



DIEGO GRANDO MÓDOLO

**PROTEÍNA L1 DE PAPILOMAVÍRUS BOVINO (BPV-1):
PRODUÇÃO EM BACTÉRIA E PLANTAS DE TABACO**

**“BOVINE PAPILLOMAVIRUS L1 PROTEIN (BPV-1):
PRODUCTION IN BACTERIA AND TOBACCO PLANTS”**

CAMPINAS

2014



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

DIEGO GRANDO MÓDOLO

**PROTEÍNA L1 DE PAPILOMAVÍRUS BOVINO (BPV-1):
PRODUÇÃO EM BACTÉRIA E PLANTAS DE TABACO**

“BOVINE PAPILLOMAVIRUS L1 PROTEIN (BPV-1): PRODUCTION IN
BACTERIA AND TOBACCO PLANTS”

Tese apresentada ao Instituto de Biologia para obtenção do Título de Doutor em Genética e Biologia Molecular, na área de Genética Vegetal e Melhoramento.

Thesis presented to the Biology Institute of the University of Campinas in partial fulfillment of the requirements for degree of Doctor in Genetics and Molecular Biology, in the area of Plant Genetics and Breeding.

ORIENTADOR: MARCELO MENOSSI TEIXEIRA
CO-ORIENTADOR: RODRIGO FRANCO DE CARVALHO

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA TESE DEFENDIDA PELO ALUNO
DIEGO GRANDO MÓDOLO E ORIENTADA PELO
PROF. DR. MARCELO MENOSSI TEIXEIRA

CAMPINAS

2014

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

M721p Módolo, Diego Grando, 1984-
Proteína L1 de Papilomavírus Bovino (BPV-1) : produção em bactéria e plantas de tabaco / Diego Grando Módolo. – Campinas, SP : [s.n.], 2014.

Orientador: Marcelo Menossi Teixeira.
Coorientador: Rodrigo Franco de Carvalho.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Papillomavirus bovino 1. 2. Proteínas recombinantes. 3. Proteína L1 de papillomavirus bovino. 4. Bactéria. 5. Tabaco. I. Teixeira, Marcelo Menossi, 1968-. II. Carvalho, Rodrigo Franco. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Bovine Papillomavirus L1 protein (BPV-1) : production in bacteria and tobacco plants

Palavras-chave em inglês:

Bovine papillomavirus 1
Recombinant proteins
L1 protein, bovine papillomavirus
Bacteria
Tobacco

Área de concentração: Genética Vegetal e Melhoramento

Titulação: Doutor em Genética e Biologia Molecular

Banca examinadora:

Marcelo Menossi Teixeira [Orientador]
Clarice Weis Arns
Marcelo Brocchi
Rita de Cássia Stocco
Roberto Ruller

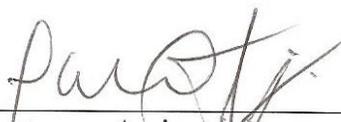
Data de defesa: 17-03-2014

Programa de Pós-Graduação: Genética e Biologia Molecular

Campinas, 17 de Março de 2014.

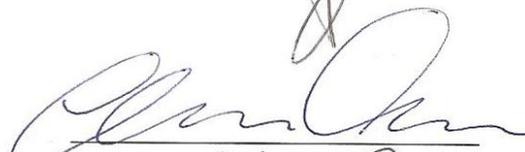
Banca Examinadora:

Prof. Dr. Marcelo Menossi Teixeira (Orientador)



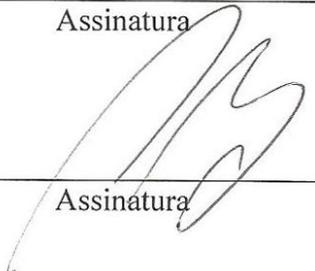
Assinatura

Profa. Dra. Clarice Weis Arns (Titular)



Assinatura

Prof. Dr. Marcelo Brocchi (Titular)



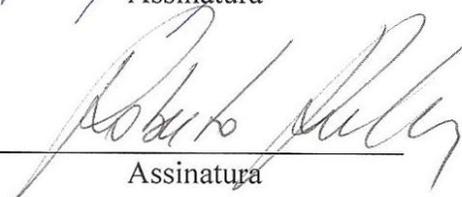
Assinatura

Profa. Dra. Rita de Cássia Stocco (Titular)



Assinatura

Prof. Dr. Roberto Ruller (Titular)



Assinatura

Prof. Dr. Márcio José da Silva (Suplente)

Assinatura

Prof. Dr. Enio Mori (Suplente)

Assinatura

Profa. Dra. Helaine Carrer (Suplente)

Assinatura

RESUMO

O Brasil é conhecido por ter o segundo maior efetivo bovino e por ser o maior exportador de carne bovina no mundo. Dentre os problemas que afetam a pecuária nacional está a papilomatose bovina, uma doença infecto contagiosa causada pelo papilomavírus bovino (BPV). Diversas doenças de alto impacto econômico não só na pecuária nacional mas também mundial estão associadas ao BPV, sendo que ainda não existe uma vacina que possa prevenir o alastramento da doença e nem métodos eficazes de tratamento. A proteína L1 do capsídeo do BPV tipo 1 é uma forte candidata para ser utilizada na formulação vacinal por ser altamente imunogênica e ter a capacidade de formar, sozinha, partículas "*virus-like*" (VLPs). Devido a incapacidade de se multiplicar papilomavírus "*in vitro*", a utilização de sistemas de produção de proteínas recombinantes é a melhor estratégia para produção de proteínas virais em larga escala que possam ser utilizadas em formulações vacinais ou em testes de diagnósticos. Neste trabalho desenvolvemos uma plataforma de produção e purificação da proteína recombinante L1 em bactéria. A proteína L1 recombinante foi purificada por cromatografia de troca iônica e foi possível obter frações em alto nível de pureza. Também produzimos plantas transgênicas visando a produção da proteína L1. A transformação genética de plantas foi confirmada por PCR e RT-PCR, mas devido à inespecificidade dos anticorpos comerciais disponíveis e a uma possível baixa expressão do gene *L1* em plantas, não foi possível confirmar a expressão da proteína recombinante. A proteína L1 obtida em bactérias poderá ser analisada como vacina e bem como na obtenção de anticorpos mais específicos e na produção de testes de diagnósticos. O conhecimento obtido neste trabalho poderá ser adaptado no desenvolvimento de outras vacinas de importância socio-econômica.

ABSTRACT

Brazil is known as the major exporter of beef and to have the second herd in the world. Several illness affecting the national beef business are associated to the bovine papillomatosis, an infectious disease caused by Bovine Papillomavirus (BPV). Although the economic impacts of these diseases affecting the livestock in global scale, there is no BPV vaccine or effective treatment methods available. The L1 capsid protein of BPV type 1 is a suitable candidate to be used in a vaccine formulation due its high immunogenicity and the ability to form virus-like particles (VLPs). Due to the inability to multiply papillomavirus *in vitro*, the use of recombinant protein production systems can be a better strategy to produce viral proteins in large scale. This strategy can be used in vaccine formulations or in diagnosis testing. In this work, we developed a bacteria expression system to produce the recombinant L1 protein. The recombinant L1 protein was purified by ion exchange chromatography and highly purified fractions of L1 were obtained. We also obtained transgenic plants to produce the L1 protein. The genetic transformation of plants was confirmed by PCR and RT-PCR. Due to lack of specificity of commercial antibodies used in this study and a possible low expression of the *L1* gene in plants, it was not possible to confirm the accumulation of the recombinant protein. The protein obtained in bacteria can be evaluated as vaccine as well as in the production of more specific antibodies and diagnosis tests. The knowledge obtained in this work can be adapted to the development of vaccines for other important socio-economic diseases.

SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT	ix
LISTA DE FIGURAS.....	xv
LISTA DE TABELAS.....	xvii
APRESENTAÇÃO DO TRABALHO	xix
1. INTRODUÇÃO GERAL	1
1.1. Papilomavírus bovino (BPV):	1
1.2. Papilomatose bovina:	4
1.3. Proteína L1:	8
2. OBJETIVOS	12
2.1. Geral:	12
2.2. Específicos:	12
3. CAPÍTULO I.....	13
“EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA L1 RECOMBINANTE EM <i>E. COLI</i> ”	13
3.1. INTRODUÇÃO DO CAPÍTULO	14
3.2. MATERIAL E MÉTODOS.....	15
3.2.1. Construção do vetor de expressão:.....	15
3.2.2. Expressão em bactérias e processamento de corpúsculos de inclusão:.....	16
3.2.3. SDS-PAGE e Western blot:.....	17
3.2.4. Purificação da proteína recombinante por cromatografia de troca iônica:.....	18
3.2.5. Análise de Espectrometria de Massa:	18
3.2.5.1. Análise em equipamento MALDI-TOF/TOF 5800 e Q-TofPREMIER:	18
3.2.5.2. Análise em equipamento Waters Synapt HDMS:.....	21
3.2.5.3. Equipamento nanoUPLC-MS:	22
3.3. RESULTADOS.....	23
3.3.1. Expressão da proteína L1 recombinante:.....	23
3.3.2. Purificação da proteína recombinante por cromatografia de troca iônica:.....	25
4. CAPÍTULO II.....	31
“PRODUÇÃO DE PLANTAS TRANSGÊNICAS E ANÁLISE DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA L1”	31
4.1. INTRODUÇÃO DO CAPÍTULO	32
4.2. MATERIAL E MÉTODOS.....	33

4.2.1. Otimização do peptídeo sinal da α -coixina:.....	33
4.2.3. Construção dos vetores de expressão:.....	34
4.2.4. Transformação de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> :.....	38
4.2.5. Expressão transiente em alface:	38
4.2.6. Teste histoquímico para atividade de GUS:	39
4.2.7. Transformação de <i>Nicotiana tabacum</i> :.....	39
4.2.7.1. Obtenção de plântulas:	39
4.2.7.2. Infecção dos fragmentos foliares:	40
4.2.7.3. Obtenção das plantas transgênicas:.....	40
4.2.8. Extração de DNA genômico de folhas de tabaco:	41
4.2.9. RT-PCR de cDNA de sementes de tabaco transgênicos:	42
4.2.10. Extração de proteínas totais de sementes de tabaco e folhas de alface:.....	42
4.2.11. Microscopia eletrônica de extrato proteico de sementes de tabaco:	43
4.2.13. Espectrometria de massa:	44
4.3. RESULTADOS.....	45
4.3.1. Otimização do peptídeo sinal e gene L1 para a utilização de códons de <i>Nicotiana tabacum</i> : .	45
5.3.2. Predição de clivagem do peptídeo sinal:.....	49
4.3.5. Obtenção de plantas transgênicas de tabaco:	54
4.3.6. Teste histoquímico para atividade de GUS em tabaco:	55
4.3.7. PCR de DNA genômico de tabaco:.....	56
4.3.8. Análise da expressão do gene L1 por RT-PCR:	57
4.3.9. Western blot extrato proteico de sementes de tabaco:	58
4.3.10. Microscopia eletrônica:.....	62
4.3.11. Espectrometria de massa:	62
5. DISCUSSÃO GERAL.....	65
6. CONCLUSÕES.....	69
7. PERSPECTIVAS FUTURAS	70
8. MATERIAL COMPLEMENTAR	71
Sequência 1: Gene <i>L1</i> nativo.	71
Sequência 2: Peptídeo sinal otimizado.	72
Sequência 3: Gene <i>L1</i> otimizado	72
Tabela de Primers: Primers utilizados	73
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Marcelo Menossi Teixeira, pela confiança depositada em mim durante todo o desenvolvimento do meu mestrado e doutorado. Por toda a sua dedicação durante a orientação e pelos ensinamentos exemplares.

Ao meu co-orientador Rodrigo Franco de Carvalho, pela oportunidade em trabalhar neste projeto e por todo o aprendizado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Tecnológico – CNPq - pelo apoio financeiro.

Aos doutores Marcelo Brocchi, Clarice Weis Arns, Rita de Cássia Stocco, Roberto Ruller, Márcio José da Silva, Enio Mori, Helaine Carrér, membros da banca examinadora.

Ao Dr. Willy Beçak, pelo apoio prestado durante o desenvolvimento do projeto.

À Dra. Cynthia Horn, da Fundação Oswaldo Cruz, por todo o apoio durante o meu mestrado e doutorado.

Aos integrantes e ex-integrantes do Laboratório de Genoma Funcional, do Departamento de Genética, Evolução e Bioagentes da UNICAMP, pelo apoio e por todos os momentos bons dentro e fora do laboratório.

Ao falecido Dr. Adilson Leite (IB-UNICAMP), que deu início a esta linha de pesquisa, por toda sua força, competência e dedicação que dava a seus trabalhos.

Aos integrantes do Laboratório Max Feffer de Genética de Plantas, Laboratório Nacional de Biociências, Laboratório de Transferência de Genes e equipe do Prof. Dr. Fábio Gozzo, pelo auxílio nos experimentos de espectrometria de massa.

A todos que participaram diretamente ou indiretamente durante a realização desta tese.

Aos amigos Tiago Farani, Kevin Padilla, Rafael Tavares, José Sérgio Soares, José Pedro Fonseca e Daniela Feltrim, pelos momentos divertidos que ocorreram durante estes anos.

Ao Salvador Lou Vega, Arthur Rupp e a família Munhoz Garcia, pela amizade incondicional.

Aos meus sogros e cunhado, pelo apoio e bons momentos.

À Dafne, minha esposa, por todo o carinho e conforto que me deu durante estes anos.

À minha mãe Luiza, meu pai João e meu irmão Thiago, por todo o apoio, amor e cuidado que me deram em toda minha vida. Por terem sido um exemplo de família e possibilitando que eu chegasse até aqui.

A Deus, por minha vida e pelas minhas realizações.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Organização do genoma de BPV-1.	2
Figura 2: Sinais clínicos de infecções por BPV.	6
Figura 3: Vetor pET L1 utilizado na expressão da proteína L1 em <i>E. coli</i>	16
Figura 4: <i>Western blot</i> de proteínas expressas em bactérias transformadas com vetor pET L1.	24
Figura 5: SDS-PAGE (coloração <i>comassie blue</i>) da cromatografia de troca iônica de corpúsculos de inclusão solubilizados.	26
Figura 6: Cromatograma obtido na purificação por IEX da proteína recombinante L1 expressa em bactérias.	27
Figura 7: <i>Western blot</i> de frações obtidas em cromatografia de troca iônica de IBs solubilizados.	28
Figura 8: Estratégia para construção dos vetores de expressão.	37
Figura 9: Análise da sequência codificadora do peptídeo sinal da α -coixina nativa e otimizada de acordo com a utilização de códons de tabaco.	47
Figura 10: Análise da sequência codificadora do gene <i>L1</i> nativo e otimizado de acordo com a utilização de códons de tabaco.	48
Figura 11: Análise do peptídeo sinal da α -coixina fusionada à sequência da proteína L1 e possível sítio de clivagem em eucariotos.	50
Figura 12: Teste histoquímico para avaliar a produção da enzima β -glucuronidase em folhas de alface.	52
Figura 13: <i>Western blot</i> de extrato proteico de folhas de alface utilizadas para a expressão transiente da proteína L1.	54
Figura 14: Teste histoquímico para avaliar a produção da enzima β -glucuronidase em folhas de tabaco.	56
Figura 15: PCR de DNA genômico de plantas transgênicas utilizando primers específicos para o gene <i>L1</i>	57
Figura 16: RT-PCR de plantas de tabaco transgênicas.	58
Figura 17: <i>Western blot</i> de extrato proteico de sementes de tabacos transgênicos.	59
Figura 18: <i>Western blot</i> de extrato proteico de sementes de tabacos transgênicos.	60
Figura 19: <i>Western blot</i> de extrato proteico de sementes de tabacos transgênicos.	61
Figura 20: Microscopia eletrônica de extrato proteico de sementes de tabaco.	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Gradiente de solventes utilizados para a análise de espectrometria de massa:	21
Tabela 2: Identificação da proteína L1 recombinante por espectrometria de massa.....	29
Tabela 3: Características dos vetores utilizados na expressão da proteína L1 em plantas:.....	37
Tabela 4: Número de plantas resistentes à fosfinotricina ou canamicina obtidas através da transformação genética de tabaco com diferentes vetores de expressão.....	55
Tabela 5: Identificação da proteína L1 recombinante em plantas por espectrometria de massa.....	64

APRESENTAÇÃO DO TRABALHO

Esta tese de doutoramento está dividida nas seguintes seções:

Introdução Geral: Nesta parte do texto apresentamos uma introdução dos Capítulos 2 e 3. Nesta introdução falamos sobre a papilomatose bovina, características gerais do Papilomavírus Bovino e a produção da proteína recombinante L1.

Objetivos: Apresentação dos objetivos do trabalho.

Capítulo 1: Neste capítulo descrevemos a produção e purificação da proteína L1 de BPV-1 de forma recombinante em *E. coli*.

Capítulo 2: Neste capítulo descrevemos a produção de plantas transgênicas visando a expressão da proteína L1 recombinante.

Discussão: É apresentada uma discussão final sobre os resultados obtidos nos Capítulos 1 e 2.

Conclusões e Perspectivas Futuras: Conclusões sobre os resultados obtidos nos Capítulos 1 e 2 e as Perspectivas Futuras e aplicações da proteína recombinante.

Material Complementar: Nesta sessão temos as principais sequências de DNA utilizadas neste trabalho.

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1. Papilomavírus bovino (BPV):

Os papilomavírus constituem-se em um grupo diverso de vírus, que são encontrados em uma ampla variedade de vertebrados. Estes vírus pertencem à família *Papillomaviridae* e atualmente são classificados em 37 gêneros, sendo descritos aproximadamente 240 tipos (Van Doorslaer et al., 2013).

O papilomavírus é considerado como um vírus relativamente pequeno e não envelopado, com apenas 55-60 nm de diâmetro e seu genoma é constituído por uma molécula de DNA circular de fita dupla, de tamanho variando entre aproximadamente 7000 a 8000 pb associada a histonas e protegida por 72 unidades proteicas (capsômeros) que reunidos formam um capsídeo icosaédrico (Campo, 2002).

BPV agrega um grupo de vírus heterogêneo que tem como organismo hospedeiro primário o gado (bovinos e bubalinos). Atualmente, são descritos treze tipos de BPVs, classificados em três gêneros: O gênero *Deltapapillomavirus* (BPV-1, -2 e -13) que infecta o epitélio cutâneo induzindo os fibropapilomas da derme e dos queratinócitos (infecção de fibroblastos), o *Xipapillomavirus* (BPV-3, -4, -6, -9, -10, -11 e -12) relacionado ao surgimento de papilomas “puros” (infecção exclusiva de queratinócitos), o *Epsilonpapillomavirus* (BPV-5 e -8), cujo genoma possui similaridades ao dos outros dois grupos anteriores e pode gerar tanto papilomas “puros” como fibropapilomas, além do BPV-7, que não é classificado em um determinado gênero (Bernard et al., 2010; Hatama et al., 2011; Lunardi et al., 2013; Zhu et al., 2012a).

Assim como ocorre com outros PVs, o genoma do papilomavírus bovino pode ser dividido em três partes: uma região longa de controle – LCR (“*Long control region*”) que possui as sequências regulatórias de transcrição e a origem de replicação de DNA; a região de transcrição precoce, onde estão presentes os genes E (de “*Early*”), que expressam proteínas não estruturais

de acordo com o ciclo viral na célula do hospedeiro e logo após a infecção viral e, por fim, a região que possui os genes de expressão tardia L (de “Late”), responsáveis pela expressão de duas proteínas estruturais, a L1 e a L2 (Munger and Howley, 2002) (Fig.18).

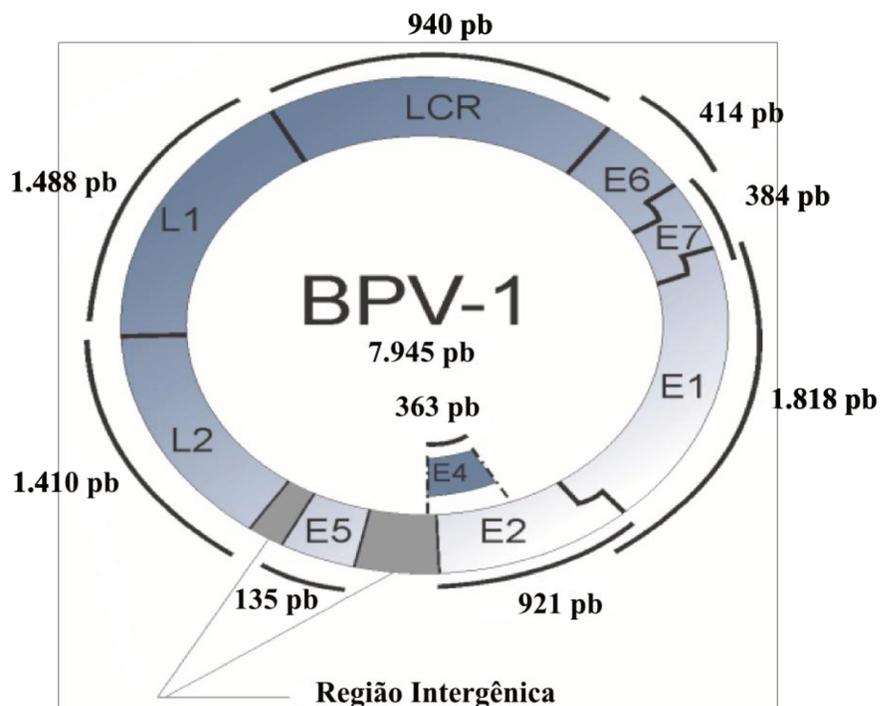


Figura 1: Organização do genoma de BPV-1. Posição dos genes virais precoces (E) e tardios (L), da região longa de controle (LCR) e a região intergênica. Adaptado de Freitas, e colaboradores (Freitas et al., 2011).

As proteínas regulatórias E são classificadas como E1, E2, E4, E5, E6 e E7. Destas, as proteínas E1 e E2 participam da regulação da replicação viral e também da expressão coordenada de outras proteínas regulatórias. A função da E4 está relacionada ao processo de maturação das partículas virais, levando à uma alteração da matriz intracelular (citoesqueleto) através da sua interação com a rede de queratina, o que permite a liberação das partículas virais. As proteínas E5, E6 e E7 são consideradas oncogênicas, pois são capazes de transformar a célula, além de estimular a sua divisão de forma anômala (Bedell et al., 1991; Buck et al., 2005; Conger et al., 1999).

O capsídeo viral é formado por duas proteínas estruturais expressas pelos genes tardios L e se constitui por 360 cópias de proteínas L1 (formando 72 capsômeros pentaméricos) e 72 cópias da proteína L2. Arranjos da proteína L1 estão expostos na superfície viral, indicando que ela é imunogênica, sendo responsável pela mediação da ligação do vírus na superfície celular. A proteína L2 está associada com a alocação interna do genoma viral no capsídeo, induzindo a organização física do virion pela sua ligação ao DNA viral (Buck et al., 2008).

O BPV é comumente encontrado em diversos rebanhos e os casos de infecções por estes vírus são relatados em diversos países. No rebanho alemão, por exemplo, foram encontrados em verrugas bovinas os BPVs dos tipos 1, 6, 8 e 10 (Schmitt et al., 2010). Já na Índia foi descrita a presença dos tipos 1 e 2 em verrugas cutâneas e do tipo 10 em verrugas nos tetos (Pangty et al., 2010). No Japão já foram detectados por PCR os BPVs do tipo 1 ao 11 em papilomas nos tetos e os tipos 1, 3, 5, 6 e 12 em papilomas cutâneos de outras regiões do corpo (Maeda et al., 2007; Ogawa et al., 2004a, b; Zhu et al., 2012b). No gado brasileiro também foram identificadas infecções causadas por diversos tipos de BPVs: no sudeste do país foram identificados BPVs dos tipos 1, 2 e 6 em verrugas de pele; já no nordeste pode ser identificada a presença de 10 tipos de BPV, enquanto no Sul recentemente foi descrito um novo tipo de papilomavírus, o BPV-13 (Carvalho et al., 2012; Lunardi et al., 2013; Silva et al., 2010).

O papilomavírus bovino é considerado um vírus epiteliotrópico (infecta tecido epitelial), porém o DNA de BPV já foi detectado em outros tipos celulares, como em células mononucleares do sangue periférico, no leite, urina, sêmen e fluido seminal de animais infectados com BPV-1, -2 e 4 (Carvalho et al., 2003; Roperto et al., 2008; Yagui et al., 2006; Yagui et al., 2008).

1.2. Papilomatose bovina:

A papilomatose bovina é uma doença infecto contagiosa, causada pela infecção por BPV e ocorre em rebanhos distribuídos por todo o território do planeta. Na pecuária, diferentes tipos de BPVs estão relacionados a doenças de alto impacto econômico negativo, sendo responsáveis por várias formas de lesões proliferativas benignas em tecidos cutâneos e em mucosas, conhecidas como papilomas e que podem regredir naturalmente ou progredir para lesões malignas quando combinados com fatores ambientais ou imunossupressão do gado (Jackson et al., 1993). Alguns tipos de BPVs podem levar ao desenvolvimento do carcinoma de bexiga urinária e do tumor do trato digestor superior (hematúria enzoótica e “caraguatá”).

Comumente, as infecções causadas pelo BPV estão associadas com o surgimento de lesões cutâneas no pescoço, úbere, tetas, nuca e palato (Campo et al., 1994). Estas lesões são geralmente benignas, podendo regredir naturalmente, sendo que a evolução para tumores malignos é observada em animais expostos a co-fatores ambientais carcinogênicos e/ou imunossupressores, como a quercetina (Campo, 2002), substância encontrada na samambaia *Pteridium aquilinum*, nativa de pastagens de solos ácidos, consumida pelos bovinos em época de seca (Jackson et al., 1993).

Os tipos de lesões e sintomas no gado são associados ao tipo viral responsável pela infecção. Estudos sugerem que alguns tipos de BPV podem infectar tecidos específicos, causando lesões características. Porém são descritos casos em que ocorre a co-infecção por mais de um tipo de BPV na mesma lesão ou tecido, sendo que determinados tipos virais podem estar presentes em locais que não os considerados como o sendo os seus preferenciais (Carvalho et al., 2012).

Caracteristicamente, o BPV-1 está relacionado aos fibropapilomas nos tetos e pênis, bem como aos fibropapilomas cutâneos em várias partes do corpo. Já o BPV-2 causa as verrugas cutâneas, os fibropapilomas no esôfago e rumem e também a tumores do trato urinário quando ocorre o consumo da samambaia *Pteridium aquilinum*. O BPV-3 está relacionado aos papilomas

cutâneos em superfícies expostas como o couro, enquanto o BPV-4 está associado ao papiloma epitelial “puro” do trato gastrointestinal superior. O BPV-5 causa lesões em forma de “grãos de arroz” nos tetos e o BPV-6 origina, principalmente, papilomas nos úberes. O BPV-7 pode ser isolado a partir de papilomas cutâneos, enquanto que o BPV-8 causa a papilomatose cutânea e os BPV-9 e -10 causam papilomas epiteliais escamosos no úbere (Borzacchiello and Roperto, 2008; Campo et al., 1992; Campo et al., 1994; Lancaster, 1979; Ogawa et al., 2007). Já o BPV-11 foi detectado em lesões ao redor dos olhos, porém não pode ser responsabilizado por estas devido à co-infecção com BPV-2. O BPV-12 pode ser identificado em papilomas epiteliais localizados na língua do gado e o BPV-13 foi identificado em papilomas cutâneos presentes no ouvido de bovinos (Carvalho et al., 2012; Lunardi et al., 2013; Zhu et al., 2012a).

A representação dos diversos sinais clínicos devido a infecção por BPV pode ser encontrada na Figura 19:

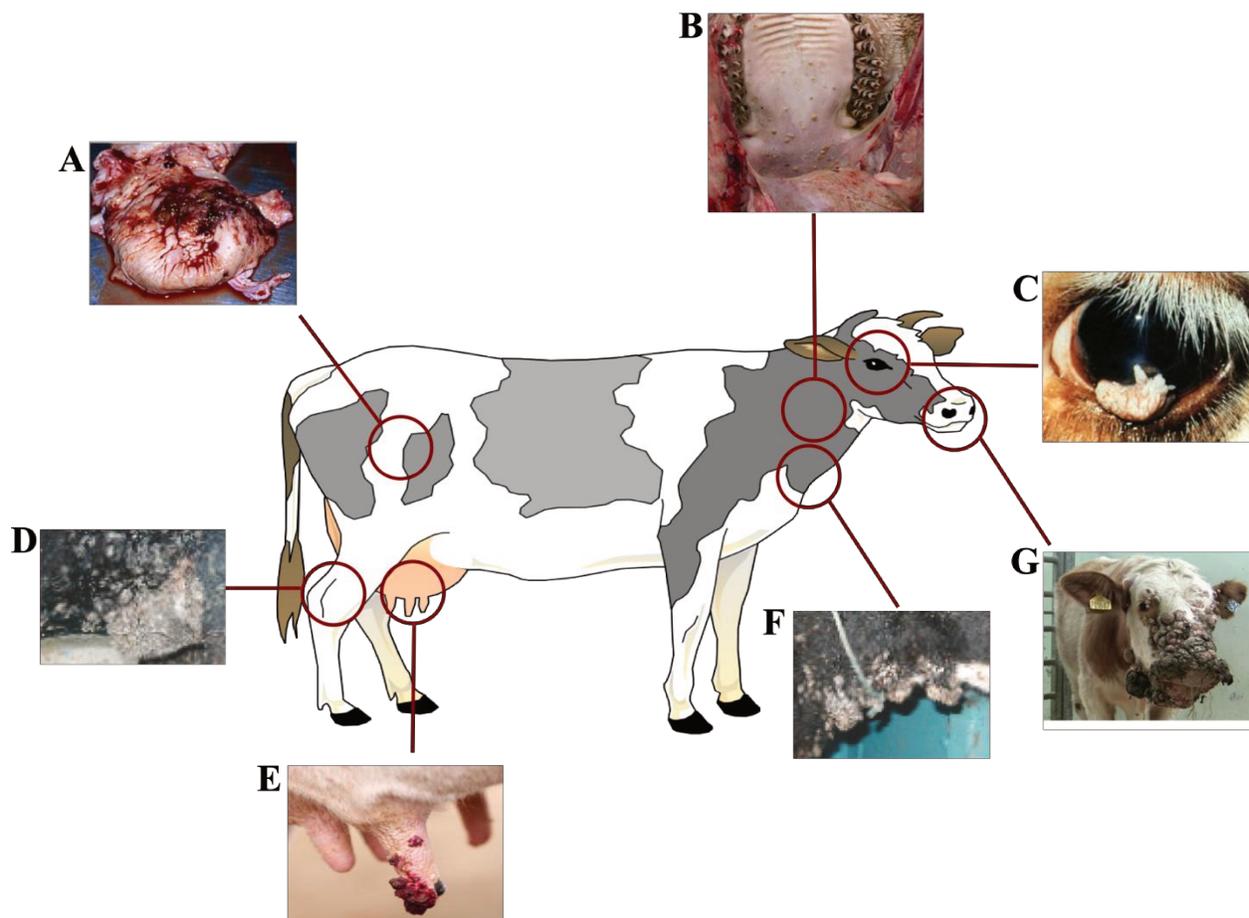


Figura 2: Sinais clínicos de infecções por BPV. Adaptado de Freitas e colaboradores (de Freitas et al., 1994). A) Carcinoma de bexiga urinária (Corteggio et al., 2013). B) Papilomas no palato mole (<http://coral.ufsm.br>). C) Papiloma na região ocular (<http://www.dpi.nsw.gov.au>). D) Verrugas na região do jarrete (Freitas et al., 2011). E) Papilomas nos tetos (Luciano Coca - www.estadao.com.br). F) Verrugas na região da barbela (Freitas et al., 2011). G) Verrugas na região da boca e focinho (<http://www.nadis.org.uk>).

Apesar dos papilomavírus bovinos serem considerados estritamente espécie específicos, os tipos BPV-1 e BPV-2 podem romper a barreira interespecífica e infectar equinos, causando lesões neoplásicas cutâneas agressivas, chamadas sarcóides. Essas lesões cutâneas múltiplas são resistentes a intervenções terapêuticas e geralmente reaparecem após a remoção cirúrgica. Dependendo de sua severidade e local de infecção, podem limitar a mobilidade do animal e acarretar grandes prejuízos financeiros a criadores (Chambers et al., 2003).

No gado, casos de alto nível de infecção e mesmo a persistência da infecção nos rebanhos têm gerado consideráveis prejuízos financeiros, já que os animais infectados apresentam atraso no desenvolvimento, perda de peso e redução na produção de leite e couro. Em todas as situações, as lesões causadas pelos papilomavírus representa um nicho em potencial para a proliferação de microorganismos e miíases, predispondo esses animais às infecções secundárias causadas por esses agentes (Embrapa Gado de Leite, 2010 - <http://www.cnpagl.embrapa.br/>).

A disseminação viral pode ocorrer tanto por contato físico direto, inclusive sexual, como através de equipamentos e instalações contaminadas (Campo, 2003). Há indícios de que a transmissão do BPV possa ocorrer verticalmente (Stocco dos Santos et al., 1998), já sendo detectada a presença de DNA viral em tecidos reprodutivos (Yagui et al., 2006), incluindo em sêmen congelado (Silva et al., 2011), o que indica que a transmissão do vírus pode ocorrer a partir de animais assintomáticos.

Ainda não existe uma vacina que proteja o gado do papilomavírus bovino e o combate à doença ocorre através de tratamento das verrugas com produtos químicos (ex: clorobutanol, diaceturato), por autovacina ou autohemoterapia, porém com resultados pouco eficientes (Sturion et al., 1997). Silva e colaboradores (Silva et al., 2004) analisaram a repetição dos quatro tratamentos para a papilomatose bovina citados anteriormente e estimaram uma baixa recuperação, de 15% a 50% dos bovinos infectados, a um custo que varia de R\$92,25 a R\$546,66 por cabeça de gado. O alto custo inviabilizaria o tratamento de animais que não se recuperaram, levando em consideração o valor comercial de um bezerro, de R\$500,00.

1.3. Proteína L1:

A proteína estrutural L1 possui aproximadamente 55 kDa, sendo a proteína majoritária no capsídeo de papilomavírus, representando em torno de 80% da estrutura proteica do vírus (Buck et al., 2013; Pfister, 1984).

Além de sua função estrutural, a L1 está associada à interação inicial do capsídeo viral com carboidratos de heparan sulfato de proteoglicanos da célula hospedeira (HSPG). Esta interação resulta em uma mudança conformacional que permite a exposição da região amino terminal da proteína L2 e conseqüentemente sua clivagem pela enzima furina, desencadeando o processo infeccioso (Johnson et al., 2009; Richards et al., 2006).

Estudos sorológicos de mapeamento de epítopos indicaram a existência de três regiões de aminoácidos conservados em L1 e BPV-1 e BPV-2 (aminoácidos 111-125, 131-145 e 191-205). Estas regiões foram reconhecidas por anticorpos produzidos através do capsídeo de BPV-1, indicando uma reação cruzada destes anticorpos (Cason et al., 1993), sugerindo a possibilidade do desenvolvimento de vacinas de amplo espectro utilizando-se regiões de peptídeos altamente conservados entre diferentes tipos de BPV.

As proteínas L1 de BPV, individualmente (sem a L2), podem formar partículas virais vazias conhecidas como VLPs (“*virus like particles*”) quando expressas em sistemas de produção de proteínas recombinantes eucarióticos (Kirnbauer et al., 1993; Zhou et al., 1991). Kirnbauer e colaboradores (Kirnbauer et al., 1992) demonstraram que a proteína L1 recombinante, produzida em cultura de células de inseto Sf9, pode formar estruturas que se assemelham aos vírions de BPV-1. Essas VLPs apresentaram uma capacidade de induzir uma alta titulação de soro neutralizante em coelhos. Esse dado não só indica que a proteína L1 é uma forte candidata para a elaboração de testes sorológicos, para medir anticorpos de epítopos conformacionais do vírus, como também para a produção de uma vacina de prevenção à papilomatose bovina.

A capacidade de L1 em formar VLPs que promovem uma alta produção de anticorpos em indivíduos vacinados, fez com que ela seja umas das proteínas mais estudadas para a produção de vacinas contra PVs. Atualmente é utilizada na produção das duas únicas vacinas comerciais contra HPV, a Gardasil (Merk) produzida em leveduras, e a Cervarix (GSK) produzida em células de insetos. Porém, devido ao fato de serem produzidas nestes sistemas de expressão, o custos das vacinas ainda são muito altos (Parkin and Bray, 2006; Roden and Wu, 2006).

Devido a alto custo de produção da proteína L1 e VLPs em células de inseto, de mamíferos e em leveduras, alternativas de sistemas de expressão mais baratos como plantas e bactéria são desejáveis para a obtenção desta proteína recombinante.

Apesar de não ser possível produzir VLPs em bactérias, é possível obter capsômeros de L1 “*in vitro*” através de sua expressão em *E. coli* (Chen et al., 2001; Yuan et al., 2001). Pentâmeros de L1 de papilomavírus oral canino (COPV) produzidos em bactérias foram capazes de proteger cães contra a infecção por COPV. A imunização de cães com 400 ng de capsômeros de L1 promoveu proteção contra a infecção de maneira similar a imunização com 50 ng de VLPs (Yuan et al., 2001).

A proteína L1 expressa em *E.coli* também pode formar VLPs “*in vitro*”. Mesmo sendo expressa na fração insolúvel em corpúsculos de inclusão (IBs), a proteína L1 de HPV-16 após ser purificada e dialisada para a retirada do agente desnaturante (ureia 8 M), foi capaz de se renaturar e espontaneamente formar VLPs, que posteriormente foram reconhecidas por anticorpos específicos para a conformação da partícula viral (Zhang et al., 1998). A formação de VLPs a partir de sistema bacteriano também pode ser observada após a purificação da L1 proveniente do HPV-18 (Seo et al., 2009).

Uma alternativa é emprego de plantas transgênicas como reatores biológicos para produzir proteínas heterólogas, já que possuem uma série de vantagens como: baixo custo de

produção, baixos riscos de contaminação, capacidade de produção em larga escala e alta qualidade do produto final (Ma et al., 2003).

Células vegetais possuem um ambiente favorável à formação de VLPs, tornando-se um sistema de produção de vacinas baseadas em VLPs muito utilizado. Como, por exemplo, a produção de vacinas contra a hepatite B (Mason et al., 1992), o vírus Norwalk (Walmsley and Arntzen, 2000) e para HPV (Lenzi et al., 2008), todas através da expressão de proteínas estruturais dos capsídeos virais.

No caso da proteína L1 de HPV-16 (Lenzi et al., 2008), quando expressa no cloroplasto de folhas de tabaco não se encontrou uma estabilidade satisfatória, pois o teor de proteína decaiu nas folhas mais velhas e mais expostas ao sol. Isto ocorre devido à alta degradação proteica. Entretanto, apesar de ter ocorrido a degradação, foi possível a visualização de VLPs nas plantas de tabaco transgênicas.

A produção de VLPs de L1 em plantas tem sido muito utilizada no desenvolvimento de novas vacinas. Outros casos que podem ser citados são: como a produção de VLPs a partir da expressão transiente de L1 de papilomavírus humano tipo 8 e da L1 de papilomavírus bovino tipo 1 em folhas de *Nicotiana benthamiana* (Love et al., 2012; Matic et al., 2012).

Devido a severidade da papilomatose bovina e a necessidade em tanto se obter produtos vacinais contra o BPV-1 de uma forma menos custosa, bem como insumos como anticorpos específicos e testes de diagnósticos, o desenvolvimento de técnicas de produção de forma recombinante de proteínas virais torna-se extremamente desejável. Portando o presente trabalho demonstra a produção de L1 de BPV-1 em bactérias e a obtenção de plantas transgênicas contendo o gene codificante desta proteína. Desta maneira, pretendemos contribuir para o desenvolvimento científico e no desenvolvimento vacinas. É importante destacar que todo o conhecimento produzido poderá ser aplicado a outras proteínas de interesse no campo da saúde no Brasil, e que todas as metodologias aqui desenvolvidas poderão ser transpostas para o estudo

de abordagens relativas à prevenção e combate das infecções causadas pelo papilomavírus humano (HPV).

2. OBJETIVOS

2.1. Geral:

Desenvolver plataformas experimentais para a obtenção de antígenos recombinantes do BPV, visando a produção de vacinas e outros insumos biotecnológicos.

2.2. Específicos:

1. Produzir a proteína L1 de BPV1-1 em *E. coli*;
2. Produzir plantas transgênicas de tabaco contendo o gene *L1*, sob o controle de um promotor semente específico;
3. Avaliar a expressão da proteína recombinante L1 de BPV-1 em plantas.

3. CAPÍTULO I

“EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA L1 RECOMBINANTE EM *E.* *COLI*”

3.1. INTRODUÇÃO DO CAPÍTULO

A bactéria *Escherichia coli* é um dos sistemas de expressão de proteínas heterólogas mais utilizados, sendo o hospedeiro preferido para a obtenção de muitas proteínas recombinantes. Isto ocorre devido à facilidade de cultivo desta bactéria, à simplicidade de manipulação genética, ao seu ciclo de vida rápido, à alta taxa de crescimento, à tecnologia de produção já bem estabelecida e ao custo de produção considerado baixo (Gopal and Kumar, 2013).

Algumas proteínas L1 de HPV foram expressas em bactéria. Geralmente a proteína L1 quando superexpressa em *E. coli*, forma corpúsculos de inclusão (IBs) tornando-se necessário adicionar algumas etapas para sua solubilização, purificação e renaturação.

Os papilomavírus não podem ser cultivados “*in vitro*”, por isso a obtenção de antígenos virais em sistemas de produção recombinante é extremamente útil na pesquisa e desenvolvimento de produtos vacinais e testes sorológicos.

Devido à importância em se obter a proteína L1 de BPV-1 recombinante, o objetivo deste capítulo foi desenvolver uma plataforma de expressão e purificação da proteína L1 de BPV-1 em *E. coli*.

3.2. MATERIAL E MÉTODOS

As técnicas rotineiras de biologia molecular utilizadas neste projeto encontram-se descritas nos manuais de laboratório de Sambrook e colaboradores (Sambrook J., 1989).

3.2.1. Construção do vetor de expressão:

Para a expressão da proteína L1 em bactéria, a região codificante do gene nativo foi amplificada por PCR (Material Complementar, Seq. 1) a partir de cópias genômicas de BPV-1 clonadas em vetor bacteriano pAT153 (Acervo do Laboratório de Oncogênese Viral - Instituto Butantan), utilizando-se os primers P-ATGHisBPV e P-StopBPV específicos para o gene *L1* (Material Complementar – Tabela de Primers). Para facilitar o processo de purificação proteica, adicionamos uma sequência 5', que codifica seis histidinas (cauda 6xHis) no primer P-ATGHisBPV. O produto de PCR foi em seguida digerido com as enzimas de restrição NcoI e BamHI e após a digestão este fragmento foi inserido nos mesmos sítios de restrição entre o promotor T7 e terminador T7 do vetor de expressão pET28a, que adicionalmente contém gene de resistência à canamicina para a seleção de bactérias transformadas. O Vetor denominado pET L1 (Fig. 20) foi clonado em bactéria *dH5 α* e subsequentemente inserido em bactérias BL21 para a expressão proteica. Após a obtenção do vetor de expressão, foi feita a confirmação de sua integridade por restrição enzimática e o sequenciamento de DNA utilizando os primers P-T7Pro e P-17Ter complementares ao promotor e terminador T7, respectivamente (Material Complementar – Tabela de Primers).

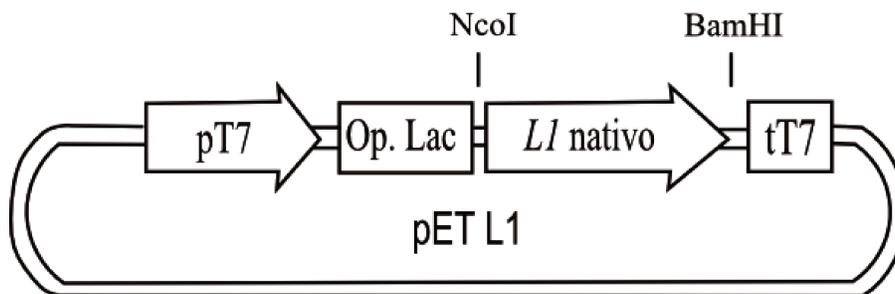


Figura 3: Vetor pET L1 utilizado na expressão da proteína L1 em *E. coli*. Nesta figura demonstramos o promotor T7 (pT7), o operon Lac (Op. Lac), o gene *LI* nativo e o terminador T7 (tT7).

3.2.2. Expressão em bactérias e processamento de corpúsculos de inclusão:

Uma colônia de bactéria BL21 transformada com o vetor de expressão pET L1 foi utilizada como pré inóculo em 15 mL de meio LB contendo 100 mM de canamicina e incubada em shaker a 250 rpm a 37°C por 16 horas. Após este pré inóculo, foi medida a OD₆₀₀ e realizada uma diluição em 1L de meio LB (contendo 100 mM de canamicina) para uma OD₆₀₀ final de 0,1. A solução foi incubada em shaker a 250 rpm a 37°C por aproximadamente 4 horas até o inóculo atingir uma OD₆₀₀ entre 0,6 e 1,0. Após o crescimento desejado, foi adicionado ao inóculo 1 mM de IPTG para induzir a expressão da proteína L1. Após 4 horas de indução, o inóculo foi centrifugado a 15.000 rpm por 5 min e a fração do precipitado foi recuperada.

As bactérias foram ressuspensas em tampão PBS (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM e KH₂PO₄ 2 mM) contendo 1 mg/mL de lisozima. A solução foi incubada por 30 min no gelo e então as células foram sonicadas 5 vezes por 10 segundos em um sonicador (Cole-Parmer, EUA). Em seguida, as células foram centrifugadas a 15.000 rpm por 15 min, a 4°C.

O sobrenadante contendo proteínas solúveis e o pellet contendo os corpúsculos de inclusão foram analisados por eletroforese em gel redutor de poliacrilamida (SDS-PAGE) e *western blot*. Após a confirmação da presença da proteína recombinante nos corpúsculos de inclusão, a fração insolúvel foi utilizada para os passos seguintes.

O pellet de 1L de cultura celular foi ressuspensionado em 10 mL de tampão de lavagem (Tris-HCl 50 mM, EDTA 6 mM, PMSF 0,1 mM, pH 8,0). Em seguida a solução foi centrifugada a 12.000 rpm, por 15 min a 4°C e o material insolúvel foi lavado duas vezes com tampão A (Tris-HCl 100 mM, NaCl 100 mM, Triton X-100 1%, pH 8,0), seguido por lavagem com o mesmo tampão contendo 2 M de ureia, e finalmente lavado com Tris 50 mM pH 8,0. Entre cada lavagem, a fração insolúvel foi separada por centrifugação a 12.000 rpm por 15 min, a 4°C.

Na fração insolúvel final, foi adicionada a proporção de 10:1 (v/v) de tampão de solubilização (Tris-HCl 50 mM, DTT 50 mM, ureia 8 M, PMSF 0,1 mM, pH 8,0) em seguida, a mistura foi incubada à temperatura ambiente por 2 horas sob agitação leve. O material insolúvel foi então removido por centrifugação a 12.000 rpm por 15 min, a 4°C.

3.2.3. SDS-PAGE e Western blot:

Amostras de 40 µg de proteínas foram misturadas com 10 µL de tampão de amostra (Tris-HCl 125 mM, SDS 4%, β-mercaptoetanol 10%, glicerol 20%, azul-de-bromofenol 0,04%, pH 6,8) e então separadas eletroforéticamente em gel SDS-PAGE 12%. Para a visualização das bandas proteicas, o gel foi corado com PhastGel Blue R (GE Healthcare, Suécia). Para experimentos de *western blot*, as proteínas foram transferidas do gel para membrana de nitrocelulose de 0,45 µm de poro a 10 V por 30 min em um aparelho Trans-Blot SD (BIO-RAD, EUA). A membrana de nitrocelulose foi corada com o corante reversível MemCode (Pierce, EUA), para verificação da eficiência da transferência e a visualização das bandas proteicas. A membrana foi então colocada em tampão TBS (Tris-HCl 20 mM, NaCl 50 mM, pH 7,5) contendo 10% de leite em pó Molico (Nestlé, Brasil) e deixada por uma noite a 4°C. A membrana de nitrocelulose foi colocada para reagir com o anticorpo antiHPV [BPV-1/1H8] (AbCam, EUA) por 2 h. Após a incubação com o anticorpo primário a membrana foi lavada 3 vezes por 5 min com tampão TBS-T (TBS, Tween 20 0,05%), seguida de 3 lavagens com TBS sozinho por 5 min

cada. Após este passo, foi feita a incubação da membrana com anticorpo secundário IgG HRP (diluição 1:20.000) por 1 h e em seguida repetiu-se a lavagem da membrana, como anteriormente. A revelação foi realizada em solução com o substrato Super Signal West Pico (Pierce, EUA).

3.2.4. Purificação da proteína recombinante por cromatografia de troca iônica:

A proteína recombinante L1, desnaturada e solubilizada, foi purificada usando a cromatografia de troca iônica (IEX). O pH do sobrenadante contendo a proteína L1 desnaturada, obtido após da solubilização dos corpúsculos de inclusão, foi ajustado para pH 7,0 com HCl 1 M. A mistura proteica foi carregada em uma coluna HiTrap SP de 1 mL (GE Healthcare, Suécia), previamente equilibrada com tampão D (Tris-HCl 50 mM, DTT 50 mM, ureia 8 M, pH 7,0). Um volume de coluna de solução proteica foi passado pela coluna em uma taxa de fluxo de 0,1 mL/min. A lavagem da coluna foi feita com a passagem de cinco volumes (volumes de coluna) de tampão D contendo NaCl 0,1 M. Após as lavagens, as proteínas ligadas foram eluídas em tampão D contendo NaCl 0,5 M. As taxas de fluxo para a lavagem e a eluição foram de 0,5 mL/min e frações de 1 mL foram coletadas. Todas as etapas da purificação foram realizadas em um aparelho AKTA (GE Healthcare, Suécia), sendo que a fração na qual a proteína L1 apresentava-se com maior pureza foi analisada por espectrometria de massa.

3.2.5. Análise de Espectrometria de Massa:

3.2.5.1. Análise em equipamento MALDI-TOF/TOF 5800 e Q-ToF PREMIER:

Após a separação proteica por SDS-PAGE, a banda do gel de aproximadamente 56 kDa referente a proteína L1 recombinante foi cortada e picotada com a ajuda de uma lâmina de bisturi. Fragmentos de aproximadamente 1 mm³ de gel foram transferidos para tubos de 1,5 mL e lavados por 3 vezes, por 5 min, em 200 µL de solução de descoloração (acetonitrila 50%, NH₄HCO₃ 25 mM). A solução de descoloração foi removida e o gel desidratado com a adição de 200 µL de acetonitrila (ACN) absoluta, por 10 min. A ACN foi retirada com a ajuda de uma

pipeta e o excesso foi eliminado por evaporação à temperatura ambiente. Os fragmentos de gel foram reidratados com a adição de aproximadamente 50 μL de solução de redução (DTT 20 mM, NH_4HCO_3 50 mM) e mantidos por 40 min, a 56°C. Após uma breve centrifugação, a solução de redução foi removida e os fragmentos foram desidratados, como descrito anteriormente. Para a alquilação proteica foi adicionado ao gel desidratado 50 μL de solução de alquilação (iodoacetamida 55 mM, NH_4HCO_3 50 mM) e a mistura foi incubada no escuro, à temperatura ambiente, por 30 min. Após uma breve centrifugação, a solução de alquilação foi retirada com uma pipeta e o gel foi lavado 2 vezes com 200 μL solução de NH_4HCO_3 25 mM, com o auxílio de um vortex, seguido de desidratação com ACN absoluta por duas vezes. A acetronitrila foi removida com uma pipeta e o excesso foi evaporado à temperatura ambiente, por 15 min.

Para a digestão proteica, foram adicionados 20 μL de solução de tripsina (tripsina 10 ng/ μL , NH_4HCO_3 50 mM) sobre os fragmentos de géis desidratados e em seguida as amostras foram incubadas por 15 min a 4°C, para a penetração da tripsina no gel. Após a retirada do excesso de tripsina das amostras, adicionaram-se 50 μL de solução de NH_4HCO_3 50 mM. As amostras foram incubadas por 14 horas a 37°C.

A reação da tripsina foi interrompida com a adição de 15 μL de solução bloqueadora (ácido fórmico 5%, ACN 50%) e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo. Para a eluição dos peptídeos digeridos, três etapas foram realizadas. Na primeira, foram adicionados 50 μL de solução de eluição I (ácido fórmico 1%, Metanol 60%) aos fragmentos de géis. Após incubação a 40°C, por 15 min, o sobrenadante foi recuperado e transferido para o mesmo tubo contendo o sobrenadante da digestão e a solução bloqueadora. Na segunda etapa, foram adicionados 50 μL de solução de eluição II (ácido fórmico 1%, ACN 50%) aos fragmentos de géis e após incubação a 40°C, por 15 min, o sobrenadante foi recuperado e transferido para o mesmo tubo da etapa anterior. Foram então adicionados 50 μL de ACN absoluta para desidratar

os fragmentos de géis e o sobrenadante foi recuperado e adicionado no mesmo tubo da etapa anterior. A solução final, contendo os peptídeos eluídos do gel, foi concentrada até chegar a aproximadamente 1 µL em um concentrador a vácuo, à temperatura ambiente. Em seguida os peptídeos em seguida foram desalinizados, utilizando-se Zip Tips C18 (Millipore, EUA) de acordo com as instruções do fabricante.

A análise por espectrometria de massa foi realizada no equipamento MALDI-TOF/TOF 5800 (AB SCIEX, EUA) sob orientação da Técnica Thaís Regiane Cataldi (Laboratório Max Feffer de Genética de Plantas/ESALQ – Piracicaba/SP). Aplicou-se na placa de MALDI, 1 µL amostra (dissolvida em ACN 50%, TFA 0,1%) e 1 µL de matrix α -ciano-4-hidroxicinâmico. O valor em Hertz, no modo MS, foi de 400 Hz e 1000 Hz, no modo MS/MS. A voltagem da fonte de ionização foi de 3400 kVolts no modo MS e 4700 kVOLT no modo MS/MS), sendo aplicado 1000 shots/spectro, no modo MS e 2500 shots/spectro, no modo MS/MS). A leitura foi realizada no modo automático, juntamente com calibração interna, utilizando-se o CAL Mix1 (AB SCIEX, EUA).

O programa utilizado para obtenção dos resultados da espectrometria foi o AB SCIEX Maldi Tof/Tof series explorer (versão 4.1.0) e o programa utilizado para fazer as análises dos conjuntos de dados foi o Protein Pilot Software (AB SCIEX, EUA), com o Mascot (Matrix Science, EUA).

Nas análises em equipamento Q-TofPREMIER, os peptídeos digeridos foram processados pela Dra. Adriana Franco Paes Lemes e Bela. Romênia Ramos Domingues (Laboratório Nacional de Biotecnologia/CNPq – Campinas/SP).

3.2.5.2. Análise em equipamento Waters Synapt HDMS:

Esta análise foi realizada pela equipe do Prof. Dr. Fábio Gozzo (Instituto de Química/UNICAMP – Campinas/SP) e o preparo das amostras ocorreu da seguinte maneira. Adicionaram-se 250 μL de Iodoacetamida 500 mM a 100 μL de amostra. A mistura permaneceu reagindo por 30 min, em temperatura ambiente, no escuro. Foram adicionados 450 μL de tampão carbonato de amônio 100 mM pH 8,0 e, em seguida, foi realizada a digestão com tripsina na proporção de 1:50 (tripsina:proteína) por 16 h, a 37°C.

Os peptídeos provenientes da digestão foram analisados no instrumento Waters Synapt HDMS, acoplado a Waters Nanoacquity (Waters, EUA). Durante a análise, foram utilizados dois solventes: Água (solvente A) e ACN (Solvente B), como o indicado na Tabela 3:

Tabela 1: Gradiente de solventes utilizados para a análise de espectrometria de massa:

Tempo (min)	Fluxo ($\mu\text{L}/\text{min}$)	% A	% B
Inicial	1	97	3
40	1	70	30
50	1	20	80
55	1	20	80
56	1	97	3

Os dados brutos foram processados utilizando-se o software Mascot Distiller (Matrix Science, EUA). Os dados finais foram buscados no banco NCBI^{nr} utilizando o Mascot .

3.2.5.3. Equipamento nanoUPLC-MS:

Esta técnica é uma das ferramentas mais sensíveis para espectrometria de massa utilizada atualmente para a identificação e quantificação de proteínas recombinantes contidas em uma mistura complexa de proteínas. Para análise em equipamento nanoUPLC-MS, as amostras foram enviadas para o Laboratório de Transferência de Genes (Centro Nacional de Recursos Genéticos e Biotecnologia, CENARGEN/EMBRAPA – Brasília/DF) e processadas pelo Dr. Elibio Rech e o Dr. André Murad. Detalhes sobre a extensa metodologia utilizada para análise das amostras podem ser encontrados na página de internet da revista Nature, na seção Protocol Exchange (<http://www.nature.com/protocolexchange/protocols/2046>).

3.3. RESULTADOS

3.3.1. Expressão da proteína L1 recombinante:

A obtenção da proteína L1 recombinante em *E. coli* foi realizada através da indução com IPTG de bactérias BL21 transformadas com o vetor de expressão pET L1. Após a indução, as bactérias foram lisadas e as amostras proteicas solúveis e insolúveis foram analisadas por SDS-PAGE corado com *comassie blue* (dados não mostrados) e por *western blot*, utilizando-se o anticorpo comercial antiHPV [BPV-1/1H8].

A proteína recombinante de aproximadamente 56 kDa foi detectada via *western blot* em amostras proteicas de bactérias induzidas com IPTG, enquanto que nas amostras em que a indução da expressão não foi realizada não ocorreu a produção da proteína L1 recombinante. Verificamos também que a proteína formou corpúsculos de inclusão, pois foi identificada apenas na fração proteica insolúvel (Fig. 21).

Foi verificado também que algumas proteínas de menor peso molecular estavam presentes na fração insolúvel e se ligaram ao anticorpo (Fig. 21). Como essas moléculas não foram encontradas na fração não induzida, concluímos que ela foi produzida durante a expressão de L1. Esses fragmentos podem aparecer devido a uma possível degradação proteica normalmente encontrada na superexpressão da proteína L1 em diversos sistemas de expressão heterólogos. Este padrão de bandas pode ser encontrado na expressão da L1 de BPV-1 em células de insetos e em plantas (Love et al., 2012; Shafti-Keramat et al., 2009) ou na expressão de L1 de HPV em *E.coli* (Zhang et al., 1998).

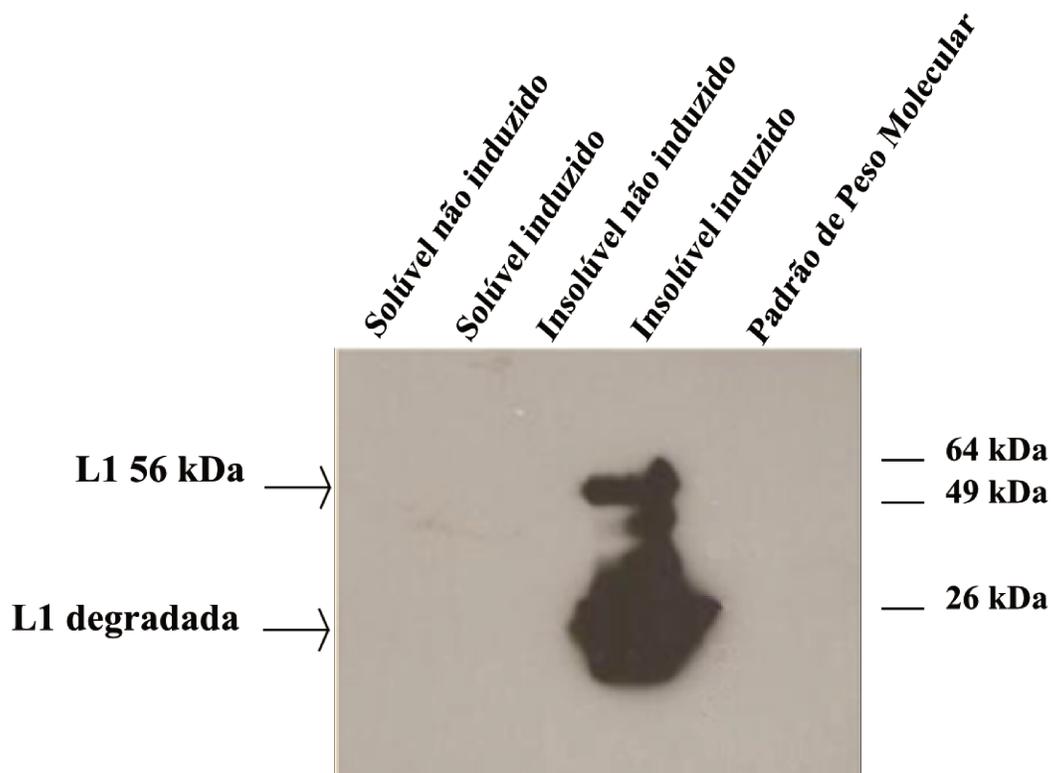


Figura 4: *Western blot* de proteínas expressas em bactérias transformadas com vetor pET L1. As amostras analisadas são frações proteicas solúveis e insolúveis obtidas de bactérias cuja expressão da proteína L1 foi induzida por IPTG ou não. A banda de 56 kDa corresponde a proteína L1 recombinante, já as bandas menores correspondem a uma possível degradação proteica. Padrão de Peso Molecular BenchMark™ Pre-Stained Protein Ladder (Life, EUA).

Após a identificação da localização da proteína recombinante, a fração insolúvel contendo os corpúsculos de inclusão (IBs) passou por diversas etapas de lavagens para se obter um produto mais limpo. Tanto a proteína L1 como as proteínas de menores pesos moleculares detectadas pela técnica de *western blot* mantiveram-se insolúveis durante as lavagens (dados não mostrados). Para a realização da purificação proteica, um forte agente desnaturante (ureia 8 M) e um redutor (DTT 50 mM) foram usados para solubilização dos corpúsculos de inclusão.

3.3.2. Purificação da proteína recombinante por cromatografia de troca iônica:

A estratégia escolhida para a purificação da proteína L1 recombinante foi a cromatografia de troca iônica (IEX), que se baseia na separação de proteínas que possuem pontos isoelétricos diferentes. Para determinar a estratégia de purificação, foi realizada uma predição do ponto isoelétrico (pI) da proteína recombinante L1 através do programa ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>). Com isto, verificamos que o pI teórico da L1 era de 8,77. Diminuímos o pH do extrato proteico para 7,0, permitindo que a proteína recombinante ficasse com carga positiva e possibilitando a sua ligação a uma resina trocadora de cátions (HiTrap SP).

As proteínas insolúveis (em tampão contendo ureia 8M) foram aplicadas a uma coluna HiTrap SP. Verificou-se pela fração coletada do *flowthrough* que a maior fração da proteína recombinante de 56 kDa e sua degradação ficaram retidas na resina, enquanto parte das proteínas contaminantes de *E. coli* não foram adsorvidas (*Flowthrough*, Fig. 22). Após a lavagem da resina com tampão contendo NaCl 0,1 M, outras proteínas contaminantes foram removidas, inclusive uma alta quantidade da proteína degradada de 30 kDa (Lavagem NaCl 0,1 M, Fig. 22).

Em seguida, as proteínas ligadas à resina foram eluídas em tampão contendo NaCl 0,5 M. A proteína L1 recombinante de 56 kDa foi eluída em diversas frações (Eluição NaCl 0,5 M, Fig. 22). Nas duas primeiras frações, a proteína L1 saiu com alguns contaminantes, sendo que nas duas últimas a proteína saiu praticamente isolada, apesar não ter apresentado um pico de eluição bem definido no cromatograma (Eluição Fig. 22 e 23).

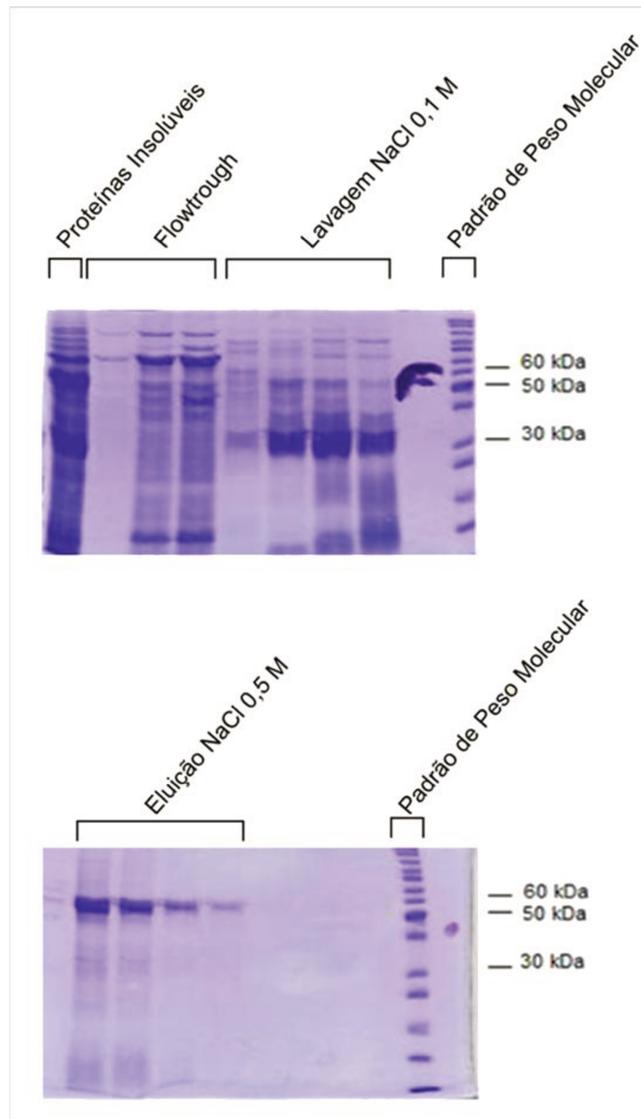


Figura 5: SDS-PAGE (coloração *comassie blue*) da cromatografia de troca iônica de corpúsculos de inclusão solubilizados. As amostras analisadas são: a fração de proteínas insolúveis antes da sua aplicação na coluna de purificação; a fração proteica que não foi retida na resina denominada *flowthrough*; frações da lavagem da resina com NaCl 0,1 M e frações da eluição da proteína recombinante com NaCl 0,5 M. Padrão de Peso Molecular “Ez Run Rec Protein Ladder” (Fischer, EUA). O tamanho esperado da proteína L1 recombinante é de 56 kDa.

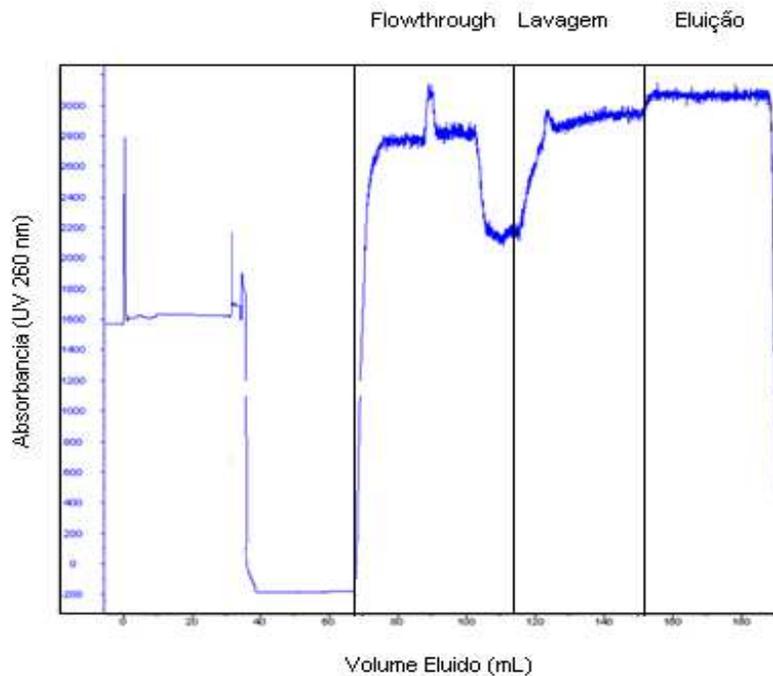


Figura 6: Cromatograma obtido na purificação por IEX da proteína recombinante L1 expressa bactérias.

3.3.3. Detecção da proteína recombinante:

Para confirmar a presença da proteína recombinante L1 nas amostras obtidas em cromatografia foi realizado o *western blot* de algumas frações proteicas. Verificamos que a proteína de 56 kDa e suas frações degradadas foram detectadas tanto na lavagem com NaCl 0,1 M quanto na eluição com NaCl 0,5 M (Lavagem, Fig. 24) Porém, as proteínas provenientes da degradação da L1 desligaram-se da resina antes da completa eluição da proteína de 56 kDa, possibilitando a obtenção da proteína L1 recombinante praticamente de forma isolada (Fig. 24 – Fração indicada pela flecha).

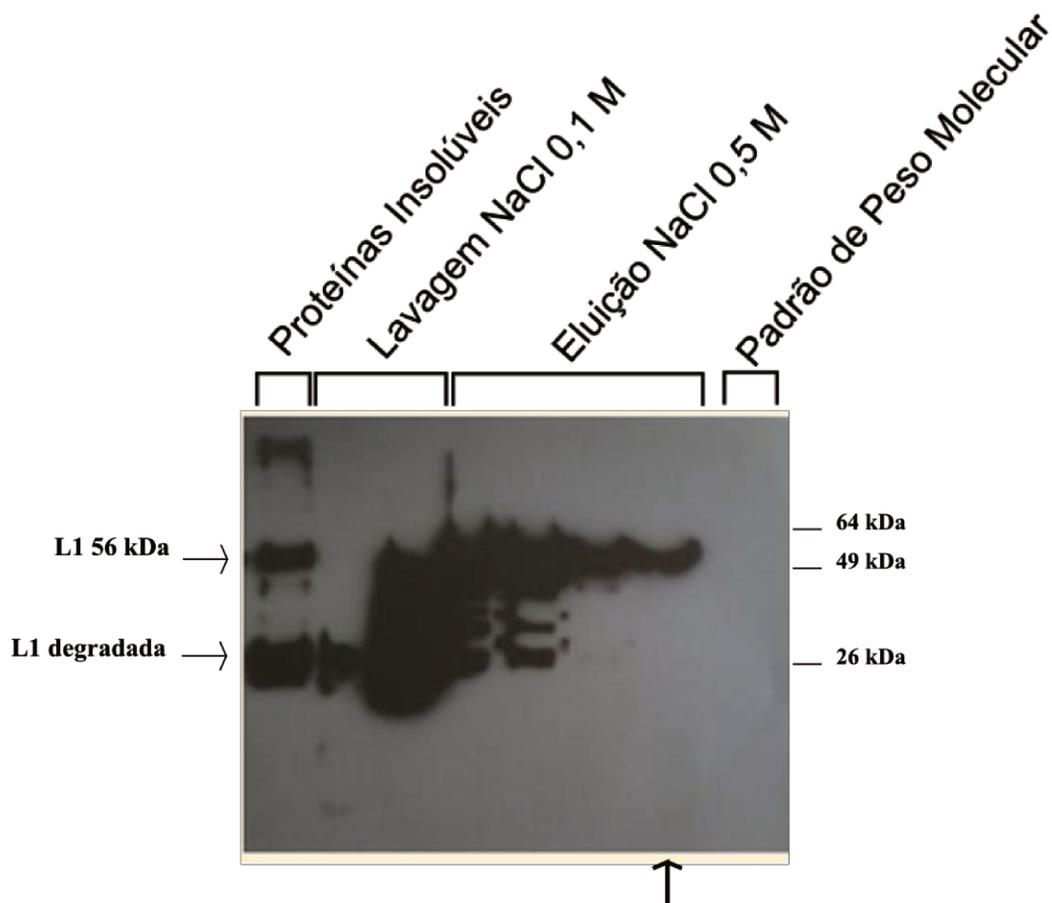


Figura 7: *Western blot* de frações obtidas em cromatografia de troca iônica de IBs solubilizados. As amostras analisadas foram: a fração de proteínas insolúveis antes da sua aplicação na coluna de purificação, frações da lavagem da resina com NaCl 0,1 M e frações da eluição da proteína recombinante com NaCl 0,5 M. Padrão de Peso Molecular BenchMark™ Pre-Stained Protein Ladder (Life, EUA). A flecha indica a fração contendo a proteína recombinante praticamente de forma isolada, que foi utilizada nos experimentos de espectrometria de massa.

Para confirmar a identidade e pureza da proteína purificada de 56 kDa, foram realizadas diversas técnicas de espectrometria de massa. Em todas as análises, foi possível identificar a proteína L1 recombinante obtida em *E. coli* (Tabela 4). Tanto na técnica que utilizou o equipamento nanUPLC-MS, quanto no Waters Synapt HDMS, foram analisadas todas as proteínas contidas na fração eluída da purificação, sem ocorrer separação proteica por SDS-PAGE e a posterior seleção da banda correspondente a 56 kDa. Devido a isto, concluímos que o

processo de purificação foi altamente eficaz e que a proteína recombinante L1 apresentou-se em alto grau de pureza, já que não foram identificadas proteínas contaminantes produzidas por *E. coli*.

Tabela 2: Identificação da proteína L1 recombinante por espectrometria de massa. A presença da L1 recombinante é demonstrada pelo sinal +. O grau de pureza alto foi determinado devido a presença isolada da proteína na fração purificada por cromatografia de troca iônica; já o grau de pureza descrito como não determinado é devido a seleção e digestão da banda proteica de 56 kDa “*in gel*”.

Técnica MS	L1 <i>E. coli</i>	Grau de Pureza
Waters Synapt HDMS	+	Alto
nanoUPLC-MS	+	Alto
MALDI TOF/TOF 5800	+	Não determinado
Q-TofPREMIER	+	Não determinado

Pela análise por nanoUPLC-MS também foi possível confirmar o peso molecular da proteína recombinante L1. De acordo com programa de predição de peso molecular (ProtParam), a proteína L1 recombinante contendo uma cauda de 6xHis teria aproximadamente 56,778 kDa, o que foi confirmado pela espectrometria de massa, já que o peso molecular médio da proteína recombinante foi determinado em 56,007 kDa.

4. CAPÍTULO II

“PRODUÇÃO DE PLANTAS TRANSGÊNICAS E ANÁLISE DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA L1”

4.1. INTRODUÇÃO DO CAPÍTULO

A produção de VLPs em células vegetais é uma alternativa promissora na produção de vacinas contra patógenos virais, pois plantas oferecem um ambiente favorável para a formação correta de VLPs recombinantes. Visando a produção de VLPs a partir L1 de BPV-1, decidimos produzir plantas transgênicas. Para isso, foi analisada a expressão transiente da proteína L1 em alface e a obtenção de plantas transgênicas de tabaco.

Na expressão transiente em alface, utilizamos um promotor constitutivo 35S, para que a expressão ocorresse em folhas. Em algumas construções, o gene *L1* nativo foi fusionado a uma sequência codificadora do peptídeo sinal da α -coixina (Ottoboni et al., 1993), responsável pelo endereçamento e retenção da proteína recombinante no retículo endoplasmático (RE). Já para plantas de tabaco transgênicas, foi utilizado o promotor da γ -kafirina de sorgo para que a expressão ocorresse somente em sementes (de Freitas et al., 1994; Leite et al., 2000). Isso se deve ao fato de existirem diversas vantagens na restrição à expressão do transgene somente em sementes, como o aumento da estabilidade da proteína e a prevenção da toxicidade para a planta hospedeira. Na transformação de tabaco, foram utilizados o gene *L1* nativo, bem como otimizado, visando a utilização de códons de tabaco, precedidos ou não do peptídeo sinal da α -coixina.

4.2. MATERIAL E MÉTODOS

As técnicas rotineiras de biologia molecular utilizadas neste projeto encontram-se descritas nos manuais de laboratório de Sambrook e Brasileiro (Brasileiro, 1998; Sambrook J., 1989).

4.2.1. Otimização do peptídeo sinal da α -coixina:

A otimização da sequência de nucleotídeos codificantes do peptídeo sinal da α -coixina foi feita com a utilização do software LETO (Entelechon, Alemanha). Para isso, a referência empregada foi a utilização de códons de *Nicotiana tabacum*, obtida através do banco de dados *Codon Usage Database* (<http://www.kazusa.or.jp/codon/>). Foram realizadas aproximadamente 100 interações manuais, evitando a utilização de apenas um códon para um determinado aminoácido.

Após a otimização “*in silico*”, a sequência obtida foi sintetizada, formando-se os oligonucleotídeos PS1 e PS2 (Material Complementar – Seq.2). Esses oligonucleotídeos foram anelados “*in vitro*”, incubando-se 500 ng de cada um deles em tampão de anelamento (Tris-HCl 10 mM, NaCl 50 mM e EDTA 1 mM, pH 8,0), tendo a reação ocorrido em um termociclador em temperatura inicial de 94°C, com queda de 1,5°C por minuto, durante 45 min. O fragmento resultante denominado PSC apresenta a extremidade 5’ protuberante e complementar àquela gerada pela enzima NcoI, para facilitar a clonagem.

4.2.2. Predição de clivagem do peptídeo sinal:

Para avaliar se o peptídeo sinal da α -coixina seria clivado corretamente da proteína L1 recombinante, a estrutura primária da proteína L1 nativa precedida pela sequência de aminoácidos do peptídeo sinal da α -coixina foi avaliada pelo software Signal-IP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>), utilizando-se eucariotos como modelo.

4.2.3. Construção dos vetores de expressão:

Para a construção dos cassetes de expressão foi utilizada a região codificadora do gene nativo *L1*, amplificado por PCR a partir de cópias genômicas de BPV-1 clonadas em vetor bacteriano pAT153 (Acervo do Laboratório de Oncogênese Viral-Instituto Butantan). Para a amplificação do gene otimizado, de acordo com a utilização de códons de tabaco (Material Complementar – Seq. 3) foi utilizada a sequência obtida através da síntese de genes pela empresa Genscript (Genscript, EUA), clonada no vetor pUC57 L1-Tab-Opt.

Para a amplificação da sequência de DNA a qual não seria ligada a sequência codificadora do peptídeo sinal da α -coixina (Ottoboni et al., 1993), utilizou-se o primer senso P-ATGHisBPV (Material Complementar – Tabela de primers) que possui uma região complementar à região 5' do gene L1 nativo, uma região codificante para cauda de histidina (6xHis) e um sítio de restrição reconhecido pela enzima NcoI. A obtenção do gene otimizado foi feita através da digestão do plasmídeo pUC57 L1-Tab-Opt pelas enzimas de restrição NcoI e BamHI.

Já para a amplificação da sequência de DNA que posteriormente seria fusionada à sequência codificante do peptídeo sinal da α -coixina (PSC), utilizou-se o primer senso P-ATGPSHisBPV (Material Complementar – Tabela de primers), que possui uma região complementar ao gene L1 e uma região codificante para uma cauda de histidina (6xHis) para a amplificação do gene nativo e o primer senso P-BPVOptSenso (Material Complementar – Tabela de primers), que possui apenas a região complementar ao gene L1 sintético (o gene sintético já possui a região codificadora da cauda 6xHis). Em todas as reações de PCR foi utilizado o primer anti senso P-StopHisBPV, na amplificação do gene nativo e o primer anti senso P-BPVOptStop (Material Complementar – Tabela de primers). Todos os primers anti senso possuem em sua extremidade 5' um sítio de restrição reconhecido pela enzima BamHI.

As sequências foram individualmente digeridas pelas enzimas de restrição NcoI e BamHI e ligadas ao plasmídeo pRT-PGK (contendo o promotor da γ -kafirina) (Leite et al., 2000), previamente digerido pelas mesmas enzimas originando as construções pRT-PGK-PSC-BPV e pRT-PGK-BPV (gene nativo) e pRT-PGK-PSC-Opt e pRT-PGK-Opt (gene otimizado). Em paralelo, as sequências contendo o gene nativo também foram inseridas no pRT104 (contendo o promotor 35S) (Topfer et al., 1987), para a transformação transiente em alface, originando as construções pRT-35s-PSC-BPV e pRT-35s-BPV (Fig. 25).

Esses cassetes de expressão, flanqueados por sítios de PstI, foram transferidos para o vetor pCambia3301 ou pCambia2300 (Cambia, AU) previamente digeridos pela enzima PstI (Fig. 25). O vetor pCambia3301 possui, em sua sequência, um gene de resistência ao herbicida fosfinotricina (*ppt^r*) e o gene repórter *gusA* para facilitar a seleção de plantas transformadas. Já o vetor pCambia2300 possui o gene de seleção *npt2*, que confere resistência ao antibiótico canamicina para a seleção de plantas transformadas (Fig. 25).

A integridade dos plasmídeos e a sequência correta do gene *LI* foram confirmadas por restrição enzimática e sequenciamento de DNA, com a utilização de primers específicos para os promotores 35S e da γ -kafirina e terminador poli-A, denominados P-P35S, P-Cons5' e P-Cons3', respectivamente (Material Complementar – Tabela de primers). Após a verificação da sequência, os plasmídeos foram utilizados para a transformação de agrobactérias que, posteriormente, foram empregadas na expressão transiente em alface e na produção de plantas transgênicas de tabaco. A descrição de cada vetor utilizado nos experimentos pode ser encontrada na Tabela 6.

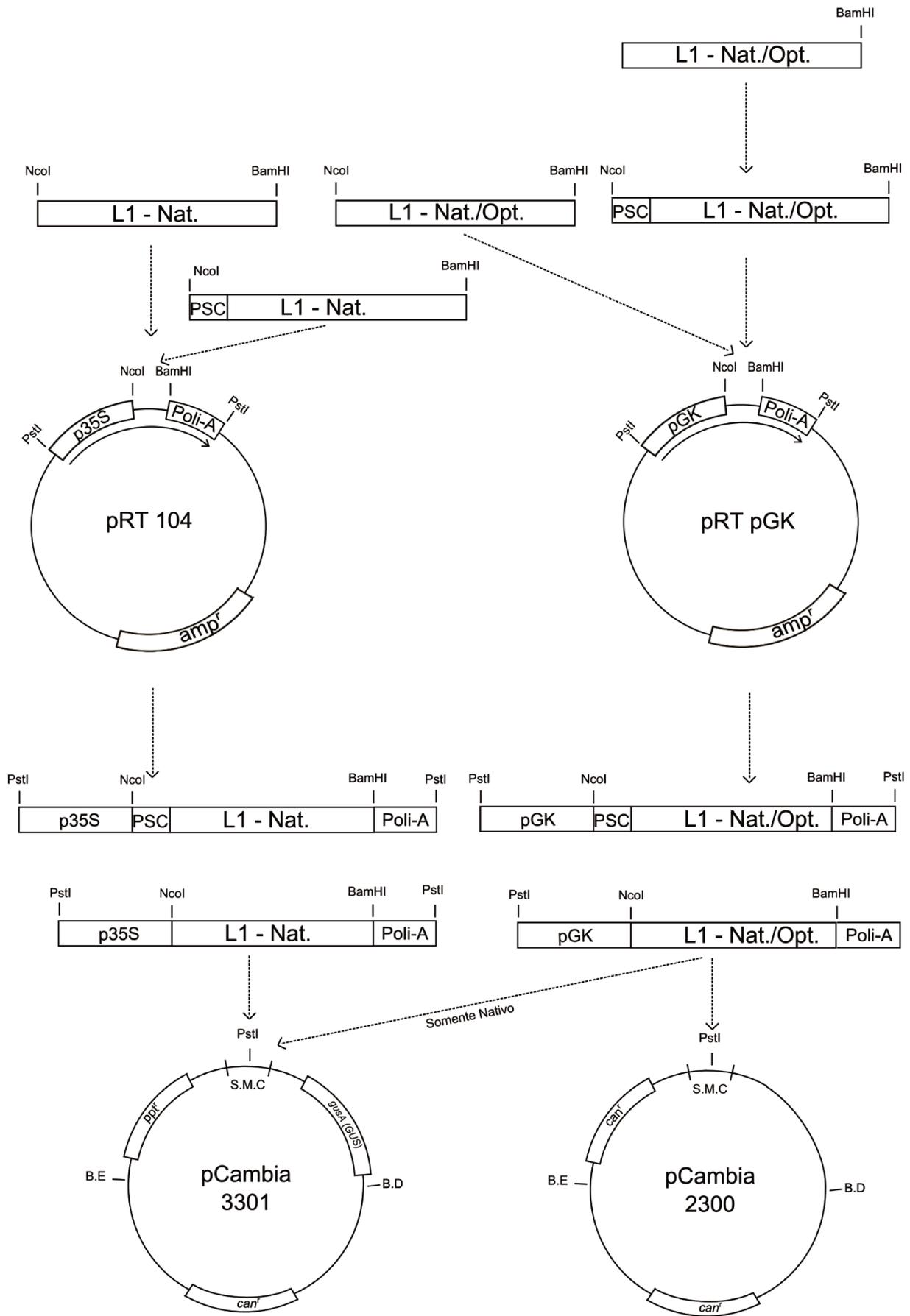


Figura 8: Estratégia para construção dos vetores de expressão. O fragmento do gene *L1* nativo ou otimizado amplificado por PCR foi fusionado ou não a sequência codificadora do peptídeo sinal da α -coixina. Após a digestão com as enzimas de restrição *NcoI* e *BamHI*, os fragmentos de DNA foram transferidos para os plasmídeos pRT 104 ou pRT pGK. Os cassetes de expressão compostos por um promotor, gene *L1* contendo ou não o PSC e a região de poliadenilação foram digeridos pela enzima *PstI* e posteriormente inseridos nos vetores pCambia3301 ou pCambia2300. Gene *L1* nativo (L1 – Opt.). Gene *L1* nativo (L1 – Nat.). Peptídeo sinal da α -coixina (PSC). Região de poliadenilação (Poli-A). Promotor 35S (p35S). Promotor da γ -kafirina (pGK). Sítio Múltiplo de Clonagem (S.M.C). Gene de resistência a ampicilina (*amp^r*). Borda Esquerda e Direita da região de transferência de DNA (B.E e B.D, respectivamente). Gene *bar* de resistência a fosfomicina (*ppt^r*). Gene *nptII* de resistência a canamicina (*can^r*).

Tabela 3: Características dos vetores utilizados na expressão da proteína L1 em plantas:

Vetor	pCambia	Promotor	PS α -coixina	Gene <i>L1</i>	Hospedeiro
pCam33-35BPV	3301	p35S	Ausente	Nativo	Alface
pCam33-35PS-BPV	3301	P35S	Presente	Nativo	Alface
pCam33-GK-BPV	3301	pGK	Ausente	Nativo	Tabaco
pCam33-GK-PS-BPV	3301	pGK	Presente	Nativo	Tabaco
pCam23-GK-BPV	2300	pGK	Ausente	Nativo	Tabaco
pCam23-GK-PS-BPV	2300	pGK	Presente	Nativo	Tabaco
pCam23-GK-BPV-Opt	2300	pGK	Ausente	Otimizado	Tabaco
pCam23-GK-PS-BPV-Opt	2300	pGK	Presente	Otimizado	Tabaco

4.2.4. Transformação de Agrobacterium tumefaciens:

Alíquotas de agrobactéria termocompetentes da linhagem GV3101 foram incubadas com 1 µg de DNA plasmidial durante 30 min em gelo. Em seguida, foram congeladas em nitrogênio líquido e transferidas para 37°C em banho-maria, por 5 min. Após adição de 1 mL de meio LB e incubação por 2 horas, a 28°C, as bactérias foram plaqueadas em meio LB contendo os antibióticos rifampicina (10 mg/L), canamicina (100 mg/L) e gentamicina (60 mg/L). As colônias foram selecionadas após 2-3 dias de incubação a 28°C e a presença do vetor de expressão foi verificada por PCR utilizando-se primers específicos para o gene *LI* nativo e otimizado (Material complementar – Tabela de primers).

4.2.5. Expressão transiente em alface:

A expressão transiente em alface foi feita seguindo o protocolo descrito por Negrouk e colaboradores (Negrouk et al., 2005). Culturas de agrobactérias transformadas com os vetores de expressão pCam33-35BPV, pCam33-35PS-BPV, pCambia 3301 intacto (controle positivo) e agrobactérias não transformadas (controle negativo) foram propagadas em meio de cultura YEB modificado (6g/L de extrato de levedura, 5 g/L de peptona, 5 g/L de sacarose, MgSO₄ 2 mM), com antibióticos (100 µg/mL de canamicina, 15 µg/mL de rifampicina, 25 µg/mL de gentamicina) por 2 dias; para o controle negativo não foi utilizado o antibiótico canamicina. Após estes dois dias, estas culturas foram diluídas 1:100 no mesmo meio de cultura YEB, complementado com antibióticos, tampão MES 10 mM pH 5,6 e acetosiringona 29 µM. O meio contendo as bactérias foi incubado por 24 horas até atingir uma OD₅₉₅ de aproximadamente 2,4.

As células bacterianas foram suplementadas com 55 g/L de sacarose e de acetosiringona 200 µM, em seguida foram incubadas por 1 hora, por 22°C. Após esta etapa adicionaram-se 2,4 D e Tween 20 para concentração final 100 µg/mL e 0,005%, respectivamente. Essa suspensão foi utilizada para a infiltração a vácuo. Uma quantidade de 1,2 L da suspensão de agrobactérias foi

colocada em um Becker de vidro de 2L, dentro de um dissecador a vácuo. Toda a folhagem da alface foi imersa na suspensão e deixada por 20 min sobre vácuo (736 mmHg) e logo em seguida a válvula de entrada de ar foi aberta rapidamente. Após a infiltração, as folhas da alface foram lavadas com água e deixadas por três dias em um Becker contendo papel toalha úmido, a 22°C, em câmara de crescimento vegetal programada com fotoperíodo de 16 horas. Após estes três dias, as folhas foram cortadas e utilizadas no teste histoquímico para atividade de GUS e extração de proteínas.

4.2.6. Teste histoquímico para atividade de GUS:

A atividade da proteína β -glucoronidase foi analisada histoquimicamente de acordo com Jefferson e colaboradores (Jefferson et al., 1987). Fragmentos foliares foram incubados em 1 mL de tampão de reação ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 100 mM, $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 0,5 mM, $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 10 mM, Triton X-100 0,1%, X-Gluc 1 mM) por 16 h, no escuro, à temperatura de 37°C. Após a retirada do tampão de reação, foi adicionado 1 mL de etanol 70% para interromper a reação de clivagem do substrato X-Gluc e retirada da clorofila, permitindo uma melhor visualização da coloração azul. Após 24 horas, as amostras foram lavadas em água destilada e transferidas para glicerol 50% em placa de Petri.

4.2.7. Transformação de Nicotiana tabacum:

4.2.7.1. Obtenção de plântulas:

Um microtubo de 1,5 mL contendo aproximadamente 100 sementes de tabaco (variedade SR-1) foi acomodado em uma câmara dissecadora do tipo *Bell Jar*, contendo um Becker com 70 mL de água sanitária comercial contendo 2,5% de cloro ativo (Anhembí, Brasil). Adicionou-se 1 mL de HCl concentrado à água sanitária e rapidamente fechou-se a câmara dissecadora com uma tampa. O sistema foi mantido fechado aproximadamente 4 horas. O tubo com as sementes foi retirado e as sementes foram semeadas em placas de Petri contendo meio de cultura MS

(Murashige and Skoog, 1962) e mantidas a 25°C em câmara de crescimento vegetal programado com fotoperíodo de 16 horas. As plântulas foram mantidas por cinco semanas em meio MS e utilizadas para transformação genética.

4.2.7.2. Infecção dos fragmentos foliares:

As colônias de agrobactérias selecionadas foram cultivadas a 28°C, em 20 mL de meio LB líquido contendo antibióticos (canamicina 100 µg/mL, rifanpicina 15 µg/mL, gentamicina 25 µg/mL). Após atingir a fase exponencial de crescimento (OD₅₉₅ de 0,6), a suspensão bacteriana foi centrifugada por 5 min, a 5.000 rpm, e ressuspensa até atingir uma OD₅₉₅ final de 0,1 em aproximadamente 30 mL de meio MS. Fragmentos foliares de 0,5 a 1,0 cm² obtidas de plântulas de tabaco (explantes) com cinco a seis semanas de idade foram mantidas por 10 min em tubo Falcon contendo 30 mL de meio MS líquido com a suspensão de agrobactérias. Após a infecção, os explantes foram transferidos para meio MS sólido contendo BAP (1 mg/L), ANA (0,1 mg/L) e acetoseringona (20 mg/L). Os explantes foram mantidos neste meio por 48 horas à temperatura de 25°C no escuro.

4.2.7.3. Obtenção das plantas transgênicas:

Os fragmentos foliares (explantes) foram transferidos para placas contendo meio MS sólido complementado com BAP (1 mg/L) e ANA (0,1 mg/L) para indução de brotos, cefotaxima (250 mg/L) e vancomicina (200 mg/L) para evitar o crescimento das bactérias remanescentes e canamicina (100 mg/L) para selecionar as células vegetais transformadas. As placas foram mantidas em fotoperíodo de 16 horas, a 25°C, por duas semanas. Os brotos resistentes em formação foram transferidos para meio MS novo idêntico ao anterior e os brotos com aproximadamente 3 cm foram excisados e transferidos individualmente para potes contendo meio de enraizamento sólido (meio MS acrescido de cefotaxima 250 mg/L, vancomicina 200 mg/L e

canamicina 100 mg/mL). Os potes foram mantidos em sala de cultura de tecidos vegetais a 25°C, em fotoperíodo de 16 horas, até o desenvolvimento completo das raízes.

Após a formação completa de raízes, as plantas foram transferidas para vasos contendo solo adubado e acomodadas em casa de vegetação até a produção de sementes. Amostras de folhas e sementes foram coletadas e utilizadas para análises posteriores.

4.2.8. Extração de DNA genômico de folhas de tabaco:

Discos de material foliar de aproximadamente 1 cm de diâmetro foram macerados por 15 segundos à temperatura ambiente, em um tubo de 1,5 mL, com o auxílio de um pistilo. Após moagem adicionaram-se 400 µL de tampão de extração de DNA (Tris-HCl 200 mM, NaCl 250 mM, EDTA 24 mM, SDS 0,5%, pH 7,5) e as amostras foram agitadas em um aparelho tipo vortex por 5 segundos. Os extratos então foram centrifugados por 1 min, a 13.000 rpm. Após a centrifugação foram coletados 300 µL do sobrenadante e transferidos para um novo tubo de 1,5 mL. Adicionaram-se 300 µL de isopropanol ao sobrenadante e a mistura foi mantida por 2 min, à temperatura ambiente. Após centrifugação por 5 min a 13.000 rpm, o precipitado de DNA foi secado em um dissecador a vácuo e então ressuspendido em água ultra pura. As amostras de DNA genômico foram utilizadas nas reações de PCR para a identificação de plantas transgênicas, utilizando primers P-ATGPSHisBPV, P-StopBPV, P-BPVOptSenso e P-BPVOptStop específicos para L1 (Material Complementar – Tabela de primers). Os fragmentos de DNA gerados pela reação de PCR foram separados eletroforéticamente em gel de agarose 1% contendo brometo de etídeo.

4.2.9. RT-PCR de cDNA de sementes de tabaco transgênicos:

Amostras de RNA total de sementes de tabaco foram obtidas através do kit de extração *RNeasy Plant Mini Kit* (Qiagen, EUA), seguindo as instruções do fabricante. Após a quantificação aproximadamente 2 µg de RNA foram tratados com 1 µL DNase (1 U/µL) por 20 min, à temperatura ambiente. Após este tratamento, foi adicionado 1 µL de EDTA 10 mM ao RNA que em seguida foi incubado a 65° C, por 10 min.

O RNA tratado foi utilizado para a produção de cDNA através da enzima SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. A reação de PCR foi realizada utilizando-se 165 ng de cDNA de sementes de plantas de tabaco selvagens (controle negativo), transgênicas e um vetor utilizado para a transformação de plantas. Os primers específicos para *L1* utilizados na amplificação do gene nativo foram: P-ATGPSHisBPV, P-StopBPV; e para o gene otimizado foram: P-BPVOptSenso e P-BPVOptStop (Material Complementar – Tabela de primers). Os fragmentos de DNA gerados pela reação de PCR foram separados eletroforéticamente em gel de agarose 1%, contendo brometo de etídeo.

4.2.10. Extração de proteínas totais de sementes de tabaco e folhas de alface:

Em um almofariz em banho de gelo foram homogeneizados 50 mg de sementes de tabaco ou folhas de alface em 1 mL de tampão de extração (Tris-HCl 50 mM, EDTA 2 mM, benzamidina 5 mM, DTT 5 mM; Triton X-100 0,5%, pH 8,0), seguido de centrifugação a 10.000 rpm, a 10°C, por 10 min. O sobrenadante foi coletado e nele foi adicionado 1 volume de hexano, seguido de centrifugação a 14.000 rpm, a 4°C, por 15 min. A fase inferior aquosa foi coletada e as amostras foram armazenadas a -20°C, até o momento de uso.

Para análise de proteínas insolúveis, o precipitado inicial da extração foi separado e nele foram adicionados 200 µL tampão de solubilização (Tris-HCl 50 mM, DTT 50 mM, ureia 8 M,

PMSF 0,1 mM, pH 8,0). Após centrifugação a 12.000 rpm, por 10 min, o sobrenadante foi resgatado e armazenado a -20°C, até o momento de uso.

4.2.11. Microscopia eletrônica de extrato proteico de sementes de tabaco:

Para obtenção do extrato proteico, 50 mg de sementes foram maceradas em nitrogênio líquido com 1 mL de tampão PBS (NaCl 0,5 M, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM e KH₂PO₄ 2 mM) e centrifugado a 12.000 rpm, por 5 min, a 4°C para eliminar debris celulares. A purificação das possíveis VLPs presentes foi feita através de centrifugação do extrato em colchão de sacarose 40%, a 140.000 x g, por 2 horas a 4°C. Em seguida o pellet foi ressuscitado em 1 mL de tampão PBS. Após a filtragem em filtro de 0,22 µm, 2 µL do extrato foram adicionados em telas de cobre revestidas com carbono e cobertas com filme Formvar. A marcação foi feita com solução de 1% de acetato de uranila por 1 min e as amostras foram inspecionadas em um microscópio eletrônico.

4.2.12. Western blot de extrato proteico de folhas de alface e sementes de tabaco:

Amostras de 40 µg de proteínas obtidas de sementes de tabaco transgênico ou folhas de alface foram misturadas com 10 µL de tampão de amostra (Tris-HCl 125 mM pH 6,8; SDS 4%; β-mercaptoetanol 10%; glicerol 20%, azul-de-bromofenol 0,04%) e 8 µL de padrão de massa molecular pré-corado e então separadas eletroforéticamente em gel SDS-PAGE 12%. Como controle negativo do experimento, foi utilizado extrato proteico de sementes de tabaco selvagem e extrato proteico de folhas de alface, tanto transformadas apenas com agrobactérias contendo o vetor de expressão sem o cassete de expressão da proteína L1, quanto agrobactérias sem o vetor.

As proteínas foram transferidas do gel para membrana de nitrocelulose de 0,45 µm de poro (BIO-RAD, EUA) a 10 V, por 30 min. A membrana de nitrocelulose foi corada com o corante reversível MemCode (Pierce, EUA), para verificação da eficiência da transferência, com

a visualização das bandas de proteínas. A membrana foi então colocada em tampão TBS (Tris-HCl 20 mM, NaCl 50 mM, pH 7,5) contendo 10% de leite em pó e deixada por uma noite a 4°C. A membrana de nitrocelulose foi colocada para reagir por 2 h com diferentes anticorpos primários: o antiHPV [BPV-1/1H8] (diluição 1:500), antiHPV [BPV-1/1H8 + CAMVIR] (AbCam-EUA) (diluição 1:500) e o anticorpo antiHis-Tag (GE Healthcare, Alemanha) (diluição 1:1.000). Após a incubação com o anticorpo primário, a membrana foi lavada 3 vezes por 5 min com tampão TBS-T (TBS, Tween 20 0,05%) seguida de 3 lavagens com TBS sozinho, por 5 min cada. Foi feita então a incubação da membrana com anticorpo secundário IgG HRP (diluição 1:20.000) por 1 h e em seguida repetiu-se a lavagem da membrana, como anteriormente. A revelação foi realizada em solução com o substrato Super Signal West Pico (Pierce, EUA).

4.2.13. Espectrometria de massa:

Os procedimentos de análise de proteínas por espectrometria de massa foram os mesmos descritos no Material e Métodos do capítulo 2. A única diferença é que a amostra analisada no capítulo anterior era uma fração purificada da proteína recombinante L1 produzida em *E. coli*. Neste capítulo utilizamos como amostra extrato bruto de proteínas totais solúveis e insolúveis, obtidas de sementes de tabaco transgênico.

4.3. RESULTADOS

4.3.1. Otimização do peptídeo sinal e gene L1 para a utilização de códons de *Nicotiana tabacum*:

Visando uma maior expressão da proteína recombinante, foi feita a otimização de códons da sequência de DNA codificante do peptídeo sinal da α -coixina e da proteína L1 de BPV-1, de acordo com a utilização de códons de *Nicotiana tabacum*. O Índice de Adaptação de Códons (IAC) é uma medida da adaptação relativa ao uso de códons de um gene quanto à utilização de códons de genes altamente expressos por um determinado organismo. O IAC é utilizado como um método quantitativo para prever o nível de expressão de um gene nativo ou heterólogo, baseado na sua utilização de códons (Xia, 2007). Os valores de IAC variam de 0 a 1 e, de acordo com a empresa Genscript, a possibilidade de um alto nível de expressão é correlacionada com o valor de IAC de 1,0, considerada como ideal, enquanto $IAC > 0,8$ é considerado bom para a expressão em tabaco. Quanto maior este valor, maior é a similaridade entre os códons de um gene e os mais utilizados por genes altamente expressos. Por isso, altos níveis de expressão de uma proteína são correlacionados a maiores índices de IAC. Já a porcentagem da distribuição de códons podem ser divididos em grupos de qualidade, aonde o valor 100 é definido para o códon com maior frequência de uso para um determinado aminoácido em tabaco, e códons com valores menores de 30 podem dificultar a eficiência da expressão.

O IAC da sequência codificadora do peptídeo sinal nativo (obtida de *Coix lacryma-jobi*) é de 0,66 quando comparado com a utilização de códons do tabaco (organismo hospedeiro). Adicionalmente, possui 9% de códons no grupo de qualidade 11-20, ao qual pertencem códons que são raramente utilizados pela planta hospedeira (grupos de qualidade menor que 30) e que podem dificultar a eficiência da expressão (Fig. 26). Por isso fizemos a otimização da sequência do PSC para adaptá-la à utilização de códons de tabaco. Nesta otimização também evitamos

saturar os códons mais expressos e evitar estruturas secundárias no mRNA transcrito pelo gene. Desta maneira, obtivemos uma sequência de DNA cujo IAC é de 0,93 (Fig. 26). Essa sequência otimizada não apresentou códons considerados raros do grupo de qualidade <30. Após a obtenção desta sequência otimizada (Material Complementar - Seq), os oligos PS1 e PS2 foram sintetizados por empresas do ramo.

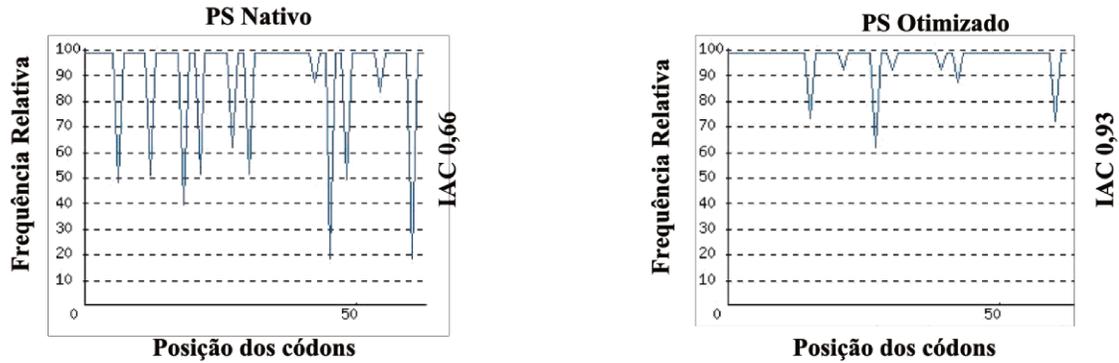
Na otimização do gene *L1*, a sequência nativa foi enviada à empresa Genscript, que fez a otimização e a produção do gene sintético. O gene *L1* nativo possui um IAC de 0,76 quando comparado à utilização de códons de tabaco e, após a otimização, este valor passou a ser de 0,87 (Fig. 27). Nesta sequência otimizada também foram trocados 1% (cinco códons) dos códons do grupo de qualidade 21-30 por códons pertencentes a grupos de qualidade $\geq 41-50$.

Em geral, motivos *cis* como sequências poli A podem regular negativamente a expressão de um gene em nível de transcrição e tradução. Onze destes motivos são encontrados no gene nativo e, após a sua otimização, todos estes motivos foram retirados.

Na otimização de códons do PSC e do gene *L1* ocorreu a modificação apenas da sequência de DNA, sem que houvesse alteração da sequência da proteína final.

A

Índice de Adaptação de Códon (IAC)



B

Frequência de Códon Ideais (FCI)

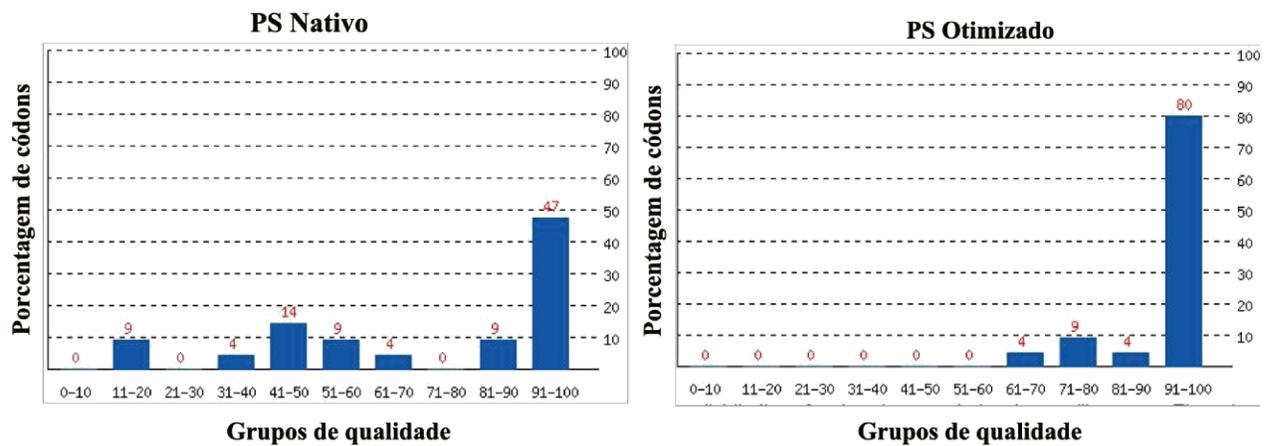


Figura 9: Análise da sequência codificadora do peptídeo sinal da α -coixina nativa e otimizada de acordo com a utilização de códons de tabaco. (A) Índice de Adaptação de Códon (IAC): A distribuição da frequência de uso de códon ao longo do comprimento da sequência codificadora de DNA a ser expresso *Nicotiana tabacum*. (B) Frequência de Códon Ideais (FCI): A porcentagem da distribuição de códons em grupos de qualidade.

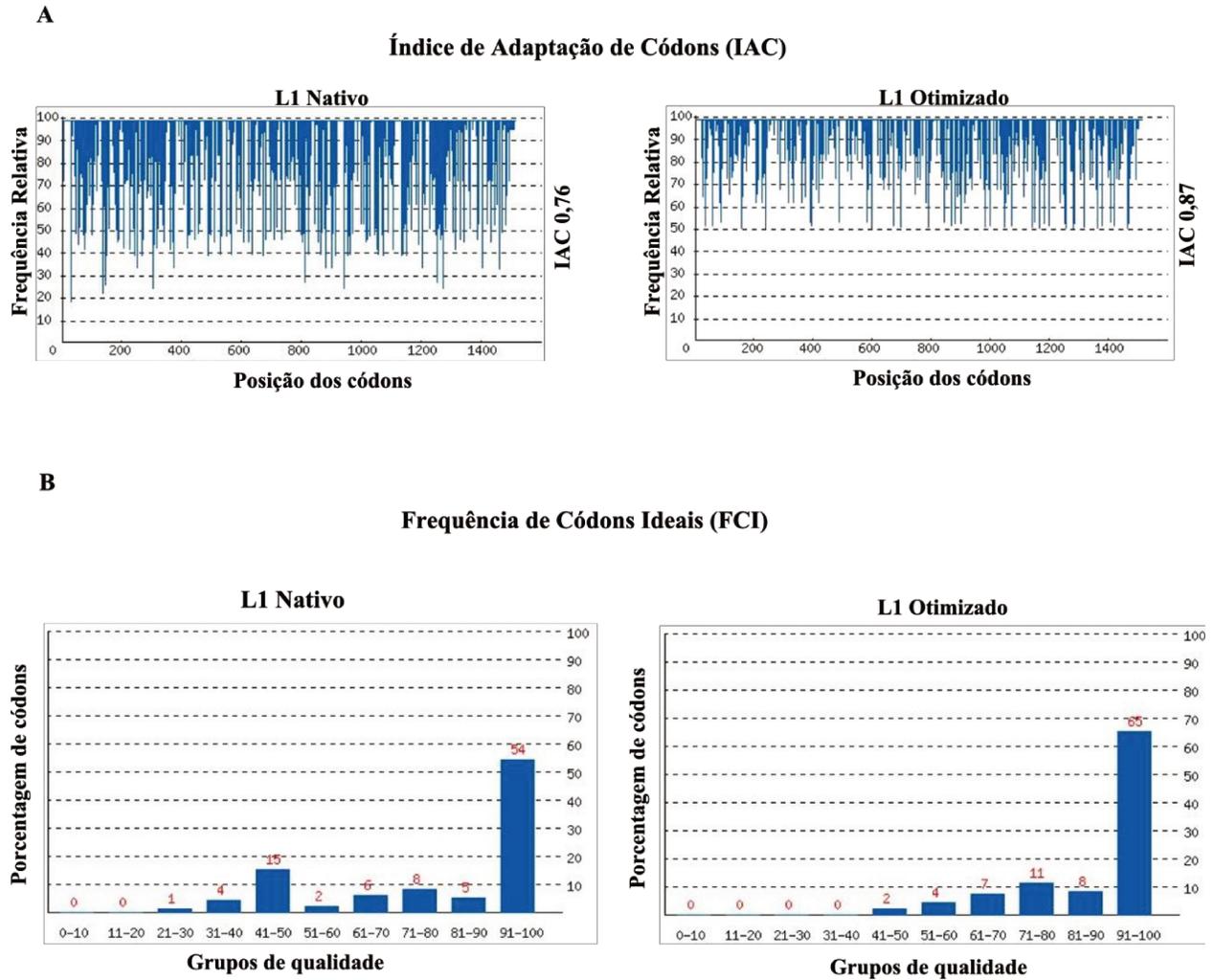


Figura 10: Análise da sequência codificadora do gene *L1* nativo e otimizado de acordo com a utilização de códons de tabaco. (A) Índice de Adaptação de Códons (IAC): A distribuição da frequência de uso de códon ao longo do comprimento da sequência codificadora de DNA a ser expresso *Nicotiana tabacum*. (B) Frequência de Códons Ideais (FCI): A porcentagem da distribuição de códons em grupos de qualidade.

5.3.2. Predição de clivagem do peptídeo sinal:

Algumas proteínas recém-sintetizadas possuem um peptídeo sinal (PS) que as endereça a compartimentos subcelulares. Quando a proteína entra no seu local de destino, o peptídeo sinal pode ou não ser clivado por enzimas. Nos vetores de expressão pCam33-35PS-BPV, pCam33-GK-PS-BPV, pCam23-GK-PS-BPV e pCam23-GK-PS-BPV-Opt inserimos uma sequência de DNA codificante de um PS da α -coixina fusionada ao gene L1 de BPV-1 para, desta maneira, promover o endereçamento e retenção da proteína recombinante no retículo endoplasmático.

Para verificar se este peptídeo sinal seria clivado corretamente, fizemos uma predição da clivagem através do programa Signal-IP. Para isso, inserimos no programa a sequência de aminoácidos do peptídeo sinal da α -coixina fusionada à sequência de aminoácidos da proteína L1 e verificamos a probabilidade de clivagem do PS em sistemas eucariotos. Verificamos, então, que o programa indicou a presença de um peptídeo sinal de 23 aminoácidos, correspondente ao peptídeo sinal da α -coixina (21 aminoácidos), mais os dois primeiros aminoácidos metionina e alanina (M22 e A23) (Fig. 28) da proteína final.

O programa Signal IP determinou que a clivagem do peptídeo sinal provavelmente fosse após o aminoácido 23 (aminoácidos AMA-HHH). Como os aminoácidos M22 e A23 não estão localizados na proteína L1 (esta se inicia no aminoácido M30), mas sim antes da cauda de 6xHis, concluímos que ocorreria a liberação correta do peptídeo sinal sem a alteração da proteína final.

Esta análise com o programa Signal-IP também permitiu que confirmássemos as regiões características de peptídeos sinais que promovem o endereçamento de proteínas para o retículo endoplasmático. Estas sequências sinais apresentam 3 regiões, que consistem em uma região hidrofóbica franqueada pelas regiões N-terminal e C-terminal do peptídeo (Fig. 28).

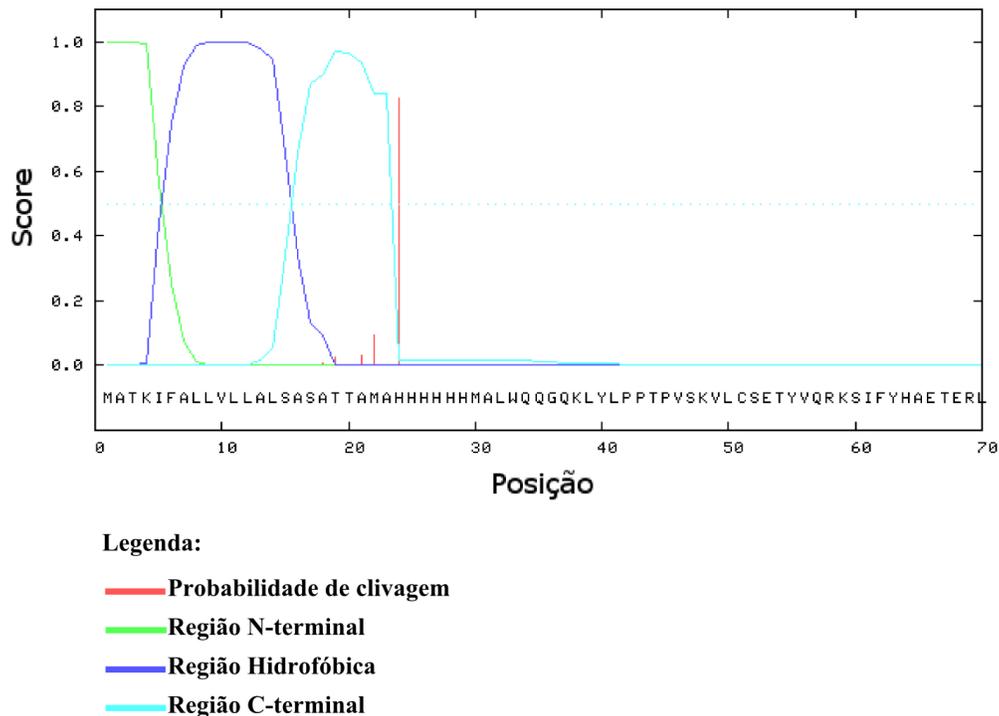


Figura 11: Análise do peptídeo sinal da α -coixina fusionada à sequência da proteína L1 e possível sítio de clivagem em eucariotos. A probabilidade da clivagem é dada pela barra vermelha; as linhas verde, azul escuro e azul claro indicam respectivamente a região N-terminal, região central hidrofóbica e a região C-terminal do peptídeo sinal. O eixo X mostra a posição dos aminoácidos e o eixo Y, a razão da probabilidade de clivagem do peptídeo.

4.3.3. Teste histoquímico para atividade de GUS:

Após a expressão transiente em folhas de alface, foi feito o teste histoquímico para atividade de GUS e assim confirmar se ocorreu a expressão do gene repórter. O vetor pCAMBIA 3301 possui o gene da beta-glucuronidase (*gusA*), com o íntron da catalase sob o controle do promotor 35S do CAMV, para expressão constitutiva em diferentes tecidos vegetais. O gene *gusA* passou a ser amplamente utilizado como gene marcador desde que foi testado, pela primeira vez, em plantas transgênicas (Jefferson et al., 1987). Foi utilizado este gene repórter devido a sua simplicidade, rapidez e versatilidade do método de detecção da atividade enzimática e ao fato de

que a maioria das plantas não apresenta atividade endógena significativa (Jefferson and Wilson, 1991).

O método utilizado neste trabalho foi o histoquímico, que é um método qualitativo, baseado na clivagem do substrato X-gluc (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-glucuronídeo) pela β -glucuronidase. O produto desta reação, na presença de oxigênio, forma dímeros, resultando em um precipitado insolúvel de cor azul.

As amostras de folhas de plantas de alface infiltradas a vácuo com agrobactérias transformadas com os vetores de expressão pCam33-35BPV e pCam33-35PS-BPV foram submetidas ao teste histoquímico de GUS, na presença do substrato X-Gluc. Também foi feito o teste com um fragmento de folha de alface infiltrada com agrobactéria sem o vetor de expressão e com agrobactéria contendo apenas o vetor pCambia3301, sem o gene *LI* controles negativo e positivo da reação, respectivamente.

As plantas infectadas com agrobactéria contendo os vetores de expressão da proteína L1 e a contendo o vetor de controle positivo (pCambia3301) apresentaram a coloração azul na presença do substrato, indicando expressão transiente da enzima β -glucuronidase. Já a planta que foi infectada apenas com agrobactéria não transformada não apresentou a produção do substrato azul como esperado (Fig. 29).

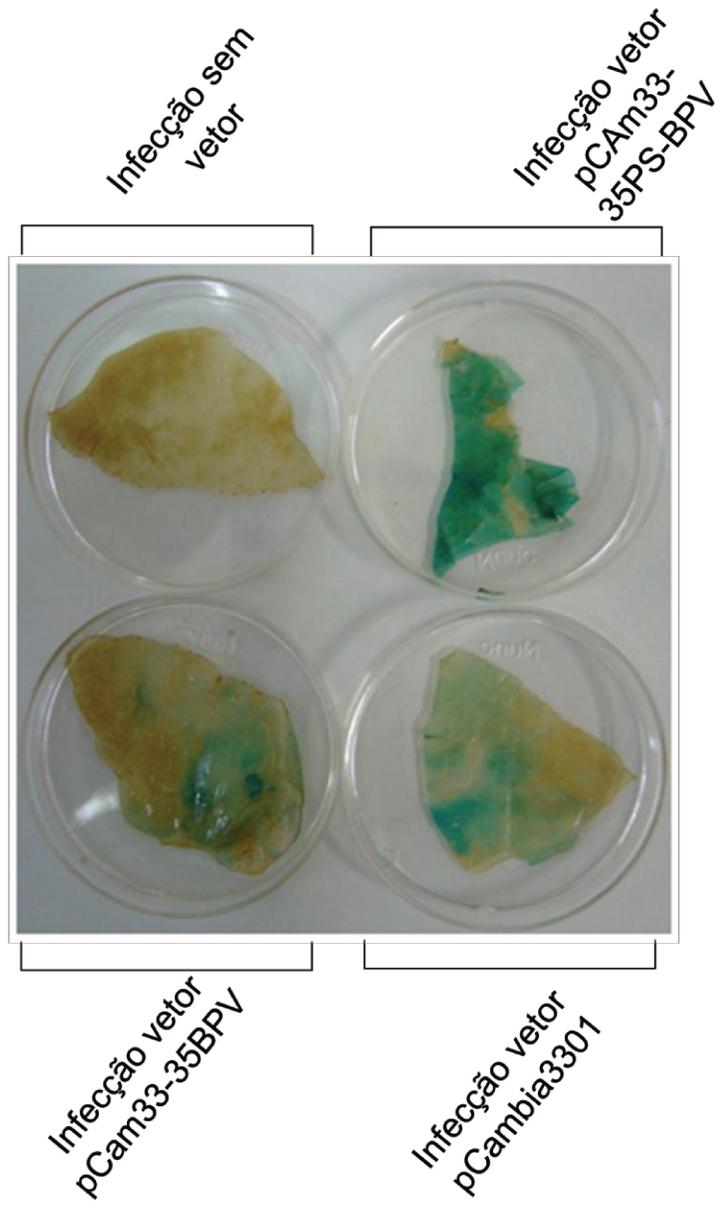


Figura 12: Teste histoquímico para avaliar a produção da enzima β -glucuronidase em folhas de alface. Folhas de alface foram infectadas com o gene *L1* precedido do peptídeo sinal (Vetor pCam33-35PS-BPV); com o gene *L1* sem o peptídeo sinal (Vetor pCam33-35BPV); com o pCambia3301, e com agrobactéria sem vetor.

4.3.4. Western blot proteínas de folhas de alface:

Após a confirmação da expressão transiente de GUS por teste histológico, foi feita a extração das proteínas totais de folhas de alface. Para verificar a presença da proteína L1 recombinante, as proteínas extraídas foram separadas eletroforéticamente pela técnica SDS-PAGE e analisadas por western blot utilizando o anticorpo anti-His-Tag. Não foi possível identificar a proteína L1 recombinante em extrato protéico de alface (Fig. 30) Porém também não foi possível identificar a proteína recombinante GUS presente nestes extratos, que também possui uma cauda de histidina (Fig. 30). Neste gel foi aplicado 1 µg do controle positivo (proteína L1 de BPV-4 purificada), que corresponde a 2,5% da proteína aplicada nas amostras de alface; por isso podemos supor que caso a expressão transiente em alface produza baixas quantidades de proteínas recombinantes (por exemplo, 0,1 a 1% da proteína total solúvel) o sinal poderia não ser detectado. Assim, mesmo que a produção de L1 possa ter ocorrido, níveis muito baixos de expressão não são desejáveis, por isso decidimos mudar o sistema de expressão e utilizar um novo organismo hospedeiro, o tabaco.

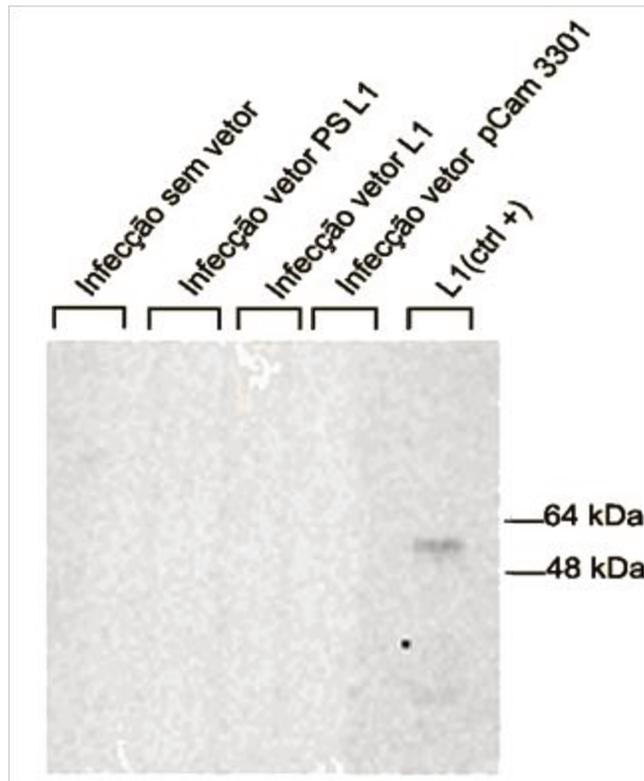


Figura 13: *Western blot* de extrato proteico de folhas de alface utilizadas para a expressão transiente da proteína L1. Foram usados extratos proteicos de folhas de alface infectadas com o gene *L1* precedido do peptídeo sinal (Vetor pCam33-35PS-BPV); com o gene *L1* sem o peptídeo sinal (Vetor pCam33-35BPV); com o pCambia3301 e com agrobactéria sem vetor. O anticorpo utilizado foi o antiHis-Tag. O controle positivo da reação foi a proteína L1 recombinante de BPV-4 (cedido pelo Laboratório de Genética – Instituto Butantan) que possui uma cauda de histidina. O peso molecular esperado da proteína L1 recombinante é de 56 kDa.

4.3.5. *Obtenção de plantas transgênicas de tabaco:*

Para a obtenção de plantas de tabaco transgênicas foi feita a infecção de 100 explantes de folha de tabaco para cada vetor de expressão. Foram obtidas 91 plantas transformadas com o vetor pCambia2300 e pCambia3301 contendo diferentes tipos de cassetes de expressão (Tabela 7). Estas plantas se desenvolveram até a formação de raiz e foram mantidas em casa de vegetação até a produção de sementes.

Tabela 4: Número de plantas resistentes à fosfotricina ou canamicina obtidas através da transformação genética de tabaco com diferentes vetores de expressão. O X indica que estes vetores não foram utilizados para a transformação genética de plantas:

Vetor	PGK PSC	PGK	35S PSC	35S
pCam 3301 (L1 nativo)	11	9	9	0
pCam 2300 (L1 nativo)	12	15	X	X
pCam 2300 (L1 otimizado)	17	18	X	X

4.3.6. Teste histoquímico para atividade de GUS em tabaco:

A expressão do gene *gus* contido no T-DNA do plasmídeo utilizado na transformação das plantas depende, entre outros fatores, do sítio em que o fragmento de DNA de transferência é integrado. Com base nesta premissa, foi verificado se as plantas de tabaco que tiveram a inserção do cassete de expressão da proteína L1 também expressam a enzima β -glucuronidase, para separarmos precocemente as melhores linhagens em relação à expressão dos dois genes (*gusA* e *L1*).

O teste histoquímico foi realizado em 29 plantas transformadas com o vetores pCambia3301 contendo os cassetes de expressão da proteína L1 e em plantas selvagens. Verificamos a expressão de Gus em 8 plantas transgênicas devido à reação da enzima β -glucuronidase com o substrato X-gluc, indicando que os genes dos cassetes de expressão foram integrados em uma região ativa do genoma de tabaco (Fig. 31).

A proteína GUS codificada pelo gene *gusA*, presente no vetor pCambia3301, também possui uma cauda de histidina. Através da predição de seu peso molecular pelo programa ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>), verificamos que seu peso era de 57 kDa, muito próximo ao da proteína L1 recombinante (56 kDa). A presença desta cauda de histidina e a

semelhança de peso molecular poderiam interferir tanto na purificação proteica por cromatografia de afinidade quanto na identificação da proteína recombinante por *western blot* utilizando o anticorpo anti-His Tag. Devido a isto, decidimos focar as análises posteriores apenas nas plantas transformadas com os vetores produzidos a partir do pCambia2300, já que eles não possuem o gene *gusA*.

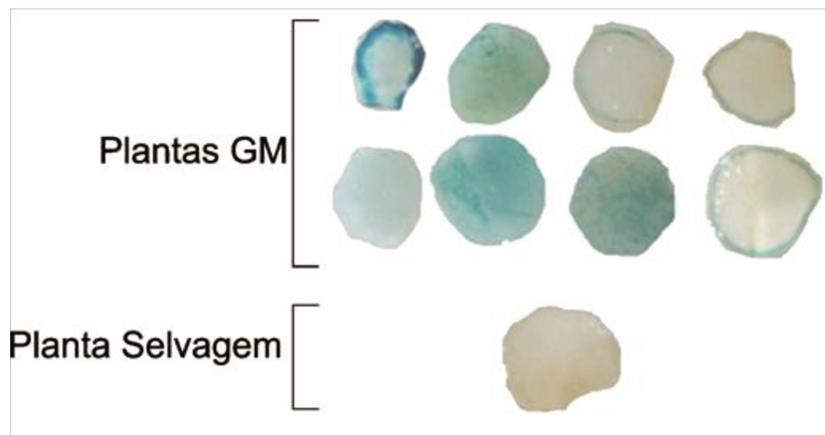


Figura 14: Teste histoquímico para avaliar a produção da enzima β -glucuronidase em folhas de tabaco. Analisamos folhas de tabacos transgênicos transformados com vetores pCambia3301 (Plantas GM), e folhas de planta selvagem.

4.3.7. PCR de DNA genômico de tabaco:

A confirmação da integração do gene *L1* no genoma de plantas de tabacos transformadas foi realizada por PCR de DNA genômico, utilizando-se primers específicos para a sequência codificadora da proteína L1. Confirmamos então, por PCR, que 35 plantas transformadas com os vetores pCam23-GK-BPV, pCam23-GK-PS-BPV, pCam23-GK-BPV-Opt e pCam23-GK-PS-BPV-Opt apresentaram a amplificação de aproximadamente 1500 pb, correspondente ao gene *L1* completo (Fig. 32). Desta maneira, foi confirmado que a transformação genética de tabaco foi

eficiente e as plantas PCR positivas foram mantidas em casa de vegetação para análises posteriores.

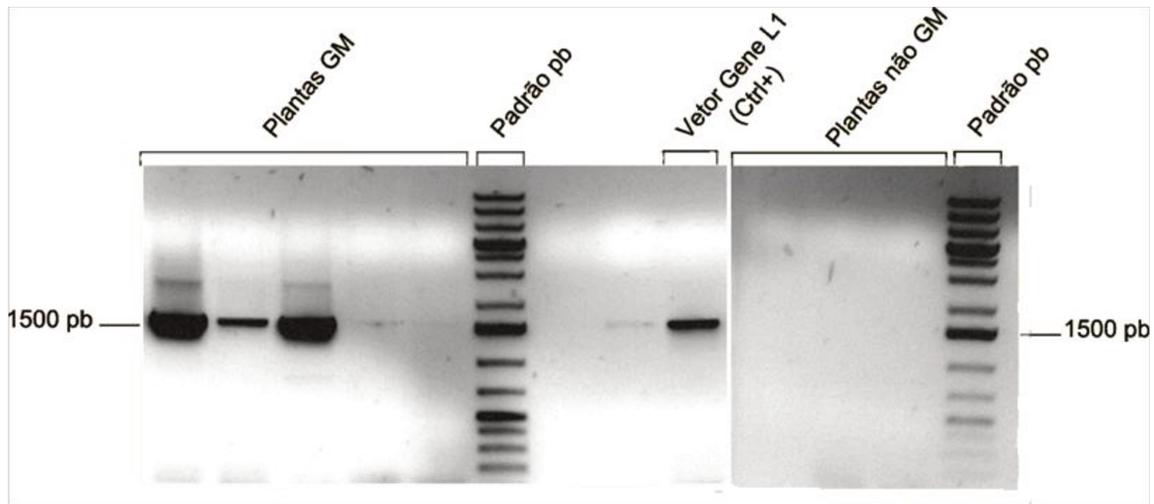


Figura 15: PCR de DNA genômico de plantas transgênicas utilizando primers específicos para o gene *L1*. Verificamos a integração do gene *L1* em plantas resistentes ao antibiótico canamicina (Plantas GM). Como controle positivo da reação utilizamos, vetor de expressão pCam2300-GK-BPVOpt (Vetor Gene *L1* – Ctrl +) e DNA de plantas selvagens como controle negativo (Plantas não GM). Padrão de nucleotídeos (Padrão pb) Gene Ruler 1Kb Plus Ladder (Life, EUA). Tamanho esperado de banda positiva de aproximadamente 1500 pb. Esta figura representa apenas uma parcela das análises realizadas.

4.3.8. Análise da expressão do gene *L1* por RT-PCR:

Amostras de cDNAs obtidas a partir de RNA de sementes de plantas PCR positivas foram amplificadas por reação de PCR, utilizando-se primers específicos para o gene *L1*. A transcrição do gene *L1* nativo ou otimizado foi confirmada pela amplificação de um fragmento de DNA de aproximadamente 1500. Dentre 20 plantas analisadas foi possível confirmar a transcrição de *L1* em apenas 8 (Fig. 33), indicando um possível silenciamento da expressão na maioria dos eventos de transformação.

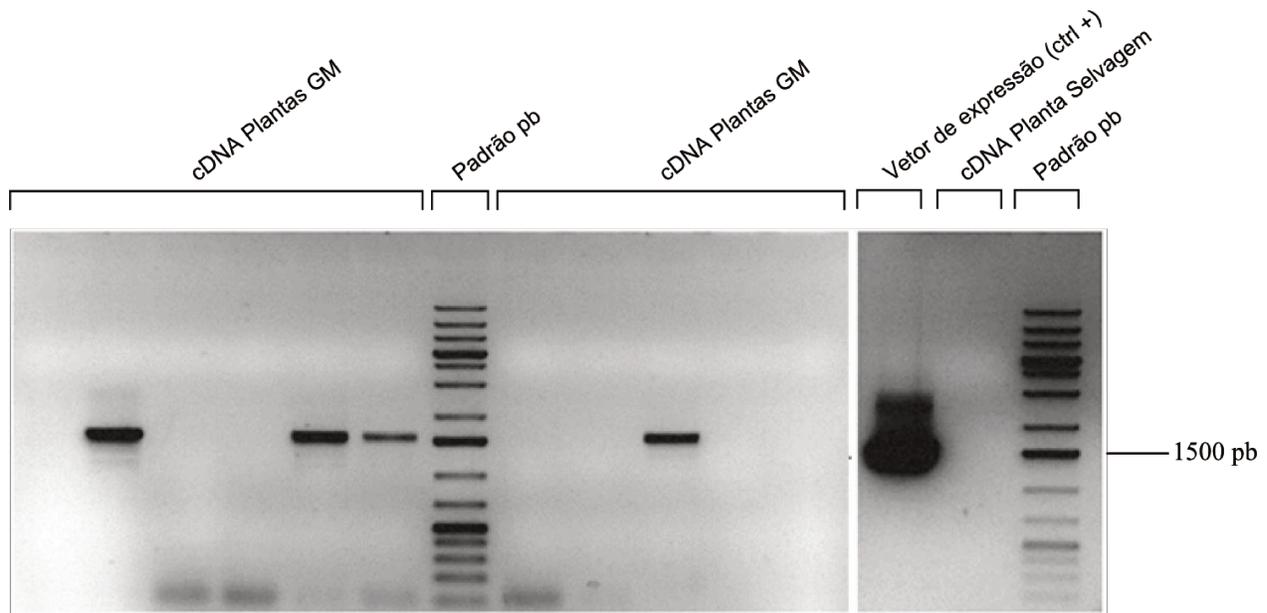


Figura 16: RT-PCR de plantas de tabaco transgênicas. Amplificação por PCR de cDNA obtido a partir de RNA extraído de sementes, utilizando primers específicos para o gene *L1*. Foram analisados cDNAs de plantas de tabaco transgênicas (cDNA Plantas GM), amostra de cDNA de plantas selvagens (cDNA Planta Selvagem) como controle negativo. Como controle positivo utilizou-se o vetor de expressão pCam2300-GK-BPVOpt (Vetor de expressão – ctrl+). Padrão de nucleotídeos (Padrão pb) Gene Ruler 1Kb Plus Ladder (Life, EUA). O tamanho esperado de banda positiva é de aproximadamente 1500 pb. Esta figura representa apenas uma parcela das análises realizadas.

4.3.9. Western blot extrato proteico de sementes de tabaco:

Após a confirmação da transgenia por PCR de DNA genômico e da transcrição do gene *L1* em plantas transformadas com os vetores descritos anteriormente, foi feita a extração de proteínas totais de sementes de tabaco. As proteínas foram separadas eletroforicamente pela técnica de SDS-PAGE e transferidas para uma membrana de nitrocelulose. Visando a detecção da proteína recombinante foram utilizados os anticorpos monoclonais anti-HPV [BPV-1/1H8], anti-HPV [BPV-1/1H8 + CAMVIR] (Abcam, EUA) e anti-His Tag (GE Healthcare, Alemanha).

O Anticorpo anti-HPV [BPV-1/1H8] ligou-se inespecificamente em uma proteína de

aproximadamente 50 kDa, presente tanto em extrato proteico de sementes de tabaco transgênico quanto de tabaco selvagem (Fig. 34).

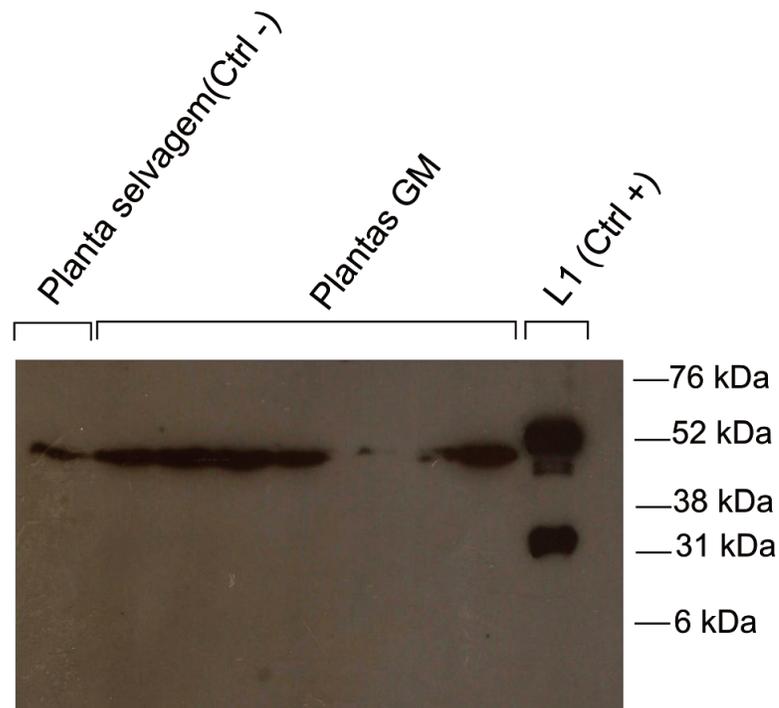


Figura 17: *Western blot* de extrato proteico de sementes de tabacos transgênicos. Foram avaliados extratos proteicos de sementes de tabacos transformados geneticamente com os vetores de expressão pCam23-GK-BPV, pCam23-GK-PS-BPV, pCam23-GK-BPV-Opt e pCam23-GK-PS-BPV-Opt (Plantas GM). Como controle negativo utilizou-se extrato proteico de sementes de tabaco selvagem (Planta Selvagem – Ctrl -). Como controle positivo utilizamos a proteína L1 expressa em *E. coli* (L1 – Ctrl +). Anticorpo primário anti-HPV [BPV-1/1H8]. Padrão de Peso Molecular Full Range Rainbow (GE Healthcare, Alemanha). Banda proteica esperada de 56 kDa.

Já o anticorpo anti-HPV [BPV-1/1H8 + CAMVIR] ligou-se a diversas proteínas de peso molecular de aproximadamente 50, 56, 45 e 6 kDa. Apesar de se ligar a uma proteína de peso semelhante a esperada pela proteína L1 recombinante de 56 kDa, ele também se ligou a uma proteína de mesmo peso molecular em tabaco selvagem, impossibilitando diferenciar as plantas transgênicas das selvagens (Fig. 35).

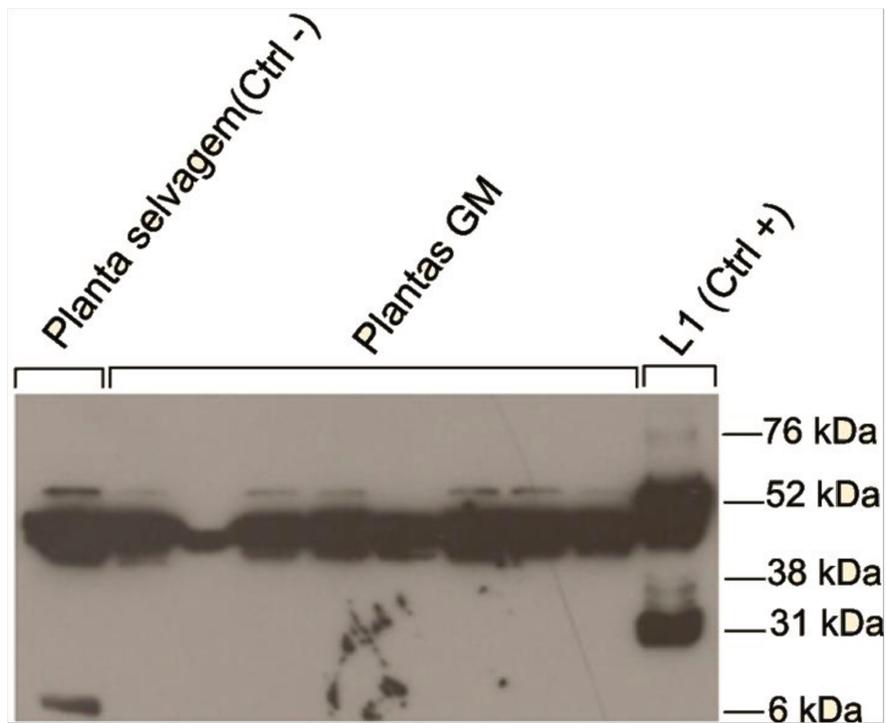


Figura 18: *Western blot* de extrato proteico de sementes de tabacos transgênicos. Foram avaliados extratos proteicos de sementes de tabacos transformados com os vetores de expressão pCam23-GK-BPV, pCam23-GK-PS-BPV, pCam23-GK-BPV-Opt e pCam23-GK-PS-BPV-Opt (Plantas GM). Como controle negativo foi utilizado extrato proteico de sementes de tabaco selvagem (Planta Selvagem – Ctrl -). Como controle positivo utilizamos a proteína L1 expressa em *E. coli* (L1 – Ctrl +). Anticorpo primário anti-HPV [BPV-1/1H8 + CAMVIR]. Padrão de Peso Molecular Full Range Rainbow (GE Healthcare, Alemanha). Banda proteica esperada de 56 kDa.

Por fim temos o *western blot* realizado com o anticorpo anti-His Tag, que não identificou proteínas tanto provenientes de tabaco selvagem quanto de transgênicos (Fig. 36). Apesar do sinal fraco, conseguimos identificar a proteína L1 expressa em *E. coli*.

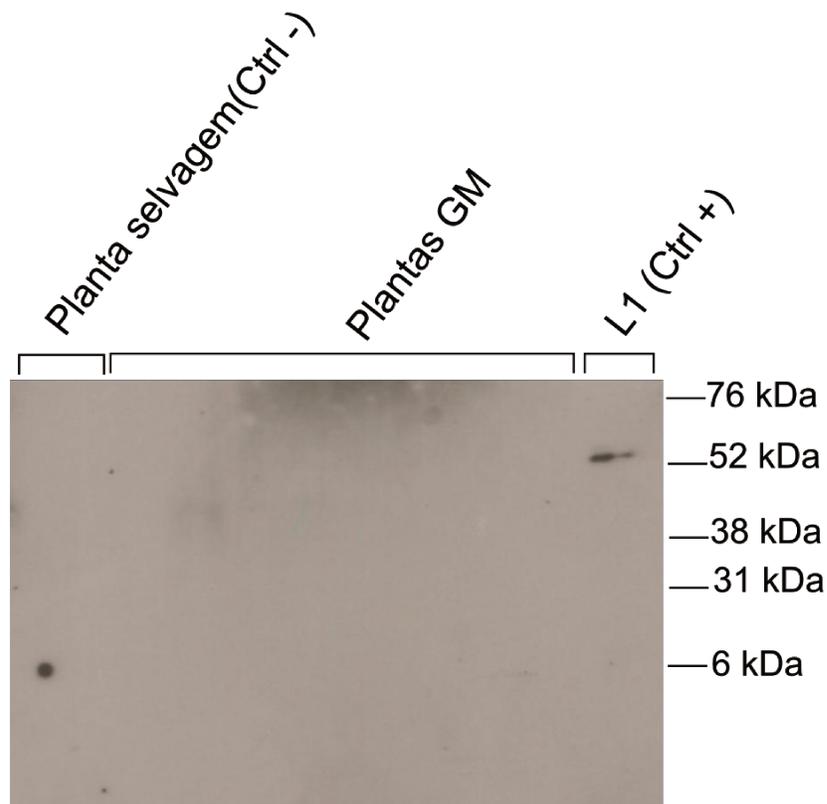


Figura 19: *Western blot* de extrato proteico de sementes de tabacos transgênicos. Foram analisados extrato proteico de sementes de tabacos transformados geneticamente com os vetores de expressão pCam23-GK-BPV, pCam23-GK-PS-BPV, pCam23-GK-BPV-Opt e pCam23-GK-PS-BPV-Opt (Plantas GM). Como controle negativo utilizamos extrato proteico de sementes de tabaco selvagem (Planta Selvagem – Ctrl -). Como controle positivo utilizamos a proteína L1 expressa em *E. coli* (L1 – Ctrl +). Anticorpo primário anti-His Tag. Padrão de Peso Molecular Full Range Rainbow (GE Healthcare, Alemanha). Banda proteica esperada de 56 kDa.

4.3.10. Microscopia eletrônica:

Amostras de proteínas de sementes de tabaco transgênicas, obtidas através da transformação genética, foram ultracentrifugadas em colchão de sacarose para separar possíveis VLPs formadas pela proteína L1 recombinante. Após a centrifugação, o precipitado foi ressuspenso em tampão PBS, então fixado em grades para microscopia eletrônica e analisado em microscopia eletrônica de transmissão. Foi possível visualizar uma estrutura de aproximadamente 50 nm, análogas à VLPs obtida somente com a proteína L1 (Kirnbauer et al., 1992) (Fig. 37).

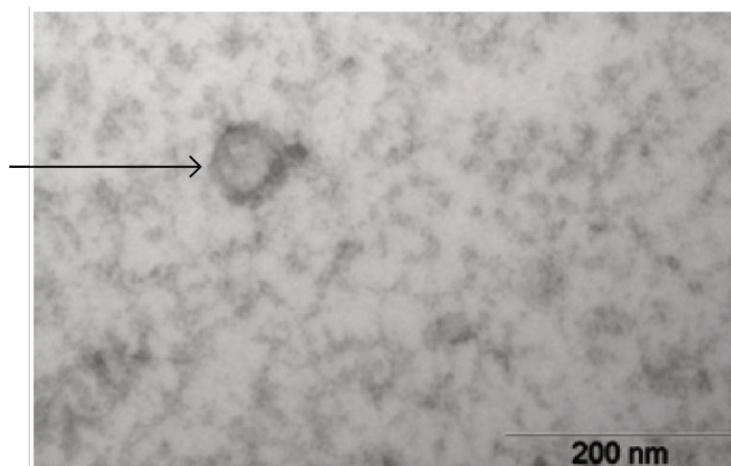


Figura 20: Microscopia eletrônica de extrato proteico de sementes de tabaco

4.3.11. Espectrometria de massa:

Visando contornar os problemas de inespecificidade dos anticorpos utilizados para a detecção da proteína recombinante em plantas transgênicas, utilizamos a técnica de espectrometria de massa. Para isso, foram realizadas diversas análises em tipos diferentes de equipamentos.

As amostras analisadas no equipamento Q-TofPREMIER foram obtidas através da separação de proteínas totais solúveis de sementes de tabaco por eletroforese em gel de acrilamida. A região do gel selecionada para a digestão peptídica “*in gel*” foi aquela na qual

estavam presentes proteínas com peso molecular entre 50 e 60 kDa. Após a análise dos peptídeos, verificamos que a L1 recombinante não foi identificada (Tabela 8).

Já as amostras analisadas no equipamento MALDI TOF/TOF 5800 foram obtidas também da mesma forma descrita anteriormente, porém foi feita também a análise de proteínas insolúveis (solubilizadas em ureia 8 M). Entretanto, também não foi possível detectar a proteína L1 recombinante em ambas as frações (Tabela 8).

A partir destes resultados optamos por realizar a análise de todas as proteínas presentes em sementes de tabaco com a técnica de nanoUPLC-MS. Esta técnica é capaz de detectar e quantificar proteínas recombinantes presentes em um extrato proteico complexo, mesmo que sua expressão seja de baixo nível. Em todas as 5 amostras de sementes transgênicas analisadas não foi possível detectar a L1 recombinante. A fração purificada de L1 produzida em *E. coli* foi detectada (Tabela 8).

Para verificar se proteínas endógenas de tabaco estavam interferindo nos resultados, também fizemos um experimento de adição (*spike*), onde a proteína recombinante L1, proveniente de *E. coli*, foi adicionada ao extrato proteico de sementes de tabaco e posteriormente analisada pela espectrometria de massa nanoUPLC-MS. Desta maneira foi identificado aproximadamente 2 ng de L1, mostrando que proteínas endógenas de tabaco não interferem no resultado de espectrometria (Tabela 8).

Os resultados de espectrometria de massa sugerem que a expressão da proteína recombinante não está ocorrendo ou ocorre em níveis muito baixos, impossibilitando a detecção por espectrometria de massa. A segunda opção é a mais plausível, já que confirmamos por PCR que as plantas transformadas continham o gene *L1* integrado em seu genoma, além de confirmamos por RT-PCR que a transcrição do gene *L1* ocorre em diversas plantas utilizadas nas análises de espectrometria de massa. Por isso acreditamos que, mesmo ocorrendo esta

transcrição, a expressão foi muito baixa do detectável ou a proteína expressa possa ter sido degradada rapidamente.

Tabela 5: Identificação da proteína L1 recombinante em plantas por espectrometria de massa. A presença da L1 recombinante é demonstrada pelo sinal +. O sinal – indica que a L1 não foi detectada. Já o X indica a amostra não foi avaliada em um determinado equipamento.

Técnica MS	Plantas GM Fração Solúvel	Plantas GM Fração Insolúvel	L1 <i>E. coli</i>	"Spike"
Q-TofPREMIER	-	X	+	X
MALDI TOF/TOF 5800	-	-	+	X
nanoUPLC-MS	-	X	+	+

5. DISCUSSÃO GERAL

A papilomatose bovina está assolando o rebanho nacional (assim como as enfermidades associadas, hematuria enzoótica e “caraguatá”), sem que haja estratégias efetivas de controle, sendo responsável por importantes perdas para a pecuária. O estabelecimento de processos vacinais com sua efetividade verificada com acurácea científica é altamente desejável, perante a gravidade da doença.

Os papilomavírus não podem ser cultivados em laboratório e, desta maneira, não é possível a produção de antígenos para testes sorológicos e para o desenvolvimento de vacinas convencionais baseadas em vírus inativado (Da Silva et al., 2001). Devido a esta incapacidade de se obter vírions a partir de culturas celulares “*in vitro*”, o desenvolvimento de processos de produção de proteínas virais de forma recombinante representa a melhor forma de se obter antígenos que podem não só ser utilizados na produção de compostos vacinais, mas também para o desenvolvimento de anticorpos que possam ser utilizados em testes de diagnóstico da doença, pela identificação da presença do vírus.

Devido à necessidade da obtenção de proteínas de papilomavírus de forma recombinante, desenvolvemos e padronizamos em um sistema bacteriano uma plataforma de expressão, purificação e identificação da proteína recombinante L1 de BPV-1.

Após a expressão da proteína L1 em *E. coli*, foram testadas duas estratégias de purificação: uma através de cromatografia de afinidade por His-Tag (dados não mostrados) e outra através de cromatografia de troca iônica (IEX). A eficácia da cromatografia de IEX foi maior quando comparada com a de afinidade, resultado de acordo com o obtido na purificação da L1 de HPV-16 produzida em *E.coli* (Lai and Middelberg, 2002). No entanto obtivemos uma fração de L1 de BPV-1 com praticamente sem suas degradações, o que não ocorreu no trabalho desenvolvido por Lai e Middelberg (Lai and Middelberg, 2002). Já a análise por espectrometria de massa demonstrou que a cromatografia de troca iônica permitiu que a proteína L1

recombinante fosse obtida em frações de alta pureza, já que ela foi identificada sem a presença de outras proteínas contaminantes.

Os anticorpos antiHPV da Abcam utilizados apresentaram inespecificidade na detecção da L1 produzida em tabaco. Devido a isto surgiu a necessidade de utilizar técnicas mais sensíveis para a detecção da L1. Dessa forma utilizamos técnica de espectrometria, que foi essencial para avaliar a expressão da proteína L1 recombinante.

O desenvolvimento da plataforma de produção da proteína L1 em *E.coli* permitiu a obtenção desta proteína para ser utilizada posteriormente no desenvolvimento de produtos vacinais e na produção de anticorpos policlonais e/ou monoclonais. Estes anticorpos poderão auxiliar na pesquisa de papilomavírus como, entre outros, na produção de testes de diagnóstico rápido da doença.

Após a obtenção da plataforma de expressão em sistema bacteriano, prosseguimos com desenvolvimento de estratégias para a produção de L1 de BPV-1 em sistemas de expressão mais complexos e que permitam a produção de VLPs, no caso, modelos vegetais (alface e tabaco). Em alface, utilizamos a metodologia para a expressão da proteína recombinante de forma transiente em folhas. Confirmamos que a expressão de GUS estava ocorrendo através do teste histoquímico, porém a uma possível baixa expressão proteica não foi identificada por *western blot* a presença da proteína L1 nem da β -glucuronidase. Uma baixa expressão de proteínas recombinantes em alface também foi observada na produção da proteína ChIFN- α (alfa interferon de frango), cujo nível expressão foi de somente 0,004% de proteína total solúvel (Song et al., 2008). A partir disto, utilizamos o tabaco como organismo hospedeiro.

A identificação β -glucuronidase pelo teste histoquímico e não por *western blot* pode ser explicada pelo fato dessa proteína quando expressa em alface, a um nível de 1,1% de proteína total solúvel, é capaz de ser detectada pelo teste histoquímico (Joh et al., 2005). Assim, mesmo que tivéssemos obtido esse nível de expressão, não seria possível identificá-la por *western blot*, já

que o limite de detecção do anticorpo anti His foi de 1 µg de proteína L1 de BPV-4. Ademais, o nível de coloração obtido pelo teste histoquímico não reflete na concentração da proteína β-glucuronidase, que por ser altamente estável, possibilita que a reação com o substrato X-Gluc ocorra durante horas, desta forma permitindo que ocorra formação intensa de coloração azul (Jefferson et al., 1987).

Visando identificar qual seria a melhor estratégia para expressar a L1 em tabaco, produzimos cassetes de expressão que continham o gene *L1* nativo ou otimizado e, adicionalmente, fizemos a adição do peptídeo sinal da α-coixina em algumas construções para endereçar a proteína recombinante para o retículo endoplasmático. Em todos os cassetes utilizamos o promotor da γ-kafirina para que a expressão ocorresse somente em sementes, um ambiente mais estável e com menos degradação proteica. Confirmamos por PCR de DNA genômico que o gene *L1* foi integrado no genoma de tabaco e por RT-PCR de cDNA, obtido através de mRNA presentes em sementes transgênicas, confirmamos a transcrição do gene recombinante.

A identificação da proteína recombinante L1 não foi possível através de *western blot*, já que os anticorpos utilizados apresentaram inespecificidade, ligando-se a diversas proteínas encontradas em tabaco selvagem. Segundo a empresa Abcam, o anticorpo antiHPV [BPV-1/1H] é produzido a partir de vírions do BPV-1 e é capaz de identificar a proteína L1. Já o anticorpo antiHPV [BPV-1/1H + CAMVIR] é composto pelo antiHPV [BPV-1/1H], mas contém também um outro anticorpo contra L1 de HPV-16. Ambos os anticorpos, mesmo sendo monoclonais, apresentaram inespecificidade, impossibilitando diferenciar plantas transgênicas das selvagens. Por isso, a produção da L1 recombinante em *E. coli* pode contribuir para o desenvolvimento de anticorpos mais específicos e melhores para estudos de expressão em plantas.

Para contornar os problemas com os anticorpos, tentamos identificar a proteína recombinante por espectrometria de massa, porém não foi possível confirmar a expressão de L1.

Isto ocorreu possivelmente devido a sua baixa expressão, que pode ter ocorrido em função de eventuais problemas na tradução do mRNA e/ou a degradação da própria proteína.

Em um trabalho publicado por outro grupo durante o desenvolvimento deste projeto foi realizada a expressão de forma transiente da proteína L1 de BPV-1 em folhas de *N. benthamiana*. Foi verificado que com uso do gene *L1* nativo os níveis de expressão são quase indetectáveis, mas com a otimização de códons o nível da expressão aumenta consideravelmente (Love et al., 2012). A detecção da proteína recombinante por este grupo pode ter ocorrido devido à utilização de um promotor mais forte que o da γ -kafirina, no caso o p35S, o que permitiu uma maior expressão de L1. Existe também a possibilidade da sequência otimizada utilizada ser diferente da utilizada em nosso trabalho, o que pode explicar o porquê de, mesmo com a otimização da utilização de códons, nossa sequência não possibilitou um aumento da expressão de L1. Um resultado semelhante foi obtido quando a L1 de HPV-16 foi otimizada para a utilização de códons de plantas e expressa em *N. benthamiana*: neste caso, o gene nativo teve uma melhor expressão do que a observada em plantas transformadas com o gene sintético (Maclean et al., 2007).

6. CONCLUSÕES

- A clonagem, expressão e purificação da proteína L1 foi realizada com sucesso em *E. coli*, obtendo-se frações desta proteína com alto grau de pureza.
- Foi estabelecida a padronização de uma metodologia para a produção de proteínas recombinantes de papilomavírus a partir de *E. coli*, aplicável ao desenvolvimento de vacinas.
- Os anticorpos disponíveis no mercado apresentaram falta de especificidade para a detecção da proteína L1 nas plantas transgênicas, o que impediu a confirmação da expressão recombinante, que pode ter ocorrido em função de eventuais problemas na tradução do mRNA e/ou a degradação da própria proteína.
- Técnicas de biologia molecular confirmaram a transformação genética de plantas de tabaco e a transcrição do gene *L1* do BPV-1. Entretanto, não foi possível identificar a presença da proteína L1 recombinante nas plantas GM empregando espectrometria de massa.

7. PERSPECTIVAS FUTURAS

- *L1 produzida em E. coli:*
 - A proteína L1 obtida em *E. coli* poderá ser testada para produção de vacina profilática. Igualmente também será analisada a sua capacidade de formar capsômeros ou VLPs espontaneamente, o que pode ampliar o potencial imunológico da proteína.
 - A L1 recombinante será utilizada para a produção de anticorpos monoclonais (parceria IBU-USP), que poderão ser utilizados por institutos de pesquisa e no desenvolvimento de testes de diagnóstico rápido da papilomatose bovina em um projeto empresarial de inovação tecnológica do Programa de Pesquisa Inovativa em Pequenas Empresas PIPE-Fapesp (Empresa Immunogold).
 - A plataforma padronizada de expressão e purificação da proteína recombinante em *E. coli* será adaptada para a produção de vacinas contra HPV.
- *Plantas como biorreatores para a produção proteínas recombinantes do papilomavírus:*
 - A continuação dos experimentos relacionados à produção da proteína L1 do BPV-1 em plantas transgênicas poderá ser abordada empregando outras construções de DNA, com outras estratégias de otimização e mesmo outros sistemas de detecção (peptídeo FLAG, por exemplo).
 - Alternativamente, devido à ausência ou baixa expressão da proteína recombinante, outras estratégias de produção de plantas transgênicas podem ser utilizadas, como por exemplo, o uso de um promotor mais forte e a produção transiente da proteína L1 em outros organismos hospedeiros vegetais.

8. MATERIAL COMPLEMENTAR

Sequência 1: Gene *LI* nativo. Sequência de DNA do gene *LI* nativo. Em itálico temos a região dos primers P-ATGHisBPV (início na base 1), P-ATGPSHisBPV (início na base 6) e P-StopBPV (início na base 1526) utilizados na amplificação por PCR. As regiões reconhecidas por enzimas de restrição estão sublinhadas. Em destaque vermelho temos a sequência codificadora da cauda de histidina (6xHis).

```
1  CATCCATGGC ACATCATCAT CATCATCAT TGGCGTTGTG GCAACAAGGC 50
51 CAGAAGCTGT ATCTCCCTCC AACCCCTGTA AGCAAGGTGC TTTGCAGTGA 100
101 AACCTATGTG CAAAGAAAAA ACATTTTTTA TCATGCAGAA ACGGAGCGCC 150
151 TGCTAACTAT AGGACATCCA TATTACCCAG TGTCTATCGG GGACAAAAC 200
201 GTTCCTAAGG TCTCTGCAA TCAGTATAGG GTATTTAAAA TACAGCTACC 250
251 TGATCCCAAT CAATTTGCAC TACCTGACAG GACTGTTCAC AACCCAAGTA 300
301 AAGAGCGGCT GGTGTGGGCA GTCATAGGTG TGCAAGTGTG CAGAGGGCAG 350
351 CCTCTTGGAG GTACTGTAAC TGGGCACCCC ACTTTTAATG CTTTGCTTGA 400
401 TGCAGAAAAAT GTGAATAGAA AAGTCACCAC CCAAACAACA GATGACAGGA 450
451 AACAAACAGG CTTAGATGCT AAGCAACAAC AGATTTTGTT GCTAGGCTGT 500
501 ACCCCTGCTG AAGGGGAATA TTGGACAACA GCCCGTCCAT GTGTTACTGA 550
551 TCGTCCAGAT AAAGGCGCCT GCCCTCCTCT TGAATTAATA AACACACACA 600
601 TAGAAGATGG GGATATGATG GAAATTTGGT TTGGTGCAGC CAACTTCAAA 650
651 GAAATTAATG CAAGTAAATC AGATCTACCT CTTGACATTC AAAATGAGAT 700
701 CTGCTTGTAC CCAGACTACC TCAAAATGGC TGAGGACGCT GCTGGTAATA 750
751 GCATGTTCTT TTTTGCAAGG AAAGAGCAGG TGTATGTTAG ACACATCTGG 800
801 ACCAGAGGGG GCTCGGAGAA AGAAGCCCCT AGTACAGAAT TTTATTTAAA 850
851 AAATAATAAA GGGGATGCCA GCCTTAAAAT ACCCAGTGTG CATTTTGGAA 900
901 GTCCAGTGG CTCACTAGTC TCAACTGATA ATCAAATTTT TAATCGGCCT 950
951 TACTGGCTAT TCCGTGCCA GGGCATGTAC AATGGAATTG CATGGAATAA 1000
1001 TTTATTGTTT TTAACAGTGG GGGACAATAC ACGTGGTACT AATCTTACCA 1050
1051 TAAGTGTAGC CTCAGATGAG ACCCCACTAA AAGAGTATGA TAGCACAAAA 1100
1101 TTCAATGTAT ACCATAGACA TATGGAAGAA TATAAGCTAG CCTTTATATT 1150
1151 AGAGCTATGC TCTGTGGAAA TCACAGCTCA AACTGTGTCA CATCTGCAAG 1200
1201 GACTTATGCC CTCTGTGCTT CAAAATTGGG AAATAGGTGT GCAGCCTCCT 1250
1251 ACCTCATCGA TATTAGAGGA CACCTATCGG TATATAGAGT CTCCTGCAAC 1300
1301 TAAATGTGCA AGCAATGTAA TTCCTGCAAA AGAAGACCCT TATGCAGGGT 1350
1351 TTAAATTTTG GAACATAGAT CTTAAAGAAA AGCTTTCTTT GGACTTAGAT 1400
1401 CAATTTCCCT TGGGAAGAAG ATTTTTAGCA CAGCAAGGGG CAGGATGTTT 1450
1451 CACTGTGAGA AAACGAAGAA TTAGCCAAAA AACTTCCAGT AAGCCTGCAA 1500
1501 AAAAAAAAAA AAAATAACGG ATCCCG 1526
```

Sequência 2: Peptídeo sinal otimizado. Sequências de DNA codificadoras do peptídeo sinal da α -coixina otimizados de acordo com a utilização de códons de tabaco. A região 5' do PS2 foi fosforilado (Fos) para permitir a ligação do PSC ao gene *LI* :

PS1: 5`CAT GCC ATG GCT ACT AAG ATT TTC GCT TTG CTT GTG TTG CTT
GCT TTG TCA GCT TCT GCT ACT ACT GCA -3`

PS2: 5`-5Fos/TGC AGT AGC AGA AGC TGA CAA AGC AAG CAA CAC AAG CAA
AGC GAA AAT CTT AGT AGC CAT GGC ATG -3`.

Sequência 3: Gene *LI* otimizado de acordo com a utilização de códons de tabaco: Sequência do gene *LI* sintetizado após a sua otimização de códons. Em itálico temos a região dos primers P-BPVOptSenso (início na base 1) e P-BPVOptStop (início na base 1520) utilizados na amplificação por PCR. As regiões reconhecidas por enzimas de restrição estão sublinhadas. Em destaque vermelho temos a sequência codificadora da cauda de histidina (6xHis).

1	<u>CCATGGCTCA</u>	TCATCATCAT	CATCAC	ATGG	CTCTCTGGCA	GCAAGGTCAA	50
51	AAATTGTATC	TCCCTCCAAC	TCCTGTTTCA	AAGGTGTTAT	GCTCAGAAAC		100
101	TTATGTTTCA	AGAAAAAGTA	TTTTCTACCA	TGCTGAAACA	GAGAGGCTTT		150
151	TGACTATCGG	ACACCCATAT	TACCCTGTTT	CAATTGGTGC	TAAGACTGTT		200
201	CCAAAAGTGA	GTGCAAATCA	ATATAGAGTG	TTCAAATCC	AGCTTCCAGA		250
251	TCCTAATCAA	TTTGCTTTGC	CAGATAGAAC	AGTTCATAAC	CCTTCTAAGG		300
301	AAAGGCTTGT	TTGGGCAGTG	ATTGGAGTTC	AGGTGTCAAG	GGGTCAACCA		350
351	TTGGGAGGTA	CTGTGACAGG	ACACCCTACT	TTTAATGCTT	TACTCGATGC		400
401	AGAGAATGTT	AACAGAAAAG	TGACTACACA	GACTACAGAT	GATAGGAAGC		450
451	AAACAGGTTT	GGATGCTAAA	CAACAGCAAA	TTCTTTTGTG	AGGATGTACT		500
501	CCAGCTGAAG	GAGAGTACTG	GACTACAGCA	AGACCTTGTG	TTACAGATAG		550
551	GCTTGAAAAT	GGTGCTTGCC	CACCTTTGGA	GTTAAAGAAC	AAACATATCG		600
601	AAGATGGAGA	TATGATGGAG	ATTGGATTTC	GTGCTGCAAA	CTTCAAGGAA		650
651	ATTAACGCCT	CTAAATCAGA	TCTCCCCTT	GATATTCAGA	ATGAGATATG		700
701	CCTTTTCTCT	GATTACTTGA	AGATGGCTGA	GGATGCTGCT	GGAAACAGTA		750
751	TGTTTTTCTT	TGCAAGAAAAG	GAGCAAGTTT	ATGTGAGACA	TATATGGACT		800
801	AGGGGAGGTT	CTGAAAAGGA	GGCTCCAAC	ACAGATTTCT	ACTTAAAGAA		850
851	TAACAAAGGA	GATGCAACTC	TCAAAATTCC	ATCCGTTTAC	TTTGGAAGTC		900
901	CTTCCGGTTC	TTTGGTGAGT	ACAGATAATC	AGATTTTCAA	CAGACCTTAT		950
951	TGGCTTTTTTA	GGGCTCAGGG	TATGAATAAC	GGAATAGCAT	GGAATAACCT		1000
1001	CCTTTTTTCTT	ACAGTTGGAG	ATAACACTAG	AGGTACAAAC	TTGACTATAT		1050
1051	CAGTGGCTAG	TGATGGAACA	CCACTCACTG	AATACGATTC	TTCAAAGTTC		1100
1101	AATGTTTATC	ATAGGCACAT	GGAAGAGTAC	AACTTGCTT	TTATATTGGA		1150
1151	ATTATGTTCA	GTTGAGATCA	CAGCACAGAC	TGTGTCCCAT	CTTCAAGGAC		1200
1201	TCATGCCATC	TGTTCTTGAA	AATTGGGAGA	TTGGTGTGCA	ACCACCTACA		1250
1251	AGTTCCATCC	TTGAAGATAC	TTACAGATAC	ATCGAGTCCC	CTGCTACTAA		1300
1301	GTGTGCATCT	AATGTTTATC	CAGCTAAGGA	AGATCCTTAT	GCAGGATTCA		1350
1351	AATTTTGGAA	CATCGATTTG	AAGGAGAAAC	TCTCACTTGA	TTTGGATCAA		1400
1401	TTCCCTTTAG	GTAGAAGGTT	TCTCGCTCAG	CAAGGAGCAG	GTTGCTCTAC		1450
1451	AGTTAGAAAA	AGAAGAATCT	CCCAGAAGAC	ATCATCAAAG	CCAGCAAAAA		1500
1501	AGAAAAAGAA	<u>GTGAGGATCC</u>					1520

Tabela de Primers: Primers utilizados no desenvolvimento deste trabalho:

Primer	Sequência
P-ATGHisBPV	5'-CATCCATGGCACATCATCATCATCATATGGCGTTGTGGCAA-3'
P-StopBPV	5'-CGGGATCCGTTATTTTTTTTTTTTTTTTGC-3'
P-T7Pro	5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'
P-17Ter	5'-GCTAGTTATTGCTCAGCGG-3'
P-ATGPSHisBPV	5'-ATGGCACATCATCATCATCATATGGCGTTGTGGCAA-3'
P-BPVOptSenso	5'-CCATGGCTCATCATCATCATCAC-3'
P-BPVOptStop	5'-CGGGATCCTCACTTCTTTTTCTTTT-3'
P-Cons5'	5'-CCCTCGTACGCCTATGCAC-3'
P-Cons3'	5'-CTTATCTGGGAAGTACTCACAC-3'
P-P35S	5'-ATGGACCCCAACCACGA-3'



Ofic. CIBio/IB 17/2007

Cidade Universitária "Zeferino Vaz",
20 de agosto de 2007.

Prof. Dr. MARCELO MENOSSI TEIXEIRA
Departamento de Genética e Evolução
IB - Unicamp

Prezado Professor:

Informamos que os projetos CIBio no. 2007/02 – Utilização de organismos geneticamente modificados como biorreatores, e o CIBio no. 2007/03 - Genômica funcional de plantas, ambos envolvendo OGM do tipo I, de sua responsabilidade foram analisados na reunião de 20 de agosto de 2007, e aprovados parcialmente para as atividades com microorganismos geneticamente modificados em seu laboratório. A aprovação para trabalho com as plantas está condicionada a finalização das obras da casa de vegetação e sala de cultura.

Recomendamos que sejam observadas as instruções normativas referentes ao trabalho em contenção com as plantas geneticamente modificadas do grupo I, Instrução normativa nº 6, disponíveis na webpage da CTNBio < <http://www.ctnbio.gov.br/index.php/content/view/3494.html> >.

Aguardamos sua solicitação de visita técnica quando do encerramento da reforma do espaço físico destinado ao trabalho com as plantas geneticamente modificadas.

Segue anexo roteiro para visita técnica.

Atenciosamente,

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Helena Coutinho Franco de Oliveira".

Profa. Dra. HELENA COUTINHO FRANCO DE OLIVEIRA
Presidente da CIBio
Instituto de Biologia - Unicamp

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bedell, M.A., Hudson, J.B., Golub, T.R., Turyk, M.E., Hosken, M., Wilbanks, G.D., and Laimins, L.A. (1991). Amplification of human papillomavirus genomes in vitro is dependent on epithelial differentiation. *J Virol* 65, 2254-2260.
- Bernard, H.U., Burk, R.D., Chen, Z., van Doorslaer, K., zur Hausen, H., and de Villiers, E.M. (2010). Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. *Virology* 401, 70-79.
- Borzacchiello, G., and Roperto, F. (2008). Bovine papillomaviruses, papillomas and cancer in cattle. *Vet Res* 39, 45.
- Brasileiro, A.C. (1998). Manual de transformação genética de plantas.
- Buck, C.B., Cheng, N., Thompson, C.D., Lowy, D.R., Steven, A.C., Schiller, J.T., and Trus, B.L. (2008). Arrangement of L2 within the papillomavirus capsid. *J Virol* 82, 5190-5197.
- Buck, C.B., Day, P.M., and Trus, B.L. (2013). The papillomavirus major capsid protein L1. *Virology* 445, 169-174.
- Buck, C.B., Thompson, C.D., Pang, Y.Y.S., Lowy, D.R., and Schiller, J.T. (2005). Maturation of papillomavirus capsids. *J Virol* 79, 2839-2846.
- Campo, M.S. (2002). Animal models of papillomavirus pathogenesis. *Virus Res* 89, 249-261.
- Campo, M.S. (2003). Papillomavirus and disease in humans and animals. *Vet Comp Oncol* 1, 3-14.
- Campo, M.S., Jarrett, W.F., Barron, R., O'Neil, B.W., and Smith, K.T. (1992). Association of bovine papillomavirus type 2 and bracken fern with bladder cancer in cattle. *Cancer Res* 52, 6898-6904.
- Campo, M.S., Jarrett, W.F., O'Neil, W., and Barron, R.J. (1994). Latent papillomavirus infection in cattle. *Res Vet Sci* 56, 151-157.
- Carvalho, C.C., Batista, M.V., Silva, M.A., Balbino, V.Q., and Freitas, A.C. (2012). Detection of bovine papillomavirus types, co-infection and a putative new BPV11 subtype in cattle. *Transbound Emerg Dis* 59, 441-447.
- Carvalho, C.C., Batista, M.V., Silva, M.A., Bruner, O., Góes, L.G.B., Yagui-Cavalcanti, A., Beçak, W., and Stocco, R.C. (2003). Bovine papillomavirus type 2 in reproductive tract and gametes of slaughtered bovine females. *Brazilian Journal of Microbiology* 34, 82-84.
- Cason, J., Kambo, P.K., Jewers, R.J., Chrystie, I.L., and Best, J.M. (1993). Mapping of linear B cell epitopes on capsid proteins of bovine papillomavirus: identification of three external type-restricted epitopes. *J Gen Virol* 74 (Pt 12), 2669-2677.
- Chambers, G., Ellsmore, V.A., O'Brien, P.M., Reid, S.W., Love, S., Campo, M.S., and Nasir, L. (2003). Association of bovine papillomavirus with the equine sarcoid. *J Gen Virol* 84, 1055-1062.
- Chen, X.S., Casini, G., Harrison, S.C., and Garcea, R.L. (2001). Papillomavirus capsid protein expression in *Escherichia coli*: purification and assembly of HPV11 and HPV16 L1. *J Mol Biol* 307, 173-182.
- Conger, K.L., Liu, J.S., Kuo, S.R., Chow, L.T., and Wang, T.S.F. (1999). Human papillomavirus DNA replication - Interactions between the viral E1 protein and two subunits of human DNA polymerase alpha/primase. *J Biol Chem* 274, 2696-2705.
- Corteggio, A., Altamura, G., Roperto, F., and Borzacchiello, G. (2013). Bovine papillomavirus E5 and E7 oncoproteins in naturally occurring tumors: are two better than one? *Infect Agents Cancer* 8.
- Da Silva, D.M., Eiben, G.L., Fausch, S.C., Wakabayashi, M.T., Rudolf, M.P., Velders, M.P., and Kast, W.M. (2001). Cervical cancer vaccines: emerging concepts and developments. *J Cell Physiol* 186, 169-182.
- de Freitas, F.A., Yunes, J.A., da Silva, M.J., Arruda, P., and Leite, A. (1994). Structural characterization and promoter activity analysis of the gamma-kafirin gene from sorghum. *Mol Gen Genet* 245, 177-186.
- Freitas, A.C., Silva, M.A.R., Jesus, A.L.S., Mariz, F.C., Cordeiro, M.N., Albuquerque, B.M.F., and Batista, M.V.A. (2011). Recent insights into Bovine Papillomavirus. *Afr J Microbiol Res* 5, 6004-6012.

- Gopal, G.J., and Kumar, A. (2013). Strategies for the production of recombinant protein in *Escherichia coli*. *Protein J* 32, 419-425.
- Hatama, S., Ishihara, R., Ueda, Y., Kanno, T., and Uchida, I. (2011). Detection of a novel bovine papillomavirus type 11 (BPV-11) using xipapillomavirus consensus polymerase chain reaction primers. *Arch Virol* 156, 1281-1285.
- Jackson, M.E., Campo, M.S., and Gaukroger, J.M. (1993). Cooperation between Papillomavirus and Chemical Cofactors in Oncogenesis. *Crit Rev Oncogenesis* 4, 277-291.
- Jefferson, R.A., Kavanagh, T.A., and Bevan, M.W. (1987). Gus Fusions - Beta-Glucuronidase as a Sensitive and Versatile Gene Fusion Marker in Higher-Plants. *Embo J* 6, 3901-3907.
- Jefferson, R.A., and Wilson, K.J. (1991). The GUS gene fusion system. In *Plant Molecular Biology Manual*, pp. 1-33.
- Joh, L.D., Wroblewski, T., Ewing, N.N., and VanderGheynst, J.S. (2005). High-level transient expression of recombinant protein in lettuce. *Biotechnol Bioeng* 91, 861-871.
- Johnson, K.M., Kines, R.C., Roberts, J.N., Lowy, D.R., Schiller, J.T., and Day, P.M. (2009). Role of heparan sulfate in attachment to and infection of the murine female genital tract by human papillomavirus. *J Virol* 83, 2067-2074.
- Kirnbauer, R., Booy, F., Cheng, N., Lowy, D.R., and Schiller, J.T. (1992). Papillomavirus L1 Major Capsid Protein Self-Assembles into Virus-Like Particles That Are Highly Immunogenic. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89, 12180-12184.
- Kirnbauer, R., Taub, J., Greenstone, H., Roden, R., Durst, M., Gissmann, L., Lowy, D.R., and Schiller, J.T. (1993). Efficient self-assembly of human papillomavirus type 16 L1 and L1-L2 into virus-like particles. *J Virol* 67, 6929-6936.
- Lai, W.B., and Middelberg, A.P. (2002). The production of human papillomavirus type 16 L1 vaccine product from *Escherichia coli* inclusion bodies. *Bioprocess Biosyst Eng* 25, 121-128.
- Lancaster, W.D. (1979). Physical maps of bovine papillomavirus type 1 and type 2 genomes. *J Virol* 32, 684-687.
- Leite, A., Kemper, E.L., da Silva, M.J., Luchessi, A.D., Siloto, R.M.P., Bonaccorsi, E.D., El-Dorry, H.F., and Arruda, P. (2000). Expression of correctly processed human growth hormone in seeds of transgenic tobacco plants. *Mol Breeding* 6, 47-53.
- Lenzi, P., Scotti, N., Alagna, F., Tornesello, M.L., Pompa, A., Vitale, A., De Stradis, A., Monti, L., Grillo, S., Buonaguro, F.M., *et al.* (2008). Translational fusion of chloroplast-expressed human papillomavirus type 16 L1 capsid protein enhances antigen accumulation in transplastomic tobacco. *Transgenic Res* 17, 1091-1102.
- Love, A.J., Chapman, S.N., Matic, S., Noris, E., Lomonossoff, G.P., and Taliany, M. (2012). In planta production of a candidate vaccine against bovine papillomavirus type 1. *Planta* 236, 1305-1313.
- Lunardi, M., Alfieri, A.A., Otonel, R.A., de Alcantara, B.K., Rodrigues, W.B., de Miranda, A.B., and Alfieri, A.F. (2013). Genetic characterization of a novel bovine papillomavirus member of the Deltapapillomavirus genus. *Vet Microbiol* 162, 207-213.
- Ma, J.K., Drake, P.M., and Christou, P. (2003). The production of recombinant pharmaceutical proteins in plants. *Nat Rev Genet* 4, 794-805.
- Maclean, J., Koekemoer, M., Olivier, A.J., Stewart, D., Hitzeroth, II, Rademacher, T., Fischer, R., Williamson, A.L., and Rybicki, E.P. (2007). Optimization of human papillomavirus type 16 (HPV-16) L1 expression in plants: comparison of the suitability of different HPV-16 L1 gene variants and different cell-compartment localization. *J Gen Virol* 88, 1460-1469.
- Maeda, Y., Shibahara, T., Wada, Y., Kadota, K., Kanno, T., Uchida, I., and Hatama, S. (2007). An outbreak of teat papillomatosis in cattle caused by bovine papilloma virus (BPV) type 6 and unclassified BPVs. *Vet Microbiol* 121, 242-248.
- Mason, H.S., Lam, D.M., and Arntzen, C.J. (1992). Expression of hepatitis B surface antigen in transgenic plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 11745-11749.

- Matic, S., Masenga, V., Poli, A., Rinaldi, R., Milne, R.G., Vecchiati, M., and Noris, E. (2012). Comparative analysis of recombinant Human Papillomavirus 8 L1 production in plants by a variety of expression systems and purification methods. *Plant Biotechnol J* 10, 410-421.
- Munger, K., and Howley, P.M. (2002). Human papillomavirus immortalization and transformation functions. *Virus Res* 89, 213-228.
- Murashige, T., and Skoog, F. (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiol Plantarum* 15, 473-&.
- Negrout, V., Eisner, G., Lee, H.I., Han, K.P., Taylor, D., and Wong, H.C. (2005). Highly efficient transient expression of functional recombinant antibodies in lettuce. *Plant Sci* 169, 433-438.
- Ogawa, T., Tomita, Y., Okada, M., Shinozaki, K., Kubonoya, H., Kaiho, I., and Shirasawa, H. (2004a). Broad-spectrum detection of papillomaviruses in bovine teat papillomas and healthy teat skin. *J Gen Virol* 85, 2191-2197.
- Ogawa, T., Tomita, Y., Okada, M., Shinozaki, K., Kubonoya, H., Kaiho, I., and Shirasawa, H. (2004b). Broad-spectrum detection of papillomaviruses in bovine teat papillomas and healthy teat skin. *J Gen Virol* 85, 2191-2197.
- Ogawa, T., Tomita, Y., Okada, M., and Shirasawa, H. (2007). Complete genome and phylogenetic position of bovine papillomavirus type 7. *J Gen Virol* 88, 1934-1938.
- Ottoboni, L.M., Leite, A., Yunes, J.A., Targon, M.L., de Souza Filho, G.A., and Arruda, P. (1993). Sequence analysis of 22 kDa-like alpha-coixin genes and their comparison with homologous zein and kafirin genes reveals highly conserved protein structure and regulatory elements. *Plant Mol Biol* 21, 765-778.
- Pangty, K., Singh, S., Goswami, R., Saikumar, G., and Somvanshi, R. (2010). Detection of BPV-1 and -2 and quantification of BPV-1 by real-time PCR in cutaneous warts in cattle and buffaloes. *Transbound Emerg Dis* 57, 185-196.
- Parkin, D.M., and Bray, F. (2006). The burden of HPV-related cancers. *Vaccine* 24, 11-25.
- Pfister, H. (1984). Biology and biochemistry of papillomaviruses. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 99, 111-181.
- Richards, R.M., Lowy, D.R., Schiller, J.T., and Day, P.M. (2006). Cleavage of the papillomavirus minor capsid protein, L2, at a furin consensus site is necessary for infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 1522-1527.
- Roden, R., and Wu, T.C. (2006). How will HPV vaccines affect cervical cancer? *Nat Rev Cancer* 6, 753-763.
- Roperto, S., Brun, R., Paolini, F., Urraro, C., Russo, V., Borzacchiello, G., Pagnini, U., Raso, C., Rizzo, C., Roperto, F., *et al.* (2008). Detection of bovine papillomavirus type 2 in the peripheral blood of cattle with urinary bladder tumours: possible biological role. *J Gen Virol* 89, 3027-3033.
- Sambrook J., F.E.F., Maniatis T. (1989). *Molecular cloning. A laboratory manual*, 2 edn.
- Schmitt, M., Fiedler, V., and Muller, M. (2010). Prevalence of BPV genotypes in a German cowshed determined by a novel multiplex BPV genotyping assay. *J Virol Methods* 170, 67-72.
- Seo, P.S., Heo, S.Y., Han, E.J., Seo, J.W., Ghim, S.J., and Kim, C.H. (2009). Bacterial expression and purification of human papillomavirus type 18 L1. *Biotechnol Bioproc E* 14, 168-174.
- Shafti-Keramat, S., Schellenbacher, C., Handisurya, A., Christensen, N., Reininger, B., Brandt, S., and Kirnbauer, R. (2009). Bovine papillomavirus type 1 (BPV1) and BPV2 are closely related serotypes. *Virology* 393, 1-6.
- Silva, L.A.F., Verissimo, A.C.C., Viana, P.R.L., Fioravanti, M.C.S., Eurides, D., Fontgalland, G.C., Romani, A.F., and Trindade, B.G. (2004). Eficiência da repetição de diferentes protocolos de tratamentos para papilomatose bovina. *Revista FZVA* 11, 153-165.
- Silva, M.A., Pontes, N.E., Da Silva, K.M., Guerra, M.M., and Freitas, A.C. (2011). Detection of bovine papillomavirus type 2 DNA in commercial frozen semen of bulls (*Bos taurus*). *Anim Reprod Sci* 129, 146-151.

Silva, M.S., Weiss, M., Brum, M.C., Dos Anjos, B.L., Torres, F.D., Weiblen, R., and Flores, E.F. (2010). Molecular identification of bovine papillomaviruses associated with cutaneous warts in southern Brazil. *J Vet Diagn Invest* 22, 603-606.

Song, L., Zhao, D.G., Wu, Y.J., and Li, Y. (2008). Transient expression of chicken alpha interferon gene in lettuce. *J Zhejiang Univ-Sc B* 9, 351-355.

Stocco dos Santos, R.C., Lindsey, C.J., Ferraz, O.P., Pinto, J.R., Mirandola, R.S., Benesi, F.J., Birgel, E.H., Pereira, C.A., and Becak, W. (1998). Bovine papillomavirus transmission and chromosomal aberrations: an experimental model. *J Gen Virol* 79 (Pt 9), 2127-2135.

Sturion, D.J., Pardo, P.E., and Tanaka, N.M. (1997). Tratamento da papilomatose bovina com implante axilar. *Unimar Ciência* 6, 51-56.

Topfer, R., Matzeit, V., Gronenborn, B., Schell, J., and Steinbiss, H.H. (1987). A Set of Plant Expression Vectors for Transcriptional and Translational Fusions. *Nucleic Acids Res* 15, 5890-5890.

Van Doorslaer, K., Tan, Q., Xirasagar, S., Bandaru, S., Gopalan, V., Mohamoud, Y., Huyen, Y., and McBride, A.A. (2013). The Papillomavirus Episteme: a central resource for papillomavirus sequence data and analysis. *Nucleic Acids Res* 41, D571-578.

Walmsley, A.M., and Arntzen, C.J. (2000). Plants for delivery of edible vaccines. *Curr Opin Biotechnol* 11, 126-129.

Xia, X. (2007). An improved implementation of codon adaptation index. *Evol Bioinform Online* 3, 53-58.

Yagui, A., Carvalho, C.C., Freitas, A.C., Góes, L.G.B., Dagli, M.L.Z., Birgel, E.H., Jr., and Stocco, R.C. (2006). Papillomatosis in cattle: In situ detection of bovine papillomavirus DNA sequences in reproductive tissues. *Brazilian Journal of Morphological Sciences* 23, 525-529.

Yagui, A., Dagli, M.L., Birgel, E.H., Jr., Alves Reis, B.C., Ferraz, O.P., Pituco, E.M., Freitas, A.C., Becak, W., and Stocco, R.C. (2008). Simultaneous presence of bovine papillomavirus and bovine leukemia virus in different bovine tissues: in situ hybridization and cytogenetic analysis. *Genet Mol Res* 7, 487-497.

Yuan, H., Estes, P.A., Chen, Y., Newsome, J., Olcese, V.A., Garcea, R.L., and Schlegel, R. (2001). Immunization with a pentameric L1 fusion protein protects against papillomavirus infection. *J Virol* 75, 7848-7853.

Zhang, W., Carmichael, J., Ferguson, J., Inglis, S., Ashrafian, H., and Stanley, M. (1998). Expression of human papillomavirus type 16 L1 protein in *Escherichia coli*: denaturation, renaturation, and self-assembly of virus-like particles in vitro. *Virology* 243, 423-431.

Zhou, J., Sun, X.Y., Stenzel, D.J., and Frazer, I.H. (1991). Expression of vaccinia recombinant HPV 16 L1 and L2 ORF proteins in epithelial cells is sufficient for assembly of HPV virion-like particles. *Virology* 185, 251-257.

Zhu, W., Dong, J., Shimizu, E., Hatama, S., Kadota, K., Goto, Y., and Haga, T. (2012a). Characterization of novel bovine papillomavirus type 12 (BPV-12) causing epithelial papilloma. *Arch Virol* 157, 85-91.

Zhu, W., Dong, J.B., Shimizu, E., Hatama, S., Kadota, K., Goto, Y., and Haga, T. (2012b). Characterization of novel bovine papillomavirus type 12 (BPV-12) causing epithelial papilloma. *Arch Virol* 157, 85-91.