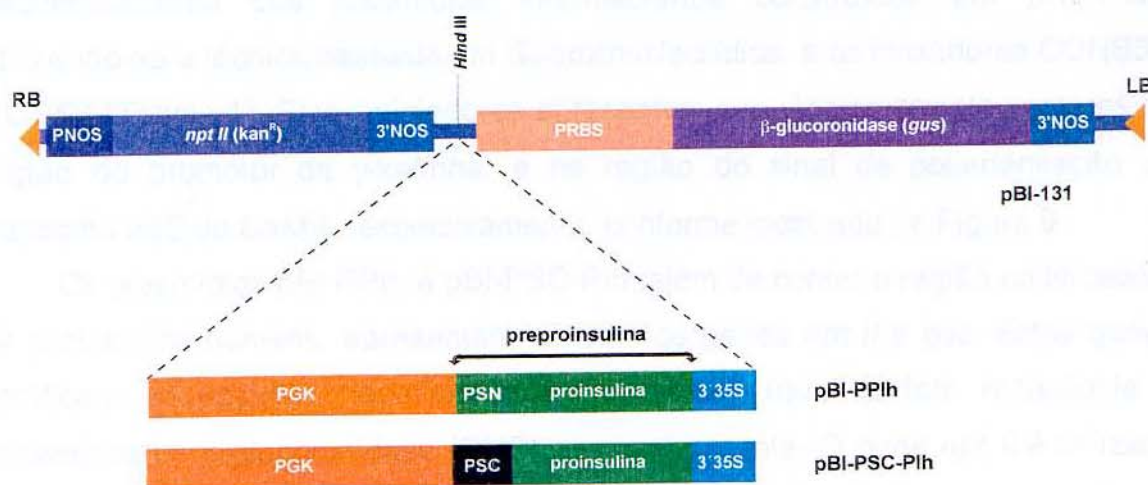


Figura 7. Representação esquemática dos plasmídios que foram utilizados para a transformação de plantas. Os plasmídios pBI-PPIh e pBI-PSC-PIh contêm a região codificadora da proinsulina humana, o promotor da γ -kafirina (PGK), e o sinal de poliadenilação do transcrito 35S do CaMV (3'35S). O plasmídio pBI-PPIh contém o peptídeo-sinal nativo (PSN) da preproinsulina humana. O plasmídio pBI-PSC-PIh contém o peptídeo-sinal de uma prolamina de *Coix* (PSC). A região do T-DNA do vetor binário pBI131, delimitada pela borda direita (RB) e esquerda (LB), contém os genes *npt II* e *gus*, que codificam as enzimas neomicina fosfotransferase (que confere resistência à kanamicina) e β-glucoronidase (GUS), respectivamente. Estes genes estão sob controle dos promotores dos genes da nopalina-sintase (PNOS) e da ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase (PRBS), respectivamente, e do sinal de poliadenilação da nopalina-sintase (3'NOS).

amplificação, cada ciclo constando de desnaturação a 94°C por 1 min, anelamento a 50°C por 1 min e extensão a 72°C por 1 min, e uma extensão final a 72°C por 10 min. O fragmento resultante da amplificação foi digerido com a enzima *BamH* I (o sítio de restrição para esta enzima fica próximo à extremidade 3' daquele fragmento), resultando no fragmento PIh.

A seguir, os fragmentos PSC e PIh foram inseridos no vetor pRT-PGK (previamente digerido com as enzimas de restrição *Nco* I e *BamH* I) através de uma ligação tripla, onde a relação molar usada foi de 6:6:1 (PSC:PIh:vetor). Esta reação de ligação resultou no plasmídeo pRT-PGK-PSC-PIh (Figura 9). O fragmento *Hind* III deste plasmídeo foi então transferido para o vetor pBI131, produzindo o plasmídeo pBI-PSC-PIh (Figura 7).

A sequência nucleotídica das construções foi monitorada através do seqüenciamento dos plasmídios intermediários construídos em pRT-PGK, utilizando-se a técnica baseada em dideoxinucleotídios, e os iniciadores CONS5 e CONS3 (Tabela 1). Estes iniciadores apresentam seqüências complementares na região do promotor da γ -kafirina, e na região do sinal de poliadenilação do transcrito 35S do CaMV, respectivamente, conforme mostrado na Figura 9.

Os plasmídios pBI-PPIh e pBI-PSC-PIh, além de conter a região codificadora da proinsulina humana, apresentam também os genes *npt II* e *gus*. Estes genes codificam as enzimas neomicina fosfotransferase (que confere resistência à kanamicina) e β -glucoronidase (GUS), respectivamente. O gene *npt II* é utilizado como marcador para a seleção das plantas transformadas, e o gene *gus*, por sua vez, é utilizado como repórter para a confirmação da transformação.

M A T K I F A L L V L L A L S A S A T T A

PS1: 5' - CATGGCTACCAAGATATTTGCCCTCCTTGCTCCTTGCTCTTTCAGCGAGCGCTACAAC TGCG - 3'

PS2: 3' - CGATGGTTC TATAAACGGGAGGAACACGAGGAACGAGAAAGTCGCTCGCGATGTTGACGC - 5'

Figura 8. Seqüência nucleotídica do fragmento PSC, produzido através do anelamento dos oligonucleotídios sintéticos PS1 e PS2. A seqüência de aminoácidos correspondente está representada acima da seqüência nucleotídica.

Fragmento PSC

Nco I

M A T K I F A L L V L L A L S A S A T T A

PS1: 5'-CATGGCTACCAAGATATTGCCCTCCTTGTGCTCCTTGTCTCTTTCAGCGAGCGCTACAACCTGCG-3'

PS2: 3'-CGATGGTTCTATAAACGGGAGGAACACGAGGAACGAGAAAGTCGCTCGCGATGTTGACGC-5'

Fragmento PIh



Digestão com BamHI

Digestão com Nco I/BamHI

Ligação

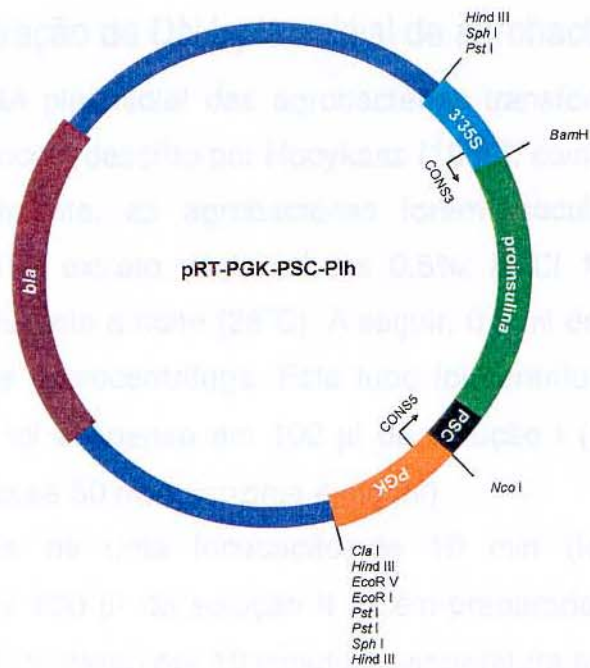
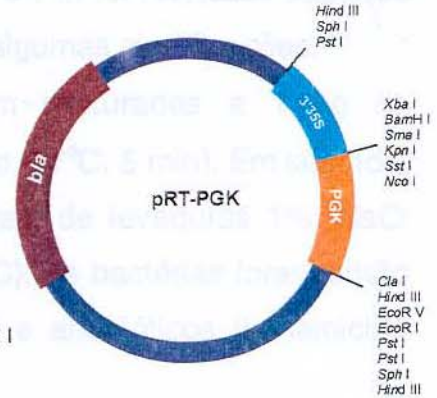


Figura 9. Representação esquemática da construção do plasmídio pRT-PGK-PSC-PIh. O plasmídio pRT-PGK contém o promotor da γ -kafirina (PGK), e o sinal de poliadenilação do transcrito 35S do CaMV (3'35S). Também estão mostrados neste vetor o gene da β -lactamase, que confere resistência ao antibiótico ampicilina, a posição relativa de alguns dos sítios únicos de restrição, os sítios de restrição envolvidos na construção do pRT-PGK-PSC-PIh, e a localização das regiões complementares aos oligonucleotídeos CONS5 e CONS3, utilizados para o seqüenciamento das construções intermediárias.

Transformação de agrobactérias

Utilizamos a linhagem LBA4404/pAL4404 de *Agrobacterium tumefaciens* para transformar tabaco, conforme descrito adiante. A transformação das agrobactérias com as construções pBI-PPIh e pBI-PSC-PIh foi realizada segundo o protocolo descrito por Gynheung *et al.* (1988), com algumas modificações.

Células competentes das agrobactérias foram misturadas a 1 µg do plasmídio de interesse, e submetidas a choque térmico (37°C, 5 min). Em seguida, foi adicionado 1 ml de meio YEP (peptona 1%; extrato de leveduras 1%; NaCl 0,5%; pH 7,0) e esta cultura foi incubada por 3 h (28°C). As bactérias foram então inoculadas em placas de Petri contendo meio YEP e antibióticos (kanamicina 50 µg/ml e estreptomicina 25 µg/ml).

Minipreparação de DNA plasmidial de agrobactérias

O DNA plasmidial das agrobactérias transformadas foi extraído de acordo com o protocolo descrito por Hooykaas (1988), com algumas modificações.

Inicialmente, as agrobactérias foram inoculadas em 2 ml de meio LB (peptona 1%; extrato de leveduras 0,5%; NaCl 1,0%; pH 7,2), e a cultura foi incubada durante a noite (28°C). A seguir, 0,5 ml desta cultura foi transferido para um tubo de microcentrífuga. Este tubo foi centrifugado (13.000 rpm, 1 min) e o sedimento foi suspenso em 100 µl de solução I (tris-HCl pH 8,0 25 mM; EDTA 10 mM; glicose 50 mM; lisozima 4 mg/ml).

Depois de uma incubação de 10 min (temperatura ambiente), foram adicionados 200 µl de solução II recém-preparada (SDS 1%; NaOH 0,2 N), e o material foi incubado por 10 minutos (temperatura ambiente).

Foram então adicionados 30 µl de fenol alcalino (fenol equilibrado com 2 volumes de NaOH 0,2 N), e em seguida 150 µl de acetato de sódio pH 4,8 3 M.

Depois de uma incubação de 20 min (-20°C), a amostra foi centrifugada (13.000 rpm, 3 min), o sobrenadante foi coletado e foram adicionados 400 µl de fenol-clorofórmio (fenol, clorofórmio e álcool isoamílico na proporção 24:24:1). A

amostra foi novamente centrifugada (13.000 rpm, 3 min), e a fase superior foi coletada.

Foram adicionados 800 µl de etanol gelado, o tubo foi centrifugado (13.000 rpm, 10 min) e o sobrenadante foi descartado. O sedimento foi lavado com 250 µl de etanol 70%, foi seco, e suspenso em 25 µl de TE pH 8,0 (tris-HCl 10 mM; EDTA 1 mM), contendo 20 µg/ml de RNase.

Transformação de tabaco

As plantas foram transformadas através do co-cultivo de discos foliares de plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum* cv. SR1) com as agrobactérias transformadas, segundo o protocolo descrito por Horsch *et al.* (1988), com algumas modificações.

As agrobactérias transformadas com as construções pBI-PPIh e pBI-PSC-PIh foram inoculadas em meio LB (peptona 1%; extrato de leveduras 0,5%; NaCl 1,0%; pH 7,2) contendo antibióticos (kanamicina 50 µg/ml e estreptomicina 25 µg/ml), e a cultura foi incubada durante a noite (28°C). No dia seguinte, esta cultura foi diluída (1:10) com o meio MS0 (sais MS 4,3 g/l; vitaminas B5 1 ml/l; sacarose 30 g/l; ágar 0,8%). O estoque de vitaminas B5 usado neste meio é composto por mioinositol 100 mg/ml; tiamina 10 mg/ml; ácido nicotínico 1 mg/ml e piridoxina 1 mg/ml.

Discos foliares de tabaco provenientes de plantas cultivadas *in vitro* foram imersos na cultura diluída de agrobactérias durante alguns segundos, foram secos com papéis de filtro esterilizados, e incubados em placas de Petri contendo meio MS104 (meio MS0 acrescido de BA 1,0 µg/ml e ANA 0,1 µg/ml), com a superfície superior voltada para baixo, durante 3 dias. Todo o processo de regeneração das plantas foi realizado em uma sala de crescimento com fotoperíodo de 16 h e temperatura controlada de 27 ± 1°C.

Após o co-cultivo, os explantes foram transferidos para placas de Petri contendo meio de seleção MS (meio MS104 acrescido de carbenicilina 500 µg/ml

e kanamicina 300 µg/ml), onde foram cultivados durante algumas semanas (3-5 semanas).

Os brotos que se desenvolveram a partir dos explantes foram transferidos para frascos contendo meio de enraizamento MS (meio MS0 contendo 0,6% de ágar, acrescido de carbenicilina 500 µg/ml e kanamicina 100 µg/ml). Depois de enraizadas, as plântulas foram transferidas para copos plásticos contendo vermiculita. Estas plântulas foram acondicionadas em caixas de plástico cobertas com filme de PVC, tendo sido aclimatadas às condições de umidade da sala de crescimento através da abertura gradual do filme de PVC. Depois de algumas semanas, as plantas foram transferidas para sacos plásticos contendo terra e foram cultivadas em casa de vegetação.

Amostras de folhas das plantas transformadas foram coletadas durante o seu desenvolvimento e armazenadas a -70°C, para serem utilizadas em ensaios posteriores. As sementes destas plantas foram colhidas e armazenadas a temperatura ambiente.

As sementes obtidas das plantas que regeneraram a partir do processo de transformação inicial foram denominadas T₁ (sementes transgênicas T₁). Estas sementes foram germinadas na presença de kanamicina para a obtenção de novas plantas. As plântulas resultantes do processo de germinação foram cultivadas *in vitro*, inicialmente, e depois transferidas para a casa de vegetação. As sementes obtidas a partir destas plantas também foram colhidas e armazenadas, tendo sido denominadas T₂ (sementes transgênicas T₂).

Extração de DNA das plantas

O DNA genômico das plantas foi obtido a partir de folhas das plantas regeneradas, conforme descrito por Ausubel *et al.* (1996), com algumas modificações.

Dois gramas de tecido foliar foram congelados em N₂ líquido e macerados em gral. O material pulverizado foi transferido para um tubo Falcon de 50 ml. Quando o tubo atingiu a temperatura ambiente foram adicionados 15 ml de tampão de extração (tris-HCl pH 8,0 100 mM; EDTA 20 mM; NaCl 1,4 M;

CTAB 2%; sarcosil 1%; β -mercaptoetanol 0,4%) pré-aquecido a 65°C. O tubo foi agitado até completa suspensão do material pulverizado.

Depois de uma incubação de 1 h (65°C), com ocasionais agitações, o tubo foi retirado do banho, e quando atingiu a temperatura ambiente foram adicionados 15 ml de clorofórmio-álcool isoamílico (na proporção 24:1). O tubo foi incubado, sob leve agitação, por 10 min.

A amostra foi centrifugada (3.000 rpm, 5 min) e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo. Foi adicionado 1 volume de álcool isopropílico e a amostra foi centrifugada (3.000 rpm, 20 min) novamente. O sedimento foi lavado com etanol 70%, e depois de seco foi suspenso em 2 ml de TE pH 8,0 (tris-HCl 10 mM; EDTA 1 mM) contendo 25 μ g/ml de RNase. O tubo foi incubado a 50°C até completa dissolução do sedimento.

Amplificação por PCR do DNA das plantas

Para a amplificação através de PCR, o DNA genômico das plantas regeneradas foi utilizado como molde, e como iniciadores foram utilizados os oligonucleotídeos CONS5 e CONS3 (Tabela 1). Estes iniciadores apresentam seqüências complementares no cassete de expressão das construções utilizadas para a transformação das plantas (Figura 9). A reação de amplificação foi realizada nas seguintes condições: uma desnaturação inicial a 94°C por 5 min, 30 ciclos de amplificação, cada ciclo constando de desnaturação a 94°C por 1 min, anelamento a 47°C por 1 min e extensão a 72°C por 1 min, e uma extensão final a 72°C por 10 min.

Os produtos da reação foram analisados através de eletroforese em gel de agarose 1% (contendo brometo de etídio), seguida de visualização através de transiluminação com luz ultravioleta.

Southern blotting

1) DNA plasmidial de agrobactérias

O DNA plasmidial das agrobactérias foi inicialmente digerido com a enzima

de restrição *Hind* III. O DNA digerido foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1%, e transferido para membranas de nylon (Hybond-N, Amersham Pharmacia Biotech). Estas membranas foram hibridizadas com duas sondas: uma específica para a proinsulina humana, e outra específica para o peptídio-sinal da α -prolamina de *Coix*.

A sonda específica para a proinsulina humana foi obtida a partir do plasmídio pRT-PGK-PSC-PIh, através de amplificação por PCR do fragmento PIh. Como iniciadores foram utilizados os oligonucleotídios PI5 e CONS3 (Tabela 1). Depois de amplificado, o fragmento foi marcado através da incorporação de α -[P³²]dCTP em reação de extensão com iniciadores randômicos, catalisada pelo fragmento Klenow da DNA polimerase I, tendo sido utilizado o kit Megaprime Labelling System, da Amersham Pharmacia Biotech.

A sonda específica para o peptídio-sinal da α -prolamina de *Coix*, por sua vez, foi obtida através de reação de fosforilação do oligonucleotídio PS1, catalisada pela enzima T4 polinucleotídio quinase. Como doador de fosfato foi utilizado γ -[P³²]ATP.

Os nucleotídios não incorporados durante a marcação das sondas foram removidos utilizando-se o kit Nucleotide Removal (QIAGEN). As sonda específicas para a proinsulina humana e para o peptídio-sinal de origem vegetal apresentaram atividades específicas de 1×10^9 cpm/ μ g de DNA e de 5×10^8 cpm/ μ g de oligonucleotídio, respectivamente. A radioatividade foi medida utilizando-se um contador de cintilações Rackbeta 1217 (LKB).

A hibridização da membrana com a sonda específica para a proinsulina humana foi realizada durante a noite, a 42°C, em solução de hibridização (SSC 5X; formamida 50%; sarcosil 0,1%; SDS 0,02%; leite em pó desnatado 1%). A hibridização da membrana com a sonda específica para o peptídio-sinal de origem vegetal foi realizada durante a noite, a temperatura ambiente, em solução de hibridização (SSC 5X; tampão fosfato de sódio pH 7,0 10 mM; sarcosil 0,1%; SDS 0,02%; leite em pó desnatado 0,25%).

As membranas foram lavadas e expostas a um filme de raios-X (Hyperfilm, Amersham Pharmacia Biotech), a -70°C, utilizando-se um cassete provido de telas

intensificadoras.

2) DNA genômico de tabaco

Aproximadamente 2 µg de DNA genômico de folhas de tabaco foram digeridos com a enzima *Hind* III, submetidos à eletroforese em gel de agarose 0,8%, e então transferidos para uma membrana de nylon (Hybond-N, Amersham Pharmacia Biotech).

Essa membrana foi hibridizada com uma sonda específica para a proinsulina humana, a mesma usada no ensaio de *Southern blotting* com DNA plasmidial de agrobactérias. As condições de hibridização também foram as mesmas.

As membranas foram lavadas e expostas a um filme de raios-X (Hyperfilm, Amersham Pharmacia Biotech), a -70°C, utilizando-se um cassete provido de telas intensificadoras.

Avaliação da atividade da enzima β-glucoronidase

A atividade da enzima β-glucoronidase (GUS) foi quantificada fluorimetricamente nas folhas das plantas regeneradas, utilizando-se MUG (4-metil-umbeliferil-β-D-glucoronídeo) como substrato, conforme o protocolo descrito por Jefferson (1987).

Amostras de 100-150 mg de folhas foram homogeneizadas em 200 µl de tampão de extração (tampão fosfato de sódio pH 7,0 50 mM; β-mercaptoetanol 10 mM; EDTA 10 mM; Triton X-100 0,2%; PMSF 0,15 mg/ml), no gelo. O extrato foi clarificado por centrifugação (13.000 rpm, 10 min, 4°C) e o sobrenadante foi utilizado para a dosagem da atividade de GUS.

Cinqüenta microlitros do extrato proteico foram misturados a 500 µl de tampão de reação (tampão fosfato de sódio pH 7,0 50 mM; EDTA 10 mM; β-mercaptoetanol 10 mM; sarcosil 0,075%; Triton X-100 0,2%; metanol 20%) contendo 1 mM de MUG. O metanol foi adicionado devido à sua capacidade de suprimir a atividade endógena de GUS (Li *et al*, 1993). As reações foram incubadas a 37°C e amostras de 100 µl destas reações foram retiradas em três tempos diferentes e misturadas a 900 µl de carbonato de sódio 0,2 M. A

fluorescência foi medida em um fluorímetro modelo F200, da Hitachi, utilizando-se os comprimentos de onda 365 e 455 nm para excitação e emissão, respectivamente.

A concentração de proteínas desse material foi determinada através do método de Bradford (Bradford, 1976), utilizando-se o kit Bio-Rad Protein Assay e soroalbumina bovina como padrão.

Uma unidade (U) de atividade enzimática da β -glucoronidase foi definida como sendo a quantidade de enzima capaz de catalisar a produção de 1 nmol de metil umbeliferona em 1 min, a 37°C. A atividade específica (U/mg) foi calculada através da razão entre a atividade enzimática em 1 ml e a concentração de proteína solúvel total, em mg, no mesmo volume.

Extração de proteínas solúveis das sementes

Para a extração de proteínas solúveis das sementes, dois métodos foram utilizados.

Para as sementes T₁, 500 mg de sementes das plantas testadas foram homogeneizadas em gral, no gelo, em 1 ml de tampão de extração (tris-HCl pH 8,0 50 mM; EDTA 2 mM; benzamidina 5 mM; DTT 5 mM; Triton X-100 0,02%). O extrato foi clarificado por centrifugação (12.000 rpm, 15 min, 4°C) e o sobrenadante foi armazenado a -20°C para ensaios subseqüentes.

Para as sementes T₂ utilizamos o protocolo descrito por Tager *et al.* (1975), com algumas modificações. Cem miligramas de sementes foram homogeneizadas em gral, no gelo, em 1 ml de solução ácido/álcool (etanol 95%; HCl 0,24 N). A seguir, foi adicionada água suficiente para reduzir a concentração do etanol para 70%. A amostra foi mantida sob agitação orbital, na geladeira, por 3 h, e foi então centrifugada (14.000 rpm, 20 min, 4°C). O sobrenadante foi recuperado e o pH foi elevado para 8,0, com a adição de NH₄OH 6M. A amostra foi novamente centrifugada (14.000 rpm, 20 min, 4°C), o sobrenadante foi recuperado e o pH foi ajustado para 5,3 com a adição de acetato de amônio pH 5,3 2 M. A solução foi então diluída com 2 volumes de etanol e 4 volumes de éter etílico, e mantida durante a noite a 4°C. O precipitado formado foi coletado através de centrifugação

(14.000 rpm, 30 min, 4°C) e, depois de seco, foi dissolvido em TE pH 8,0 (tris-HCl 10 mM; EDTA 1 mM) e armazenado a -20°C.

Radioimunoensaio

O nível de produção de (pro)insulina recombinante nas sementes foi estimado através de radioimunoensaios (RIE). Estes RIE foram realizados no Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Biologia da UNICAMP, conforme descrito por Delattre & Boschero (1983). Os ensaios foram realizados a partir de extratos de sementes, tendo sido utilizado um anticorpo policlonal contra insulina de origem suína.

Imunoensaios para detecção de insulina e peptídeo C

Estes ensaios foram realizados no Laboratório de Fisiologia Clínica do Hospital das Clínicas da UNICAMP, utilizando-se os kits IMMULITE Insulin e IMMULITE C-Peptide (Diagnostic Products Corporation) para a quantificação de insulina e de peptídeo C, respectivamente. Nestes ensaios, a detecção dos produtos de interesse é realizada através de quimioluminescência, sendo utilizados anticorpos específicos. De acordo com as informações do fabricante, o ensaio para detecção de insulina não apresenta reação cruzada com proinsulina ou com peptídeo C, e o ensaio para detecção de peptídeo C, embora não apresente reação cruzada com insulina, apresenta 13% de reatividade com proinsulina.

Western blotting

Alíquotas dos extratos de sementes foram misturadas com tampão de amostra 4X (tris-HCl pH 8,0 40 mM; SDS 10%; glicerol 20%; β - mercaptoetanol 5%; azul de bromofenol 0,025%) e incubadas a 95°C por 5 min. As proteínas dos extratos foram separadas através de eletroforese em gel de poliacrilamida (15%) contendo SDS (SDS-PAGE), e transferidas para uma membrana de nylon (Hybond-N, Amersham Pharmacia Biotech). Esta membrana foi bloqueada em solução contendo 5% de leite em pó desnatado, durante a noite, foi lavada e

incubada com um anticorpo monoclonal contra a proinsulina humana (RDI-TRK2P9-3A1, da Research Diagnostics) durante 3 h, sob agitação. A membrana foi lavada novamente, e incubada com um anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado à fosfatase alcalina (Santa Cruz Biotechnology), por 2 h, sob agitação. Ela foi lavada mais uma vez, incubada em tampão (tris-HCl pH 9,5 100 mM; NaCl 100 mM) por 5 min, e em tampão contendo um substrato quimioluminescente para a fosfatase alcalina (CSPD, da Tropix) por mais 5 min. A membrana foi então exposta a um filme de raios-X (T-Mat, da Kodac).

Técnicas cromatográficas

Extratos contendo as proteínas solúveis das sementes T₂ foram analisados através de técnicas cromatográficas de fase reversa e de troca iônica.

A cromatografia de fase reversa foi realizada em coluna AP-1 (10 mm x 100 mm, da Waters) contendo aproximadamente 6 ml da resina Poros 50 R2 (PerSeptive). A coluna foi pré-equilibrada com 50 ml de solução A (acetonitrila 2%; ácido trifluoracético 0,065%), utilizando-se fluxo de 2 ml/min. Após a injeção da amostra, a coluna foi lavada com 20 ml de solução A, e as proteínas adsorvidas foram eluídas com 60 ml de um gradiente linear de 0 a 100% de solução B (acetonitrila; ácido trifluoracético 0,05%). A coluna foi então lavada com 20 ml de solução B. A absorbância a 214 nm foi monitorada, registrada, e foram coletadas frações de 0,5 ml.

A cromatografia de troca iônica foi realizada em coluna AP-1 (10 mm x 100 mm, da Waters) contendo aproximadamente 7 ml da resina aniônica Poros 50 HQ (PerSeptive). A coluna foi pré-equilibrada com 50 ml de solução A (tris-HCl pH 8,2 25 mM), utilizando-se fluxo de 2 ml/min. Após a injeção da amostra, a coluna foi lavada com 30 ml de solução A, e as proteínas adsorvidas foram eluídas com 80 ml de um gradiente linear de 0 a 100% de solução B (tris-HCl pH 8,2 25 mM; NaCl 1 M). A coluna foi então lavada com 20 ml de solução B. A absorbância a 214 nm e a condutividade foram monitoradas e registradas. Foram coletadas frações de 1,0 ml.

Todos os processos cromatográficos foram realizados em aparelho de HPLC biocompatível, HRLC (Bio-Rad), equipado com Solvent Delivery System Model 2700, Programable UV/VIS Monitor Model 1790 e Econo Gradient Monitor Model EG-1.

Obtenção das plantas transgênicas

Conforme descrito em "Materiais e métodos", inicialmente obtivemos o plasmídeo pKS-PPIh (Figura 5), que foi utilizado para a construção dos plasmídios pRT-PGK-PPIh (Figura 6) e pRT-PGK-PSC-PIh (Figura 9). A sequência nucleotídica destes plasmídios foi confirmada através de seqüenciamento. Após esta verificação, os cassetes de expressão foram transferidos para o vetor binário pBI131, resultando, respectivamente, nos plasmídios pBI-PPIh e pBI-PSC-PIh (Figura 7).

Os plasmídios pBI-PPIh e pBI-PSC-PIh, além de conter a região codificadora da proinsulina humana controlada por um promotor semente-específico, apresentam ainda um gene marcador (que confere resistência à kanamicina), para a seleção das plantas transformadas, e um gene repórter (que codifica GUS), para a confirmação da transformação. Nas construções pBI-PPIh e pBI-PSC-PIh, a região codificadora do prohormônio é precedida, respectivamente, pela região codificadora do peptídeo-sinal da proteína nativa, e pela região codificadora do peptídeo-sinal de uma proteína de reserva de *Coix*.

O peptídeo-sinal da proteína nativa foi substituído pelo peptídeo-sinal de uma proteína de reserva de *Coix*, na construção pBI-PSC-PIh, para viabilizar o direcionamento da proteína recombinante para a via secretória das células. Este mesmo peptídeo-sinal foi utilizado por Leite *et al.* (2000) para a expressão do hormônio de crescimento humano em sementes de tabaco transgênico, tendo sido eficiente no direcionamento da proteína recombinante para o retículo endoplasmático, e corretamente removido da proteína precursora.

Por outro lado, a construção pBI-PPIh permitirá avaliar se as plantas de tabaco transgênicas são capazes de reconhecer e processar corretamente o peptídeo-sinal nativo da insulina humana. A eficiência do processamento das

proteínas contendo o peptídio-sinal nativo ou o peptídio-sinal da α -prolamina de *Coix* poderá ser comparada.

Dando continuidade ao processo de obtenção de plantas transgênicas, as agrobactérias foram transformadas com as construções pBI-PPIh e pBI-PSC-PIh. A presença destes plasmídios nas agrobactérias transformadas foi confirmada através de *Southern blotting*. Foram utilizadas duas sondas: uma específica para a proinsulina humana, e outra específica para o peptídio-sinal da α -prolamina de *Coix* (Figura 10).

Conforme mostra a Figura 10A, a hibridização do DNA plasmidial extraído das linhagens de agrobactérias transformadas com os plasmídios pBI-PPIh (canaletas 1-4) e pBI-PSC-PIh (canaletas 5-9), realizada com a sonda específica para a proinsulina, resultou em bandas compatíveis com os tamanhos esperados de 1842 e 1833 pb, respectivamente. Por outro lado, a sonda específica para o peptídio-

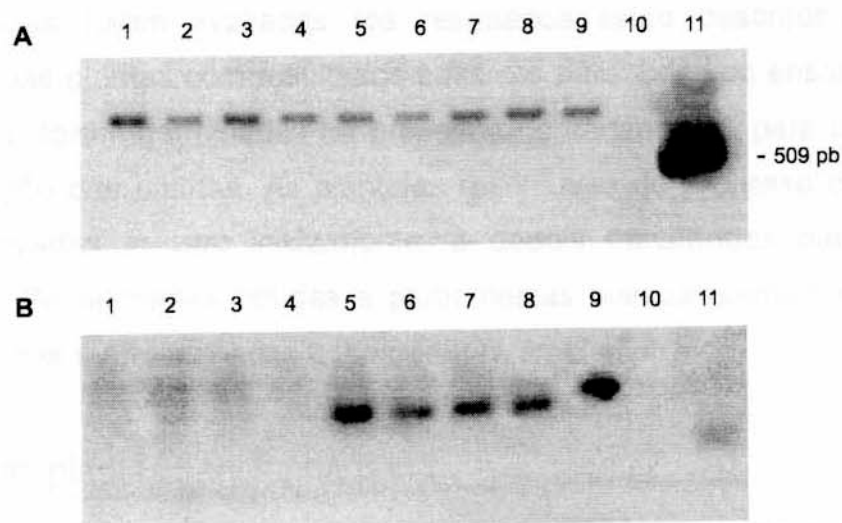


Figura 10. *Southern blotting* de DNA plasmidial extraído de agrobactérias transformadas com os plasmídios pBI-PPIh e pBI-PSC-PIh. A) Sonda específica para a proinsulina humana; B) Sonda específica para o peptídio-sinal da α -prolamina de *Coix*. Canaletas 1-4: DNA plasmidial de agrobactérias transformadas com a construção pBI-PPIh. Canaletas 5-9: DNA plasmidial de agrobactérias transformadas com a construção pBI-PSC-PIh. Canaleta 10: DNA do vetor pBI131 (controle negativo). Canaleta 11: DNA do plasmídio pKS-PPIh (controle positivo para a sonda específica para a proinsulina humana). O DNA plasmidial das agrobactérias e o DNA do vetor pBI131 foram digeridos com a enzima de restrição *Hind* III. O DNA do plasmídio pKS-PPIh foi digerido com a enzima de restrição *Eco*R I, liberando um inserto de 509 pb.

sinal da α -prolamina de *Coix* reconheceu seqüências complementares apenas nos plasmídios extraídos de agrobactérias transformadas com a construção pBI-PSC-PIh (Figura 10B), conforme esperado. Portanto, estes resultados confirmaram a presença dos plasmídios de interesse nas agrobactérias transformadas.

As plantas foram então transformadas através do co-cultivo de discos foliares de plantas de tabaco com as agrobactérias transformadas.

As plântulas regeneradas *in vitro*, em meio contendo kanamicina, foram transferidas para a casa de vegetação, onde foram cultivadas. Chegaram ao estágio de produção de sementes 30 plantas transformadas com a construção pBI-PPIh, e 47 plantas transformadas com a construção pBI-PSC-PIh.

As sementes dessas 77 plantas (sementes T₁) foram colhidas e armazenadas a temperatura ambiente para ensaios posteriores.

A transformação e a integração do fragmento de transferência nas plantas transformadas foram avaliadas (os resultados estão descritos a seguir), e sementes das plantas com resultados positivos para todos os ensaios envolvidos (18 plantas) foram germinadas na presença de kanamicina, para a obtenção de nova geração das plantas. As plântulas resultantes do processo de germinação foram cultivadas *in vitro* inicialmente, e depois transferidas para a casa de vegetação. As sementes obtidas a partir destas plantas (sementes T₂) também foram colhidas e armazenadas a temperatura ambiente.

Análise das plantas transformadas

Para confirmar a transformação, as 77 plantas regeneradas que chegaram ao estágio de produção de sementes foram testadas inicialmente através de PCR. O DNA genômico destas plantas, obtido a partir de folhas, foi utilizado como molde para a reação de amplificação. As plantas contendo o transgene foram identificadas pela presença de um produto amplificado de 604 pb para as plantas transformadas com a construção pBI-PPIh, ou de 595 pb no caso das plantas transformadas com a construção pBI-PSC-PIh. A Figura 11 mostra o resultado para algumas das plantas testadas.

Conforme mostrado na Tabela 2, a reação de amplificação por PCR detectou a presença da região codificadora da proinsulina humana em 33,3% das plantas transformadas com a construção pBI-PPIh, e em 21,3% das plantas transformadas com a construção pBI-PSC-PIh.

Tabela 2. Resultado da amplificação por PCR para as plantas transformadas com as construções pBI-PPIh e pBI-PSC-PIh

Construção	Plantas regeneradas ¹	Resultado da PCR	
		+	-
pBI-PPIh	30	10	20
pBI-PSC-PIh	47	10	37

¹ Plantas regeneradas que chegaram ao estágio de produção de sementes

As plantas com resultado positivo para a amplificação através de PCR foram submetidas então a ensaio para avaliar a expressão do gene repórter (*gus*), presente no cassete de expressão dos plasmídios pBI-PPIh e pBI-PSC-PIh. Embora o resultado negativo para a reação de amplificação por PCR não signifique necessariamente a ausência da região codificadora da proinsulina humana no genoma da planta, nós selecionamos as plantas com resultado positivo em função do grande número de plantas com o qual estávamos trabalhando.

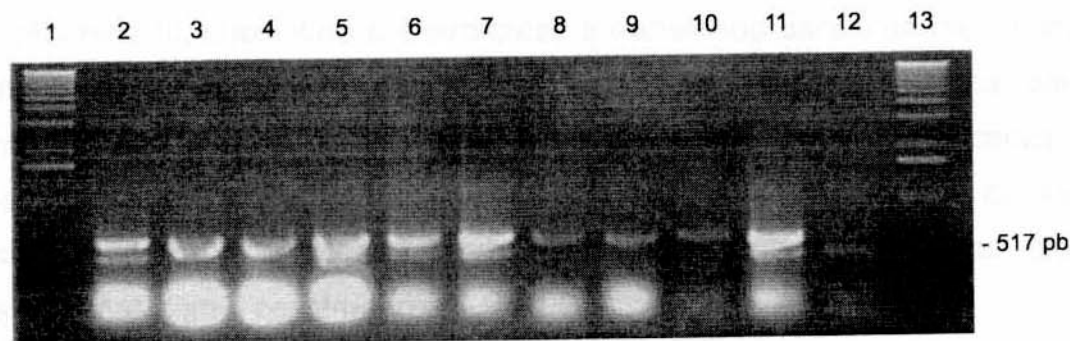


Figura 11. Amplificação por PCR do DNA genômico de algumas das plantas regeneradas. A reação de amplificação foi realizada utilizando-se os oligonucleotídios CONS5 e CONS3. Canaletas 1 e 13: marcadores moleculares (1 kb DNA Ladder, Gibco BRL). Canaletas 2-11: DNA de plantas regeneradas, com resultado positivo. Canaleta 12: DNA da planta SR1 não transformada (controle negativo).

Para avaliar a expressão do gene repórter, a atividade da enzima β -glucoronidase (GUS) foi quantificada fluorimetricamente nas folhas das plantas regeneradas. Os resultados estão mostrados na Tabela 3.

Tabela 3. Resultado da quantificação da atividade da enzima β -glucoronidase (GUS) nas folhas das plantas transformadas

Planta ¹	U/mg	Planta ¹	U/mg
N1	457,9	C1	726,0
N3	409,0	C2	460,9
N5	241,2	C3	8,9
N6	405,0	C6	377,5
N7	695,9	C20	130,2
N8	492,7	C21	28,0
N9	2563,8	C23	711,3
N10	978,1	C44B	1717,6
N37B	163,9	C46B	312,3
N39B	280,1	C55B	111,8
N43B ²	339,76	SR1 ³	0,00

¹ N: plantas transformadas com a construção pBI-PPIh; C: plantas transformadas com a construção pBI-PSC-PIh

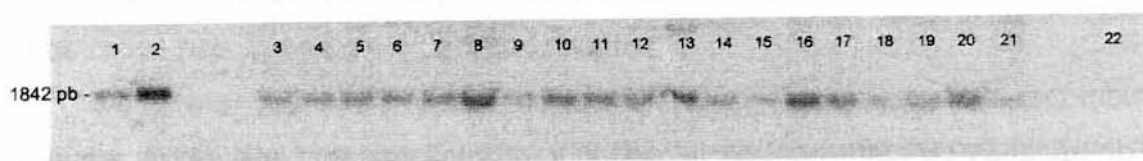
² Esta planta não chegou ao estágio de produção de sementes

³ Planta SR1 não transformada (controle negativo)

As plantas com resultado da quantificação da atividade de GUS maior que 100 U/mg foram então analisadas através de *Southern blotting* (Figura 12). O DNA genômico destas plantas, obtido a partir de folhas, foi digerido com a enzima de restrição *Hind* III, submetido à eletroforese e transferido para uma membrana de nylon. Esta membrana foi hibridizada com uma sonda específica para a proinsulina humana. As plantas contendo o transgene foram identificadas pela presença de uma banda de aproximadamente 1840 pb (1842 pb para as plantas transformadas com a construção pBI-PPIh, ou 1833 pb para as plantas transformadas com a construção pBI-PSC-PIh).

O resultado do *Southern blotting* (Figura 12) mostra bandas correspondentes ao cassete de expressão de intensidades diferentes, sugerindo a integração de diferentes números de cópias. Devido à presença de sítios *Hind* III flanqueando o fragmento integrado, não é possível saber, através deste ensaio, se a integração das cópias ocorreu em um mesmo *locus* ou em *loci* diferentes.

Para limitar o número de plantas para os ensaios seguintes, relacionados à análise da produção de (pro)insulina recombinante nas sementes de tabaco, selecionamos as linhagens férteis com resultado positivo para o ensaio de *Southern blotting*. Estas linhagens não apresentaram alterações fenotípicas aparentes em relação à linhagem SR1 não transformada. Adotamos esta conduta em função das dificuldades de se trabalhar com um número grande de plantas, relacionadas ao seu manejo e à falta de espaço na casa de vegetação.



01 - contr. positivo	07 - N7	13 - N43B	19 - C44B
02 - contr. positivo	08 - N8	14 - C1	20 - C46B
03 - N1	09 - N9	15 - C2	21 - C55B
04 - N3	10 - N10	16 - C6	22 - contr. negativo
05 - N5	11 - N37B	17 - C20	
06 - N6	12 - N39B	18 - C23	

Figura 12. *Southern blotting* do DNA genômico das plantas regeneradas que apresentaram atividade de GUS superior a 100 U/mg. Canaletas 1 e 2: respectivamente, 5 e 10 pg de DNA do plasmídeo pRT-PGK-PPIh digerido com a enzima *Hind* III (controle positivo). Canaletas 3-21: DNA das plantas testadas. A planta N43B foi testada apesar de não ter chegado ao estágio de produção de sementes. Canaleta 22: DNA da planta SR1 não transformada (controle negativo). Foi utilizada uma sonda específica para a proinsulina humana. O DNA genômico de folhas de tabaco (2 µg) foi digerido com a enzima *Hind* III. N: plantas transformadas com a construção pBI-PPIh; C: plantas transformadas com a construção pBI-PSC-PIh.

Análise da expressão do transgene nas sementes de tabaco

A produção de (pro)insulina recombinante nas sementes das plantas transformadas foi avaliada através de radioimunoensaios (RIE). Os RIE foram adotados inicialmente em função de sua sensibilidade, podendo detectar baixos níveis de insulina (a partir de 20 pg).

Os RIE foram realizados a partir de extratos de sementes, tendo sido utilizado um anticorpo policlonal contra insulina de origem suína, que é rotineiramente utilizado nos ensaios para detecção de insulina humana ou murina no Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Biologia da UNICAMP.

Conforme mencionado no item anterior, selecionamos para esse ensaio as linhagens férteis com resultado positivo para o ensaio de *Southern blotting*. As sementes T_2 (obtidas a partir de plantas provenientes da germinação das sementes T_1) destas linhagens também foram avaliadas através de RIE.

Os resultados do RIE para as sementes T_1 e para as sementes T_2 estão mostrados nas Tabelas 4 e 5, respectivamente.

As diferenças observadas na quantificação de (pro)insulina recombinante nas sementes das diversas linhagens podem ser decorrentes de variação no nível de expressão do transgene, devido ao diferente número de cópias integradas e/ou aos diferentes sítios de integração.

Os valores obtidos nos RIE podem estar subestimados caso a proinsulina produzida pelas plantas não esteja sendo processada, pois o anticorpo utilizado neste RIE é um anticorpo policlonal produzido contra insulina, que pode estar detectando proinsulina através de reatividade cruzada.

Os resultados dos RIE para as sementes T_1 e para as sementes T_2 estão graficamente representados na Figura 13. Aparentemente, houve diminuição do nível de expressão de (pro)insulina nas sementes T_2 . Entretanto, os níveis de expressão das sementes T_1 e T_2 não podem ser comparados, pois foram utilizados métodos diferentes para a extração de proteínas solúveis destas duas gerações de sementes.

O método utilizado para a extração de proteínas solúveis das sementes T_1 foi substituído por um método desenvolvido para a extração de proinsulina, insulina e peptídio-C de tecido pancreático (descrito em “Materiais e métodos”). Este método envolve etapas de pré-purificação, e foi utilizado para a extração de proteínas solúveis das sementes T_2 , visando-se à obtenção de uma mistura com menor complexidade proteica e com maior rendimento de (pro)insulina.

Tabela 4. Detecção e quantificação de (pro)insulina recombinante através de radioimunoensaio a partir de extratos de sementes T₁

Planta ¹	ng/g semente ²	Planta ¹	ng/g semente ²
N1	7,76	C1	11,88
N3	5,82	C2	16,38
N5	13,2	C6	13,1
N6	6,92	C20	8,86
N7	15,26	C23	2,74
N8	21,00	C44B	--- ³
N9	8,94	C46B	16,26
N10	6,04	C55B	2,2
N37B	9,34		
N39B	--- ³	SR1 ⁴	0,00

¹ N: plantas transformadas com a construção pBI-PPIh; C: plantas transformadas com a construção pBI-PSC-PIh

² Resultados do RIE: ng (pro)insulina/ml de extrato de sementes. Estes valores foram convertidos para ng (pro)insulina/g de sementes

³ As sementes T₁ destas plantas não foram submetidas ao RIE, embora elas apresentassem resultado positivo para o ensaio de *Southern blotting*

⁴ Planta SR1 não transformada (controle negativo)

Tabela 5. Detecção e quantificação de (pro)insulina recombinante através de radioimunoensaio a partir de extratos de sementes T₂

Planta ¹	ng/g semente ²	Planta ¹	ng/g semente ²
N1	7,52	C1	3,04
N3	2,16	C2	6,96
N5	5,24	C6	6,72
N6	3,08	C20	3,44
N7	9,28	C23	3,4
N8	2,76	C44B	6,8
N9	1,92	C46B	5,4
N10	0,84	C55B	1,88
N37B	5,8		
N39B	9,48	SR1 ³	0,00

¹ N: plantas transformadas com a construção pBI-PPIh; C: plantas transformadas com a construção pBI-PSC-PIh

² Resultados do RIE: ng (pro)insulina/ml de extrato de sementes. Estes valores foram convertidos para ng (pro)insulina/g de sementes

³ Planta SR1 não transformada (controle negativo)

A expressão dos genes contidos no T-DNA dos plasmídios utilizados na transformação das plantas depende, entre outros fatores, do sítio em que o fragmento de transferência é integrado. Com base nesta premissa, foi verificado se existia correlação entre a expressão do gene repórter e a expressão do gene da (pro)insulina, apesar destes dois genes possuírem promotores diferentes. No caso da correlação ser positiva, as melhores linhagens em relação ao nível de expressão de (pro)insulina poderiam ser selecionadas precocemente, através de ensaios para a quantificação da atividade de GUS. A Figura 14, entretanto, mostra a inexistência de tal correlação, inviabilizando a seleção precoce das plantas transformadas baseada na avaliação da atividade de GUS.

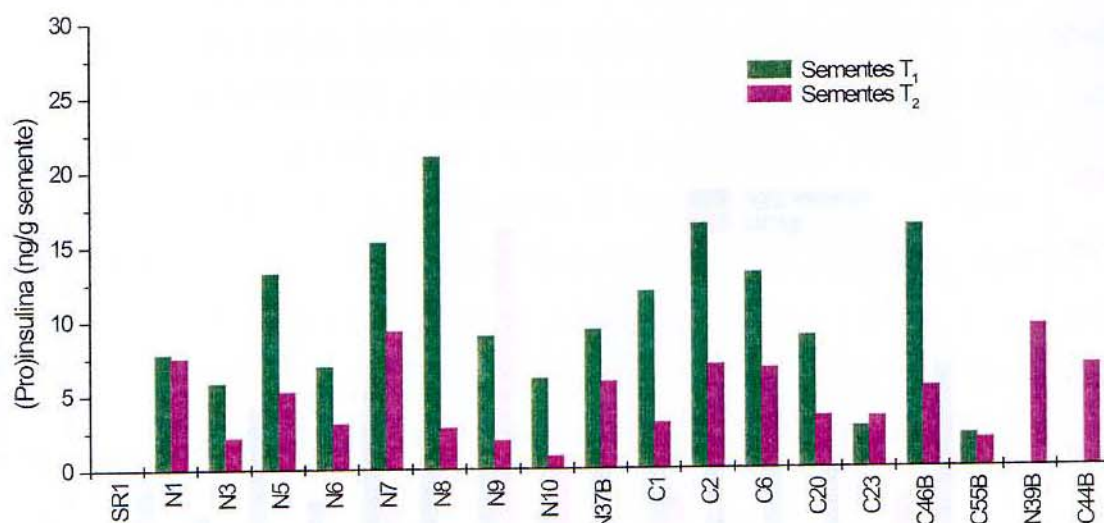


Figura 13. Representação gráfica dos resultados obtidos nos radioimunoensaios para quantificação da (pro)insulina recombinante em extratos de sementes T₁ e T₂. As sementes T₁ das plantas N39B e C44B não foram submetidas ao RIE. N: plantas transformadas com a construção pBI-PPIh; C: plantas transformadas com a construção pBI-PSC-PIh. SR1: planta não transformada (controle negativo).

O nível de produção de (pro)insulina nas sementes das plantas transgênicas foi baixo, em relação aos níveis obtidos por outros grupos que também produziram proteínas heterólogas em sementes de tabaco. Pen *et al.* (1993), por exemplo, obtiveram tabaco transgênico capaz de produzir fitase em níveis de até 1% das proteínas solúveis das sementes maduras, utilizando o promotor constitutivo CaMV 35S. Tackaberry *et al.* (1999), por sua vez, desenvolveram sementes de tabaco transgênicas capazes de expressar a glicoproteína B do citomegalovírus humano em níveis que variaram de 70-146 ng/mg de proteínas extraídas. Estes autores usaram um promotor semente-específico, o promotor Gt3 da glutelina, a principal proteína de reserva do endosperma de sementes de arroz.

O baixo nível de (pro)insulina recombinante produzida nas sementes transgênicas pode ser resultado do uso de um promotor proveniente de uma

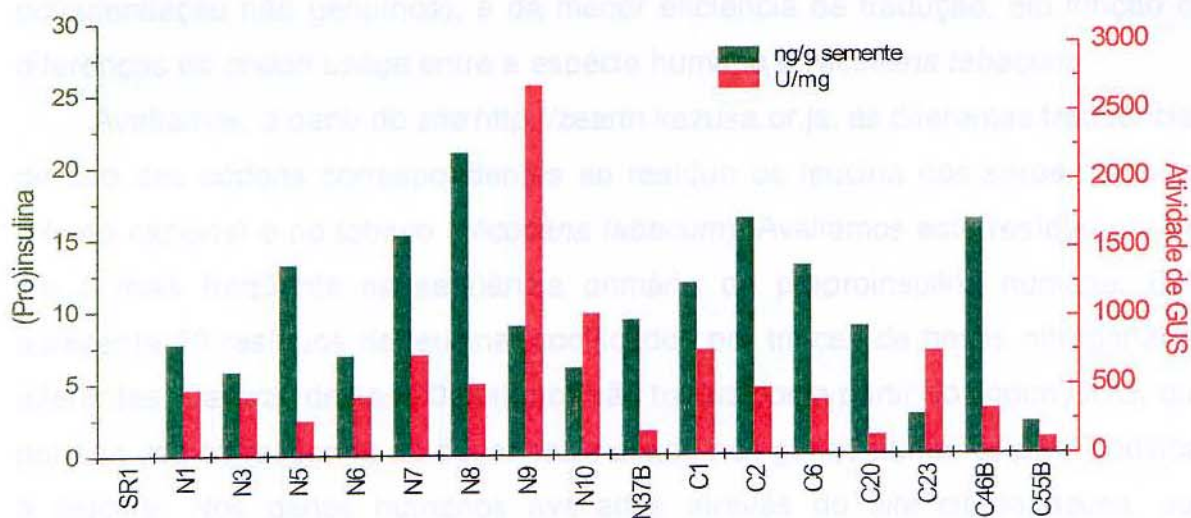


Figura 14. Representação gráfica dos resultados da quantificação da (pro)insulina recombinante em extratos de sementes T₁ e da quantificação da atividade da β-glucoronidase (GUS) nas folhas das plantas transformadas. N: plantas transformadas com a construção pBI-PPIh; C: plantas transformadas com a construção pBI-PSC-PIh. SR1: planta não transformada (controle negativo).

planta monocotiledônea (o sorgo) para a expressão de uma proteína heteróloga em uma planta dicotiledônea (o tabaco). Este promotor foi escolhido por ser responsável pela produção de até 5% do total de proteínas de reserva das sementes de sorgo, dirigindo a expressão do gene da γ -kafirina, que por sua vez é representado por apenas algumas cópias no genoma dessa planta (Leite *et al.*, 2000). Além disso, este promotor confere expressão endosperma-específica do gene *gus* em milho (Freitas *et al.*, 1994). As proteínas recombinantes produzidas e armazenadas no endosperma das plantas poderiam ser facilmente extraídas. Provavelmente, níveis mais altos de produção de (pro)insulina poderão ser obtidos em monocotiledôneas como o milho, por exemplo.

Os níveis de produção de (pro)insulina humana nas sementes de tabaco foram bem menores que os níveis de produção do hormônio de crescimento humano obtidos por Leite *et al.* (2000), com o mesmo sistema de expressão (até 0,16% das proteínas solúveis totais). A quantidade reduzida de (pro)insulina presente nas sementes também pode ser decorrente de fatores que afetam a estabilidade do mRNA (como seqüências desestabilizadoras do mRNA e sinais de poliadenilação não genuínos), e da menor eficiência de tradução, em função de diferenças de *codon usage* entre a espécie humana e *Nicotiana tabacum*.

Avaliamos, a partir do *site* <http://zearth.kazusa.or.jp>, as diferentes freqüências de uso dos códons correspondentes ao resíduo de leucina nos seres humanos (*Homo sapiens*) e no tabaco (*Nicotiana tabacum*). Avaliamos este resíduo por ser ele o mais freqüente na seqüência primária da preproinsulina humana. Esta apresenta 20 resíduos de leucina, codificados por trincas de bases nitrogenadas diferentes. Catorze destes 20 resíduos são traduzidos a partir do códon CUG, que por sua vez corresponde ao códon mais usado nos genes humanos para codificar a leucina. Nos genes humanos avaliados através do *site* citado acima, sua freqüência de uso é de 40,3%, em relação às demais trincas de bases nitrogenadas que codificam a leucina. Em tabaco, por outro lado, a freqüência de uso deste códon é de 11,7%. Estas diferenças podem acarretar uma menor eficiência de tradução de genes humanos em plantas de tabaco.

Mason *et al.* (1998) mostraram o aumento da produção da toxina LT-B de *E. coli* em batata através do uso de uma seqüência codificadora otimizada para plantas. As modificações na seqüência original incluíram a remoção de motivos desestabilizadores do mRNA e de potenciais sinais de processamento, além de substituições das bases nitrogenadas da seqüência codificadora, para que os códons de todos os aminoácidos da proteína fossem aqueles usados preferencialmente pelas plantas.

Detectada a presença de (pro)insulina recombinante nas diferentes linhagens testadas através de radioimunoensaios, selecionamos a linhagem N7, transformada com o vetor de expressão contendo o peptídio-sinal humano, para ensaios subseqüentes. Esta linhagem foi escolhida por ter apresentado um dos melhores resultados no RIE realizado para a quantificação de (pro)insulina em extratos de sementes T₂.

Caracterização do produto de expressão do transgene

Não se sabe se as plantas de tabaco, *per se*, são capazes de reproduzir os eventos do processamento que ocorre com a proinsulina humana, necessário para a síntese de insulina humana madura. Para avaliar esta questão, foram realizados ensaios visando à caracterização do produto de expressão do transgene.

Devido ao baixo nível de proteína recombinante produzida nas sementes, não foi possível a obtenção, através de purificação, de quantidade suficiente para a análise de sua estrutura primária através de seqüenciamento. Portanto, para verificar se o produto de expressão do transgene sofreu o mesmo processamento que ocorre com a proinsulina humana, um extrato de sementes T₂ da linhagem N7 foi testado através imunoensaios específicos para a detecção de insulina madura e de peptídio C, conforme descrito em "Materiais e métodos". Os resultados destes ensaios estão mostrados na Tabela 6.

O imunoensaio específico para insulina não detectou este produto nos extratos de sementes das linhagens N7 e SR1. Por outro lado, o imunoensaio específico para peptídio C indicou a presença de proinsulina apenas no extrato de sementes da linhagem N7. A presença de proinsulina é justificada pelo fato do

imunoensaio para detecção do peptídeo C apresentar reatividade cruzada com a proinsulina (13%).

Tabela 6. Resultado de imunoensaios para a detecção de insulina processada e de peptídeo C

Linhagem	Insulina (μ UI/ml) ¹	Peptídeo-C (ng/ml) ²
N7	---	1,1
SR1 ³	---	---

¹ Sensibilidade do ensaio: a partir de 2 μ UI/ml. UI= unidades internacionais. Este ensaio não apresenta reatividade cruzada com a proinsulina

² Sensibilidade do ensaio: a partir de 0,3 ng/ml. Este ensaio não apresenta reatividade cruzada com a insulina, mas apresenta 13% de reatividade cruzada com a proinsulina

³ Linhagem SR1 não transformada (controle negativo)

Os resultados desses imunoensaios indicaram que o produto expresso pelo transgene não sofreu processamento. Com base nestes resultados, foram realizados ensaios de *western blotting* para confirmar a natureza do produto de expressão do transgene, utilizando-se um anticorpo monoclonal contra a proinsulina humana (descrito em "Materiais e métodos") que, segundo o fabricante, não apresenta reatividade cruzada com a insulina humana.

Inicialmente, foram realizados ensaios para a padronização da técnica, onde insulina e proinsulina produzidas pela Biobrás foram utilizadas como padrões. A insulina utilizada consiste em insulina de origem bovina e suína (insulina mista), altamente purificada. A proinsulina usada, por sua vez, é um produto intermediário do processo de produção de insulina humana recombinante em *E. coli* pela Biobrás, e nos foi gentilmente cedida pela Dra. Heloisa R. T. de Sousa, pesquisadora da referida empresa.

A proinsulina humana padrão apresentou 3 bandas imunorreativas no *western blotting*. Esta proinsulina é, na realidade, uma proteína de fusão composta por uma cauda N-terminal de polihistidina (M-A-H-H-H-H-H-M-G-R) conectada à proinsulina humana. A banda de menor peso molecular (10,6 kDa) observada na Figura 15 corresponde à proteína de fusão renaturada, obtida durante o processo de produção de insulina humana recombinante em *E. coli* pela Biobrás (Dra.

Heloisa R. T. de Sousa, comunicação pessoal). As bandas de maior peso molecular correspondem a formas não renaturadas da proteína de fusão.

Depois de padronizada a técnica, realizamos ensaios de *western blotting* com extratos de sementes T₂ das linhagens N7 e SR1 não transformada (controle negativo). Alíquotas dos extratos de sementes foram misturadas com tampão de amostra contendo β -mercaptoetanol, e as proteínas destes extratos foram separadas através de eletroforese em gel de poliacrilamida (15%) contendo SDS (SDS-PAGE), conforme descrito em "Materiais e métodos". A Figura 15 mostra o resultado obtido em um destes ensaios. A canaleta 6 mostra que não foi possível detectar proinsulina nos extratos de sementes através desta abordagem.

Uma vez que a técnica de *western blotting* não apresentou sensibilidade suficiente para detectar proinsulina nas amostras avaliadas, foram testadas técnicas cromatográficas visando ao enriquecimento do produto de expressão do transgene da linhagem N7. O método utilizado para a extração de proteínas solúveis das sementes T₂ desta linhagem permitiu a obtenção de uma mistura pré-purificada, com menor complexidade proteica, aumentando a eficiência das técnicas cromatográficas.

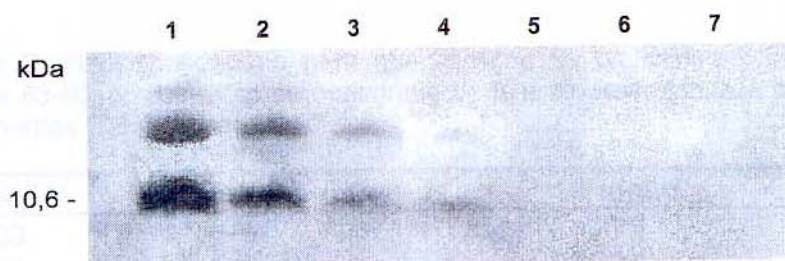


Figura 15. *Western blotting* de extratos de sementes. Canaletas 1-4: amostras contendo 125, 62, 31 e 15 ng, respectivamente, de proinsulina humana recombinante da Biobrás (controle positivo). Canaleta 5: amostra contendo 125 ng de insulina humana da Biobrás. Canaleta 6: extrato de sementes da planta N7. Canaleta 7: extrato de sementes da planta SR1 não transformada (controle negativo). Foi utilizado um anticorpo monoclonal contra a proinsulina humana.

Foram testadas duas técnicas cromatográficas: cromatografia de fase reversa e cromatografia de troca iônica, conforme descrito em "Materiais e métodos". Estas cromatografias foram inicialmente realizadas com proinsulina padrão (proinsulina humana recombinante da Biobrás), para avaliação do tempo de retenção desta proteína em cada uma das colunas usadas. As frações correspondentes aos picos dos cromatogramas foram coletadas e analisadas através de SDS-PAGE. O tempo de retenção da proinsulina padrão foi de 28 minutos na coluna de fase reversa (Figura 16A), e de 27 minutos na coluna de troca iônica (Figura 17A).

A Figura 16A mostra o perfil de eluição da cromatografia de fase reversa de um extrato de sementes (T₂) da linhagem N7. A análise das frações coletadas através de *western blotting* (Figura 16B) indicou a presença de proteína reativa com o anticorpo específico para a proinsulina humana. As frações imunorreativas apresentaram tempo de retenção comparável ao tempo de retenção da proinsulina humana padrão. Apesar do tempo de retenção indicar a presença de proinsulina, a banda imunorreativa apresentou peso molecular aparente de aproximadamente 20 kDa, superior portanto, ao da proinsulina humana (9,4 kDa).

A presença de proteínas relacionadas à proinsulina, nas frações de número 63-80 da cromatografia mostrada na Figura 16A, foi também avaliada através de um radioimunoensaio. Os resultados deste ensaio estão mostrados na Tabela 7.

Tabela 7. Radioimunoensaio para quantificação de proinsulina recombinante nas frações 63-80, coletadas na cromatografia de fase reversa realizada com um extrato de sementes (T₂) da linhagem N7

Fração	ng/ml ¹	Fração	ng/ml ¹
63	---	72	1,14
64	---	73	1,28
65	---	74	2,92
66	---	75	4,46
67	0,04	76	---
68	0,08	77	---
69	0,16	78	---
70	0,32	79	---
71	0,68	80	---

¹ Resultados do RIE: ng proinsulina/ml da fração avaliada

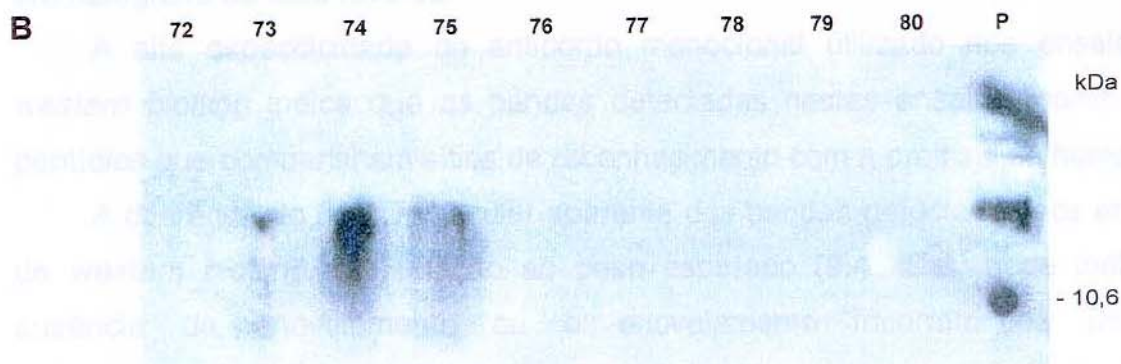
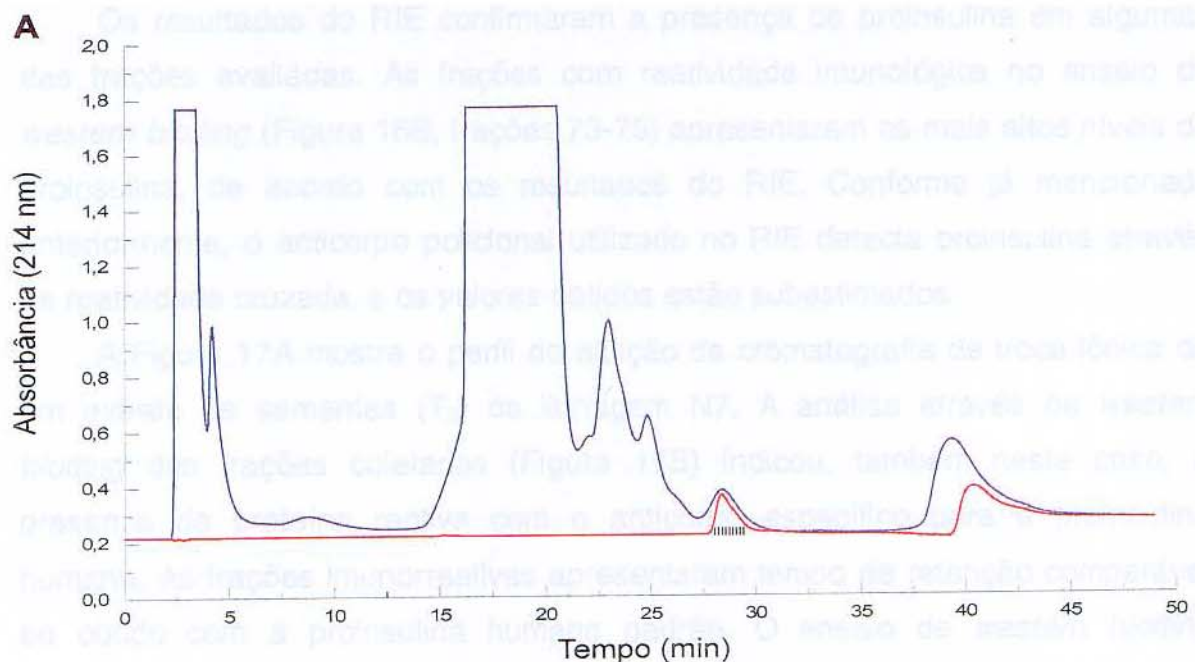


Figura 16. Caracterização da proteína recombinante produzida nas sementes transgênicas. A) Cromatografia de fase reversa de um extrato de sementes (T_2) da linhagem N7 (em azul), e de 40 μ g de proinsulina humana padrão (em vermelho). Foi injetado 0,5 ml de extrato preparado a partir de 1,5 g de sementes. Alíquotas das frações correspondentes aos picos do cromatograma foram submetidas a *western blotting* para detecção da presença de proinsulina recombinante. B) *Western blotting*. As canaletas estão numeradas de acordo com a fração testada. Estas frações (72-80) estão representadas no cromatograma por barras verticais. Canaleta P: 30 ng de proinsulina humana recombinante da Biobrás (controle positivo). Foi utilizado um anticorpo monoclonal contra a proinsulina humana.

Os resultados do RIE confirmaram a presença de proinsulina em algumas das frações avaliadas. As frações com reatividade imunológica no ensaio de *western blotting* (Figura 16B, frações 73-75) apresentaram os mais altos níveis de proinsulina, de acordo com os resultados do RIE. Conforme já mencionado anteriormente, o anticorpo policlonal utilizado no RIE detecta proinsulina através de reatividade cruzada, e os valores obtidos estão subestimados.

A Figura 17A mostra o perfil de eluição da cromatografia de troca iônica de um extrato de sementes (T₂) da linhagem N7. A análise através de *western blotting* das frações coletadas (Figura 17B) indicou, também neste caso, a presença de proteína reativa com o anticorpo específico para a proinsulina humana. As frações imunorreativas apresentaram tempo de retenção comparável ao obtido com a proinsulina humana padrão. O ensaio de *western blotting* apontou, ainda, que as bandas imunorreativas apresentaram peso molecular aparente (de aproximadamente 20 kDa, quando comparadas a padrões de peso molecular) similar ao peso das bandas detectadas nas frações obtidas na cromatografia de fase reversa.

A alta especificidade do anticorpo monoclonal utilizado nos ensaios de *western blotting* indica que as bandas detectadas nestes ensaios representam peptídios que compartilham sítios de reconhecimento com a proinsulina humana.

A diferença do peso molecular aparente das bandas detectadas nos ensaios de *western blotting*, em relação ao peso esperado (9,4 kDa), pode indicar a ausência de enovelamento ou o enovelamento incorreto da proteína recombinante. A linhagem N7 contém a região codificadora da proinsulina humana precedida pelo peptídio-sinal humano, que pode não estar direcionando a proinsulina recombinante para o retículo endoplasmático, onde ocorreria o enovelamento.

Os resultados obtidos nos ensaios de *western blotting* podem indicar, ainda, a formação de dímeros de proinsulina estáveis nas condições utilizadas nos ensaios, ou a ocorrência de modificações pós-traducionais. A glicosilação, por exemplo, pode resultar em significativo retardamento na mobilidade eletroforética da proteína.

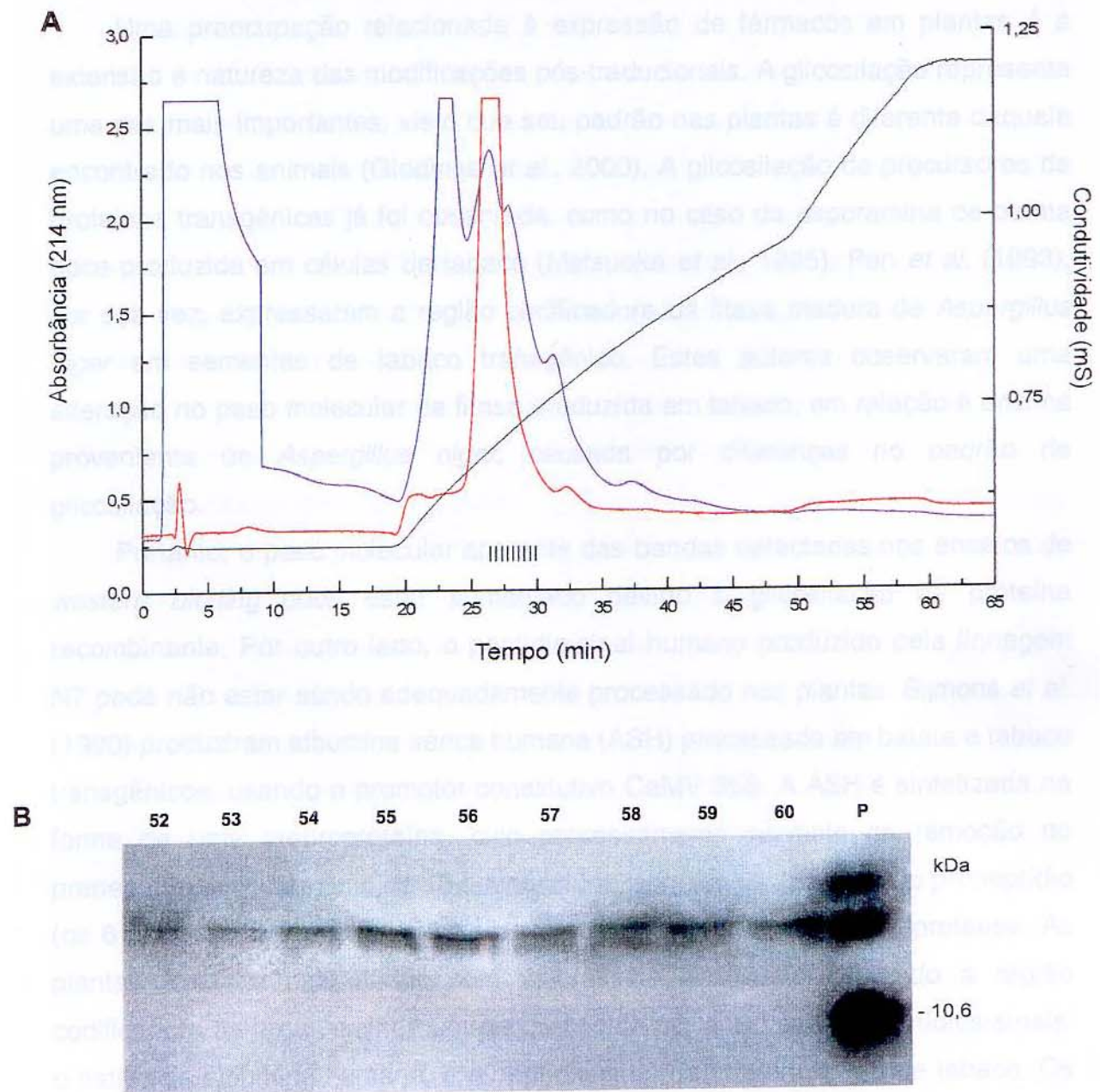


Figura 17. Caracterização da proteína recombinante produzida nas sementes transgênicas. A) Cromatografia de troca iônica de um extrato de sementes (T_2) da linhagem N7 (em azul), e de 400 μ g de proinsulina humana padrão (em vermelho). Foram injetados 2 ml de extrato preparado a partir de 5 g de sementes. Alíquotas das frações correspondentes aos picos do cromatograma foram submetidas a *western blotting* para detecção da presença de proinsulina recombinante. B) *Western blotting*. As canaletas estão numeradas de acordo com a fração testada. Canaleta P: 50 ng de proinsulina humana recombinante da Biobrás (controle positivo). Foi utilizado um anticorpo monoclonal contra a proinsulina humana.

Uma preocupação relacionada à expressão de fármacos em plantas é a extensão e natureza das modificações pós-traducionais. A glicosilação representa uma das mais importantes, visto que seu padrão nas plantas é diferente daquele encontrado nos animais (Giddings *et al.*, 2000). A glicosilação de precursores de proteínas transgênicas já foi observada, como no caso da esporamina de batata doce produzida em células de tabaco (Matsuoka *et al.*, 1995). Pen *et al.* (1993), por sua vez, expressaram a região codificadora da fitase madura de *Aspergillus niger* em sementes de tabaco transgênico. Estes autores observaram uma alteração no peso molecular da fitase produzida em tabaco, em relação à enzima proveniente de *Aspergillus niger*, causada por diferenças no padrão de glicosilação.

Portanto, o peso molecular aparente das bandas detectadas nos ensaios de *western blotting* pode estar aumentado devido à glicosilação da proteína recombinante. Por outro lado, o peptídeo-sinal humano produzido pela linhagem N7 pode não estar sendo adequadamente processado nas plantas. Sijmons *et al.* (1990) produziram albumina sérica humana (ASH) processada em batata e tabaco transgênicos, usando o promotor constitutivo CaMV 35S. A ASH é sintetizada na forma de uma preproteína, cujo processamento consiste na remoção do prepeptídeo aminoterminal de 18 aminoácidos, seguida da remoção do propeptídeo (os 6 aminoácidos aminoterminais da proalbumina) por uma serino-protease. As plantas foram transformadas com vetores de expressão contendo a região codificadora da proalbumina humana precedida por dois tipos de peptídios-sinais: o nativo da albumina humana, e o peptídeo-sinal da proteína PR-S de tabaco. Os autores demonstraram que a HSA pôde ser secretada com os dois tipos de peptídios-sinais utilizados. Tanto o peptídeo-sinal humano quanto o vegetal foram corretamente processados. Entretanto, a construção contendo o peptídeo-sinal humano resultou no processamento parcial da proteína precursora e secreção de proalbumina humana (o propeptídeo não foi removido neste caso), enquanto que a construção contendo o peptídeo-sinal vegetal resultou na secreção de HSA corretamente processada.

É importante que se esclareça, em trabalhos subseqüentes, a causa do aumento do peso molecular das bandas detectadas nos ensaios de *western blotting*, em relação ao peso da proinsulina humana padrão. A hipótese de glicosilação poderá ser testada submetendo-se os extratos de sementes a tratamentos de deglicosilação utilizando-se glicosidases ou o ácido trifluorometanosulfônico (TFMS), seguidos de ensaios de *western blotting*. A redução do peso molecular da proinsulina recombinante confirmaria a ocorrência de glicosilação nesta proteína.

Para avaliar o enovelamento das proteínas recombinantes, os extratos de sementes poderiam ser submetidos a tratamentos com altas concentrações de agentes desnaturantes e de agentes redutores, como a uréia e o DTT, seguidos de tratamento com agentes alquilantes, para impedir o reestabelecimento das pontes de dissulfeto, e conseqüentemente o reenovelamento das proteínas. Desta forma, a proinsulina recombinante poderia ser comparada com o padrão de proinsulina, submetido ao mesmo tratamento. O SDS e o β -mercaptoetanol utilizados nas eletroforeses em gel de poliacrilamida provavelmente não foram suficientes para desnaturar completamente a proinsulina humana padrão. Isto explicaria a ocorrência de bandas correspondendo a formas renaturadas e não renaturadas desta proteína nos ensaios de *western blotting*.

A determinação da seqüência aminoterminal da proteína recombinante, por sua vez, permitirá a avaliação do processamento do peptídio-sinal humano.

Também serão realizados ensaios para a caracterização da proteína recombinante produzida pelas linhagens transformadas com o vetor de expressão contendo o peptídio-sinal vegetal. Será interessante comparar o processamento das proteínas recombinantes contendo o peptídio-sinal humano, com as proteínas recombinantes contendo o peptídio-sinal vegetal.

Embora o tabaco seja bastante empregado em pesquisas como planta modelo, uma vez que é facilmente transformado, bem caracterizado e fácil de se trabalhar, não é ideal para aplicações comerciais ou outras aplicações em larga escala (Giddings, 2000). Os cassetes de expressão desenvolvidos neste trabalho estão sendo testados também em plantas que possivelmente possibilitarão maior

rendimento na produção de proteínas recombinantes em sementes, tais como o milho e a soja. Os ensaios com milho estão sendo realizados por pesquisadores do CBMEG (UNICAMP), em colaboração com pesquisadores do Núcleo de Biologia Aplicada do Centro de Milho e Sorgo (Embrapa, Sete Lagoas, MG), e os ensaios com soja estão sendo realizados em colaboração com pesquisadores do Centro de Recursos Genéticos e Biotecnologia (Embrapa, Brasília, DF).

Para avaliar a viabilidade da produção de insulina humana em sementes de plantas transgênicas, plantas de tabaco foram transformadas com vetores de expressão contendo a região codificadora da proinsulina humana precedida por dois tipos de peptídios-sinais: o nativo da insulina humana, e o peptídio-sinal de uma proteína de reserva de *Coix*.

O nível de produção da proteína recombinante nas sementes das plantas transgênicas foi baixo, em relação aos níveis obtidos por outros grupos que também expressaram proteínas heterólogas em sementes de tabaco. A produção da proteína recombinante poderia ser aumentada através do uso de uma sequência codificadora otimizada para plantas. As modificações na sequência original incluiriam a remoção de motivos desestabilizadores do mRNA e de potenciais sinais de processamento, além de substituições das bases nitrogenadas da sequência codificadora, para que os códons dos aminoácidos da proteína fossem aqueles usados preferencialmente pelas plantas. O uso dos cassetes de expressão desenvolvidos neste trabalho em plantas monocotiledôneas provavelmente resultará em níveis mais altos de produção da proteína recombinante, uma vez que o promotor utilizado nestes cassetes é proveniente de uma planta monocotiledônea.

Os imunoensaios realizados para a caracterização do produto de expressão do transgene em uma das plantas, transformada com o vetor de expressão contendo o peptídio-sinal humano, demonstraram a presença de proinsulina nas sementes destas plantas, e indicaram, por outro lado, que o processamento proteolítico deste prohormônio em tabaco não ocorre tal qual o observado em mamíferos durante a síntese de insulina madura.

A proinsulina recombinante detectada nos imunoensaios apresentou mobilidade eletroforética anômala, resultante possivelmente de enovelamento incorreto, modificações pós-traducionais ou de processo de dimerização. Ensaios

adicionais são necessários para melhor caracterização bioquímica das proteínas recombinantes, e para a avaliação do processamento das preproteínas produzidas a partir dos dois vetores de expressão utilizados para a transformação das plantas. A padronização, neste trabalho, de vários métodos para a análise dos produtos recombinantes (as técnicas de purificação destes produtos e diversos imunoenaios) permitirá a realização desses ensaios com relativa facilidade.

Para a obtenção de insulina recombinante nas sementes de tabaco transgênicas, as plantas precisarão ser modificadas através da introdução de genes codificadores de enzimas que permitam o processamento da proinsulina humana.

- Ausubel, F.M.; Brent, R.; Kingston, R.E.; Moore, D.D.; Seidman, J.G.; Smith, J.A. & Struhl, K. 1996. *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, Inc. New York.
- Arakawa, T.; Yu, J.; Chong, D.K.X.; Hough, J.; Engen, P.C. & Langridge, W.H.R. 1998. A plant-based cholera toxin B subunit-insulin fusion protein protects against the development of autoimmune diabetes. *Nature Biotech.* **16**, 934-938.
- Beachy, R.N.; Fitchen, J.H.; Hein, M.B. 1996. Use of plant viruses for delivery of vaccine epitopes. *Ann. NY Acad. Sci.* **796**, 43-49.
- Borisjuk, N.V.; Borisjuk, L.G.; Logendra, S.; Petersen, F.; Gleba, Y.; Raskin, I. 1999. Production of recombinant proteins in plant root exudates. *Nature Biotechnol.* **17**, 466-469.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
- Cowley, D.J. & Mackin, R.B. 1997. Expression, purification and characterization of recombinant human proinsulin. *FEBS Lett.* **402**, 124-130.
- Delattre, E. & Boschero, A.C. 1983. Validação de um radioimunoensaio para dosagem de insulina murina. *Ciência e Cultura* **36**, 107-114.
- Emilien, G.; Maloteaux, J.-M. & Ponchon, M. 1999. Pharmacological management of diabetes: recent progress and future perspectives in daily drug treatment. *Pharmacol. Ther.* **81**, 37-51.
- Fiedler, U. & Conrad, U. 1995. High-level production and long-term storage of engineered antibodies in transgenic tobacco seeds. *Bio/Technology* **13**, 1090-1093.
- Freitas, F.A.; Yunes, J.A.; da Silva, M.J.; Arruda, P. & Leite, A. 1994. Structural characterization and promoter activity analysis of the γ -kafirin gene from sorghum. *Mol. Gen. Genet.* **245**, 177-186.
- Giddings, G.; Allison, G.; Brooks, D. & Carter, A. 2000. Transgenic plants as factories for biopharmaceuticals. *Nat. Biotechnol.* **18**, 1151-1155.
- Goddijn, O.J.M. & Pen, J. 1995. Plants as biorreactors. *Trends Biotechnol.* **13**, 379-387.
- Gynheung, A.; Ebert, P.R.; Mitra, A. & Ha, S.B. 1988. Binary vectors. In: Gelvin, S.B.; Schiperoort, R.A.; Verma, D.P.S. (eds). *Plant Molecular Biology Manual*, pp. A3: 1-19. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Haq, T.A.; Mason, H.S.; Clements, J.D. & Arntzen, C.J. 1995. Oral immunization with a recombinant antigen produced in transgenic plants. *Science* **268**, 714-716.

- Harris, B. 1999. Exploiting antibody-based technologies to manage environmental pollution. *Trends Biotechnol.* **17**, 290-296.
- Herbers, K.; Wilke, I. & Sonnewald, U. 1995. A thermostable xylanase from *Clostridium thermocellum* expressed at high levels in the apoplast of transgenic tobacco has no detrimental effects and is easily purified. *Bio/Technology* **13**, 63-66.
- Hood, E.E. & Jilka, J.M. 1999. Plant-based production of xenogenic proteins. *Curr. Opin. Biotechnol.* **10**, 382-386.
- Hood, E.E.; Witcher, D.R.; Maddock, S.; Meyer, T.; Baszczynski, C.; Bailey, M.; Flynn, P.; Register, J.; Marshall, L.; Bond, D.; Kulisek, E.; Kusnadi, A.; Evangelista, R.; Nikolov, Z.; Wooge, C.; Mehig, R.J.; Hernan, R.; Kappel, W.K.; Ritland, D.; Li, C.P. & Howard, J.A. 1997. Commercial production of avidin from transgenic maize: characterization of transformant, production, processing, extraction and purification. *Mol. Breeding* **3**, 291-306.
- Hooykaas, P.J.J. 1988. *Agrobacterium* molecular genetics. In: Gelvin, S.B.; Schilperoort, R.A.; Verma, D.P.S. (eds). *Plant Molecular Biology Manual*, pp. A4: 1-13. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Horsch, R.B.; Fry, J.; Hoffmann, N.; Neidermeyer, J.; Rogers, S.G. & Fraley, R.T. 1988. Leaf disc transformation. In: Gelvin, S.B.; Schilperoort, R.A.; Verma, D.P.S. (eds). *Plant Molecular Biology Manual*, pp. A5: 1-9. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Jefferson, R.A. 1987. Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system. *Plant Mol. Biol.* **5**, 387-405.
- Johnson, I. 1983. Human insulin from rembinant DNA technology. *Nature* **219**, 632-637.
- Kaufmann, J.E.; Irminger, J.-C.; Mungall, J. & Halban, P.A. 1997. Proinsulin conversion in GH3 cells after coexpression of human proinsulin with the endoproteases PC2 and/or PC3. *Diabetes* **46**, 978-982.
- Kjeldsen, T.; Pettersson, A.F. & Hach, M. 1999. The role of leaders in intracellular transport and secretion of the insulin precursor in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biotechnol.* **75**, 195-208.
- Kusnadi, A.R.; Nikolov, Z.L. & Howard, J.A. 1997. Production of recombinant proteins in transgenic plants: practical considerations. *Biotech. Bioeng.* **56**, 473-484.
- Lee, H.C.; Kim, S.J.; Kim, K.S.; Shin, H.C. & Yoon, J.W. 2000. Remission in models of type 1 diabetes by gene therapy using a single-chain insulin analogue. *Nature* **408**, 483-488.
- Leite, A.; Kemper, E.L.; da Silva, M.J.; Luchessi, A.D.; Siloto, R.M.P.; Bonaccorsi, E.D.; El-Dorry, H.F. & Arruda, P. 2000. Expression of correctly processed human growth hormone in seeds of transgenic tobacco plants. *Molecular Breeding* **6**, 47-53.
- Li, L.; Qu, R.D.; Kochko, A.; Fauquet, C. & Beauchy, R.N. 1993. An improved rice transformation system using the biolistic method. *Plant Cell Rep.* **12**, 250-255.

- Ma, J.K.-C.; Lehner, T.; Stabila, P.; Fux, C.I. & Hiatt, A. 1994. Assembly of monoclonal antibodies with IgG1 and IgA heavy chain domains in transgenic tobacco plants. *Eur. J. Immunol.* **24**, 131-138.
- Ma, J.L.C.; Hikmat, B.Y.; Wycoff, K.; Vine N.D.; Chargelegue, D.; Yu, L.; Hein, M.B. & Lehner, T. 1998. Characterization of a recombinant plant monoclonal secretory antibody and preventive immunotherapy in humans. *Nat. Med.* **4**, 601-606.
- Mackin, R.B. 1998. Proinsulin: recent observations and controversies. *CMLS* **54**, 696-702.
- Mason, H.S.; Lam, D.M.-K. & Arntzen, C.J. 1992. Expression of hepatitis B surface antigen in transgenic plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 11745-11749.
- Mason, H.S.; Ball, J.M.; Shi, J.-J.; Jlang, X.; Estes, M.K. & Arntzen, C.J. 1996. Expression of Norwalk virus capsid protein in transgenic tobacco and potato and its oral immunogenicity in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 5335-5340.
- Mason, H.S.; Haq, T.A.; Clements, J.D. & Arntzen, C.J. 1998. Edible vaccine protects mice against *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin (LT): potatoes expressing a synthetic LT-B gene. *Vaccine* **16**, 1336-1343.
- Matsuoka, K.; Watanabe, N. & Nakuamure, K. 1995. O-glycosilation of a precursor to a sweet potato vacuolar protein, sporamin, expressed in tobacco cells. *Plant J.* **8**, 877-889.
- Moffat, A.S. 1995. Exploring transgenic plants as a new vaccine source. *Science* **268**, 658-660.
- Murashige, T. & Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant* **15**: 473-497.
- Nawrath, C.; Poirier, Y. & Somerville, C. 1994. Targeting of the polyhydroxybutyrate biosynthetic pathway to the plastids of *Arabidopsis thaliana* results in high levels of polymer accumulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 12760-12764.
- Nilsson, J.; Jonasson, P.; Samuelsson, E.; Stahl, S.; Uhlén, M. 1996. Integrated production of human insulin and its C-peptide. *J. Biotechnol.* **48**, 241-250.
- Oliveira, A.E.A.; Machado, O.L.T.; Gomes, V.M.; Xavier-Neto, J.; Pereira, A.C.; Vieira, J.G.H.; Fernandes, K.V.S. & Xavier-Filho, J. 1999. Jack bean seed coat contains a protein with complete sequence homology to bovin insulin. *Protein Peptide Lett.* **6**, 15-21.
- Ottoboni, L.M.M.; Leite, A.; Yunes, J.A.; Targon, M.L.P.M.; de Souza Filho, G.A.; Arruda, P. 1993. Sequence analisys of 22 kDa-like α -coixin genes and their comparison with homologous zeins and kafirin genes reveals highly conserved protein structure and regulatory elements. *Plant Mol. Biol.* **21**, 765-778.
- Parizotto, E.A.; De Lucca, P.C.; Jungmann, L.; Kemper, E.L.; da Silva, A.C. & Leite, A. 2000. Plantas como biorreatores. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento* **17**, 12-17.

- Parmenter, D.L.; Boothe, J.G.; van Rooijen, G.J.H.; Yeung, E.C.; Moloney, M.M. 1995. Production of biologically active hirudin in plant seeds using oleosin partitioning. *Plant Mol. Biol.* **29**, 1167-1180.
- Pen, J.; Molendijk, L.; Quax, W.J.; Sijmons, P.C.; van Ooyen, A.J.J.; van den Elzen, P.J.M.; Rietveld, K. & Hoekema, A. 1992. Production of active *Bacillus licheniformis* alpha-amylase in tobacco and its application in starch liquefaction. *Bio/Technology* **10**, 292-296.
- Pen, J.; Verwoerd, T.C.; van Paridon, P.A.; Beudeker, R.F.; van den Elzen, P.J.M.; Geerse, K.; van der Klis, J.D.; Versteegh, H.A.J.; van Ooyen, A.J.J. & Hoekema, A. 1993. Phytase-containing transgenic seeds as a novel feed additive for improved phosphorus utilization. *Bio/Technology* **11**, 811-814.
- Poirier, Y.; Nawrath, C & Somerville, C. 1995. Production of polyhydroxyalkanoates, a family of biodegradable plastics and elastomers, in bacteria and plants. *Bio/Technology* **13**, 142-150.
- Richter, L.J.; Thanavala, Y.; Arntzen, C.J. & Mason, H.S. 2000. Production of hepatitis B surface antigen in transgenic plants for oral immunization. *Nat. Biotechnol.* **18**, 1167-1171.
- Sambrook, J.; Fritsch, E.F. & Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Shen, S.-H. 1984. Multiple joined genes prevent product degradation in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 4627-4631.
- Sijmons, P.C.; Dekker, B.M.M.; Schrammeijer, B.; Verwoerd, T.C.; van den Elzen, P.J.M. & Hoekema, A. 1990. Production of correctly processed human serum albumin in transgenic plants. *Bio/Technology* **8**, 217-221.
- Staub, J.M.; Garcia, B.; Graves, J.; Hajdukiewicz, P.T.J.; Hunter, P.; Nehra, N.; Paradkar, V.; Schlittler, M.; Carroll, J.A.; Spatola, L.; Ward, D.; Ye, G.; Russel, D.A. 2000. High-yield production of a human therapeutic protein in tobacco chloroplasts. *Nat. Biotechnol.* **18**, 333-338.
- Steiner, D.F.; Rouillé, Y.; Gong, Q.; Martin, S.; Carroll, R. & Chan, S.J. 1996. The role of prohormone convertases in insulin biosynthesis: evidence for inherited defects in their action in man and experimental animals. *Diabetes & Metabolism* **22**, 94-104.
- Tackaberry, E.S.; Dudani, A.K.; Prior, F.; Tocchi, M.; Sardana, R.; Altosaar, I. & Ganz, P.R. 1999. Development of biopharmaceuticals in plant expression systems: cloning, expression and immunological reactivity of human cytomegalovirus glycoprotein B (UL55) in seeds of transgenic tobacco. *Vaccine* **17**, 3020-3029.
- Tacket, C.O.; Mason, H.S.; Losonsky, G.; Clements, J.D.; Levine, M.M. & Arntzen, C.J. 1998. Immunogenicity in humans of a recombinant bacterial antigen delivered in a transgenic potato. *Nat. Med.* **4**, 607-609.
- Tager, H.S.; Rubenstein, A.H. & Steiner, D.F. 1975. Methods for the assessment of peptide precursors. Studies on insulin biosynthesis. *Methods Enzymol.* **37**, 326-345.

- Thanavala, Y.; Yang, Y.-F.; Lyons, P.; Mason, H.S. & Arntzen, C.J. 1995. Immunogenicity of transgenic plant-derived hepatitis B surface antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 3358-3361.
- Vandekerckhove, J.; Van Damme, J.; Van Lijsebettens, M.; Botterman, J.; De Block, M.; Vandewiele, M.; De Clercq, A.; Leemans, J.; Van Montagu, M. & Krebbers, E. 1989. Enkephalins produced in transgenic plants using modified 2S seed storage proteins. *Bio/Technology* **7**, 929-932.
- Vollenweider, F.; Kaufmann, J.; Irminger, J.-C. & Halban, P.A. 1995. Processing of proinsulin by furin, PC2, and PC3 in (co)transfected COS (monkey kidney) cells. *Diabetes* **44**, 1075-1080.
- Witcher, D.R.; Hood, E.E.; Peterson, D.; Bailey, M.; Bond, D.; Kusnadi, A.; Evangelista, R.; Nikolov, Z.; Wooge, C.; Mehig, R.; Kappe, W.; Register, J. & Howard, J.A. 1998. Commercial production of beta-glucuronidase (GUS): a model system for the production of proteins in plants. *Mol. Breeding* **4**, 301-312.
- Ye, X.; Al-Babili, S.; Klöti, A.; Zhang, J.; Lucca, P.; Beyer, P. & Potrykus, I. 2000. Engineering the provitamin A (β -carotene) biosynthetic pathway into (carotenoid-free) rice endosperm. *Science* **287**, 303-305.