

UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE
CAMPINAS

mestrado

BC/51167

IB/ 81835

INSTITUTO DE BIOLOGIA

**Universidade Estadual de Campinas
Instituto de Biologia**



**Utilização de Sementes de Tabaco
Transgênico como Biorreatores para
Produção de um Fragmento scFv de um
Anticorpo Monoclonal**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Letícia Jungmann Cançado
Adilson Leite
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Dissertação apresentada à banca examinadora do
Instituto de Biologia da Universidade Estadual de
Campinas para obtenção do título de Mestre em
Genética e Biologia Molecular, área de
concentração Genética Vegetal e Melhoramento.

Letícia Jungmann Cançado (Aluna)
Adilson Leite (Orientador)

**Campinas – São Paulo – Brasil
2002**

UNIDADE I-B/81835
Nº CHAMADA T/UNICAMP
C16u
V _____ EX _____
TOMBO BC/ 5-1167
PROC 16-837102
C _____ D X _____
PREÇO R\$ 11,00
DATA 0-11-10/02
Nº CPD _____

CM00174637-3

BIB ID 260343

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

C16u

Cançado, Leticia Jungmann

Utilização de sementes de tabaco transgênico como biorreatores para produção de um fragmento scFv de um anticorpo monoclonal/
Leticia Jungmann Cançado. /
Campinas, SP:[s.n.], 2002 /

Orientador: Adilson Leite

*Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Biologia*

1. Sementes transgênicas. 2. Biorreatores. 3. Anticorpo. 4. Câncer.
I. Leite, Adilson. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de

Biologia. III. Título.

Campinas, 10 de maio de 2002

BANCA EXAMINADORA:

PROF. DR. ADILSON LEITE



DR. NEWTON PORTILHO CARNEIRO



PROF. DR. JOSÉ CAMILLO NOVELLO



PROF. DR. MICHEL GEORGES ALBERT VICENTZ

Meu terceiro conselho vem diretamente da Bíblia: seja quente ou seja frio, não seja morno que eu te vomito. É exatamente isso que está escrito na carta de Laodiceia: seja quente ou seja frio, não seja morno que eu te vomito.

É preferível o erro à omissão. O fracasso, ao tédio. O escândalo, ao vazio. Porque já vi grandes livros e filmes sobre a tristeza, a tragédia, o fracasso. Mas ninguém narra o ócio, a acomodação, o não fazer, o remanso. Colabore com seu biógrafo. Faça, erre, tente, falhe, lute. Mas, por favor, não jogue fora, se acomodando, a extraordinária oportunidade de ter vivido. Tendo consciência de que cada homem foi feito para fazer história. Que todo homem é um milagre e traz em si uma revolução. Que é mais do que sexo ou dinheiro. Você foi criado para construir pirâmides e versos, descobrir continentes e mundos e caminhar, sempre, com um saco de interrogações na mão e uma caixa de possibilidades na outra.

[N i z a n G u a n a e s]

**Nós somos muitos
Não somos fracos
Somos sozinhos nesta multidão
Nós somos só um coração
Sangrando pelo sonho de...**

[Lulu Santos & Nelson Motta]

... fazer Ciência

A g r a d e c i m e n t o s

Ao meu orientador, Adilson Leite,
*pela oportunidade de estar em seu laboratório,
por todos os ensinamentos e por todo o seu apoio*

À minha mãe, Maria Inês,
*pelo apoio incondicional que tenho recebido e por você
ter sido sempre um exemplo de luta e dedicação*

À minha avó, Lita,
por ser a minha segunda mãe

À Lú Gauer,
amiga e irmã, sempre presente

À Érica e à Dri,
por terem sido sempre tão amigas

Às amigonas Alba, Eneida, Fabiana, Flávia, Irina, Isa, Luzinha, Mary e Sábata,
por terem feito parte de tantos bons momentos meus aqui em Campinas

À Camilla, à Danizinha, ao De Lucca e ao Dudu,
por toda a ajuda com os experimentos

Aos Drs. Eduardo Ozinaga e Alvaro Babino,
pela oportunidade de estar trabalhando com um de seus genes

Ao Seu Chico,
pela grande ajuda com as casas de vegetação

Aos companheiros de bancada Branda, Jiri, Mário, Paulo Jiló,
Pim, Rodriguinho, Sylvia, e Tiaguinho

À Embrapa Milho e Sorgo,
nas pessoas do Dr. Newton Carneiro e do Dr. Carlos Henrique S. de Carvalho

À Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia,
nas pessoas do Dr. Elíbio Rech e do Dr. Francisco Aragão

À Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo
pelo apoio financeiro

Às meninas Tânia, Fabiana e Sandra

Índice Geral

PÁGINA

Resumo	xi
Abstract	xii
Capítulo I - Introdução	01
Sistemas para produção de proteínas heterólogas	01
A utilização de plantas transgênicas como biorreatores	04
Sementes como biorreatores	10
Estrutura geral dos anticorpos e seus derivados	11
Um histórico da produção de anticorpos em plantas transgênicas	15
O antígeno Tn e sua importância como marcador tumoral e pré-tumoral	20
Anticorpos anti-Tn	23
Capítulo II - Apresentação da Tese, Justificativas e Objetivos	26
Capítulo III - Materiais e Métodos	28
Produção do fragmento scFvINV em bactéria	28
Purificação do scFvINV produzido em bactéria	28
Imunização de coelhos para produção de anti-soros policlonais	30
<i>Western blottings</i> do scFvINV produzido em bactéria	30
Ensaio de Elisa	31
Construção dos plasmídeos para expressão do scFvINV em sementes de plantas	32
Obtenção de células de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> contendo o plasmídeo pBI131-PSscFvINV	35
Obtenção e marcação de sondas radioativas e condições para <i>Southern blotting</i>	35
Transformação de tabaco via <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	36
Teste quantitativo da atividade da enzima β -glucuronidase (GUS) em folhas de tabaco	36
Análise por <i>Southern blotting</i> das plantas selecionadas com kanamicina	33
<i>Western blottings</i> de extratos protéicos de sementes de plantas transgênicas	37
Purificação do scFvINV produzido em sementes de tabaco transgênico	38

Capítulo IV - Resultados e Discussão	40
Obtenção dos plasmídeos para transformação de tabaco	40
Análise da seqüência dos clones de pRT-PSscFvINV	41
Confirmação da transformação de	
Agrobactéria com o plasmídeo pBI131-PSscFvINV	46
Seleção de plantas resistentes a kanamicina.....	46
Análise quantitativa da atividade	
de β -glucuronidase em folhas de tabaco.....	47
Análise por <i>Southern blotting</i> das	
plantas selecionadas com kanamicina	48
Produção do scFvINV em bactéria.....	48
Purificação do scFvINV	
recombinante produzido em bactéria	50
Produção de anticorpos policlonais	
contra o fragmento scFvINV	
purificado a partir de extratos bacterianos	55
Teste da especificidade do scFvINV	
produzido em bactéria contra o antígeno Tn.....	57
Análise da produção do fragmento	
scFvINV nas sementes das plantas transgênicas	58
Purificação do scfvINV produzido em sementes de plantas	60
Capítulo V - Conclusões	64
Capítulo VI - Perspectivas	66
Capítulo VII - Referências Bibliográficas	69

Lista de Abreviaturas

- AA(s)**: aminoácido(s)
- AcM(s)**: anticorpo(s) monoclonal(is)
- A. tumefaciens**: *Agrobacterium tumefaciens*
- C**: segmento gênico que corresponde à região constante das cadeias de um anticorpo.
Pode ser κ ou λ nas cadeias leves e α , δ , ϵ , γ ou μ nas cadeias pesadas
- C_H**: *constant heavy* [região constante da cadeia pesada de um anticorpo]
- C_L**: *constant light* [região constante da cadeia leve de um anticorpo]
- CaMV**: *Cauliflower Mosaic Virus* [vírus do mosaico da couve-flor]
- cDNA**: DNA complementar, sintetizado através de PCR reversa a partir de RNAs mensageiros
- CDR(s)**: *complementarity-determining region(s)* [região(ões) determinante(s) de complementaridade]
- D**: segmento gênico que determina a diversidade nas cadeias pesadas de um anticorpo
- DNA**: *desoxiribonucleic acid* [ácido desoxirribonucleico]
- dsFv**: *dissulfide-linked Fv* [molécula de Fv ligada por uma ponte de dissulfeto]
- E. coli**: *Escherichia coli*
- Fab**: *antigen binding fragment* [fragmento de ligação ao antígeno]
- FR(s)**: *frame work region(s)* [região estrutural]
- Gal**: galactosamina
- GalNac**: N-acetil-galactosamina
- GlcNac**: N-acetil-glicosamina
- Gly**: glicina
- gus**: gene *gus*, *gusA* ou *uidA*, que codifica a enzima β -glucuronidase
- GUS**: enzima β -glucuronidase
- hGH**: *human growth hormone* [hormônio de crescimento humano]
- His**: histidina
- HV(s)**: *hypervariable region(s)* [regiões hipervariáveis]
- IgA**: classe de imunoglobulinas que contém as cadeias pesadas do isotipo α
- IgD**: classe de imunoglobulinas que contém as cadeias pesadas do isotipo δ
- IgE**: classe de imunoglobulinas que contém as cadeias pesadas do isotipo ϵ
- IgG**: classe de imunoglobulinas que contém as cadeias pesadas do isotipo γ
- IgM**: classe de imunoglobulinas que contém as cadeias pesadas do isotipo μ
- J**: segmento gênico que promove a união (*joining*) da região variável com a região constante nas cadeias leves e pesadas de um anticorpo
- kDa**: kilo-Daltons
- MS**: meio de cultura para tecidos vegetais (segundo Murashige & Skoog, 1962)
- MU**: 4-metilumbeliferona
- MUC1**: gene MUC1, que codifica uma mucina
- MUG**: 4-metil-umbeliferil- β -D-glucuronídeo

Ni-NTA: *níquel – nitrilo-triacetic-acid* (níquel – ácido-nitrilo-triacético)

PCR: *polymerase chain reaction* [reação em cadeia da polimerase]

PGK: promotor de γ -kafirina

PS: peptídeo sinal

RE: retículo endoplasmático

RNA: *ribonucleic acid* [ácido ribonucleico]

scFv: *single chain fragment variable* [fragmento variável de cadeia única]

SDS-PAGE: *SDS - polyacrylamide gel electrophoresis* [eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS]

Ser: serina

sTn: antígeno sialil-Tn. Corresponde a um antígeno Tn ligado uma molécula de ácido siálico

T35S: terminador 35S

TF: antígeno TF (Thomsen-Friedenreich). Antígeno Tn ligado a um resíduo de galactose

Thr: treonina

Tn: antígeno Tn. Porção glicídica antigênica encontrada na superfície de algumas células sanguíneas - em certas patologias - e em mucinas

V: segmento gênico que determina a variabilidade nos anticorpos, tanto nas cadeias pesadas quanto nas cadeias leves

V_H: *variable heavy* [região variável da cadeia pesada de um anticorpo]

V_L: *variable light* [região variável da cadeia leve de um anticorpo]

R e s u m o

Um fragmento de anticorpo do tipo scFv consiste numa molécula que contém os domínios variáveis das cadeias leve e pesada de um anticorpo, unidos por um peptídeo conector flexível. Estas pequenas moléculas recombinantes apresentam vantagens porque possuem a mesma atividade de ligação ao antígeno que as imunoglobulinas inteiras e não requerem os mesmos processos de montagem e enovelamento necessários que os anticorpos inteiros. Estes fragmentos têm diversas aplicações e são amplamente usados em diagnósticos e terapias de tumores, geralmente marcados com isótopos radioativos ou como produtos de fusão com toxinas. A maioria dos fragmentos scFv comerciais utilizados atualmente é produzida em bactérias. Porém, muitas vezes este sistema não é o mais indicado para expressão de genes eucarióticos, principalmente se o produto final requer algum tipo de processamento pós-traducional. Na busca por sistemas mais econômicos e eficazes para produção de anticorpos e seus derivados, as plantas têm sido utilizadas para expressar genes que codificam estas moléculas. O presente trabalho relata a produção de um fragmento scFv, construído a partir de um anticorpo monoclonal com provável afinidade a antígenos específicos de câncer de mama, em sementes de plantas transgênicas de *Nicotiana tabacum*. As plantas foram obtidas a partir de transformação de discos foliares de tabaco com *Agrobacterium tumefaciens*, seguida de seleção e regeneração em presença de kanamicina. O T-DNA contém a seqüência codificadora do fragmento scFv sob controle de um promotor específico de endosperma e do terminador 35S do Vírus do mosaico da couve flor. Análises realizadas através de *Southern blotting* confirmaram a presença do transgene na maioria das plantas regeneradas e análises feitas por *western blotting* revelaram que a maioria das plantas transgênicas produz o fragmento scFv em suas sementes. O fragmento produzido em plantas foi parcialmente purificado para ser caracterizado quanto aos aspectos bioquímicos.

A b s t r a c t

ScFv fragments consist of antibody fragments containing the variable domains of both the light and heavy chains, joined by a flexible linker. These small recombinant molecules represent an advantage, since they usually retain the same binding activity of whole immunoglobulins but don't require the complex assembling processes of whole antibodies. The scFv fragments have a broad range of applications and are very useful in tumor diagnosis and therapy, even radioactively labeled or fused with toxins. Nowadays, most commercial scFv fragments are produced in bacteria. Although, plants have been increasingly considered as cost efficient and contamination safe factories for the production of recombinant mammalian proteins, including antibodies and its derivatives. The present work aimed to use transgenic tobacco seeds to produce an scFv fragment obtained from a monoclonal antibody candidate to recognize a breast cancer antigen. *Nicotiana tabacum* transgenic plants were obtained from *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation. The transformants were selected and regenerated in the presence of kanamicina. In the T-DNA, the expression of the coding sequence for the scFv fragment is being controlled by a seed endosperm specific promoter and by the Cauliflower Mosaic Virus 35S terminator. Southern blotting analysis confirmed the presence of the scFv transgene in most regenerated plants. Western blotting analysis showed that most of the transgenic plants produce the scFv antibody fragment in the seeds. This plant made antibody fragment was partially purified in order to have its biochemical properties characterized.

Sistemas para produção de proteínas heterólogas

Proteínas heterólogas são aquelas produzidas em organismos diferentes daqueles de sua origem. Atualmente, as proteínas heterólogas podem ser produzidas tanto em sistemas procarióticos, quanto eucarióticos.

Dentre os procariotos destaca-se a bactéria *Escherichia coli*. Atualmente, este sistema é o mais empregado pela indústria biotecnológica na produção de proteínas recombinantes, pois apresenta a vantagem de oferecer maior rendimento. Porém, muitas vezes ele não é o mais indicado para a expressão de genes eucarióticos, principalmente se a proteína requer algum tipo de processamento pós-traducional. Além das limitações associadas ao processamento protéico, outra desvantagem reside no fato de que proteínas exógenas podem ser degradadas pela ação de proteases bacterianas. Além disso, muitas proteínas heterólogas podem ser tóxicas às bactérias (Georgiou, 1988; Georgiou & Bowden, 1991). Um outro problema apresentado por este sistema consiste no fato de que altos níveis de expressão de genes exógenos, geralmente, resultam na formação de corpos

de inclusão, que são agregados constituídos de proteínas desnaturadas ou incorretamente enoveladas (Schein, 1989). Apesar destas estruturas protegerem as proteínas da ação de proteases e facilitarem a sua purificação, sua formação apresenta a desvantajosa necessidade de extração na presença de agentes desnaturantes. A solubilização dos agregados e a recuperação da estrutura funcional da proteína requerem etapas adicionais no processo de purificação, o que pode representar um aumento considerável no custo final do produto de interesse.

Os sistemas eucarióticos, ao contrário dos bacterianos, permitem a modificação e o processamento das proteínas (Bradley, 1990) e incluem: leveduras, culturas de células de mamíferos e de insetos, animais transgênicos e plantas.

As leveduras consistem no sistema eucariótico de expressão de proteínas heterólogas mais antigo. A primeira levedura utilizada foi o levedo de panificação *Saccharomyces cerevisiae* (Romanos *et al.*, 1992). Atualmente este levedo vem sendo substituído pela *Pichia pastoris*, que apresenta melhores rendimentos na produção (Ratner,

1989). Os sistemas baseados em leveduras são tão econômicos quanto os bacterianos. No entanto, alguns estudos mostram que as proteínas produzidas muitas vezes são hiperglicosiladas e, quando produzidas em altos níveis, são instáveis e insolúveis (Higgins, 1995).

Células de mamíferos e de insetos são muito utilizadas para produzir proteínas de interesse farmacêutico (em sua maioria de origem eucariótica) devido a sua habilidade para realizar glicosilações e processamentos complexos (Goosen, 1993). No entanto, um problema que advém do uso de culturas de células animais consiste na presença de certos contaminantes, como vírus, pirógenos, restos celulares, lipídeos, DNA e proteínas das próprias células, (Pollock *et al.*, 1999). Um outro aspecto a ser considerado é o de que os rendimentos da produção geralmente são baixos. Além disso, o requerimento de soro fetal bovino nos meios de culturas para células de mamíferos tornam a produção extremamente dispendiosa.

Estima-se que nos próximos anos haverá um grande crescimento na demanda por biofármacos. Com os avanços obtidos a partir de estudos de genomas, novas proteínas terapêuticas estão sendo descobertas. Devido a esta perspectiva há a necessidade de se buscar sistemas de produção mais eficientes. Estes novos sistemas devem

garantir tanto a disponibilidade de produtos farmacêuticos recombinantes seguros quanto à viabilidade econômica de produção (Giddings *et al.*, 2000).

Há alguns anos, o leite de animais transgênicos surgiu como uma alternativa promissora de produção de proteínas humanas, uma vez que as células das glândulas mamárias são capazes de enovelar corretamente proteínas complexas e de fazer modificações pós-traducionais, incluindo-se aí glicosilações e γ -carboxilação (Lubon *et al.*, 1996; Velaner *et al.*, 1997). Exemplos bem sucedidos já foram obtidos para várias proteínas, produzidas em gado, cabra, ovelha, porco, coelho e camundongo (Larrick & Thomas, 2001). Entre os fármacos protéicos produzidos por glândulas mamárias incluem-se anticorpos (Pollock *et al.*, 1999), o ativador do plasminogênio tecidual (Gordon *et al.*, 1987; Pittius *et al.*, 1988), o fator IX de coagulação sanguínea (Clark *et al.*, 1989) e a uroquinase (Meade *et al.*, 1990).

Como a utilização do leite como fonte de proteínas heterólogas restringe a produção a fêmeas em fase de lactação, Kerr *et al.* (1998) propuseram a produção em urina de animais transgênicos. Eles utilizaram um promotor específico do endotélio de bexiga para a produção de hormônio de crescimento humano (hGH) em camundongos trans-

gênicos. Também com o mesmo objetivo Dyck *et al.* (1999) descreveram a produção de hGH no epitélio da vesícula seminal e no fluido seminal de camundongos transgênicos. Neste trabalho, a expressão do gene do hGH foi controlada pelo promotor P12, específico para a glândula acessória sexual masculina.

Uma abordagem recente na utilização de animais para a produção de proteínas heterólogas consiste na utilização de ovos de galinhas transgênicas Harvey *et al.*, (2002) demonstraram o potencial desta técnica através de produção de β -lactamase na clara de ovos.

Apesar das vantagens apresentadas, a produção de animais transgênicos não representa uma prática trivial. Neste processo estão envolvidas as técnicas de microinjeção ou de transferência nuclear, que consomem muito tempo e dinheiro. Além destas técnicas não representarem uma rotina em muitos laboratórios, a frequência de obtenção de animais transgênicos viáveis não é muito alta.

Um outro aspecto que deve ser considerado com relação à produção de proteínas recombinantes em animais é o risco de contaminação por vírus animais e príons (Larrick & Thomas, 2001).

Com o crescimento do domínio sobre as técnicas de transformação de plantas (que cada vez mais são eficientemente aplicáveis a um maior número

de espécies) e sobre a biologia dos vírus vegetais, as plantas têm se tornado um sistema alternativo e atraente para a produção de lipídeos, carboidratos e proteínas (Goddijn & Pen, 1995).

Os vegetais representam um dos sistemas mais econômicos para a produção em larga escala de proteínas para uso industrial e farmacêutico. Este sistema apresenta as seguintes vantagens: baixo custo para o estabelecimento de grandes plantações; a facilidade de manutenção da área plantada; o fato de já estarem estabelecidas as práticas de colheita, transporte, estocagem e processamento do material vegetal; a possibilidade de compartimentalização das proteínas recombinantes em diferentes organelas; a presença de órgãos naturais de acúmulo de proteínas e a eliminação da necessidade de purificação do produto de interesse quando o tecido contendo a proteína recombinante é utilizado como alimento (Kusnadi *et al.*, 1997).

Kusnadi *et al.* (1997) estimaram que os custos de produção de proteínas recombinantes em plantas podem ser até 10 a 50 vezes menores que os custos para produção das mesmas proteínas em *E. coli*.

Além das vantagens econômicas, há benefícios qualitativos que favorecem o uso de plantas para produzir proteínas recombinantes, em particular

as de interesse farmacêutico. Os processos de síntese, secreção e modificação pós-traducional são similares em células vegetais e animais, havendo pequenas diferenças somente no padrão de glicosilação de proteínas. Além disso, como ainda não foram descritos patógenos comuns a animais e vegetais, os produtos obtidos de plantas aparentemente estão livres de contaminação por patógenos animais (principalmente vírus) e toxinas microbianas (Giddings, 2001).

Duas estratégias diferentes para obter a expressão de genes heterólogos em plantas têm sido utilizadas com sucesso. Uma delas consiste na expressão transiente do gene de interesse, utilizando vetores virais. O sistema baseia-se na utilização de vírus de RNA fita-simples, que ocorrem naturalmente nas plantas. Neste caso, o fragmento de ácido nucléico que codifica a proteína de interesse é inserido no genoma do vírus, geralmente fusionado à região estrutural de um dos genes que codifica uma das proteínas da capa viral. Após a infecção da planta, o vírus promove sua auto-replicação e expressão de seus genes, incluindo o gene codificador da proteína recombinante (Figura 1, lado esquerdo). Trata-se de uma expressão transiente. A planta funciona apenas como um veículo para a amplificação das partículas virais. A proteína recombinante pode ser recuperada através do

processamento da proteína da capa viral purificada a partir de extratos dos tecidos infectados. Opcionalmente, as partículas virais quiméricas purificadas podem ser utilizadas diretamente na formulação de vacinas orais e nasais (Beachy *et al.*, 1996).

A outra estratégia consiste na obtenção de plantas transgênicas. Nesse caso ocorre a integração estável do gene de interesse no genoma vegetal. A integração pode ser obtida de forma indireta, utilizando-se a bactéria *Agrobacterium*, ou através de métodos diretos de transformação, que incluem: microinjeção; eletroporação de tecidos, células e protoplastos; e o bombardeamento com micropartículas cobertas com DNA (Mason & Arntzen, 1995; Giddings *et al.*, 2000; Leite, 2001).

A utilização de plantas transgênicas como biorreatores

A produção de proteínas recombinantes através de plantas transgênicas envolve os seguintes passos: (1) inserção do gene de interesse no vetor de transformação; (2) transformação; (3) seleção e regeneração; (4) análise das plantas regeneradas e (5) extração, purificação e caracterização estrutural e funcional da proteína recombinante (Figura 1, lado direito).

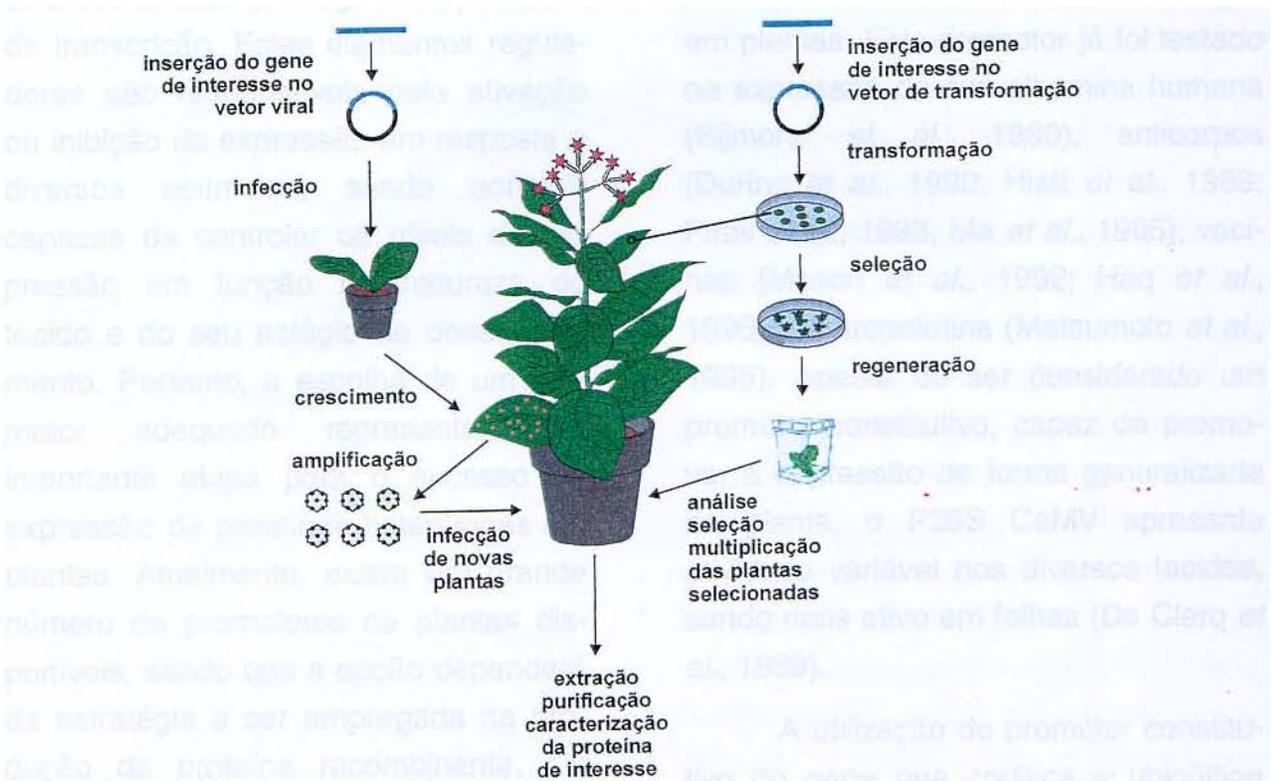


Figura 1: Representação esquemática das diferentes estratégias utilizadas na produção de proteínas heterólogas em plantas. Do lado esquerdo estão representadas as principais etapas envolvidas na produção utilizando-se vírus. A planta serve como um meio de propagação das partículas virais, que contém a proteína de interesse geralmente fusionada à capa protéica. Do lado direito são mostradas as principais etapas da produção de proteínas heterólogas em plantas transgênicas. Nessa estratégia, o gene de interesse está integrado no genoma vegetal. Modificado a partir de Parizotto *et al.* (2000).

A transformação de plantas apresenta a vantagem de que o transgene é fixado na linhagem. Dessa forma, através de autofecundação ele estará presente também nas gerações subsequentes. Além disso, é possível a incorporação de mais de um gene de interesse no mesmo indivíduo. Na maioria das vezes isso é obtido através do cruzamento de duas plantas, cada uma

contendo um dos transgenes (Mason & Arntzen, 1995).

Geralmente o gene de interesse é inserido em um cassete de expressão que contém um promotor seguido da seqüência codificadora da proteína, e de uma seqüência contendo sinal e sítio de poliadenilação. A região promotora, além de conter a seqüência de DNA responsável pela ligação da RNA polimerase no início da transcrição, apre-

senta também sítios de ligação para diversos fatores que regulam o processo de transcrição. Estes elementos reguladores são responsáveis pela ativação ou inibição da expressão em resposta a diversos estímulos, sendo portanto capazes de controlar os níveis de expressão em função da natureza do tecido e do seu estágio de desenvolvimento. Portanto, a escolha de um promotor adequado representa uma importante etapa para o sucesso da expressão de proteínas heterólogas em plantas. Atualmente, existe um grande número de promotores de plantas disponíveis, sendo que a opção dependerá da estratégia a ser empregada na produção da proteína recombinante. Os níveis de expressão e o local do acúmulo da proteína recombinante são os principais fatores a serem levados em conta na escolha do promotor (Leite, 2001).

Diversos peptídeos de interesse industrial e farmacêutico já foram produzidos em plantas transgênicas, com sucesso. Eles compreendem anticorpos, antígenos vacinais, hormônios, soroalbumina humana, peptídeos anticoagulantes e enzimas (Giddings *et al.*, 2000; Daniell *et al.*, 2001; Giddings, 2001; Leite, 2001).

O promotor do transcrito 35S do vírus do mosaico da couve-flor (P35S CaMV) e seus derivados estão entre os

promotores mais utilizados no controle da expressão de proteínas heterólogas em plantas. Este promotor já foi testado na expressão de soroalbumina humana (Sijmons *et al.*, 1990), anticorpos (During *et al.*, 1990; Hiatt *et al.*, 1989; Firek *et al.*, 1993, Ma *et al.*, 1995), vacinas (Mason *et al.*, 1992; Haq *et al.*, 1995) e eritropoietina (Matsumoto *et al.*, 1995). Apesar de ser considerado um promotor constitutivo, capaz de promover a expressão de forma generalizada na planta, o P35S CaMV apresenta atividade variável nos diversos tecidos, sendo mais ativo em folhas (De Clerq *et al.*, 1989).

A utilização do promotor constitutivo do gene que codifica a ubiquitina em milho resultou no acúmulo de altos níveis de avidina (Hood *et al.*, 1997), β -glucuronidase (Witcher *et al.*, 1998) e aprotinina (Zhong *et al.*, 1999) em embriões de milho.

A secreção de proteínas heterólogas em exsudatos de raízes, a rizosecreção, constitui um exemplo de sistema de produção de proteínas recombinantes em plantas, onde são utilizados promotores específicos de raízes. Borisjuk *et al.* (1999) demonstraram a eficiência desta estratégia através da produção de altos níveis da proteína verde fluorescente (GFP), da fosfatase alcalina de placenta humana e de uma xilanase bacteriana em plantas transgê-

nicas de tabaco, cultivadas em condições de hidroponia.

Uma estratégia que tem se mostrado eficaz para aumentar os níveis de expressão de transgenes em plantas é o direcionamento da integração do gene para cloroplastos, que pode ser obtida inserindo-se nos vetores de transformação seqüências homólogas a seqüências presentes nestas organelas. Desta forma, através de recombinação homóloga, o cassete de expressão é integrado ao genoma plastidial. Como cerca de cem cloroplastos estão presentes numa célula, o número de cópias do transgene é naturalmente amplificado, o que determina um maior nível de expressão. Uma outra vantagem da obtenção de plantas transplastômicas (como são chamadas as plantas cuja integração do transgene é direcionada para cloroplastos), é que o genoma plastidial raramente é transmitido através de grãos de pólen (Scott & Wilkinson, 1999), o que elimina os riscos de escape do transgene para espécies selvagens.

Um aspecto que deve ser considerado na avaliação da eficiência de plantas transgênicas para a produção de proteínas heterólogas é a estabilidade da expressão. O silenciamento gênico de transgenes em plantas tem sido observado por vários grupos. Revisões sobre este assunto foram feitas por Flavell (1994); Meyer & Saedler (1996);

Meyer (1996); Depicker & Van Montagu (1997); Stam *et al.* (1997) e Matzke & Matzke, (1998). Apesar dos transformantes jovens muitas vezes acumularem proteínas heterólogas em altos níveis, plantas mais velhas podem acumular 100 vezes menos as mesmas proteínas. Além disso, plantas da progênie de transformantes primários (que apresentam altos níveis de acúmulo de proteínas heterólogas) geralmente apresentam níveis muito reduzidos de expressão do transgene. Provavelmente, isso é consequência da ocorrência de homozigose na progênie, o que provoca uma inativação reversível do transgene devido a altos níveis de expressão ou de uma inativação transcricional progressiva (De Neve *et al.*, 1999).

O processamento pós-transcricional pode exercer grande influência nos níveis de produção de proteínas heterólogas em plantas transgênicas. Através de vários exemplos tem sido demonstrado que a introdução de íntrons potencializa a expressão gênica. Os mecanismos envolvidos nesta ativação não foram ainda completamente esclarecidos. No entanto, este efeito parece estar relacionado com a eficiência do processamento e com a estabilidade do RNA. A região 3' não traduzida também exerce grande influência na estabilidade do mRNA, através da presença do sinal e sítio de poliadenilação (Hunt, 1994), bem como de outros moti-

vos capazes de estimular ou inibir sua degradação (Sullivan & Green, 1993).

A produção de proteínas heterólogas em plantas depende também da eficiência da tradução. A seqüência nucleotídica não traduzida da região 5' dos mRNAs, conhecida como seqüência líder, exerce forte influência na etapa de iniciação da tradução. Um grande número de vetores utilizados na transformação de plantas incorpora seqüências líderes virais e a região consenso de iniciação de tradução de vertebrados (G/A)NNATGG identificada por Kozak (1987).

Após a iniciação, a velocidade da tradução pode ser limitada pela privação de tRNAs específicos. Este problema pode ser contornado, como demonstrado na expressão da proteína inseticida CryIA (Perlak *et al.*, 1991) e de uma toxina recombinante de *E. coli* (Mason *et al.*, 1998), através da substituição dos códons originais pelos mais freqüentes na espécie transformada (Murray *et al.*, 1989).

Deve-se pensar também nos processamentos pós-traducionais que serão realizados com as proteínas de interesse. Staub *et al.* (2000) descreveram a obtenção de altos níveis de rendimento de hGH através da transformação de cloroplastos de tabaco. Entretanto, grande parte do hGH recombinante produzido apresentou um

resíduo do aminoácido prolina na extremidade aminoterminal, ao invés do resíduo de fenilalanina presente na mesma região no hormônio natural. Este resultado indica que a estratégia utilizada no processamento do hGH nascente, catalisado por uma protease específica para a ubiquitina, que é produzida simultaneamente com a proteína de fusão ubiquitina-hGH, não apresentou a eficiência desejada em cloroplastos. A fenilalanina que deveria estar presente na extremidade aminoterminal do hGH provavelmente foi removida durante o processamento da proteína de fusão. Portanto, apesar do alto rendimento descrito para a produção do hGH, o sistema de expressão baseado em cloroplastos requer aperfeiçoamento na etapa de processamento pós-traducional.

Uma das modificações pós-traducionais que devem ser avaliadas num sistema de expressão de proteínas heterólogas é a glicosilação, que desempenha um papel determinante em várias atividades fisiológicas dos polipeptídeos (Meynial-Salles & Combes, 1996; Imperiali & O'Connor, 1999; Palacpac *et al.*, 1999; Leite, 2001). A adição de carboidratos constitui uma das principais modificações das proteínas em eucariotos. A maioria das proteínas solúveis e de membrana produzidas no retículo endoplasmático (RE), destinadas às diversas organelas

ou secretadas no espaço extracelular, é glicoproteína. A adição do resíduo de açúcar à cadeia polipeptídica pode ocorrer através de ligações glicosídicas com o grupo amino da cadeia lateral de um resíduo de asparagina (N-glicosilação), ou com a hidroxila da cadeia lateral de resíduos de serina e treonina (O-glicosilação). Enquanto a N-glicosilação inicia-se no interior do RE, a O-glicosilação ocorre depois que a proteína abandonou este compartimento.

Com o advento da utilização de plantas como reatores biológicos, a caracterização da N-glicosilação das proteínas recombinantes produzidas adquiriu grande importância, principalmente em sistemas que exploram o direcionamento das proteínas para o RE. Esta caracterização apresenta ainda maior interesse na produção de proteínas em alimentos e para uso clínico. Como a maioria das proteínas humanas de interesse farmacêutico é glicoproteína, um padrão diferente de glicosilação pode causar sua desativação, ou ainda, devido ao caráter imunogênico dos oligossacarídeos, sua utilização pode resultar em uma resposta imune indesejável. Nos alimentos, a glicosilação pode resultar na produção de novos alérgenos. Dessa maneira, é necessário verificar se as glicanas, presentes em proteínas de mamíferos produzidas em plantas, diferem ou não

das glicanas encontradas nas proteínas produzidas pela fonte original.

Na N-glicosilação, um polissacarídeo é ligado covalentemente a um resíduo de asparagina, encontrado na seqüência consenso Asn-X-Thr/Ser (onde X pode ser qualquer aminoácido com exceção da prolina). A glicosilação de resíduos de asparagina é uma modificação co-traducional de proteínas, catalisada por enzimas específicas. Após a transferência para a proteína, as glicanas são processadas através da ação de glicosil hidrolases e glicosil transferases (Imperiali & O'Connor, 1999). De acordo com as substituições, as N-glicanas de plantas são classificadas em 4 grupos: ricas em manose, complexas, paucinomanosídicas, e híbridas (Lerouge *et al.*, 1998). As N-glicanas ricas em manose de plantas são idênticas às encontradas em outras células eucarióticas. Porém as glicanas complexas diferem substancialmente entre sistemas vegetais e animais (Palacpac *et al.*, 1999).

Os mecanismos iniciais para realização de N-glicosilação em mamíferos e vegetais são evolucionariamente conservados e ocorrem no RE. Todavia, os detalhes finais de “acabamento” e os processamentos subseqüentes realizados no complexo de Golgi são diferentes.

Uma maneira de contornar este problema tem sido a modificação do padrão de glicosilação em plantas através da transformação de plantas com genes de enzimas humanas, envolvidas na glicosilação. Palacpac *et al.* (1999) conseguiram obter sucesso neste sentido, expressando a enzima β 1,4-galactosil transferase, sob controle do promotor P35S.

Sementes como biorreatores

As folhas não constituem órgãos adequados para o armazenamento de proteínas recombinantes, pois seus tecidos apresentam grande quantidade de água e alta atividade hidrolítica, resultando em baixa estabilidade da proteína produzida. As sementes, por sua vez, apresentam tecidos especializados, capazes de armazenar proteínas de forma eficiente durante longos períodos. Devido ao seu baixo conteúdo de água as sementes, ao contrário das folhas, não requerem condições especiais de conservação. Apesar desta vantagem, até o momento poucos sistemas baseados na expressão específica em sementes foram descritos (Leite, 2001).

As proteínas de reserva acumulam-se em grandes quantidades nas sementes, onde constituem fonte de nitrogênio e enxofre a ser utilizada nos

primeiros estágios do desenvolvimento das plântulas (Shewry *et al.*, 1995). Devido aos altos níveis de expressão proporcionados por seus promotores, os genes que codificam proteínas de reserva de sementes representam excelente fonte de promotores específicos de sementes. Este tipo de promotor foi utilizado na expressão de um anticorpo modificado (Fiedler & Conrad, 1995), de um antígeno do citomegalovírus humano (Tackaberry *et al.*, 1999) e da β 1,3-1,4-glucanase (Horvath *et al.*, 2000).

O estudo de genes de prolaminas (proteínas de reserva de sementes de monocotiledôneas) em nosso laboratório possibilitou o desenvolvimento de um cassete para expressão de proteínas heterólogas em plantas. Este cassete contém um promotor de γ -kafirina (uma prolamina de *Sorghum vulgare*); um peptídeo sinal de uma α -coixina de *Coix lacryma-jobi* e o terminador T35S do CaMV.

O promotor do gene da γ -kafirina (PGK) de sorgo promove expressão específica em endosperma (Freitas *et al.*, 1994). O peptídeo sinal (PS) de *Coix* promove o endereçamento de polipeptídeos nascentes para o RE (Ottoboni *et al.*, 1993). O cassete de expressão PGK-PS-gene de interesse-T35S foi utilizado com sucesso na expressão do gene do hormônio de crescimento hu-

mano em sementes de tabaco transgênico (Leite *et al.*, 1999) e da proinsulina humana em sementes de tabaco e milho transgênicos (dados não publicados).

Estrutura geral dos anticorpos e seus derivados

Segundo Kuby (1997), os anticorpos ou imunoglobulinas são glicoproteínas multiméricas complexas do sistema imune de animais superiores, responsáveis pelo reconhecimento e ligação a antígenos. Estas moléculas foram inicialmente identificadas na fração protéica do soro sanguíneo por A. Tiselius e E. A. Kabat. em 1939. Todas elas apresentam certas características estruturais em comum e executam algumas funções biológicas específicas. Conforme ilustra a Figura 2, a unidade básica de um anticorpo é composta por duas cadeias pesadas e duas cadeias leves, idênticas entre si, unidas por pontes de dissulfeto e por ligações não covalentes.

Cada cadeia leve e cada cadeia pesada de uma imunoglobulina apresenta uma região aminoterminal variável que consiste de 100 a 110 aminoácidos e que é denominada V_L (*variable light*) nas cadeias leves e V_H (*variable heavy*) nas cadeias pesadas. Entre anticorpos distintos ocorre uma alta variabilidade nesses domínios. O restante das cadeias leve e pesada exibe uma variação limitada e constitui a

limitada e constitui a região carboxiterminal constante.

As regiões constantes das cadeias leves, denominadas C_L (*constant light*), apresentam duas seqüências básicas de aminoácidos, designadas κ e λ , que determinam dois subtipos de anticorpos. As regiões constantes das cadeias pesadas, ou C_H (*constant heavy*), agrupam-se em cinco padrões diferentes de seqüências de aminoácidos: α , δ , ϵ , γ , e μ . As cadeias pesadas de um anticorpo determinam a que classe ou isotipo ele pertence, que podem ser então IgA, IgD, IgE, IgG ou IgM, respectivamente correspondentes aos cinco padrões de região constante evidenciados. Estes cinco isotipos apresentam capacidade de multimerização distinta e funções efectoras próprias.

Tanto no homem quanto em camundongos as cadeias leves e pesadas são codificadas por famílias multigênicas localizadas em cromossomos distintos. Em camundongos, animais freqüentemente utilizados na produção de anticorpos, os genes de κ estão situados no cromossomo 16; os genes de λ no cromossomo 6 e os genes codificantes das cadeias pesadas no cromossomo 12 (Kuby, 1997). As famílias κ e λ contêm os segmentos gênicos V, J e C. As famílias α , δ , ϵ , γ e μ apresentam os segmentos V, D, J e C. A Figura 3 exemplifica os processos de rearranjo

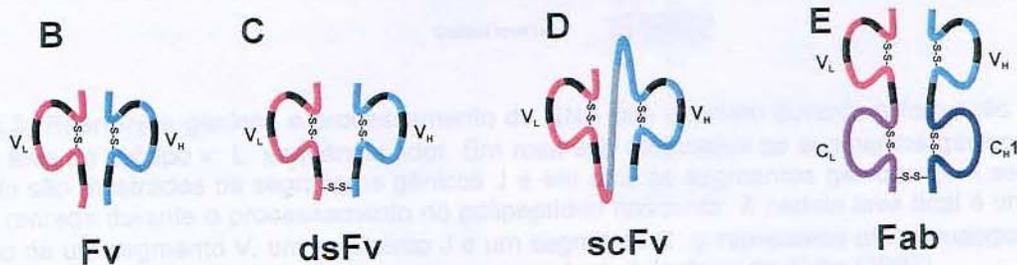
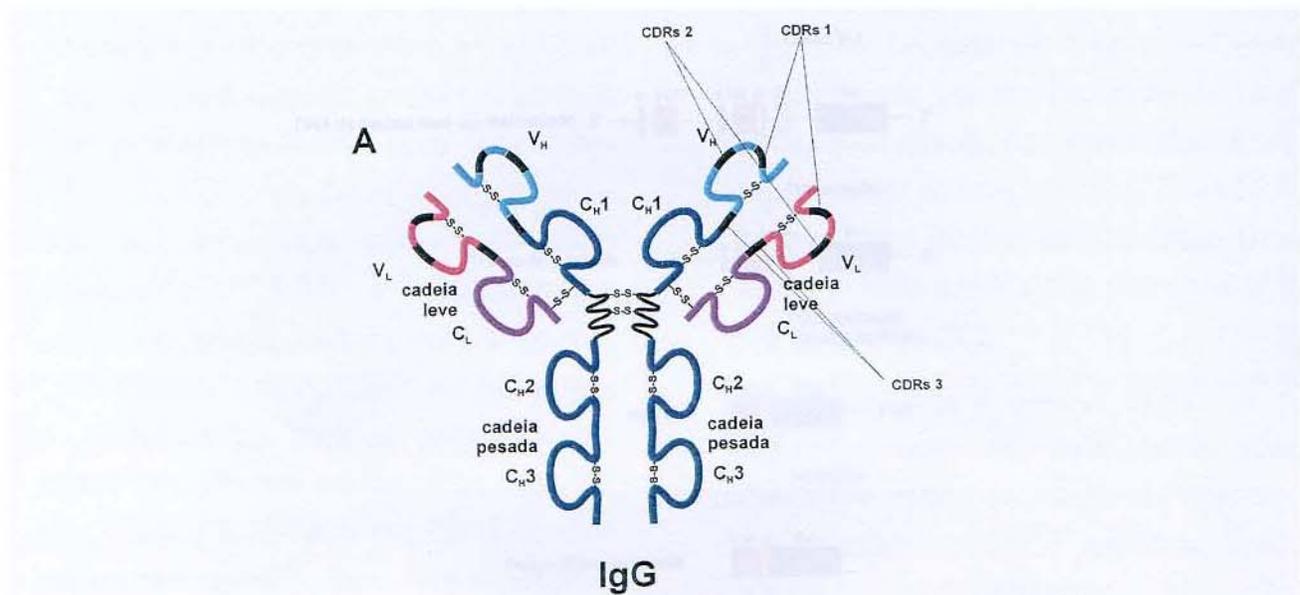


Figura 2: Estrutura geral de um anticorpo do isotipo IgG (A) e de alguns dos fragmentos de anticorpo que podem ser produzidos por digestão com papaína (E) ou por engenharia genética (B a E). Em A é mostrada uma IgG, que é composta por duas cadeias pesadas e duas cadeias leves, idênticas entre si. Em B observa-se um fragmento Fv; em C um fragmento dsFv; em D um fragmento scFv e em E um fragmento Fab. No fragmento scFv pode ser observado, em cinza, o peptídeo conector de glicina e serina. Extraído e modificado a partir de Leite (2001).

sofridos por uma cadeia leve de um anticorpo do subtipo κ .

Tanto as cadeias leves quanto as pesadas, quando enoveladas, apresentam domínios que contêm cerca de 110 resíduos de aminoácidos, sendo que uma ponte de dissulfeto forma uma alça

de aproximadamente 60 aminoácidos (Figura 2).

Comparações detalhadas das seqüências de aminoácidos de V_H e V_L revelaram que a variabilidade se concentra em regiões hipervariáveis,

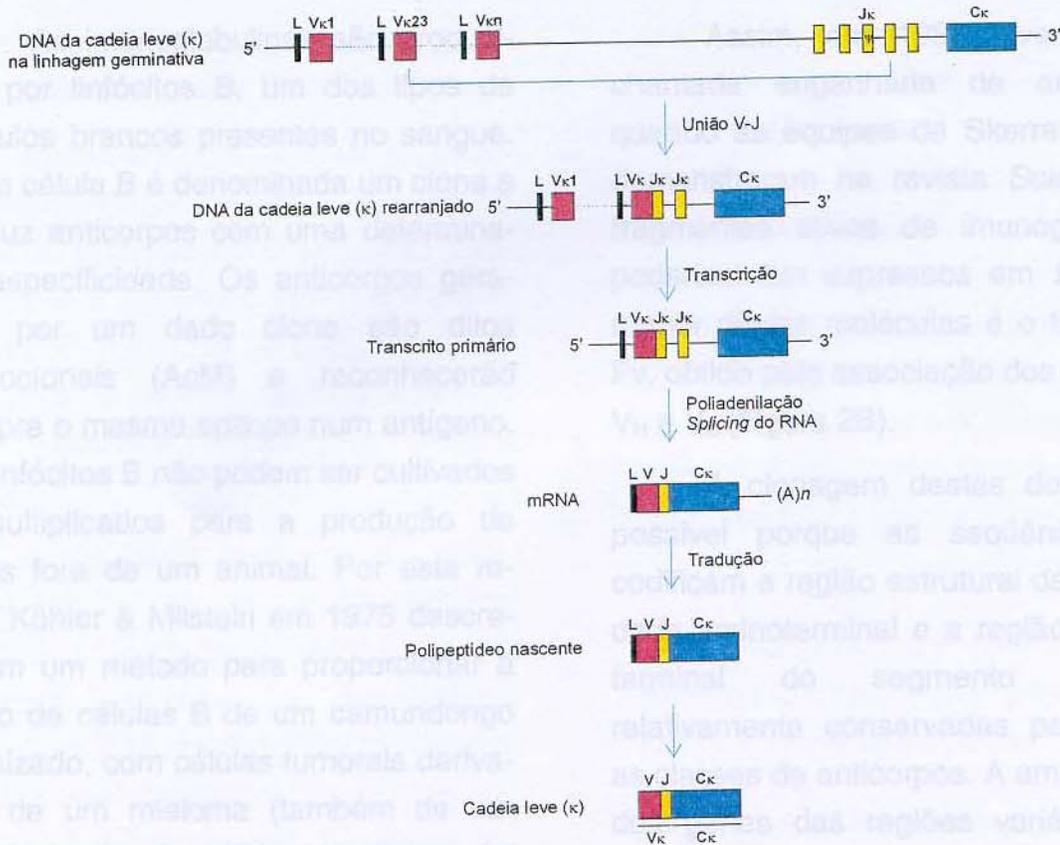


Figura 3: Rearranjos gênicos e processamento do RNA que ocorrem durante a formação de uma cadeia leve do subtipo κ . L: seqüência líder. Em rosa são mostrados os segmentos gênicos V. Em amarelo são mostrados os segmentos gênicos J e em azul os segmentos gênicos C. A seqüência líder é retirada durante o processamento do polipeptídeo nascente. A cadeia leve final é uma combinação de um segmento V, um segmento J e um segmento C. ψ representa um pseudogene. (A)_n representa a cauda de poli A no RNA mensageiro maduro. Adaptado de Kuby (1997).

também chamadas regiões determinantes de complementaridade (CDRs). Essas regiões hipervariáveis formam o sítio de ligação do anticorpo ao antígeno.

Em humanos e em camundongos três CDRs estão presentes em cada cadeia leve e cada cadeia pesada, constituindo 15% a 20% dos domínios variáveis. Os outros 80% a 85% desses domínios exibem uma baixa variação constituindo as regiões estruturais. A

região de ligação ao antígeno é também denominada paratopo, e a porção da molécula antigênica que interage com o paratopo é designada epitopo.

As funções efetoras, que envolvem a fixação do complemento e a ligação a células do sistema imune, são mediadas pelos domínios constantes dos anticorpos, que são então dispensáveis para o reconhecimento do e a ligação ao antígeno.

As imunoglobulinas são produzidas por linfócitos B, um dos tipos de glóbulos brancos presentes no sangue. Cada célula B é denominada um clone e produz anticorpos com uma determinada especificidade. Os anticorpos gerados por um dado clone são ditos monoclonais (AcM) e reconhecerão sempre o mesmo epitopo num antígeno. Os linfócitos B não podem ser cultivados e multiplicados para a produção de AcMs fora de um animal. Por esta razão, Köhler & Milstein em 1975 descreveram um método para proporcionar a fusão de células B de um camundongo imunizado, com células tumorais derivadas de um mieloma (também de camundongos). A célula resultante foi denominada “hibridoma”, era imortal e produzia o mesmo AcM que o linfócito B original. Por este trabalho os autores ganharam o prêmio Nobel de medicina, em 1984.

Até recentemente, a produção de anticorpos esteve limitada a metodologias muito laboriosas e demoradas, que envolvem a imunização de animais e a formação de hibridomas. Tais processos, além de trabalhosos e demorados, implicam em baixos rendimentos de produção. Todavia, a tecnologia do DNA recombinante e a possibilidade de amplificação de genes *in vitro* tornaram possível a clonagem e expressão de genes de anticorpos em bactérias.

Assim, em 1988 teve início a chamada engenharia de anticorpos, quando as equipes de Skerra e Better demonstraram na revista *Science* que fragmentos ativos de imunoglobulinas poderiam ser expressos em *E. coli*. A menor destas moléculas é o fragmento Fv, obtido pela associação dos domínios V_H e V_L (Figura 2B).

A clonagem destes domínios é possível porque as seqüências que codificam a região estrutural da extremidade aminoterminal e a região carboxiterminal do segmento J são relativamente conservadas para todas as classes de anticorpos. A amplificação dos genes das regiões variáveis das cadeias leves e pesadas pode ser obtida a partir de PCR, utilizando-se oligonucleotídeos que se anelam nessas seqüências conservadas (Amersham Pharmacia Biotech, 2000).

No entanto, quando o anticorpo recombinante é produzido, as interações hidrofóbicas entre estes dois domínios não são suficientemente fortes para mantê-los associados. Dessa forma, moléculas semelhantes, mas que apresentam uma ligação covalente unindo os dois domínios, passaram a ser utilizadas. Uma das formas de produzir este tipo de fragmento consiste no estabelecimento de pontes de dissulfeto na interface entre V_H e V_L (Reiter *et al.*,

1994), obtendo-se assim fragmentos dsFv (*dissulfide-linked Fv*) (Figura 2C).

Existe ainda um tipo de fragmento denominado Fab, obtido através da digestão limitada com papaína. Este fragmento é composto pela cadeia leve ligada por uma ponte de dissulfeto a um fragmento da cadeia pesada que inclui a região variável e o domínio C_H1 (Figura 2E).

A estratégia mais utilizada atualmente consiste no uso de um peptídeo conector entre os domínios V_H e V_L. O fragmento resultante é denominado *single-chain Fv* (scFv) (Figura 2D), e constitui um fragmento Fv de cadeia única. O peptídeo conector é geralmente constituído por resíduos de glicina e serina que proporcionam flexibilidade e resistência ao ataque de proteases.

Quando o conector flexível apresenta mais do que 12 AAs, os domínios V_H e V_L interagem entre si assumindo uma orientação espacial similar a que ocorre no fragmento Fv natural (Figura 4A). Com a diminuição da extensão do conector os domínios interligados são incapazes de interagir entre si e são formados pares V_H/V_L através da combinação de domínios presentes em duas moléculas separadas de scFv (Figura 4B). Os dímeros assim formados, denominados *diabodies*, são bivalentes, pois apresentam dois sítios de combinação com antígenos. A redução do co-

necto para 2 ou menos AAs resulta na formação de trímeros, denominados *triabodies* (Figura 4C). Os fragmentos de anticorpos ou mesmo multímeros obtidos a partir destes, têm sido avaliados como candidatos à substituição de imunoglobulinas inteiras em aplicações terapêuticas. Revisões sobre o tema foram feitas por Adams & Schier (1999); Hudson & Kortt (1999); Chames & Baty (2000); van Dijk & van de Winkel (2001).

Um histórico da produção de anticorpos em plantas transgênicas

Devido à possibilidade de produção de anticorpos contra virtualmente quaisquer antígenos, estas moléculas têm sido exploradas em um grande número de aplicações médicas e industriais. Entretanto, a alta complexidade estrutural dos anticorpos inteiros impõe limites à sua produção em larga escala. O fragmento de anticorpo mais complexo já produzido em *E. coli* foi um Fab (Smith, 1996). Nenhuma imunoglobulina inteira funcional foi produzida em bactérias até o presente.

Da mesma maneira que a tecnologia do DNA recombinante possibilitou a clonagem de genes de imunoglobulinas para a expressão dos fragmentos de anticorpos em bactérias, ela tornou

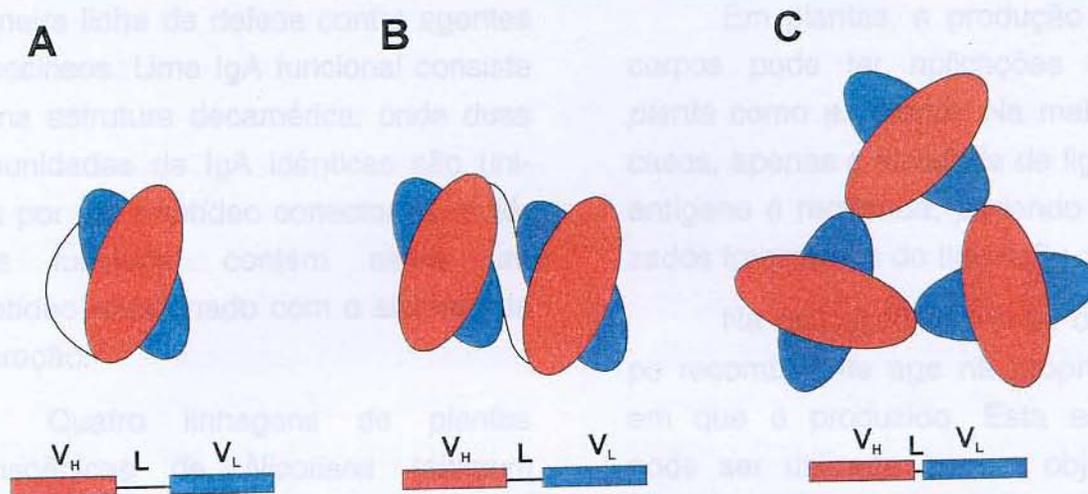


Figura 4: As diferentes formas de scFv. (A) scFv monomérico, conector L contendo mais do que 12 resíduos de AAs; (B) scFv dimérico (*diabody*), conector L com 3 a 12 AAs; (C) scFv trimérico (*triabody*), conector L com menos de 3 AAs. Modificado a partir de Hudson & Kortt (1999).

viável a produção de imunoglobulinas em outros sistemas.

Na tentativa de explorar os sistemas vegetais para a expressão de imunoglobulinas inteiras e funcionais, Hiatt *et al.* (1989) demonstraram num trabalho pioneiro e inovador que plantas transgênicas de tabaco eram capazes de produzir um anticorpo catalítico funcional do isotipo IgG. Este anticorpo liga-se a um éster fosfonato (P3) e catalisa a hidrólise de certos ésteres carboxílicos. Anticorpos catalíticos são descritos também como *abzymes*.

Neste trabalho, os cDNAs que codificavam as cadeias pesada γ e leve κ do anticorpo 6D4 (derivados de mRNAs de um hibridoma de camundongo) foram utilizados para transformar plantas de tabaco. Plantas transgênicas

expressando cada uma das cadeias foram cruzadas entre si e originaram uma progênie em que γ e κ estavam sendo expressas simultaneamente. A capacidade de ligação ao antígeno do anticorpo produzido em plantas foi a mesma do anticorpo produzido pelo hibridoma 6D4.

Desde então surgiram na literatura vários relatos da produção de imunoglobulinas e seus derivados em sistemas vegetais. Os anticorpos produzidos em plantas muitas vezes são denominados *plantibodies*.

Ma *et al.* (1995) mostraram a possibilidade da utilização de plantas para produzir um anticorpo IgA secretório. As imunoglobulinas secretórias do isotipo A são as mais abundantes em secreções mucosas e participam da

primeira linha de defesa contra agentes infecciosos. Uma IgA funcional consiste numa estrutura decamérica, onde duas subunidades de IgA idênticas são unidas por um peptídeo conector. A molécula funcional contém ainda um peptídeo relacionado com o sistema de secreção.

Quatro linhagens de plantas transgênicas de *Nicotiana tabacum* foram geradas e expressavam, cada uma, uma cadeia leve κ de cabra, uma cadeia pesada híbrida α - γ de cabra, uma cadeia de ligação também de cabra e um componente secretório de coelho. O cruzamento sexual entre estas plantas e entre seus descendentes resultou na produção de plantas que expressavam as quatro cadeias simultaneamente. Os autores demonstraram que a progênie foi capaz de produzir uma imunoglobulina secretória funcional, que reconheceu uma adesina de superfície de *Streptococcus mutans*, a bactéria causadora da cárie dental (Figura 5). Até o momento, plantas transgênicas constituem o único sistema de expressão heteróloga capaz de produzir IgAs funcionais (Leite, 2001). A produção de IgAs em mamíferos requer a utilização de dois tipos celulares (Mestecky & McGhee, 1987), ao passo que em tabaco transgênico esta classe de imunoglobulinas é produzida em células individuais (Frigerio *et al.*, 2000).

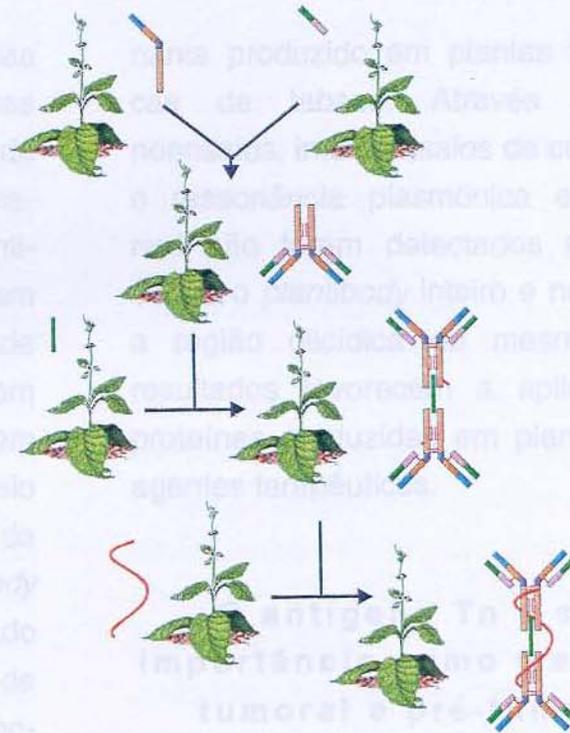
Em plantas, a produção de anticorpos pode ter aplicações tanto *in planta* como *ex planta*. Na maioria dos casos, apenas a atividade de ligação ao antígeno é requerida, podendo ser utilizados fragmentos do tipo scFv ou dsFv.

Na aplicação *in planta*, o anticorpo recombinante age na própria célula em que é produzido. Esta estratégia pode ser utilizada com o objetivo de modificar a atividade *in vivo* de um determinado alvo. Owen *et al.* (1992) foram os primeiros a modular uma via metabólica através da expressão *in situ* de um fragmento scFv anti-fitocromo, em tabaco.

Tavladoraki *et al.* (1993) demonstraram que a expressão constitutiva em plantas transgênicas de *Nicotiana benthamiana* de um fragmento scFv contra o tombusvírus icosaédrico ACMV (*Artichoke Mottled Crinkle Virus*), resultou em atenuação dos sintomas e redução na incidência de infecção.

Para as aplicações *ex planta*, os anticorpos recombinantes geralmente têm que ser purificados e utilizados como reagentes específicos. Na maioria das vezes, são necessárias grandes quantidades de anticorpos, o que geralmente é limitado pelos baixos rendimentos de alguns sistemas de produção. As plantas transgênicas apresentam algumas vantagens na

Figura 5: Esquema geral da produção de uma imunoglobulina do isotipo IgA em tabaco transgênico (Ma *et al.*, 1995). Estão evidenciadas as quatro linhagens transgênicas produzidas. Ao lado de cada linhagem está(ão) representada(s) a(s) cadeia(s) polipeptídica(s) produzida(s) pela planta. As setas indicam os cruzamentos sexuais realizados para que a linhagem final produzisse o IgA funcional. Extraído de Leite (2001).



produção desse tipo de molécula. A primeira consiste na possibilidade de obtenção de grande biomassa a baixo custo, o que compensa o baixo nível de expressão (quando comparado a sistemas bacterianos). A segunda consiste na capacidade que as células vegetais apresentam de sintetizar de forma eficiente diferentes versões de anticorpos (Peeters *et al.*, 2001). Além disso, segundo Hiatt (1990) e Smith & Glick (2000), estima-se que os *plantibodies* apresentem custo final de produção menor que o dos anticorpos obtidos em hibridomas ou em microrganismos.

Vários aspectos relacionados à produção de anticorpos favorecem a utilização de plantas transgênicas. Porém, um requerimento crítico para a

expressão de anticorpos e seus fragmentos é o enovelamento e a montagem corretos das cadeias individuais. Em plantas superiores isso tem sido obtido através do direcionamento dos polipeptídeos para o RE utilizando-se peptídeos sinais de plantas (De Neve *et al.*, 1993), animais (Hiatt *et al.*, 1989) e leveduras (Hein *et al.*, 1991).

Em seu trabalho de 1989, Hiatt *et al.* evidenciaram a necessidade de expressar a cadeia leve κ e pesada γ com uma seqüência líder. Foram geradas plantas que expressavam ambas as cadeias com e sem a seqüência líder. Somente as plantas transformadas com as construções que tinham a seqüência líder foram capazes de produzir imunoglobulinas funcionais.

Apesar da hipótese de que o enovelamento de imunoglobulinas poderia ocorrer espontaneamente em diversos compartimentos celulares não ser descartada, sabe-se que nos linfócitos B as cadeias leve e pesada são sintetizadas como polipeptídeos precursores. Estes precursores são endereçados ao lúmen do RE, onde as seqüências sinais são clivadas e algumas chaperoninas auxiliam no enovelamento correto de imunoglobulinas funcionais. Além disso, enzimas envolvidas na glicosilação de proteínas promovem a adição de carboidratos em sítios específicos.

A via de secreção de proteínas, mediada pelo complexo de Golgi, direciona os polipeptídeos do RE para a superfície celular ou para compartimentos intracelulares (vacúolos em plantas e leveduras e lisossomos em animais). Uma grande variedade de proteínas de interesse farmacêutico – dentre elas os anticorpos – são secretadas por células de mamíferos. Muitos dos passos da via de secreção em plantas, incluindo o enovelamento protéico, a oligomerização, a glicosilação no RE e as primeiras etapas do processamento de glicanas do complexo de Golgi, são, se não idênticas, altamente similares aos passos da via secretória em mamíferos (Rayon *et al.*, 1998; Vitale & Denecke, 1999).

Em mamíferos, pelo menos duas chaperonas (BiP/GRP78 e GRP94) auxiliam no dobramento e na montagem das cadeias leve e pesada dos anticorpos. Em plantas já foram identificadas no RE chaperonas homólogas a BiP e GRP94. Considerando-se a presença destas proteínas, é possível inferir que o enovelamento de anticorpos no RE de células vegetais não seja muito diferente daquele que é promovido em células animais (Peeters *et al.*, 2001).

Com relação ao padrão de glicosilação de anticorpos produzidos em plantas, alguns grupos têm realizado análises para verificar se imunoglobulinas produzidas por sistemas vegetais apresentam as mesmas glicanas que as produzidas por sistemas animais.

As imunoglobulinas são glicoproteínas que apresentam uma variação no seu conteúdo de carboidratos. Apesar de a maioria dos estudos do grau de glicosilação de anticorpos estar relacionado à região constante, sabe-se que a região variável também pode ser glicosilada. Os oligossacarídeos presentes na região variável parecem estar envolvidos na ligação ao antígeno, uma vez que ficam expostos a ele nas imunoglobulinas enoveladas (Dunn-Walters *et al.*, 2000).

Cabanes-Macheteau *et al.* (1999) fizeram uma análise detalhada da glicosilação de uma IgG monoclonal funcio-

nal produzida em plantas transgênicas de tabaco. As estruturas das N-glicanas encontradas nas cadeias pesadas do *plantibody* foram identificadas e comparadas as glicanas encontradas no anticorpo correspondente, de origem murina. Todos os sítios de N-glicosilação encontrados estavam glicosilados no anticorpo de origem vegetal, assim como no produzido pelo hibridoma. No entanto, o número de glicofornas evidenciado no *plantibody* foi maior do que o número encontrado no anticorpo produzido por células de mamífero. Dentre as glicofornas encontradas, certos oligossacarídeos eram específicos de plantas. Apesar da diversidade estrutural das glicanas adicionadas pelas células vegetais, a glicosilação não resultou em alteração na solubilidade e na funcionalidade da IgG vegetal. Os oligossacarídeos próprios de proteínas vegetais não representaram uma limitação para a utilização tópica da IgG em imunoterapia. Todavia, os autores consideraram que a diferença no padrão de glicosilação poderia provocar uma resposta imunológica em seres humanos, no caso de administração parenteral.

Na tentativa de avaliar a imunogenicidade de um *plantibody* em animais, Chargelegue *et al.* (2000) imunizaram camundongos subcutaneamente (juntamente com um adjuvante) com um anticorpo monoclonal recombi-

nante produzido em plantas transgênicas de tabaco. Através de imunoenaios, imunoenaios de competição e ressonância plasmônica em tempo real não foram detectados anticorpos contra o *plantibody* inteiro e nem contra a região glicídica do mesmo. Estes resultados favorecem a aplicação de proteínas produzidas em plantas como agentes terapêuticos.

O antígeno Tn e sua importância como marcador tumoral e pré-tumoral

Inicialmente o antígeno Tn foi identificado em pacientes portadores da síndrome Tn, também conhecida como poliaglutinabilidade permanente. Esta doença humana rara caracteriza-se pela exposição de determinantes antigênicos de natureza glicídica truncados, em particular o antígeno Tn, na superfície de uma parte das células sanguíneas. A expressão deste antígeno é responsável pela aglutinação das hemácias. Os pacientes portadores dessa síndrome são, geralmente, separados em um grupo sanguíneo próprio, o grupo Tn, em contraste com os grupos sanguíneos A, B, AB e O. Estes pacientes ocasionalmente desenvolvem anemia hemolítica, trombopenia e leucopenia, distúrbios provocados, na maioria das vezes, por anticorpos naturais anti-Tn

presentes no soro circulante (Bird *et al.*, 1971).

O antígeno Tn é encontrado também, em pequenas quantidades, em um tipo de proteína denominado mucina. As mucinas constituem grande parte do muco que recobre as superfícies lumbais de órgãos epiteliais. Dessa forma, elas agem como uma barreira física entre o ambiente extracelular e a membrana plasmática, e faz parte dos mecanismos de defesa desenvolvidos pelos epitélios (Moniaux *et al.*, 2001). Em câncer, freqüentemente sua expressão é elevada e o seu padrão de glicosilação é alterado.

Várias famílias de mucinas já foram descritas. Todas elas apresentam algumas características comuns: 1) a repetição em *tandem* de certos domínios nucleotídicos; 2) um domínio peptídico contendo altas porcentagens de serinas e treoninas e 3) um padrão de expressão de RNAs complexo (Moniaux *et al.*, 2001).

A família de mucinas que apresenta maior utilidade clínica como marcador tumoral, particularmente como marcador em câncer de mama humano, é codificada pelo gene polimórfico *Muc1* (Petrakou *et al.*, 1998).

As MUC1 são glicoproteínas associadas a membranas que representam o principal componente da superfície luminal de células glandulares

normais. Elas foram descritas pela primeira vez no leite humano, como um produto de secreção das células epiteliais produtoras de leite.

As mucinas MUC1 estão organizadas estruturalmente em três domínios: uma cauda citoplasmática, uma região transmembrana e um domínio extracelular extenso formado por repetições em *tandem* de um domínio de 20 aminoácidos. Carregam uma alta porcentagem de oligossacarídeos ligados a hidroxilas livres (O-glicosilação) dos resíduos de serina e treonina localizados nessas regiões repetitivas (revisado por Van den Steen *et al.*, 1998).

O primeiro passo na síntese dos oligossacarídeos O-ligados em proteínas do tipo mucina corresponde à adição de N-acetil-galactosamina (GalNac) à hidroxila, produzindo o antígeno Tn (Figura 6). Em células normais ocorre, então, a adição de um resíduo de galactose (Gal) ou N-acetil-glicosamina (GlcNac), produzindo estruturas denominadas *Core 1* (antígeno TF, Thomsen-Friedenreich) e *Core 3*, respectivamente. Estas estruturas são posteriormente estendidas através de glicosilações adicionais (Van den Steen *et al.*, 1998; Iitzkowitz *et al.*, 1989; Cho *et al.*, 1994).

Em células cancerosas, geralmente, algumas destas etapas de glicosilação são inibidas, determinando o acúmulo dos antígenos Tn e TF. Em

tumores é freqüente também a adição de ácido siálico (ácido N-acetilneuramínico) após a formação do antígeno Tn. O ácido siálico age como um terminador da glicosilação, inibindo as modificações subseqüentes. Quando isso ocorre, forma-se então o antígeno sialil-Tn (sTn).

Apesar desse tipo de processamento ainda não ser bem entendido, sabe-se que as reações de glicosilação são diretamente dependentes da atividade específica de enzimas glicosiltransferases e da disponibilidade dos precursores (Schachter & Willians, 1982). Em células normais as vias enzimáticas de adição de Gal e GlcNac são altamente ativas. Em contraste, células tumorais apresentam estas duas vias com atividade insuficiente e alta atividade da via de adição de ácido siálico.

A expressão dos antígenos glicídicos Tn, TF e sTn tem sido relacionada a prognósticos de transformação maligna e à agressividade de carcinomas em vários órgãos (Springer, 1984), tais como mama (Osinaga *et al.*, 1992; Cho *et al.*, 1994; Kinney *et al.*, 1997; Hadden, 1999; Osinaga *et al.*, 2000), ovário (Kobayashi *et al.*, 1992; Ghazizadeh *et al.*, 1997), útero (Hirao *et al.*, 1993; Terasawa *et al.*, 1996), sistema gastrintestinal (Iitzkowitz *et al.*, 1989; Iitzkowitz *et al.*, 1990; Cao *et al.*, 1995;

Chung *et al.*, 1996; Sakamoto *et al.*, 1997; Burdick *et al.*, 1997), cavidade nasal (Franchi & Gallo, 1996) e glândulas salivares (Therkildsen *et al.*, 1993; Therkildsen *et al.*, 1998).

O antígeno Tn é expresso na maioria dos tumores humanos (Springer, 1984; Hakomori, 1989), sendo considerado um importante marcador associado a prognósticos desfavoráveis em câncer de mama (Osinaga *et al.*, 1992; Osinaga *et al.*, 1994; Desai *et al.*, 1997; Kanska *et al.*, 1998). Babino *et al.* (2000) observaram, ao analisar tecidos mamários e amostras de soro de ratos com câncer de mama induzido por N-nitrosometiluréa, que este antígeno é detectável não somente em carcinomas já estabelecidos, mas também nos tecidos em processo de transformação maligna, indicando portanto tratar-se de um importante marcador pré-tumoral.

Devido ao seu caráter imunogênico e à associação com carcinomas, os antígenos Tn e sTn têm sido explorados no desenvolvimento de vacinas anti-câncer (Hadden, 1999; Miles & Taylor-Papadimitriou, 1999). Por exemplo, mucina da região submaxilar de ovelha, enriquecida em antígeno Tn através de tratamento com neuraminidase, foi utilizada com sucesso na imunização de camundongos contra a linhagem celular metastática de câncer de mama TA3-HA (Singhal *et al.*, 1991).

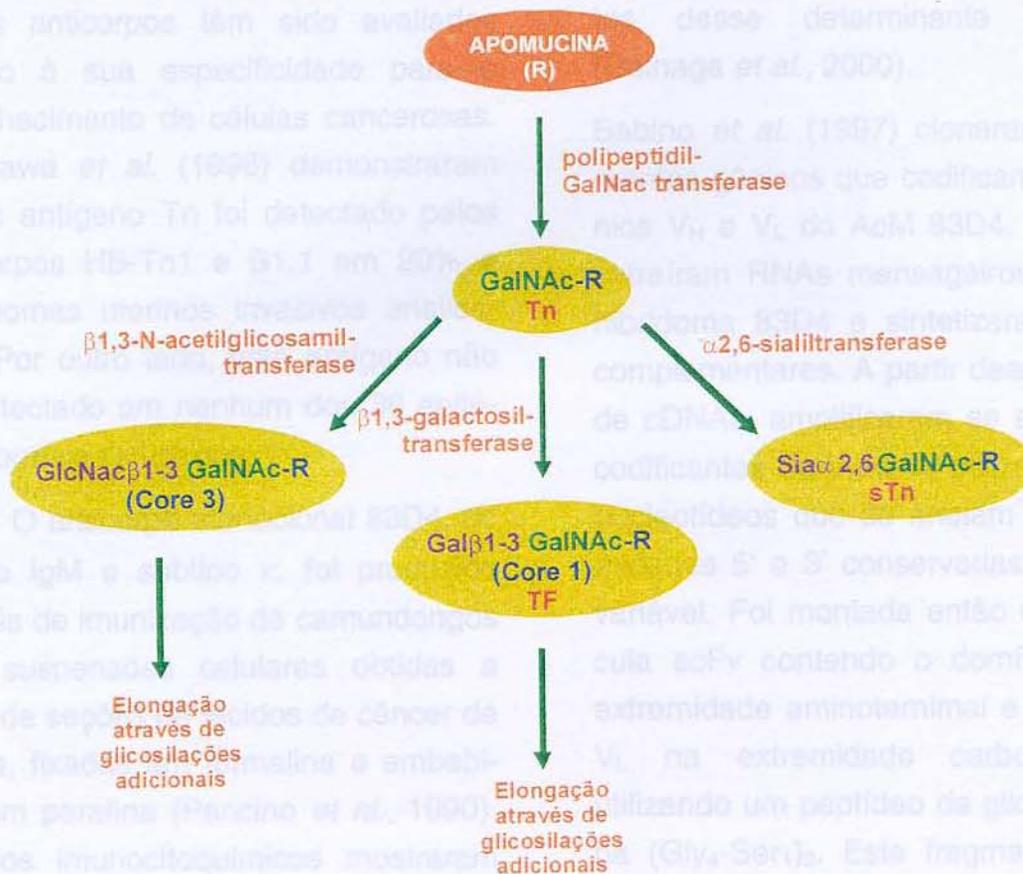


Figura 6: Esquema simplificado das etapas iniciais de síntese dos O-glicanos ligados a mucina. Tn, TF e sTn são determinantes antigênicos glicídicos expressos preferencialmente em células cancerosas. R, representa resíduos de serina ou treonina.

Encontra-se em fase final de ensaios clínicos a vacina Theratope™ contra câncer metastático de mama. Esta construção associada com o adjuvante Detox™ e com uma dose baixa de ciclofosfamida apresentou alta atividade imunogênica em animais e humanos (Longenecker *et al.*, 1994; Yacyshyn *et al.*, 1995; Miles *et al.*, 1996). Diferentes versões de peptídeos sintéticos contendo os determinantes antigênicos glicídicos

resíduos de Tn adjacentes, im-
cos conjugados a diversas proteínas portadoras têm sido testados na imunoterapia de câncer (Ding *et al.*, 1993; Lo-Man *et al.*, 1999; Ragupathi *et al.*, 1999).

Anticorpos anti-Tn

Diversos anticorpos monoclonais (AcMs) foram produzidos contra o antígeno Tn (Babino *et al.*, 1997; Itzkowitz

et al., 1989; Terasawa *et al.*, 1996). Esses anticorpos têm sido avaliados quanto à sua especificidade para o reconhecimento de células cancerosas. Terasawa *et al.* (1996) demonstraram que o antígeno Tn foi detectado pelos anticorpos HB-Tn1 e B1.1 em 20% e carcinomas uterinos invasivos analisados. Por outro lado, este antígeno não foi detectado em nenhum dos 36 epitélios normais estudados.

O anticorpo monoclonal 83D4, do isotipo IgM e subtipo κ , foi produzido através de imunização de camundongos com suspensões celulares obtidas a partir de seções de tecidos de câncer de mama, fixados em formalina e embebidos em parafina (Pancino *et al.*, 1990). Estudos imunocitoquímicos mostraram que este AcM reage fortemente com células de diversos carcinomas, incluindo câncer de mama, ovário e região do colo retal, porém apresenta baixa ou ausência de reatividade com tecidos normais (Charpin *et al.*, 1992). O AcM 83D4 reconhece antígenos Tn encontrados em glicoproteínas de alto peso molecular presentes em infiltrados de câncer de mama (Pancino *et al.*, 1991) e na linhagem de células de câncer de mama MCF-7 (Osinaga *et al.*, 1994). Estudos de espectroscopia plasmônica de superfície utilizando glicopeptídeos sintéticos mostraram que o reconhecimento pelo AcM 83D4 requer no mínimo dois resíduos de Tn adjacentes, indi-

cando sua preferência por agrupamentos desse determinante antigênico (Osinaga *et al.*, 2000).

Babino *et al.* (1997) clonaram os segmentos gênicos que codificam os domínios V_H e V_L do AcM 83D4. Para isso, extraíram RNAs mensageiros totais do hibridoma 83D4 e sintetizaram cDNAs complementares. A partir dessa coleção de cDNAs, amplificaram as seqüências codificantes de V_H e V_L utilizando oligonucleotídeos que se anelam nas extremidades 5' e 3' conservadas da região variável. Foi montada então uma molécula scFv contendo o domínio V_H na extremidade aminoterminal e o domínio V_L na extremidade carboxiterminal, utilizando um peptídeo de glicina e serina (Gly₄-Ser₁)₃. Este fragmento, denominado scFv direto (scFvDIR), foi produzido em bactéria e testado através de ELISA quanto à atividade anti-Tn, mostrando-se eficiente no reconhecimento deste antígeno.

Um segundo fragmento scFv foi construído a partir do hibridoma 83D4, contendo, dessa vez, o domínio V_L na extremidade aminoterminal e o domínio V_H na extremidade carboxiterminal. Este fragmento foi denominado scFv invertido (scFvINV). A Figura 7 mostra uma comparação entre os dois fragmentos scFvs 83D4 construídos.

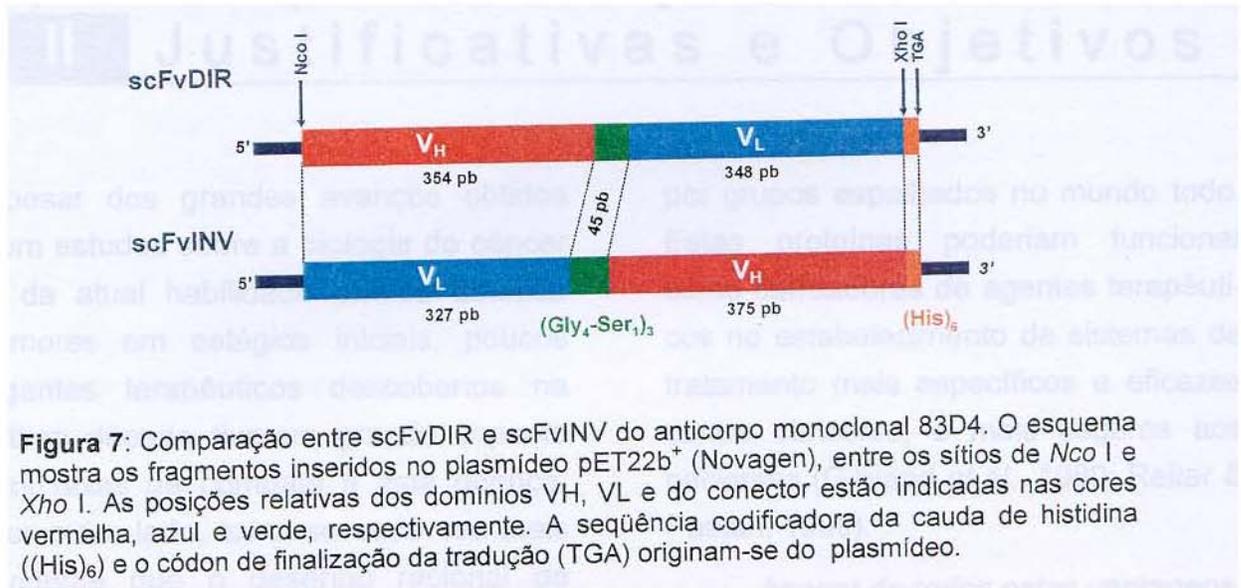


Figura 7: Comparação entre scFvDIR e scFvINV do anticorpo monoclonal 83D4. O esquema mostra os fragmentos inseridos no plasmídeo pET22b⁺ (Novagen), entre os sítios de *Nco* I e *Xho* I. As posições relativas dos domínios VH, VL e do conector estão indicadas nas cores vermelha, azul e verde, respectivamente. A sequência codificadora da cauda de histidina ((His)₆) e o códon de finalização da tradução (TGA) originam-se do plasmídeo.

Capítulo II Apresentação da Tese, Justificativas e Objetivos

Apesar dos grandes avanços obtidos com estudos sobre a biologia do câncer e da atual habilidade em se detectar tumores em estágios iniciais, poucos agentes terapêuticos descobertos na última década tiveram grande impacto nas taxas de combate a esta doença. Por outro lado, torna-se cada vez mais evidente que o desenho racional de drogas seria capaz de provocar mudanças significativas neste quadro.

Várias células tumorais apresentam marcadores que são expressos especificamente na sua superfície ou são secretados para o ambiente circundante. A utilização destes marcadores para diferenciar as células cancerosas das células normais consiste numa estratégia valiosa de combate a tumores. O desenho de drogas com capacidade de fazer a distinção entre os tipos celulares normal e tumoral representa o primeiro passo no desenvolvimento de terapias com as chamadas “drogas inteligentes”.

Os anticorpos são moléculas capazes de diferenciar antígenos distintos que apresentam alta similaridade. Diversos anticorpos específicos contra antígenos tumorais têm sido produzidos

por grupos espalhados no mundo todo. Estas proteínas poderiam funcionar como carreadores de agentes terapêuticos no estabelecimento de sistemas de tratamento mais específicos e eficazes contra cânceres, e mais seguros aos pacientes (Gilliland *et al.*, 1980; Reiter & Pastan, 1998).

Apesar de todas estas vantagens, os métodos atualmente disponíveis para produção de anticorpos em escala comercial são altamente laboriosos e apresentam altos custos. Isso torna o produto final caro e muitas vezes inviável na utilização em terapias.

Há algum tempo as plantas têm sido exploradas como possíveis biofábricas para a produção de proteínas de interesse farmacêutico. Em nosso laboratório, foi desenvolvido um cassete para expressão de proteínas heterólogas em sementes de plantas. Com a finalidade de utilizar este cassete para produção de anticorpos, foi estabelecida uma colaboração com pesquisadores do Laboratório de Oncologia Básica, Departamento de Bioquímica, Faculdade de Medicina, Montevideu, Uruguai. Através desta colaboração, nos propusemos a produzir o fragmento scFvINV

83D4 anti-Tn em sementes de plantas transgênicas de tabaco.

Diante destas perspectivas, a presente dissertação teve o objetivo geral de expressar o fragmento scFvINV do anticorpo monoclonal 83D4 em plantas transgênicas de tabaco.

Para se chegar a este resultado, o projeto teve os seguintes objetivos específicos:

- 1) Realizar ensaios de transformação de discos foliares de tabaco utilizando *Agrobacterium tumefaciens*, com uma construção gênica contendo a seqüência codificadante do fragmento scFvINV 83D4 sob controle do promotor de γ -kafirina;
- 2) Selecionar e regenerar plantas transgênicas;
- 3) Analisar as plantas selecionadas quanto à integração do transgene e quanto à expressão do mesmo;
- 4) Avaliar a eficiência de plantas de tabaco para produzir esse tipo de molécula;
- 5) Estabelecer uma metodologia de purificação do scFvINV a partir de extratos protéicos de sementes.

As metodologias de rotina, como digestão com enzimas de restrição, reações de ligação, transformação de bactérias, minipreparação de DNA de plasmídeo de *E. coli*, *Southern blotting*, *western blotting*, preparo de meios de cultura e soluções foram realizadas de acordo com as instruções dos fabricantes dos reagentes e com Sambrook *et al.* (1989).

Produção do fragmento scFvINV em bactéria

A produção do fragmento scFvINV recombinante foi realizada a partir do plasmídeo pETscFvINV utilizando-se a cepa BL21-*CodonPlus*(DE3)-RIL de *E. coli* (Stratagene). A indução foi feita em uma cultura de 600 ml obtida diluindo-se (com base na DO a 600 nm) um pré-inóculo de aproximadamente 18 horas para DO 0,1. A indução foi realizada com 200 mM de lactose, por 6 horas, a 37°C, sob agitação de 300 rpm. Foram testadas induções em meio LB e meio 2YT. Para cada experimento realizado foi feito um experimento controle, sem a adição de lactose. Após o período de indução, a cultura foi centrifugada por 15 minutos a

4.000 rpm (rotor A-4-62, Eppendorf). O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi suspenso em 180 ml de tampão de lise (tris-HCl pH 7,5 50 mM; Benzamidina-HCl 5 mM; DTT 5 mM; EDTA 5 mM). A lise foi realizada adicionando-se lizozima (0,3 mg/ml de cultura), seguida de congelamento em nitrogênio líquido; após o degelo a 37°C foram realizados 8 ciclos (40 segundos cada) de sonicação (em gelo). O lisado foi então centrifugado por 25 minutos a 14.000 rpm, a 4°C. O sobrenadante foi considerado como a fração solúvel do extrato e o sedimento como a fração insolúvel. O sedimento foi suspenso em 180 ml de tampão de lise gelado. Amostras das 2 frações foram analisadas em SDS-PAGE 15% em condições redutoras.

Purificação do scFvINV produzido em bactéria

As proteínas presentes na fração insolúvel foram solubilizadas em tampão de ligação (tris-HCl pH 8,0 20 mM; imidazol 5 mM; NaCl 0,5 M e uréia 4 M). Após a solubilização, o material foi centrifugado por 30 minutos a 14.000 rpm (rotor SS-34, Sorval).

A primeira etapa de purificação consistiu em uma cromatografia de afinidade a metal (IMAC, *immobilized metal chelate affinity chromatography*), utilizando-se uma resina com uma matriz de agarose contendo o grupamento quelante Ni-NTA (Quiagen). A cromatografia foi realizada a temperatura ambiente. A resina foi previamente equilibrada em tampão de ligação. A adsorção das proteínas foi realizada antes do empacotamento da resina, sob agitação suave. Após a adsorção, a resina foi empacotada em coluna de 15 mm de diâmetro, por 40 mm de altura. A renaturação protéica foi promovida com as proteínas adsorvidas à resina, usando-se um gradiente decrescente de concentração de uréia de 4 M a 0,5 M, em tampão de renaturação (tris-HCl pH 8,0 20 mM; imidazol 20 mM; NaCl 0,5 M). A eluição do anticorpo adsorvido foi feita com um gradiente de 20 mM a 1 M de imidazol, em tampão de eluição (tris-HCl pH 8,0 20 mM; NaCl 0,5 M; uréia 0,5 mM). A quantificação da proteína total nas amostras coletadas foi feita segundo Bradford (1976).

As frações coletadas na cromatografia de afinidade que apresentaram proteína foram reunidas e a mistura contendo 7,2 ml foi submetida a uma cromatografia de exclusão molecular (filtração em gel), que consistiu na segunda etapa de purificação. Foi utilizada a resina Superdex 75 (Amersham

Pharmacia Biotech) empacotada em coluna XK 26/70 (Amersham Pharmacia Biotech), com altura de 62,4 cm de resina. A coluna foi equilibrada e lavada com tampão contendo tris-HCl pH 7,5 25 mM; DTT 1 mM; EDTA 5 mM e NaCl 150 mM.

A estimativa da massa molecular dos produtos de eluição foi realizada com base no coeficiente de eluição (K_{av}), utilizando-se a relação:

$$[K_{av} = \frac{V_e - V_o}{V_t - V_o}]$$

onde V_e representa o volume de eluição; V_o , o volume morto da resina, determinado através do volume de eluição de Blue-Dextran (2000 kDa); e V_t , o volume total de resina empacotada. Uma curva padrão estabelecida utilizando-se as proteínas: soroalbumina bovina (67 kDa), ovalbumina (43 kDa), quimiotripsinogênio A (25 kDa) e ribonuclease A (13,7 kDa). Com base nos volumes de eluição, V_t de 331,13 ml e V_o de 106,25 ml, foram calculados os respectivos K_{av} . Os valores de K_{av} foram relacionados linearmente com os logaritmos das massas moleculares de cada proteína. A massa molecular do anticorpo recombinante recuperado foi obtida através de interpolação gráfica.

As frações contendo o fragmento de anticorpo recombinante foram reunidas e concentradas através de ultrafiltração em aparelho de filtração tangencial *Labscale TFF System*

(Millipore). Foi utilizada membrana *Pellicon XL Filter* (PXB010A50, Millipore) que apresenta limite de exclusão de 10 kDa.

Imunização de coelhos para produção de anti-soros policlonais

Anticorpos policlonais contra o scFvINV produzido em bactéria foram obtidos a partir de imunização de coelhos da linhagem Nova Zelândia. Foram imunizados 2 coelhos machos de aproximadamente 14 semanas. O scFvINV puro foi administrado em três doses. A primeira dose foi aplicada na forma de uma emulsão (1:1, volume:volume) com adjuvante completo de Freund (Sigma). A segunda e a terceira doses foram aplicadas na forma de emulsão (1:1, volume:volume) com adjuvante incompleto de Freund (Sigma). Para preparação das emulsões, o scFvINV foi previamente submetido a desnaturação por 10 minutos a 100°C em tampão contendo tris-HCl pH 6,8 0,3 M; glicerol 40%; β -mercaptoetanol 5% e SDS 2%. Em cada dose, procedeu-se a aplicação de cerca de 20 μ g de scFvINV puro em cada animal, sendo que o total de emulsão administrada foi dividido em quatro injeções subcutâneas na região ventral e quatro injeções subcutâneas na região dorsal.

Dezesseis dias após a aplicação da primeira dose, foi aplicada a segunda. A primeira coleta de sangue para obtenção do soro foi realizada 20 dias após a administração da segunda dose.

Uma terceira dose de scFvINV puro foi administrada 35 dias após a segunda. A segunda coleta de sangue foi realizada quinze dias após a aplicação da terceira dose do antígeno.

As amostras de sangue coletadas foram centrifugadas a temperatura ambiente por 20 minutos a 3000 rpm (rotor A-4-62, Sorval). Os sobrenadantes foram coletados e submetidos a nova centrifugação por 10 minutos a 3000 rpm (rotor A-4-62, Sorval). Os sobrenadantes foram então coletados e estocados a -20°C até o momento de utilização.

A especificidade dos soros obtidos contra o scFvINV foi testada através de *western blotting*.

***Western blottings* do scFvINV produzido em bactéria**

Para análise das etapas de purificação do scFvINV a partir de extratos bacterianos as amostras foram submetidas a eletroforese em SDS-PAGE 15% (condições redutoras) e as proteínas transferidas para membranas Hybond-N (Amersham Pharmacia Biotech). Foram

utilizados os seguintes anticorpos primários: anti-soro policlonal, preparado em coelho, específico contra o anticorpo monoclonal AcM 83D4 [diluição 1:500, incubação por 15 horas a temperatura ambiente] (gentilmente cedido pelos Drs. Alvaro Babino e Eduardo Osinaga) e anti-soro policlonal, produzido em coelho, específico para reconhecimento da cauda de Histidina [diluição 1:500, incubação por 15 horas a temperatura ambiente] (His-Probe G-18, Santa Cruz Biotechnology).

Para análise dos anticorpos policlonais produzidos em coelho, amostras de scFvINV puro foram submetidas a eletroforese em SDS-PAGE 15% em condições redutoras e transferidas para membranas Hybond-N (Amersham Pharmacia Biotech). Foram aplicados no gel 200 ng e 50 ng de scFvINV, para cada teste efetuado. Como anticorpos primários foram utilizados os soros coletados (1ª e 2ª coletas) dos coelhos 1 e 2, imunizados com o scFvINV puro. Foram testadas as seguintes diluições: 1:250; 1:500 e 1:1000, com incubação por 15 horas, a temperatura ambiente.

Como anticorpo secundário foi utilizado anti-soro anti-IgG de coelho conjugado a fosfatase-alcálica, preparado em cabra (Sigma) [diluição 1:5000, incubação por 2 horas a temperatura ambiente]. A revelação foi realizada com o substrato quimioluminescente da

fosfatase-alcálica CSPD (Tropix) e filme Kodak MXG/Plus.

Ensaio de Elisa

Os ensaios de Elisa para teste da especificidade do fragmento scFvINV produzido em bactéria contra o antígeno Tn foram realizados pelos colaboradores do Uruguai. A metodologia descrita a seguir foi obtida através de comunicação pessoal.

O antígeno Tn foi submetido ao ensaio sob a forma de mucina submaxilar ovina, que foi purificada de glândulas submaxilares de carneiro. A mucina pura foi submetida a desialização por tratamento com HCl 0,01 M durante 1 hora, a 80°C, seguido de neutralização com NaOH 0,01 M.

A mucina desializada foi adsorvida à placa de Elisa em uma concentração de 250 ng/ml em tampão carbonato, pH 9,6, a 4°C, durante aproximadamente 15 horas. O bloqueio foi realizado utilizando-se gelatina 1% em PBS. A incubação com os anticorpos foi realizada em PBS contendo Tween20 0,1% e gelatina 0,5%, por 1 hora e meia a 37°C. As lavagens foram realizadas com PBS contendo Tween20 0,05%. Como anticorpo secundário foi utilizado um anticorpo anti-83D4 produzido em coelho. Foi utilizado um anticorpo terciário anti-Ig de coelho conjugado a Biotina

(Sigma), na diluição 1:6000. A revelação foi feita com avidina conjugada a peroxidase (Sigma), na diluição 1:2000, com ABTS como substrato. A densidade óptica foi analisada em leitor de Elisa, com um comprimento de onda de 405 nm.

Construção dos plasmídeos para expressão do scFvINV em sementes de plantas

A seqüência codificadora do fragmento scFvINV foi obtida a partir do plasmídeo pETscFvINV, que é o plasmídeo pET22b+ (Novagen) contendo o fragmento scFvINV (Figuras 7 e 8), gentilmente cedido pelos Drs. Alvaro Babino e Eduardo Osinaga do Laboratório de Oncologia Básica, Departamento de Bioquímica, Faculdade de Medicina, Montevideu, Uruguai. O fragmento scFvINV foi amplificado por PCR, utilizando-se como iniciadores os oligonucleotídeos B5SCFV e K3SCFV (Figura 8). As reações de PCR foram realizadas através de uma etapa inicial de desnaturação a 94°C por 3 minutos, seguida de 30 ciclos de: desnaturação a 94°C por 45 segundos, anelamento a 50°C por 30 segundos e extensão pela *Tli* DNA polimerase (Promega) a 72°C por 1 minuto e 30 segundos e de uma última etapa de extensão a 72°C por 20 minutos. O produto da reação foi

produto da reação foi submetido a digestão com a enzima *Kpn* I.

O fragmento PSscFvINV foi obtido a partir da adição da seqüência codificadora do peptídeo sinal de *Coix* (PS) à extremidade abrupta 5' do fragmento scFvINV (Figura 9). A seqüência codificadora de PS é resultante do anelamento dos oligonucleotídeos sintéticos PS1 e PS2 (este, previamente fosforilado), que geram um fragmento com extremidade 3' abrupta e extremidade 5' compatível com produto de digestão com a enzima *Nco* I. Ao produto de ligação entre PS e o fragmento scFvINV foi adicionado o plasmídeo pRT-PGK, contendo o promotor de γ -kafirina, previamente digerido com *Knp* I e *Nco* I obtendo-se o plasmídeo pRT-PSscFvINV (Figura 9).

O fragmento scFvINV foi seqüenciado utilizando-se o plasmídeo pRT-PSscFvINV como molde e os iniciadores CONS3 [CTTATCTGGGAAC-TACTCACAC] e CONS5 [CCCTCG-TACGCCTATGCAC] (Figura 9). Foram utilizados o ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit, um ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer e o programa DNA Sequencing Analysis Software Version 3.0 (Applied Biosystems). Os seqüenciamentos foram realizados em triplicata. As seqüências consenso obtidas a partir do seqüenciamento foram comparadas

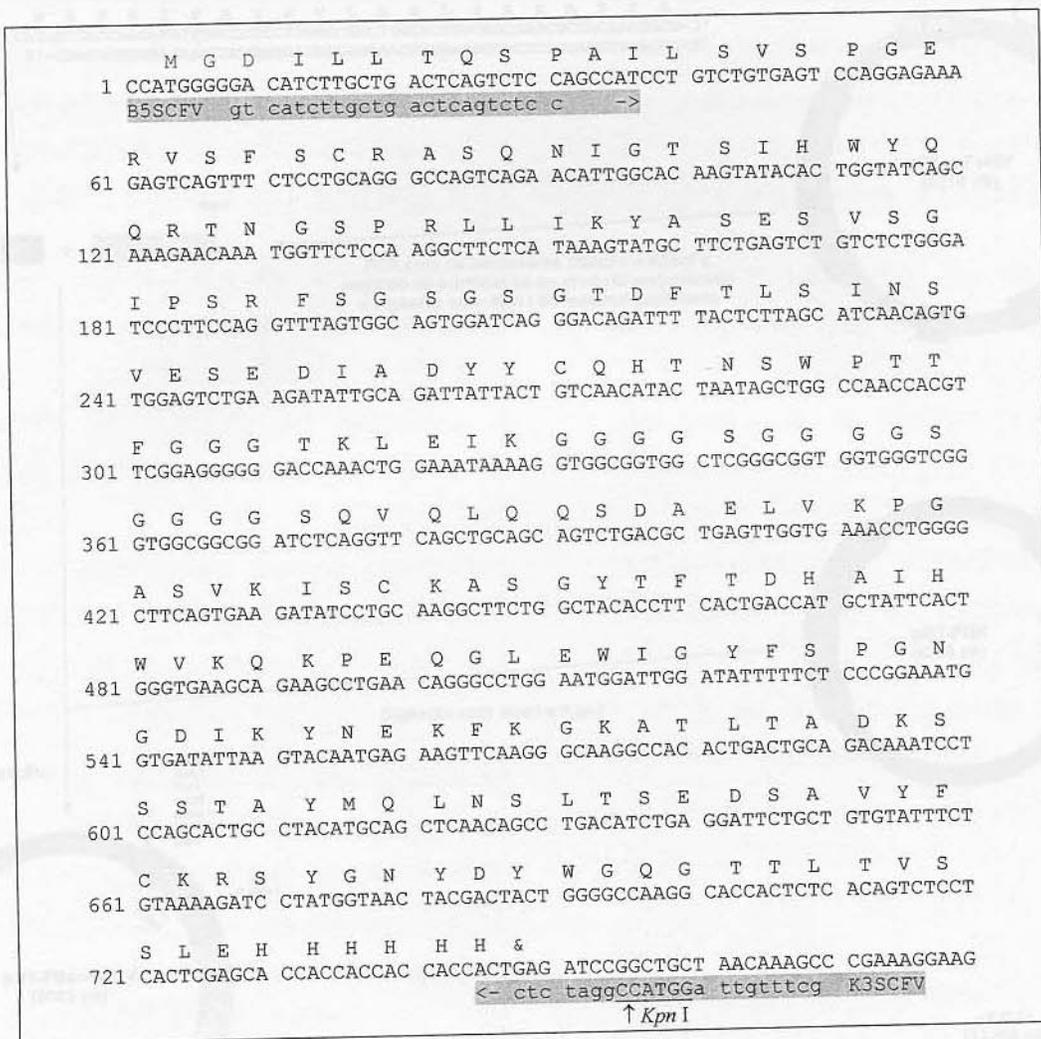


Figura 8: Seqüências do scFvINV (clonado em pET22b+) e dos iniciadores B5SCFV e K3SCFV. As linhas inferiores representam a seqüência de nucleotídeos e as linhas superiores a seqüência de aminoácidos. À esquerda estão indicados os números do nucleotídeos. O sítio para reconhecimento pela enzima *Kpn* I está indicado pela seta.

com as seqüências de V_H e V_L do anticorpo monoclonal 83D4, depositadas no banco de dados do National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Foi utilizado o programa BLAST. Os números de acesso são AF201961 para V_L e AF201962 para V_H .

A partir do plasmídeo pRT-PSscFvINV retirou-se o cassete de expressão PGK-PSscFvINV-T35S com a enzima *Hind* III, o qual foi transferido para o plasmídeo pBI131 (Clontech) previamente digerido com a mesma enzima (Figura 9).

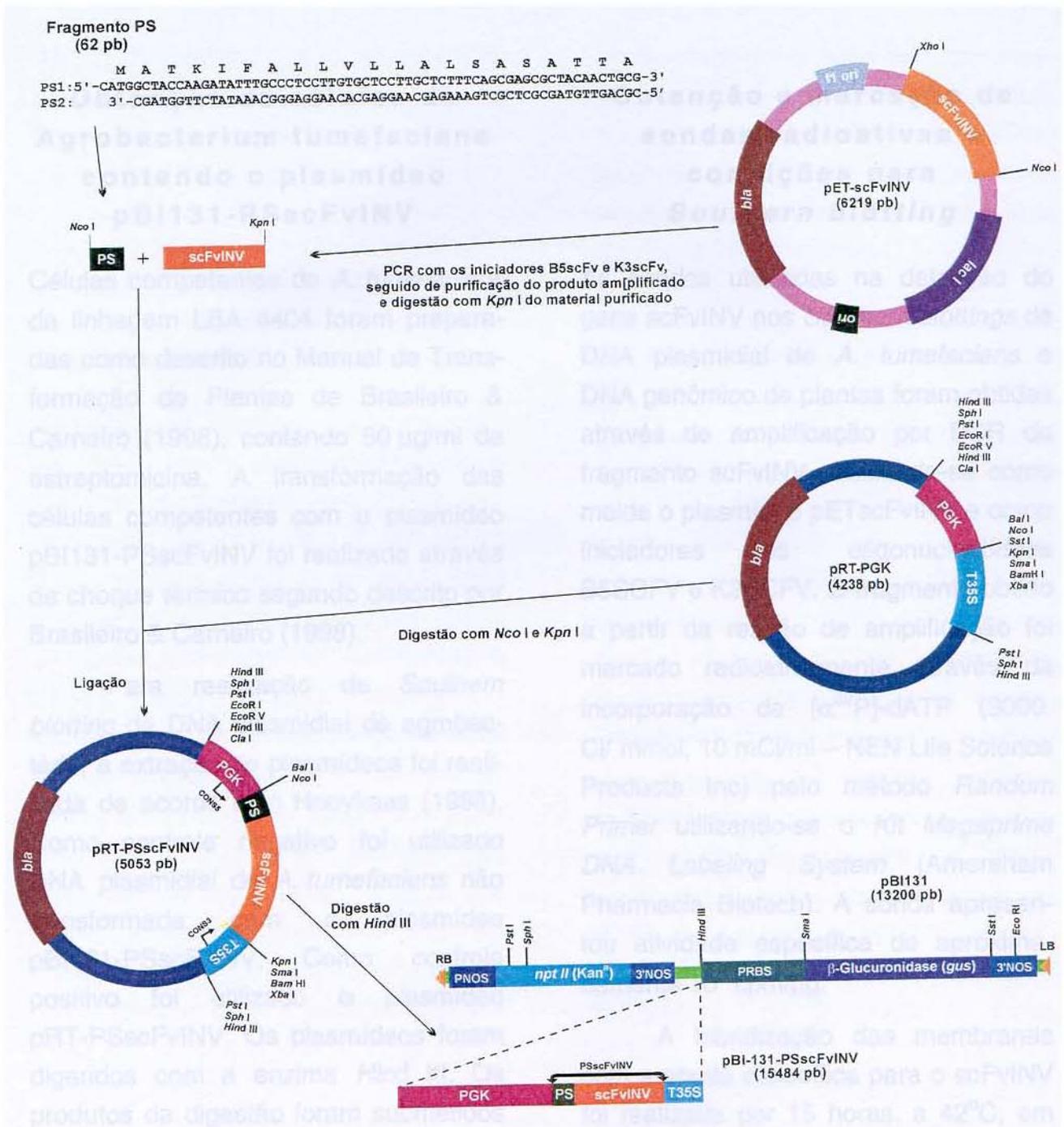


Figura 9: Estratégia para construção dos plasmídeos pRT-PSscFvINV e pBI131-PSscFvINV. O fragmento scFvINV amplificado por PCR a partir de pETscFvINV, purificado, digerido com *Kpn* I e ligado ao peptídeo sinal de *Coix* (PS). O segmento resultante foi clonado em pRT-PGK previamente digerido com *Kpn* I e *Nco* I. O cassete de expressão PGK-PSscFvINV-T35S foi retirado de pRT-PSscFvINV por digestão com *Hind* III e clonado em pBI131, resultando no plasmídeo pBI131-PSscFvINV. A região do T-DNA do vetor binário pBI131, delimitada pelas bordas direita (RB) e esquerda (LB), contém os genes *nptII* e *gus*, que codificam as enzimas neomicina fosfotransferase (que confere resistência a kanamicina) e β-glucuronidase (GUS), respectivamente. Estes genes estão sob controle do promotor da nopalina sintetase (PNOS) e da ribulose-1,5-bifosfato carboxilase (PRBS) e do sinal de poliadenilação da nopalina sintetase (3'NOS). *bla*: gene que codifica a enzima β-lactamase, que confere resistência a ampicilina; *f1* origin: origem de replicação para fagos filamentosos; *ori*: origem de replicação do plasmídeo; *lacI*: sequência codificadora do repressor Lac I.

**Obtenção de células de
Agrobacterium tumefaciens
contendo o plasmídeo
pBI131-PSscFvINV**

Células competentes de *A. tumefaciens* da linhagem LBA 4404 foram preparadas como descrito no Manual de Transformação de Plantas de Brasileiro & Carneiro (1998), contendo 50 µg/ml de estreptomicina. A transformação das células competentes com o plasmídeo pBI131-PSscFvINV foi realizada através de choque térmico segundo descrito por Brasileiro & Carneiro (1998).

Para realização de *Southern blotting* de DNA plasmidial de agrobactéria, a extração de plasmídeos foi realizada de acordo com Hooykaas (1988). Como controle negativo foi utilizado DNA plasmidial de *A. tumefaciens* não transformada com o plasmídeo pBI131-PSscFvINV. Como controle positivo foi utilizado o plasmídeo pRT-PSscFvINV. Os plasmídeos foram digeridos com a enzima *Hind* III. Os produtos da digestão foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1% e transferidos para membrana Hybond-N (Amersham Pharmacia Biotech).

**Obtenção e marcação de
sondas radioativas e
condições para
*Southern blotting***

As sondas utilizadas na detecção do gene scFvINV nos *Southern blottings* de DNA plasmidial de *A. tumefaciens* e DNA genômico de plantas foram obtidas através de amplificação por PCR do fragmento scFvINV, utilizando-se como molde o plasmídeo pETscFvINV e como iniciadores os oligonucleotídeos B5SCFV e K3SCFV. O fragmento obtido a partir da reação de amplificação foi marcado radioativamente através da incorporação de [$\alpha^{32}\text{P}$]-dATP (3000 Ci/ mmol, 10 mCi/ml – NEN Life Science Products Inc) pelo método *Random Primer* utilizando-se o *Kit Megaprime DNA Labeling System* (Amersham Pharmacia Biotech). A sonda apresentou atividade específica de aproximadamente 10^8 cpm/µg.

A hibridização das membranas com a sonda específica para o scFvINV foi realizada por 15 horas, a 42°C, em solução de hibridização (tris-HCl pH 7,5 0,01 M; DNA de esperma de salmão 0,4 mg/ml; formamida deionizada 50%; SDS 1%; SSC 5X; solução de Denhardt 2X). A membrana foi lavada 2 vezes, 15 minutos cada, com solução contendo SSC 1X e SDS 0,1% a 55°C e 2 vezes, 15 minutos cada, com solução contendo

SSC 0,1X e SDS 0,1% na mesma temperatura. O resultado foi visualizado através de exposição a *Hyperfilm* MP (Amersham Pharmacia Biotech).

Transformação de tabaco via *Agrobacterium tumefaciens*

Sementes de *Nicotiana tabacum*, cultivar SR1, foram desinfestadas por 5 lavagens com: etanol 70% (1 minuto); hipoclorito de sódio 1% (10 minutos) e água destilada estéril (2 minutos). Após a desinfestação, as sementes foram semeadas em meio MS (Murashige & Skoog, 1962) contendo 100mg/l de inositol, e cultivadas após a germinação até as plantas atingirem aproximadamente 10 cm de altura. Quando as plantas atingiram este estágio de desenvolvimento, discos foliares de tabaco foram transformados segundo Horsch *et al.* (1988). Os transformantes foram selecionados e regenerados em meio MS contendo AIA 0,1 mg/l; BAP 0,1 mg/l; MES 0,5 g/l; cefotaxima 100 µg/ml e kanamicina 100 µg/ml.

Após a regeneração as plantas foram aclimatadas e cultivadas em casa de vegetação. Folhas jovens foram coletadas e conservadas a -20°C até o momento da extração de DNA ou proteínas. Quando as plantas produziram sementes, esperou-se que as cápsulas

amadurecessem e secassem para serem coletadas. Após a coleta elas foram expostas ao sol por 8 horas, para eliminação da umidade e acondicionadas à temperatura ambiente até o momento da extração de proteínas.

Teste quantitativo da atividade da enzima β-glucuronidase (GUS) em folhas de tabaco

A atividade específica da enzima β-glucuronidase (GUS) (em extratos protéicos obtidos a partir de folhas das plantas regeneradas) foi quantificada fluorimetricamente utilizando-se 4-metil-umbeliferil-β-D-glucuronídeo (MUG) como substrato. Os extratos protéicos de folhas e as reações foram obtidos conforme descrito por Jefferson (1987), e com modificações no tampão de extração de proteínas (adição de metanol), segundo proposto por Li *et al.* (1993). As medidas de fluorescência foram realizadas em um F-200 *Fluorescence Spectrofotometer* (Hitachi) com excitação a 365 nm e emissão a 455 nm.

Análise por *Southern blotting* das plantas selecionadas com kanamicina

O DNA genômico das plantas foi extraído segundo o método descrito por Saghai-Marroof *et al.* (1984) utilizando-se o tampão tris-HCl pH 8,0 0,1 M; CTAB 2%; EDTA 0,02 M; NaCl 1,4 M; β -mercaptoetanol 0,4%.

Aproximadamente 5 μ g de DNA foram digeridos com 10 U da enzima *Hind* III por 16 horas. Os produtos da digestão foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 0,9% e transferidos para membrana Hybond-N (Amersham Pharmacia Biotech) através do método de transferência alcalina (Sambrook *et al.*, 1989).

***Western blottings* de extratos protéicos de sementes de plantas transgênicas**

Para análise da expressão do fragmento scFvINV nas plantas transgênicas, foram preparados extratos protéicos da seguinte maneira: 50 mg de semente foram macerados em 1 ml de tampão de extração (tris-HCl pH 8,5 50 mM; benzamidina 5 mM; DTT 5 mM; EDTA 2 mM e triton X-100 0,2%). O material foi centrifugado por 20 minutos a 14.000 rpm (rotor FA45-30-11, Eppendorf), a 4°C. A

fração aquosa foi recolhida e foi submetida a outra centrifugação por 20 minutos a 14.000 rpm (rotor FA45-30-11, Eppendorf), a temperatura ambiente. 20 μ l de extrato foram usados para preparar as amostras para cada planta. Como controle positivo foi utilizado o scFvINV purificado de extratos bacterianos. Como controle negativo foi utilizado extrato de sementes de tabaco SR1 não transformado. As amostras foram submetidas a eletroforese em SDS-PAGE 15% em condições redutoras e as proteínas foram transferidas para membranas Hybond-N (Amersham Pharmacia Biotech). Como anticorpo primário foi utilizado o anti-soro policlonal preparado no coelho 2 (2ª coleta) [diluição 1:1000, incubação por 15 horas a temperatura ambiente]. Os *western blottings* para análise das etapas de purificação do scFvINV produzido em sementes de plantas foram realizados nas mesmas condições.

Como anticorpo secundário foi utilizado anti-soro anti-IgG de coelho conjugado a fosfatase-alcalina, preparado em cabra (Sigma) [diluição 1:5000, incubação por 2 horas a temperatura ambiente]. A revelação foi realizada com o substrato quimioluminescente da fosfatase-alcalina CSPD (Tropix) e filme Kodak MXG/Plus.

Purificação do scFvINV produzido em sementes de tabaco transgênico

O fragmento recombinante scFvINV foi purificado a partir de extrato preparado através de homogeneização de 4g de sementes (planta T30) em 100 ml de tampão de extração (tris-HCl pH 8,0 50 mM; benzamidina 5 mM; triton X-100 0,2%).

O homogenato foi submetido a agitação orbital por duas horas a temperatura ambiente, então centrifugado por 10 minutos a 3.500 rpm (rotor A-4-62, Eppendorf). Após a centrifugação, a fase lipídica foi removida com ajuda de pipeta Pasteur e a amostra foi centrifugada por 20 minutos a 12.000 rpm a 10°C (rotor F34-6-38, Eppendorf). O volume da amostra foi completado para 100 ml com água seguido da adição de NaCl suficiente para obter-se uma concentração final de 500 mM. Em seguida foram realizadas três extrações com 1 volume de n-hexano. A amostra foi então centrifugada por 30 minutos a 12.000 rpm a 10°C (rotor F34-6-38, Eppendorf). Ao sobrenadante foi adicionado imidazol suficiente para obter uma concentração final de 10 mM.

A primeira etapa de purificação foi realizada através de cromatografia IMAC utilizando-se uma resina de agarose contendo Cu-IDA (ácido iminodiacético). A agarose utilizada apresenta

4% de ligação cruzada, possibilitando sua utilização em aparelhos de cromatografia de alta pressão.

Foi utilizada uma coluna Waters AP-1 (10 mm x 100 mm) contendo aproximadamente 6 ml de resina IDA-Agarose (Sigma). Inicialmente a resina foi lavada com 50 ml de tampão acetato de sódio pH 4,0 10 mM, seguido de igual volume do mesmo tampão acrescido de 20 mM de sulfato cúprico. O excesso de Cu foi retirado através de lavagem com 50 ml de tampão acetato de sódio pH 4,0 10 mM seguido de 50 ml de água deionizada.

A coluna foi então equilibrada com 50 ml de tampão de ligação (tris-HCl pH 8,0 20 mM; imidazol 10 mM; NaCl 0,5 M). Após a injeção da amostra a coluna foi lavada com 50 ml de tampão de lavagem (tris-HCl pH 8,0 20 mM; imidazol 20 mM; NaCl 0,5 M). As proteínas ligantes foram eluídas utilizando-se um gradiente de 20 mM a 500 mM de imidazol em um volume de 40 ml, no mesmo tampão.

Todos os procedimentos foram realizados em aparelho HPLC biocompatível, HPLC (Bio-Rad). Foi utilizado fluxo de 1 ml/min e durante a eluição foram recolhidas frações de 0,5 ml. A presença do scFvINV nas diversas frações foi analisada através de SDS-PAGE em condições redutoras, seguida de *western blotting* específico.

As frações que apresentaram o fragmento de anticorpo forma reunidas e submetidas a cromatografia de fase reversa. A cromatografia foi realizada em coluna AP-1 (10 mm x100 mm, Waters) contendo aproximadamente 6 ml de resina Poros R2 (PerSeptive). A coluna foi pré-equilibrada com 50 ml de solução A, constituída por acetonitrila (ACN) 2% e ácido trifluoroacético (TFA) 0,065%. Após a injeção da amostra a coluna foi lavada com 30 ml de solução A e as proteínas adsorvidas foram eluí-

das com 40 ml de um gradiente linear de 0 a 70% de solução B (ACN contendo 0,05% de TFA). A coluna foi então lavada com 20 ml de solução B. A absorbância a 214 nm foi monitorada, registrada e foram coletadas frações de 0,5 ml.

A presença do scFvINV nas diversas frações foi analisada através de SDS-PAGE em condições redutoras, seguida de *western blotting*.

Obtenção dos plasmídeos para transformação de tabaco

O fragmento scFvINV de 761 pb foi obtido através de amplificação por PCR a partir do plasmídeo pET-scFvINV, utilizando-se os oligonucleotídeos iniciadores B5SCFV e K3SCFV (Figura 8). A utilização do iniciador B5SCFV, complementar à região 5' da fita molde, além de gerar uma terminação abrupta nesta extremidade, teve como objetivos: 1) eliminar o códon original de iniciação de transcrição; 2) eliminar o códon adjacente que correspondente a um resíduo de glicina e 3) substituir o resíduo de ácido aspártico subsequente por valina. Este procedimento teve a finalidade de adaptar o fragmento amplificado à adição do fragmento PS. A substituição do ácido aspártico é justificada pela observação de baixa frequência de resíduos ácidos em regiões próximas a sítios de processamento envolvendo peptídeos sinais de endereçamento para o RE. O iniciador K3SCFV é complementar à região do plasmídeo pET 22b+ adjacente à extremidade 3' da seqüência codificadora de scFvINV. Este iniciador foi desenhado para manter no produto

amplificado por PCR a cauda de histidina que está codificada no plasmídeo pET22b+. Além disso, o iniciador K3SCFV promoveu a adição de um sítio de reconhecimento para a enzima *Kpn I*.

O fragmento PSscFvINV foi obtido através da adição da seqüência PS codificadora do peptídeo sinal de α -coixina ao fragmento scFvINV (Figura 9). O fragmento PS foi obtido a partir do anelamento dos oligonucleotídeos PS1 e PS2. Quando anelados, estes oligonucleotídeos geram um fragmento com a extremidade 5' apresentando complementaridade com extremidades geradas por digestão com *Nco I* e extremidade 3' abrupta.

A inserção do fragmento PSscFvINV no plasmídeo pRT-PGK foi verificada através da análise de digestão com a enzima *Hind III* (Figura 10). A obtenção do plasmídeo pBI131-PSscFvINV pode ser verificada na Figura 11, também por digestão com a enzima *Hind III*.

O plasmídeo pRT-PSscFvINV foi seqüenciado com a finalidade de confirmar a manutenção da fase leitura no fragmento scFvINV após a adição do fragmento PS.

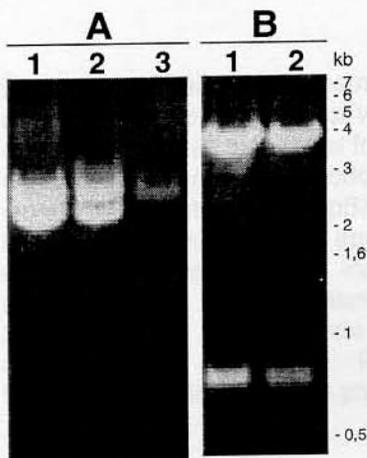


Figura 10: Análise da construção do plasmídeo pRT-PSscFvINV. Amostras de DNA plasmidial de dois clones transformados com a construção pRT-PSscFvINV foram digeridos com as enzimas *Hind* III (A) e *Kpn* I + *Nco* I (B). Em 1 e 2 são mostrados clones de pRT-PSscFvINV e em 3 é mostrado o plasmídeo pRT-PGK. A digestão com a enzima *Hind* III resultou, em ambos clones analisados, em dois fragmentos, coerentes com os tamanhos 2.769 pb e 2.284 pb esperados. Na digestão dupla com as enzimas *Kpn* I e *Nco* I observou-se a liberação de um fragmento de aproximadamente 800 pb, indicando a presença do fragmento PSscFvINV (813 pb).

Análise da seqüência dos clones de pRT-PSscFvINV

Dois clones independentes foram seqüenciados, utilizando-se como iniciadores os oligonucleotídeos CONS5 e CONS3. O oligonucleotídeo CONS5 anela-se no promotor PGK e CONS3 anela-se no terminador T35S (Figura 9).

As seqüências obtidas foram idênticas para os dois clones. Entretanto, a comparação das seqüências obtidas com a seqüência esperada, baseada nas seqüências de V_H e V_L do AcM 83D4 (publicadas por Babino *et al.*, 1997), depositadas no banco de dados do NCBI, mostrou diversas discrepâncias. Foram encontradas substituições em 85 posições ao longo dos 804 nucleotídeos entre o códon de iniciação (ATG) e o códon de terminação da tradução (TGA). Dentre as mutações encontradas, 24 não resultam em alterações na seqüência de aminoácidos.

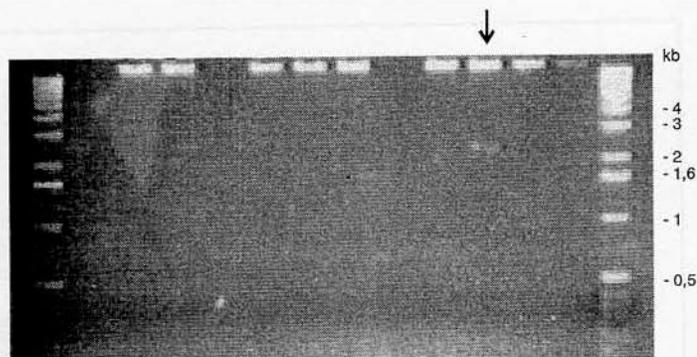
fundamental para a afinidade, no reconhecimento desses antígenos. Como o

No entanto, 61 delas resultam em substituições de aminoácidos. De acordo com o alinhamento entre aminoácidos realizado pelo programa Clustal X 1.64b, utilizando a matriz de similaridade Gonnet, a seqüência obtida apresenta 83,5% de identidade e 88,4% de similaridade com a seqüência esperada.

Dois clones foram também seqüenciados a partir do plasmídeo pET-scFvINV. Os resultados obtidos confirmam as seqüências observadas para os clones seqüenciados em pRT-PSscFvINV., eliminando a hipótese de que o erro pode ter ocorrido durante o processo de clonagem.

A alta discrepância entre as duas seqüências foi encontrada principalmente na cadeia pesada do scFvINV 83D4. Verifica-se que um grande número de aminoácidos discrepantes encontra-se localizado nos CDRs (Figura 12), o que poderia comprometer a especificidade

Figura 11: Análise da construção do plasmídeo pBI131-PSscFvINV. Amostras de DNA plasmidial foram digeridas com *Hind* III. De todos os clones contendo pBI131-PSscFvINV analisados, apenas um (seta) apresentou o inserto esperado de aproximadamente 2.300 pb, que corresponde ao cassete de expressão PGK-PSscFvINV-T35S, de 2.284 pb.



de reconhecimento do fragmento em questão.

Babino *et al.* (1997), quando relataram a construção do scFvDIR, fizeram uma análise de qual seria a porção da região variável responsável pela interação com o antígeno Tn. Até então, nenhuma seqüência de anticorpos anti-Tn havia sido publicada, apesar da produção e a da caracterização de vários anticorpos com esta especificidade já terem sido relatadas. No entanto, as seqüências de vários anticorpos anti-sTn era conhecida. Alguns destes anticorpos anti-sTn, reconhecem fracamente o antígeno Tn. A comparação entre as seqüências das regiões variáveis das cadeias leve e pesada do anticorpo 83D4 com anticorpos anti-sTn indicou que as cadeias leves originaram-se de genes diferentes nas células da linhagem germinativa. Todavia, todos os anticorpos anti-sTn e o anti-Tn 83D4 possuem o mesmo segmento gênico ($V_H\alpha$ TAG1) (Figura 13), indicando que a cadeia pesada desempenha um papel

fundamental para a afinidade, no reconhecimento desses antígenos. Como o AcM 83D4 não reconhece sTn, o uso preferencial deste segmento gênico provavelmente está associado à ligação ao antígeno Tn.

Apesar das seqüências analisadas serem altamente similares, algumas mutações somáticas não silenciosas nas cadeias pesadas foram encontradas. Estas mutações revelaram duas substituições recorrentes de aminoácidos, ambas ocorrendo no CDR2 da cadeia pesada. Uma delas envolve a substituição Gly56-Asp e é encontrada em todos menos um dos anticorpos anti-sTn (Figura 13). No entanto, ela não está presente no 83D4. A outra envolve a substituição Ile51-Phe. Esta é a única mutação somática não silenciosa observada no 83D4 e também é evidenciada em dois dos cinco AcMs anti-sTn.

Outras mutações somáticas são encontradas no domínio V_H . Entretanto elas estão presentes somente em um

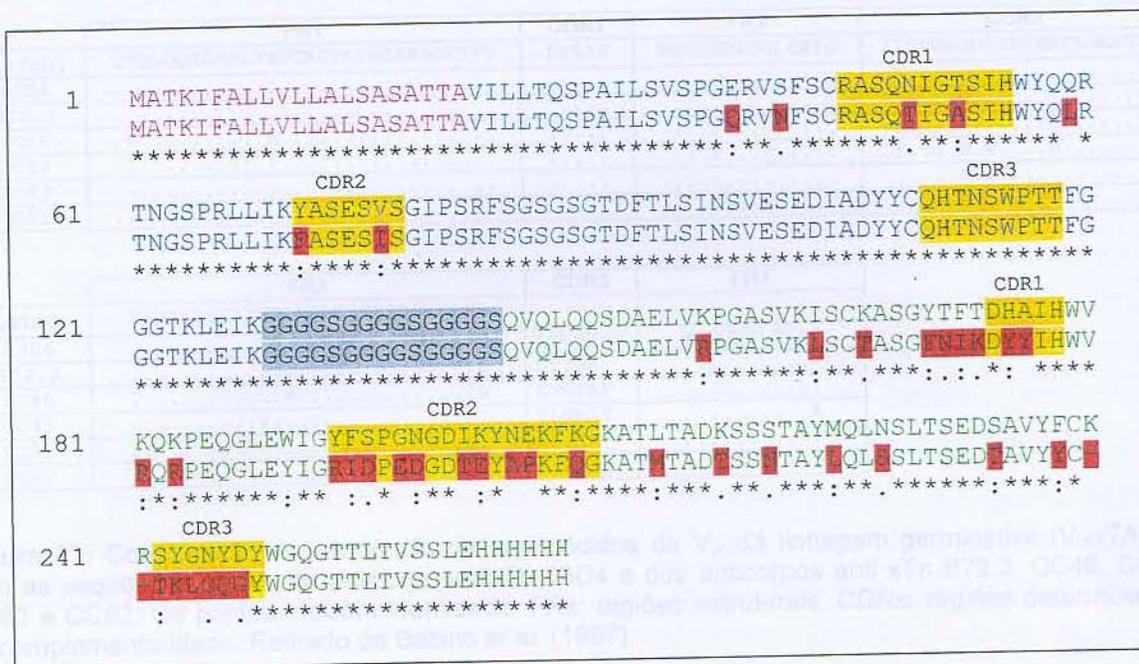


Figura 12: Comparação entre as seqüências de aminoácidos esperada e observada deduzidas a partir da seqüência nucleotídica do fragmento PSscFvINV. A seqüência superior representa a seqüência esperada e a inferior, a observada. O peptídeo sinal de *Coix* (PS) aparece assinalado em cor magenta. Em azul observa-se a região variável da cadeia leve e em verde a região variável da cadeia pesada do anticorpo. A cor amarela indica as regiões determinantes de complementaridade ao antígeno (CDRs). O peptídeo conector formado por glicina e serina aparece assinalado em cinza. Em vermelho são indicados os aminoácidos da seqüência observada que não coincidem com os seus correspondentes na seqüência esperada. O alinhamento foi realizado utilizando o programa Clustal X 1.64b, utilizando a matriz de similaridade Gonnet. O símbolo "." indica identidade entre os aminoácidos, ":" indica ocorrência de substituição dentro de um dos seguintes grupos fortemente conservados: STA; NEQK; NHQK; NDEQ; QHRK; MILV; MILF; HY; FYW e "." indica ocorrência de substituição dentro de um dos seguintes grupos fracamente conservados: CSA; ATV; SAG; STNK; STPA; SGND; SNDEQK; NDEQHK; NEQHRK; FVLIM; HFY. Os CDRs foram definidos segundo proposto por Kabat (<http://www.rubic.rdg.ac.uk/abs/>).

anticorpo, o que sugere que estas alterações não desempenham um papel predominante na interação com o antígeno.

Babino *et al.* (1997) construíram um modelo tridimensional para o Fv

83D4 (Figura 14), baseando-se em estruturas depositadas para fragmentos Fab. De acordo com as similaridades nas seqüências de aminoácidos, as estruturas cristalinas dos anticorpos B72.3 (código PDB lbbj), 17E8 (leap) e

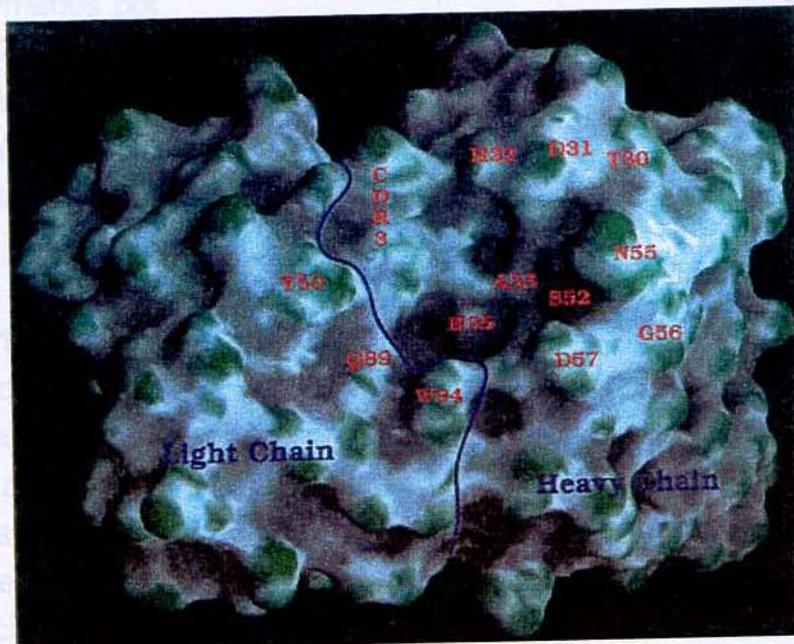
	FR1	CDR1	FR2	CDR2
V _H αTAG1	QVQLQQSDAELVKPGASVKISCKASGYTFT	DHAIH	WVKQKPEQGLEWIG	YISPGNGDIKYNEKFRGKATL
83D4F.....
B72.3L.....D.....
CC46	.F.....R.....F.....D.F.....R.....
CC49N.....D.....
CC83D.....
CC92D.....

	FR3	CDR3	FR4
V _H αTAG1	TADKSSSTAYMQLNSLTSEDSAVYFCKR		
83D4	SYGNYDY	WGQGTTLTVSS
B72.3	SYYGH
CC46F.....TG	GYGFAF
CC49V.....T	SLNMAYA
CC83R.....	SEYGN
CC92	...P.N.V.....T	SLSGNS

Figura 13: Comparação da seqüência de aminoácidos de V_H da linhagem germinativa (V_HαTAG1), com as seqüências de V_H do anticorpo anti Tn 83D4 e dos anticorpos anti sTn B72.3, CC46, CC49, CC83 e CC92. Os pontos indicam identidade. FRs: regiões estruturais. CDRs: regiões determinantes de complementaridade. Retirado de Babino *et al.* (1997).

Figura 14: Modelo molecular do sítio de ligação ao antígeno do anticorpo monoclonal 83D4, mostrando a cavidade putativa de ligação a Tn. Os resíduos conservados que definem a cavidade estão indicados segundo a numeração proposta por Kabat*. Figura feita com programa GRASP (Nicholls *et al.*, 1991), gentilmente cedida por Álvaro Babino e Eduardo Osinaga.

* <http://www.rubic.rdg.ac.uk/abs>



Hy-HEL5 (3hfl) foram utilizadas como moldes para a cadeia pesada e as estruturas de Hy-HEL10 (3hfm), OPG2

(lopg) e M29B (livl) como molde para a cadeia leve.

Os três CDRs da cadeia leve e os CDRs 1 e 2 da cadeia pesada são altamente homólogos aos CDRs dos anticorpos usados como molde, tanto na seqüência quanto em extensão, permitindo a dedução de um modelo altamente confiável para uma fração representativa do sítio de ligação ao antígeno do AcM 83D4.

Várias conformações foram testadas e em todas elas é evidenciada uma cavidade, próxima ao centro do paratopo, que seria a região putativa de ligação ao antígeno.

O assoalho e grande parte das laterais desta cavidade são formados por resíduos dos CDR H1 e CDR H2. Apesar da maioria destes resíduos situarem-se em posições nas imunoglobulinas em que geralmente ocorre muita variação na seqüência, todos são altamente conservados nos anticorpos anti-Tn e anti-sTn analisados (Figura 13). Dessa forma, a uso preferencial do mesmo segmento gênico nos anticorpos que reconhecem o antígeno Tn pode estar associada à formação desta cavidade de ligação, que provavelmente serve para acomodar a protuberância glicídica representada pela estrutura Tn.

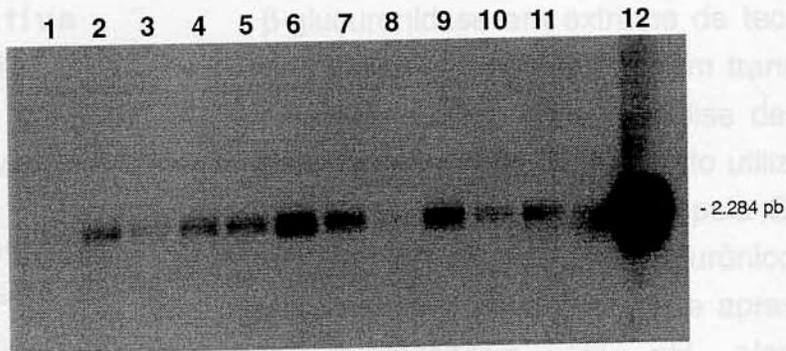
Diante destes resultados obtidos por Babino *et al.* (1997) e das discrepâncias encontradas nos dois clones de pRT-PSscFvINV com relação à seqüência esperada, a especificidade e a fun-

cionalidade do fragmento de anticorpo recebido pelos colaboradores do Uruguai foi questionada.

O alto grau de conservação entre a região variável da cadeia pesada dos anticorpos anti-sTn e do anticorpo 83D4, sugere que provavelmente o fragmento recombinante de anticorpo provavelmente trata-se de uma outra molécula, que não o fragmento scFvINV do AcM 83D4. No entanto, por questões práticas o fragmento discrepante continuará sendo chamado de scFvINV 83D4 (ou somente scFvINV) nesta dissertação. Com a finalidade de verificar se o scFvINV discrepante apresenta atividade contra o antígeno Tn, iniciou-se uma etapa de produção deste fragmento recombinante de anticorpo em bactéria, para posteriormente realizar a purificação do mesmo e utilizá-lo em ensaios de ELISA para avaliação da sua especificidade.

Além disso, foi dada continuidade ao projeto de transformação de plantas com este fragmento, uma vez que produzido em plantas ele poderia ser usado como um modelo para avaliação da eficiência de vegetais na produção deste tipo de moléculas e para o estabelecimento de metodologias de purificação. A possibilidade de utilização tanto de vegetais quanto de bactéria permite a realização de uma posterior compara-

Figura 15: *Southern blotting* de DNA plasmideal de *A. tumefaciens*. Foi utilizado como sonda um fragmento de 761 pb amplificado por PCR com os iniciadores B5SCFV e K3SCFV. 1) Controle negativo; 2 a 11 DNAs plasmidiais das colônias de agrobactéria selecionadas por kanamicina; 12: Controle positivo (pRT-PSscFvINV digerido com *Hind* III).



ção da composição e da estrutura de um mesmo produto gênico expresso em sistemas diferentes.

Confirmação da transformação de agrobactéria com o plasmídeo pBI131-PSscFvINV

A confirmação da transformação da *A. tumefaciens* com o plasmídeo pBI131-PSscFvINV foi realizada por meio de *Southern blotting* de DNA plasmidial (Figura 15). No controle negativo, não houve detecção do cassete de expressão pela sonda, ao contrário do controle positivo, no qual um fragmento de aproximadamente 2.300 pb foi detectado. Este fragmento corresponde ao cassete de expressão de 2.284 pb, liberado pela digestão de pRT-PSscFvINV com a enzima *Hind* III. Os fragmentos detectados nas onze colônias analisadas têm o mesmo tamanho

que o detectado no controle positivo, indicando tratar-se do cassete de expressão liberado pela digestão do DNA plasmidial com a enzima *Hind* III.

Seleção de plantas resistentes a kanamicina

Foram regeneradas 52 plântulas, que foram transferidas para vermiculita. Três destas plântulas morreram durante o período de aclimação e 49 foram transferidas para terra e mantidas em casa de vegetação. Com o objetivo de analisar as plantas regeneradas, foram coletadas folhas para: 1) extração DNA para realização de *Southern blotting* e 2) extração de proteínas para realização de ensaio de atividade da enzima β -glucuronidase.

Análise quantitativa da atividade de β -glucuronidase em folhas de tabaco

De todas as plantas selecionadas com kanamicina, 35 foram analisadas quanto à atividade de β -glucuronidase. A Figura 16 apresenta os dados relativos ao ensaio de atividade específica desta enzima em extratos protéicos foliares das plantas.

O gene *gus*, *gusA* ou mesmo *uidA* (um dos genes presentes no T-DNA do plasmídeo pBI131-PSscFvINV) foi isolado de *E. coli*, codifica a enzima β -glucuronidase e é um gene repórter amplamente usado para a discriminação entre plantas transformadas e não transformadas. No entanto, a expressão de *gus* é considerada apenas uma evidência da transformação, não sendo suficiente como prova definitiva da integração do gene *gus* no genoma da planta (Potrykus, 1990). A integração só pode ser confirmada através da realização de técnicas de hibridação, como *Southern blotting*. Ainda assim, o ensaio de GUS é extremamente útil na identificação de tecidos ou plantas potencialmente transformados.

O ensaio fluorimétrico de GUS é um método muito sensível para identificar e quantificar a atividade da

β -glucuronidase em extratos de tecidos de plantas candidatas a serem transgênicas ou mesmo para a análise de expressão transiente. O substrato utilizado é o MUG, que é hidrolisado pela GUS, resultando em ácido glucurônico e 4-metilumbeliferona (MU), que apresenta fluorescência em pH alcalino (Jefferson, 1987).

Das 35 plantas analisadas, treze plantas não apresentaram atividade de GUS. Nove plantas apresentaram atividade entre zero e 5 pmoles de substrato formado/minuto/ μ g de proteína. A planta controle (cultivar SR1, não submetida a ensaio de transformação com agrobactéria) não apresentou atividade enzimática. As demais plantas apresentaram atividade superior a 5 pmoles de substrato formado/minuto/ μ g de proteína.

Como a planta controle não apresentou atividade de β -glucuronidase, a ocorrência de atividade enzimática em extratos protéicos foliares das plantas regeneradas após o ensaio de transformação indica a possibilidade de ter ocorrido integração do T-DNA no DNA vegetal, em pelo menos um sítio transcricionalmente ativo do genoma. Tais plantas são fortes candidatas a contem o cassete de expressão PGK-PSscFvINV-T35S e a estarem expressando a molécula scFvINV.

Distribuição de freqüência da atividade específica de β -glucuronidase nas plantas regeneradas

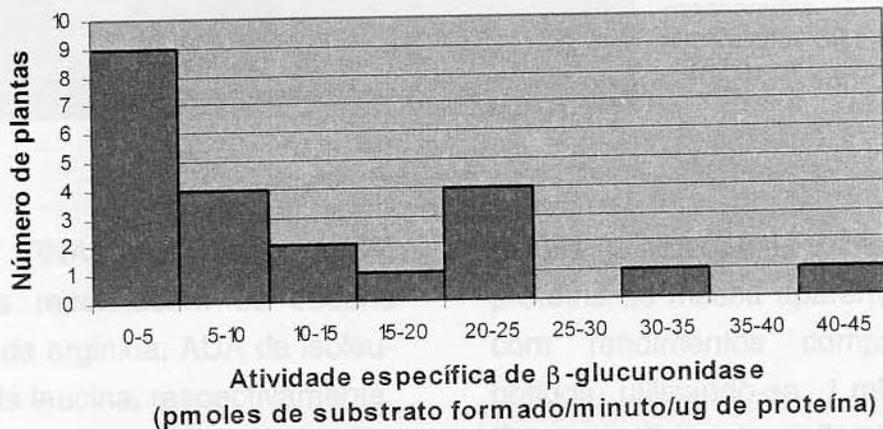


Figura 16: Atividade específica da enzima β -glucuronidase em extratos protéicos foliares das plantas regeneradas, expressa em (pmoles de substrato formado/minuto/ μ g de proteína).

Análise por Southern blotting das plantas selecionadas com kanamicina

As plantas selecionadas com kanamicina foram analisadas através de *Southern blotting*, para confirmação da integração do transgene (scFvINV) no genoma vegetal. Os DNAs genômicos foram digeridos com a enzima *Hind* III, para liberação do cassete de expressão PGK-PSscFvINV-T35S íntegro, de 2.284 pb. A sonda utilizada, que apresenta 100% de identidade com o transgene, identificou a presença de um fragmento de mesmo tamanho daquele gerado pela digestão do controle positi-

vo em 8 das 13 plantas cuja análise é mostrada na Figura 17, confirmando a integração do transgene (scFvINV) no genoma vegetal. O tamanho das bandas observadas é coerente com o tamanho esperado para o cassete de expressão íntegro.

Produção do fragmento scFvINV em bactéria

A expressão do fragmento scFvINV recombinante foi realizada utilizando-se a cepa de *E. coli* BL21-CodonPlus (DE3)-RIL (Stratagene). Esta linhagem contém cópias extras dos genes que

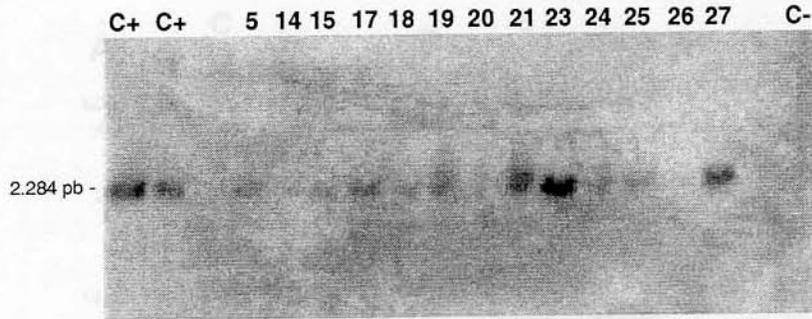


Figura 17: Southern blotting das plantas selecionadas em presença de kanamicina. C+: Controle positivo (plasmídeo pRT-PSscFvINV digerido com a enzima *Hind* III). 05 a 27: plantas regeneradas. C-: Controle negativo (planta SR1 não submetida a ensaio de transformação).

codificam os tRNAs *argU*, *ileY* e *leuW*. Estes tRNAs reconhecem os códons AGA e AGG da arginina, AUA da isoleucina e CUA da leucina, respectivamente. Estes códons, freqüentes em genes eucarióticos, são considerados raros em genes bacterianos. Portanto, a utilização desta cepa tem por objetivo aumentar a eficiência de tradução de genes eucarióticos no sistema bacteriano de expressão.

No plasmídeo pET-scFvINV o gene de scFvINV está sob controle do promotor da T7 RNA polimerase e na cepa bacteriana utilizada, o gene da T7 RNA polimerase está sob controle do operon *lac*. A expressão de genes controlados por este operon geralmente é induzida utilizando-se isopropil- β -D-galactosídeo (IPTG). Devido ao elevado custo do IPTG, decidimos testar a lactose para produção do scFvINV, um indutor que apresenta menor custo. Com esta finalidade foram realizados ensaios comparativos de indução por IPTG e lactose. Estes ensaios demonstraram que a utilização de 200 mM de lactose

resulta na indução da expressão de uma proteína de massa aparente de 30 kDa, com rendimentos comparáveis aos obtidos utilizando-se 1 mM de IPTG. Ensaio adicionais realizados com meio LB apresentaram indução equivalente. A utilização de meio LB reduziu o tempo de crescimento bacteriano. Baseado nestes resultados foram adotadas as seguintes condições para a produção do scFvINV: indução com 200 mM de lactose, por seis horas, em meio LB. A Figura 18A mostra o resultado da análise através de SDS-PAGE 15% de extratos bacterianos obtidos nas condições estabelecidas.

Foi também realizado ensaio visando verificar a solubilidade do scFvINV produzido em bactéria. A Figura 18B mostra que a proteína induzida encontra-se na fração insolúvel, indicando que ela acumula-se em corpúsculos de inclusão. Os corpos de inclusão são formados por agregados da maioria das proteínas insolúveis em *E. coli*. Do ponto de vista da purificação de

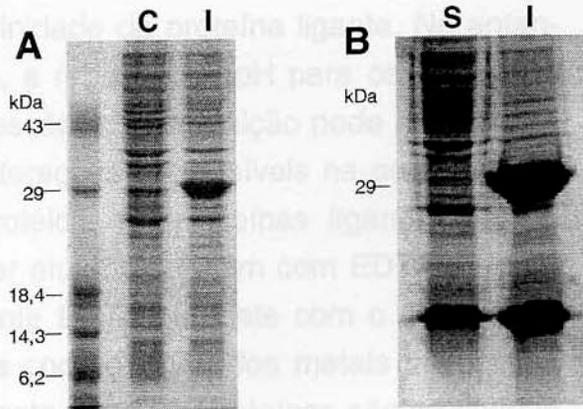


Figura 18: Análise através de SDS-PAGE de amostras protéicas obtidas durante indução da expressão do anticorpo recombinante scFvINV 83D4 em *E. coli*. Em A observam-se o experimento controle (C) e o induzido (I) com 200 mM de lactose, por seis horas. Em B observam-se as frações solúvel (S) e insolúvel (I) do extrato bacteriano.

proteínas, expressar uma proteína insolúvel que forma corpos de inclusão pode ser interessante porque elimina dos processos de purificação as proteínas solúveis. No entanto, purificar proteínas dos corpos de inclusão requer a solubilização das mesmas com altas concentrações de uréia ou com cloreto de guanidina, o que acontece por desnaturação. Uma vez que a atividade da proteína de interesse depende da sua estrutura tridimensional, torna-se necessário realizar um processo de renaturação que garanta o seu re-enovelamento adequado.

Purificação do scFvINV recombinante produzido em bactéria

A cromatografia de afinidade a níquel foi realizada utilizando-se uma coluna empacotada com uma resina de NTA (ácido nitrilotriacético). Este grupo funciona como um quelante de íons metálicos.

Uma molécula de NTA possui quatro sítios de interação que ocupam quatro dos seis sítios de coordenação do níquel, deixando dois livres para interação com a cauda de histidina (Figura 19A). Esta propriedade permite que o grupo NTA ligue-se de forma muito estável a átomos de níquel, retendo estes íons em uma grande variedade de condições. O complexo Ni-NTA apresenta uma alta afinidade por motivos que contém seis resíduos de histidina. Esta característica permite uma melhor discriminação entre a proteína de interesse e as contaminantes portadoras de domínios enriquecidos em resíduos de His. Dessa forma, as proteínas bacterianas que se ligam com menor afinidade à resina podem ser eluídas em condições relativamente estridentes, sem afetar a ligação da cauda de histidina.

A eluição da proteína pode ser realizada através de redução do pH, que determina a protonação dos resíduos de histidina e por consequência redução da

afinidade da proteína ligante. No entanto, a redução do pH para os níveis necessários para eluição pode resultar em alterações irreversíveis na conformação protéica. As proteínas ligantes podem ser eluídas também com EDTA. O quelante EDTA compete com o grupo NTA na coordenação dos metais bivalentes. Neste caso, as proteínas são co-eluídas com o metal. Outra alternativa consiste na utilização de imidazol que, por competição com a histidina, liga-se ao complexo Ni-NTA e provoca a dissociação da proteína da resina (Figura 19B).

Conforme descrito na metodologia, antes de ser submetida à cromatografia de afinidade, a fração insolúvel do extrato bacteriano foi tratada por uma hora e meia com tampão contendo 4 M de uréia. A finalidade deste tratamento foi promover a solubilização dos peptídeos presentes nos corpúsculos de inclusão, para proceder a cromatografia de afinidade a níquel. A adsorção do fragmento de anticorpo à resina foi realizada em tampão contendo 5 mM de imidazol, mantendo-se as condições desnaturantes. A presença de 20 mM de imidazol nos tampões de renaturação tem por finalidade aumentar a especificidade da purificação. No entanto, esta concentração de imidazol não é suficiente para provocar a eluição do 6xHis-scFvINV, uma vez que a cauda de histidina apresenta alta afinidade por metais bivalentes. Com a finalidade de promo-

ver renaturação da proteína *in loco*, a coluna foi submetida a um gradiente linear decrescente na concentração de uréia, de 4 M para 0,5 M. O scFvINV foi eluído da coluna com um gradiente linear crescente (de 20 mM a 1 M) de imidazol na presença de 0,5 M de uréia. A Figura 20 mostra o perfil de eluição da coluna de afinidade a níquel. A partir da fração 48 começa a ocorrer detecção de peptídeos, sendo que o pico de eluição ocorre em 700 mM de imidazol.

Análises em SDS-PAGE 15% indicaram que uma proteína de massa aparente 30 kDa foi eluída. Essa massa aparente é relativamente coerente com o tamanho esperado para o fragmento scFvINV (26,6 kDa) (Figura 21). Na eletroforese pode ser observada uma banda correspondente a um peptídeo de massa aparente de aproximadamente 30 kDa, e de uma segunda banda, de mobilidade um pouco maior.

As frações contendo o fragmento recombinante de anticorpo obtidas a partir da cromatografia de afinidade foram reunidas e a mistura foi submetida a uma segunda etapa de purificação cromatográfica, que consistiu numa filtração em gel. As frações eluídas na filtração em gel foram monitoradas por absorvância a 280 nm. O perfil de eluição obtido é mostrado na Figura 22.

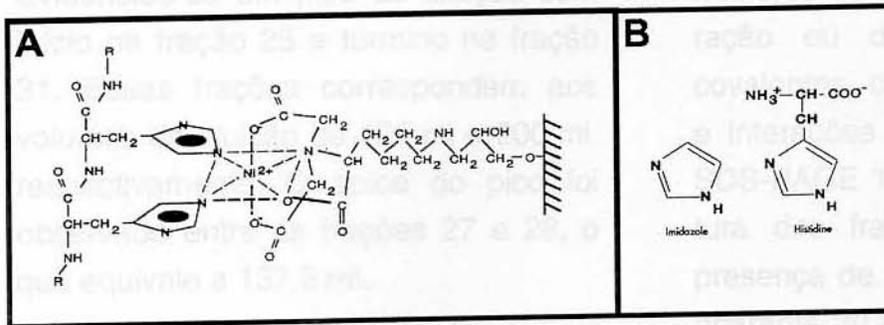


Figura 19: A) Interação entre a resina Ni-NTA e a cauda 6xHis. B) Comparação entre as estruturas do imidazol e da histidina.

Figura 20: Curva de eluição das proteínas durante a cromatografia de afinidade a níquel. A linha pontilhada representa o gradiente de imidazol. Cada fração corresponde a 0,48 ml.

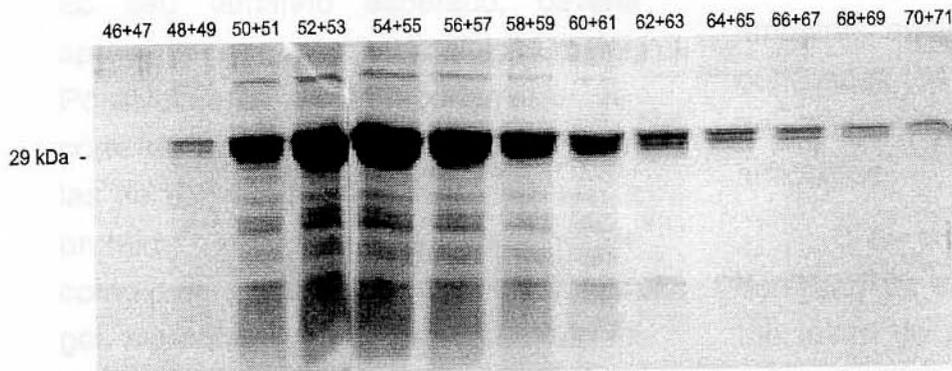
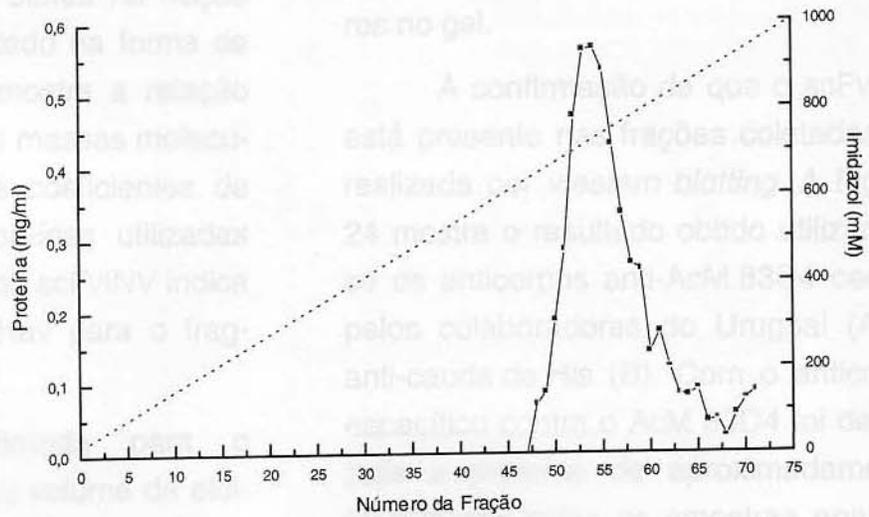


Figura 21: SDS-PAGE 15% das frações 44 a 71 obtidas na cromatografia de afinidade a níquel.

Evidenciou-se um pico de eluição com início na fração 25 e término na fração 31. Essas frações correspondem aos volumes de eluição de 125 ml e 200 ml, respectivamente. O ápice do pico foi observado entre as frações 27 e 28, o que equivale a 137,5 ml.

Com base na curva de calibração previamente estabelecida para a coluna Superdex 75, foi estimada a massa molecular da proteína eluída na fração 27. O gráfico apresentado na forma de inserto na Figura 22 mostra a relação entre os logaritmos das massas moleculares e os respectivos coeficientes de eluição (K_{av}) das proteínas utilizadas como padrão. A seta sob scFvINV indica o valor calculado de K_{av} para o fragmento recombinante.

A massa estimada para o scFvINV a partir do seu volume de eluição foi de 63,5 kDa. Essa estimativa indica um comportamento diferente do esperado para o scFvINV, que devido ao seu tamanho esperado, deveria apresentar um volume de eluição maior. Possivelmente tal comportamento decorre de interações entre duas moléculas de scFvINV, o que faria com que a proteína purificada se comportasse como um dímero durante filtração em gel. No entanto, até o momento não foi determinado se esta interação intermolecular estaria acontecendo devido a pontes de dissulfeto ligando dois mo-

nômeros durante o processo de renaturação ou devido a interações não covalentes, como pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas. Análises em SDS-PAGE 15% realizadas com a mistura das frações obtidas mostram a presença de um polipeptídeo de massa aparente 30 kDa (Figura 23). A realização da eletroforese em condições desnaturantes e redutoras elimina a possibilidade de visualização de dímeros no gel.

A confirmação de que o scFvINV está presente nas frações coletadas foi realizada por *western blotting*. A Figura 24 mostra o resultado obtido utilizando-se os anticorpos anti-AcM 83D4 cedido pelos colaboradores do Uruguai (A) e anti-cauda de His (B). Com o anticorpo específico contra o AcM 83D4 foi detectada a proteína de aproximadamente 30 kDa em todas as amostras analisadas. Com o anticorpo específico contra a cauda de histidina também foi detectada a proteína de 30 kDa em todas as amostras analisadas. As duas bandas purificadas (de maior e menor mobilidade) são reconhecidas por ambos os anticorpos.

O *western blotting* realizado para detecção da cauda de histidina detectou, além do provável scFvINV, vários outros peptídeos. Este padrão era esperado, uma vez que o produto obtido a partir da cromatografia de afinidade a

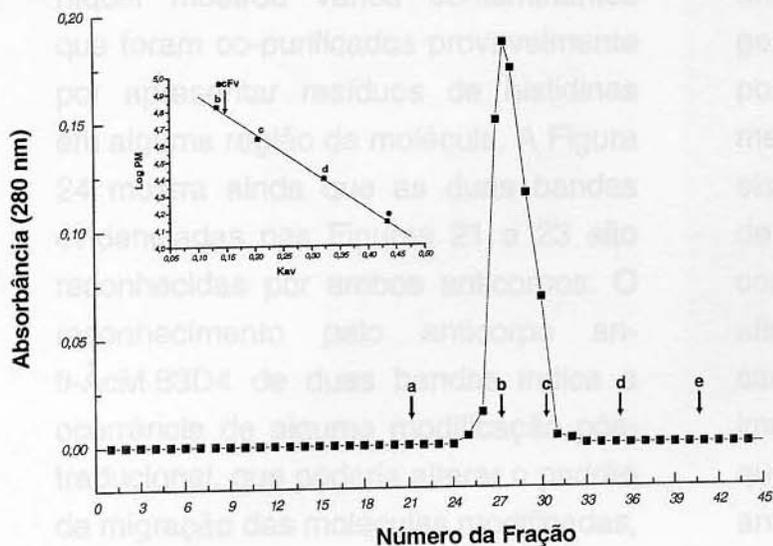


Figura 22: Curva de eluição das proteínas obtidas na filtração em gel. Cada fração corresponde a 5 ml. As letras representam, no gráfico menor, as proteínas padrão e, no gráfico maior, seus volumes de eluição:

- a) Blue dextram;
- b) Soroalbumina bovina;
- c) Ovoalbumina;
- d) Quimiotripsinogênio A;
- e) Ribonuclease A.

O gráfico menor, apresentado na forma de inserto, mostra a relação entre os logaritmos das massas moleculares e os respectivos coeficientes de eluição (K_{av}) das proteínas utilizadas como padrão. A seta sob scFv indica o valor calculado de K_{av} para o fragmento scFvINV.

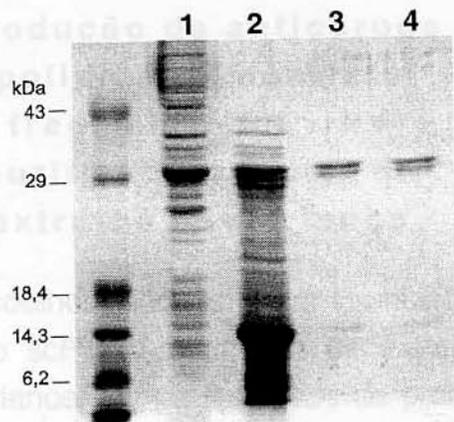
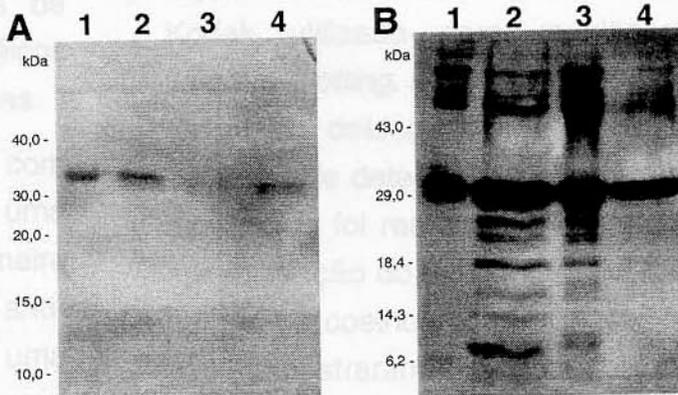


Figura 23: SDS-PAGE 15% com amostras das etapas de purificação: 1) Extrato bacteriano total; 2) Fração insolúvel solubilizada em uréia; 3) Pool de amostras obtidas após a filtração em gel e 4) Material obtido após a filtração tangencial.

Figura 24: Western blotting utilizando-se os anticorpos anti AcM 83D4 (A) e anti cauda His (B). 1) Extrato bacteriano total; 2) Fração insolúvel solubilizada em uréia; 3) Pool de amostras obtidas após a filtração em gel e 4) Material concentrado obtido após a ultrafiltração.



níquel mostrou vários contaminantes que foram co-purificados provavelmente por apresentar resíduos de histidinas em alguma região da molécula. A Figura 24 mostra ainda que as duas bandas evidenciadas nas Figuras 21 e 23 são reconhecidas por ambos anticorpos. O reconhecimento pelo anticorpo anti-AcM 83D4 de duas bandas indica a ocorrência de alguma modificação pós-traducional, que poderia alterar o padrão de migração das moléculas modificadas, ou mesmo de uma clivagem na extremidade aminoterminal.

Produção de anticorpos policlonais contra o fragmento scFvINV purificado a partir de extratos bacterianos

Dois coelhos machos foram imunizados com o scFvINV purificado de extratos bacterianos, com a finalidade de produzir anticorpos policlonais que deverão ser utilizados na análise, através de *western blotting*, de extratos protéicos de sementes das plantas transgênicas.

A imunização foi realizada com mais de uma dose para garantir uma resposta imune eficiente. A primeira dose consiste na apresentação do antígeno ao sistema imune e gera uma resposta imune primária, a partir da qual ocorre maturação da afinidade dos

anticorpos produzidos contra o imunógeno e os linfócitos envolvidos na resposta se diferenciam em células de memória. As doses subseqüentes consistem de reforços, em que as células de memória são recrutadas e os anticorpos produzidos apresentam maior afinidade com o antígeno aplicado. Em cada reforço é gerada uma resposta imune secundária, muito mais eficiente que a primária e na qual o título de anticorpos produzidos é superior.

Os soros obtidos a partir dos sangues coletados dos coelhos imunizados foram utilizados como anti-soros para padronização da técnica de *western blotting* e para determinação do limite de detecção do scFvINV por esses anti-soros, através desta técnica.

Os dois soros testados reconheceram duas bandas de aproximadamente 30 kDa (Figura 25), correspondentes às duas bandas do scFvINV puro.

A Tabela 1 mostra uma representação do resultado obtido no filme Kodak utilizado para revelação do *western blotting*. O sinal (+) indica ocorrência de detecção; o sinal (-) indica ausência de detecção. A primeira coleta de sangue foi realizada 20 dias após a administração do antígeno. Os soros de ambos os coelhos obtidos nesta coleta não se mostraram eficientes para detectar 50 ng de scFvINV puro nas três

Figura 25: Western blotting utilizando-se o soro do Coelho 2 (2ª coleta) como anticorpo primário, na diluição: 1:1000. Duas bandas de aproximadamente 30 kDa foram reconhecidas.

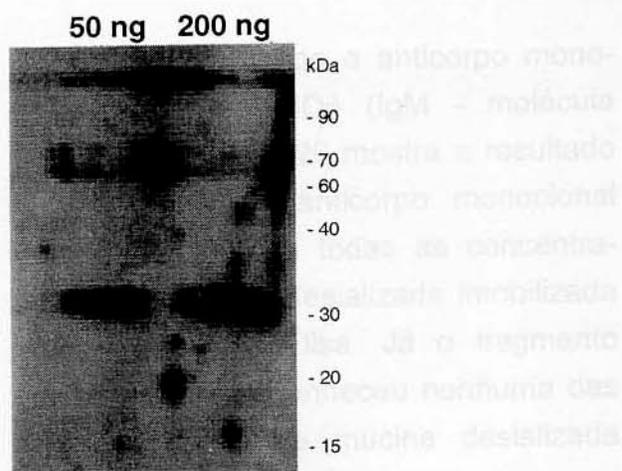


Tabela 1: Detecção do fragmento scFvINV produzido em bactéria pelo anticorpos monoclonais produzidos em coelho. A primeira coleta foi realizada 20 dias após a administração do antígeno.

	Diluição do Anticorpo Primário	Coelho 1 1ª coleta		Coelho 1 2ª coleta		Coelho 2 1ª coleta		Coelho 2 2ª coleta	
		50 ng scFvINV	200 ng scFvINV						
	1:250	-	-	+++++	+++++	+	+++	+++++	+++++
	1:500	-	-	+++++	+++++	-	++	+++++	+++++
	1:1000	+	++	+++++	+++++	-	+	++++	++++

diluições testadas. Apesar do soro do coelho 1 detectar 200 ng de scFvINV em todas as diluições avaliadas, o sinal observado foi fraco se comparado ao sinal observado para o soro obtido do mesmo coelho, na segunda coleta. A Tabela 1 evidencia que os anti-soros obtidos na segunda coleta, realizada quinze dias após o reforço, foram muito mais eficientes na detecção do scFvINV, o que indica que no 20º dia após a ad-

ministração do imunógeno o título dos anticorpos gerados na resposta imune estava mais baixo do que no 50º dia. Os soros dos dois coelhos, obtidos na segunda coleta, detectaram tanto 200 ng quanto 50 ng de scFvINV nas três diluições avaliadas e não houve diferença significativa entre essas três diluições com relação ao sinal de hibridação específica. No entanto, a medida que o anti-soro foi diluído, o *background* foi

reduzido, indicando que diluições acima de 1:1000 devem ser testadas na tentativa de se otimizar uma condição em que ocorra menor *background* sem perda do limite de detecção do antígeno.

Teste da especificidade do scFvINV produzido em bactéria contra o antígeno Tn

Para testar a especificidade do fragmento scFvINV, cuja seqüência apresentou discrepâncias em relação à seqüência esperada, contra o antígeno Tn, este fragmento do AcM 83D4 foi produzido em bactéria e purificado a partir de extratos protéicos bacterianos. O scFvINV puro foi então enviado ao Uruguai para realização de teste de especificidade através de Elisa. Como controle

positivo foi utilizado o anticorpo monoclonal anti-Tn 83D4 (IgM - molécula inteira). A Figura 26 mostra o resultado obtido, onde o anticorpo monoclonal 83D4 reconheceu todas as concentrações de mucina desializada imobilizada nas placas de Elisa. Já o fragmento scFvINV não reconheceu nenhuma das concentrações de mucina desializada testadas.

Babino *et al.* (1997) mostraram que a especificidade de alguns anticorpos anti-sTn e do anticorpo anti-Tn 83D4 é determinada principalmente pelos CDR H1 e CDR H2. Além disso, estas regiões são altamente conservadas e esta conservação parece estar associada à especificidade destes anticorpos. Os resultados obtidos após o seqüenciamento do fragmento scFvINV indicam que várias mutações não silenciosas estão presentes nestes CDRs.

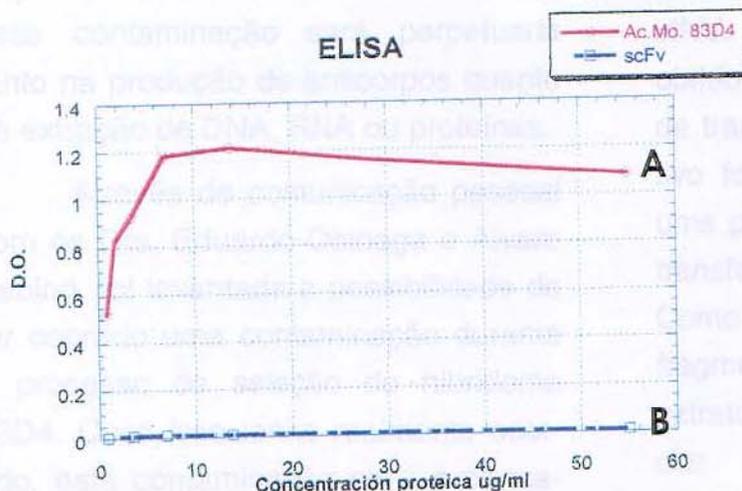


Figura 26: Ensaio de Elisa realizado com diferentes concentrações de mucina desializada. Em A observam-se as densidades ópticas verificadas para o anticorpo monoclonal anti Tn 83D4. Em B observam-se as densidades ópticas verificadas para o fragmento scFvINV purificado a partir de extratos bacterianos. Resultados obtidos por Eduardo Osinaga e Alvaro Babino.

Portanto, o não reconhecimento do antígeno Tn pelo fragmento scFvINV pode ser explicado pela ocorrência das discrepâncias nas seqüências do scFvINV e de V_H e V_L do anticorpo monoclonal 83D4.

Durante a produção de anticorpos monoclonais através da tecnologia de hibridoma, uma coleção de clones de linfócitos B produzidos após a imunização são fundidos com as células de mieloma. Dessa forma, a coleção de hibridomas passa por um processo de seleção em que são eles são colocados em contato com o antígeno. Uma vez feita uma seleção, os clones sofrem nova seleção para aumentar a especificidade do processo.

Quando um clone é selecionado, ele produz um anticorpo monoclonal específico contra o antígeno. Se durante o processo de seleção houver contaminação por outro clone de hibridomas, essa contaminação será perpetuada tanto na produção de anticorpos quanto na extração de DNA, RNA ou proteínas.

Através de comunicação pessoal com os Drs. Eduardo Osinaga e Alvaro Babino, foi levantada a possibilidade de ter ocorrido uma contaminação durante o processo de seleção do hibridoma 83D4. Caso isso tenha realmente ocorrido, esta contaminação seria propagada nas etapas de produção de cDNAs para a clonagem das regiões variáveis

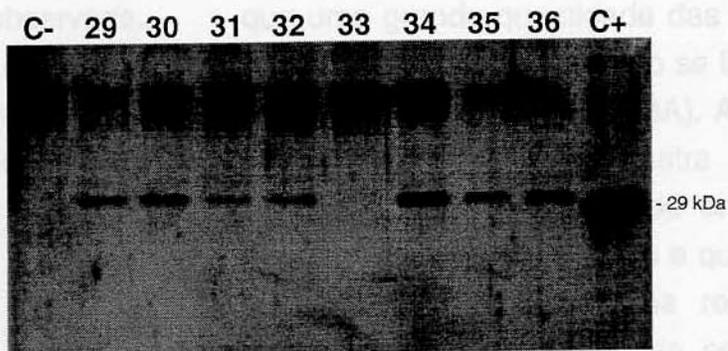
das cadeias leve e pesada do AcM 83D4.

Como o AcM 83D4 foi produzido a partir de imunização de camundongos com suspensões celulares obtidas a partir de secções de tecidos de câncer de mama, a possibilidade de ocorrência de seleção de um clone de hibridoma produtor de um AcM específico contra outro antígeno de câncer de mama não pode ser descartada.

Análise da produção do fragmento scFvINV nas sementes das plantas transgênicas

O anti-soro policlonal produzido na 2ª coleta de sangue do coelho 2 foi utilizado para analisar através de *western blotting* os extratos protéicos de sementes das plantas transgênicas quanto à expressão do fragmento scFvINV. A Figura 27 mostra o resultado obtido na análise de alguns dos eventos de transformação. Como controle negativo foi utilizado o extrato protéico de uma planta de tabaco não submetida a transformação com *A. tumefaciens*. Como controle positivo foi utilizado o fragmento scFvINV purificado a partir de extratos bacterianos. É possível evidenciar que o anti-soro anti-scFvINV reconheceu uma banda de

Figura 27: *Western blotting* de extratos protéicos de sementes de algumas das plantas transformadas com o fragmento scFvINV. Como controle negativo (C-) foi utilizado uma planta de tabaco SR1 não transformada e como controle positivo (C+) foi utilizado o scFvINV purificado a partir de extratos bacterianos. Os números indicam os eventos transformantes analisados.



aproximadamente 30 kDa em 7 das 8 plantas, indicando que tais plantas estão produzindo o fragmento scFvINV.

As bandas reconhecidas nas amostras protéicas dos extratos de sementes apresentam uma mobilidade eletroforética um pouco inferior que o fragmento scFvINV produzido em bactéria. Apesar de não terem sido realizadas análises que possam justificar esse padrão, duas hipóteses podem explicar esta observação.

A primeira delas consiste na possibilidade das células vegetais não estarem realizando o correto processamento do PS de endereçamento ao RE. O PS é constituído de 21 AAs, o que representa cerca de 2 kDa a mais na sequência primária da proteína, antes de ocorrer o processamento deste peptídeo no RE.

Makowski & Ramsby (1997) fizeram uma revisão a respeito da produção e das aplicações de SDS-PAGE na

determinação da massa molecular de proteínas. Nessa revisão, proteínas de 6,5 kDa a 205 kDa foram separadas em SDS-PAGE contendo géis de separação com diferentes concentrações de acrilamida-bisacrilamida. Segundo os resultados mostrados, num gel de 15% seria possível evidenciar uma diferença de 2kDa entre polipeptídeos que estão entre 20 kDa e 35 kDa.

Dessa forma, é necessário considerar que a diferença no padrão migratório evidenciado no *western blotting*, pode ser decorrente de uma diferença na massa molecular provocada pela permanência parcial ou total do PS.

A segunda hipótese consiste na possibilidade de ocorrência de glicosilação do scFvINV produzido em plantas. A presença de carboidratos promove um retardamento eletroforético das glicoproteínas. Assim, mesmo que o PS esteja sendo clivado, a adição de oligossacarídeos pode estar provocando a diferença

na mobilidade eletroforética observada. Já foi descrito que as plantas são capazes de glicosilar proteínas heterólogas (Bardor *et al.*, 1999), incluindo os anticorpos (Bakker *et al.*, 2001).

Purificação do scFvINV produzido em sementes de plantas

O extrato de 4g de sementes, preparado conforme descrito em Materiais e Métodos, foi inicialmente submetido à cromatografia IMAC. A resina utilizada apresenta como quelante de metais o grupo IDA (ácido iminodiacético). Este grupamento apresenta capacidade de realizar 3 ligações coordenadas enquanto que o grupo NTA (ácido nitrilotriacético) faz 4 ligações com metais bivalentes. As proteínas ligantes podem ser eluídas de forma similar aos processos descritos anteriormente para a resina Ni-NTA.

Como a proteína scFvINV apresentou-se solúvel no tampão de extração utilizado, o processo de purificação do fragmento de anticorpo recombinante produzido em sementes foi realizado sem as etapas de desnaturação e renaturação protéicas utilizadas na purificação da proteína produzida em bactéria.

A Figura 28 mostra a análise eletroforética das frações obtidas na cromatografia IMAC. É possível evidenciar

que uma grande quantidade das proteínas presentes no extrato não se ligaram à resina (coluna L, Figura 28A). A análise de *western blotting* mostra que o fragmento scFvINV foi eluído entre as frações 38 e 54 (Figura 28B) e que uma pequena fração da proteína recombinante presente no extrato de semente não se ligou à resina (coluna L). As frações eluídas que apresentaram reatividade com o anticorpo anti-scFvINV foram reunidas em duas amostras. Uma delas incluiu as frações 38 a 47 que se apresentaram contaminadas com diferentes proteínas e a segunda foi obtida a partir da reunião das frações reativas 48 a 54 que segundo o gel corado com *comassie blue* apresentaram baixo índice de contaminação (Figuras 28A e 28B).

A amostra obtida a partir da reunião das frações de menor pureza foi submetida à cromatografia de fase reversa. Este método de separação de moléculas baseia na diferença de hidrofobicidade. As moléculas apolares ou hidrofóbicas ligam-se a fase estacionária enquanto que as polares mantêm-se na fase móvel. A eluição diferencial das moléculas ligadas é realizada através da redução da polaridade da fase móvel com a aplicação de gradientes contínuos. O gradiente é geralmente realizado partindo-se de uma baixa concentração de um solvente orgânico

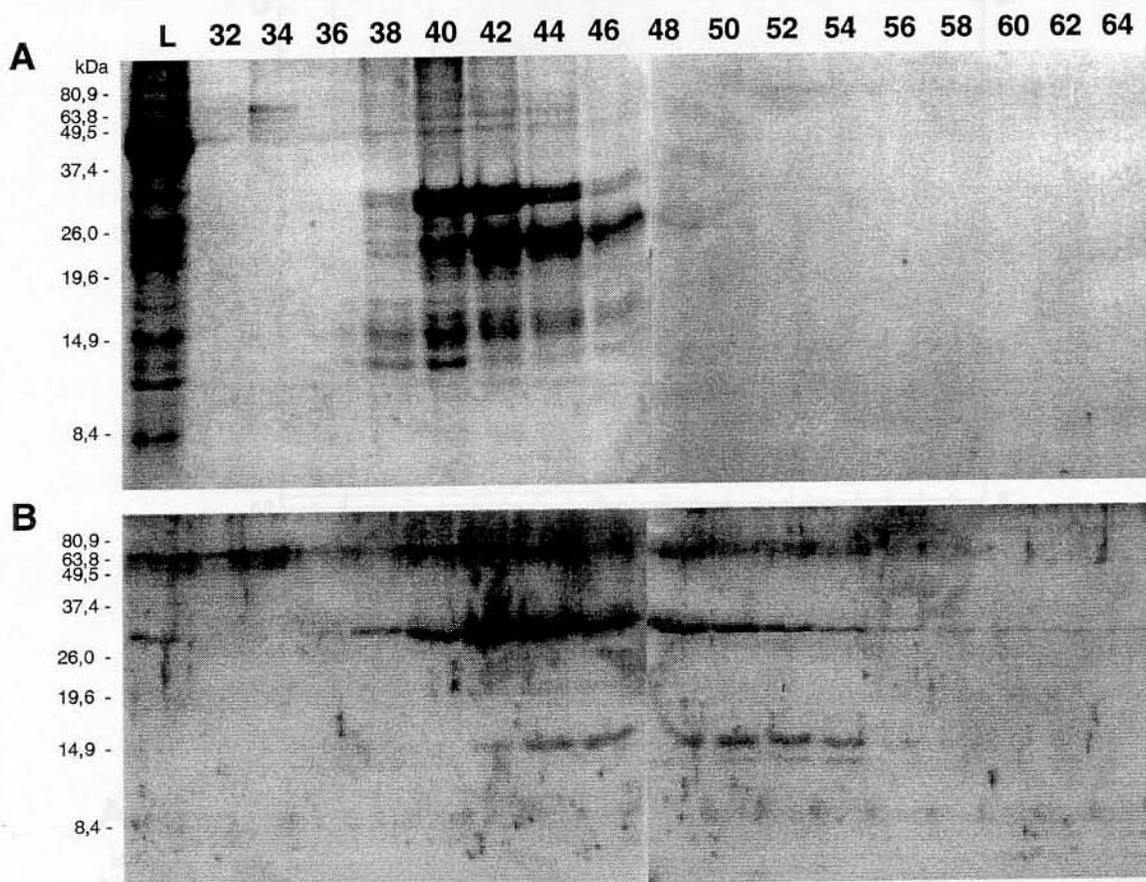


Figura 28: Análise eletroforética das frações obtidas na cromatografia IMAC durante a purificação do scFvINV produzido em sementes. Em A evidencia-se um SDS-PAGE 15% corado com *comassie blue* e em B observa-se um *western blotting* revelado com anticorpo anti-scFvINV. L: amostra durante a o lavagem da coluna com tampão contendo 20 mM de imidazol. Os números representam as frações coletadas após o início do gradiente de imidazol (20 a 500 mM) utilizado na eluição.

(acetonitrila, metanol ou isopropanol) misturado com água.

Um componente importante do sistema de solvente neste tipo de cromatografia é o agente pareador de íons. Este tipo de agente apresenta caráter anfifílico e, portanto, é capaz de ligar-se, através de interações hidrofóbicas, à fase estacionária e de pontes salinas, às cadeias laterais dos resíduos de amino-

ácidos das proteínas. O agente pareador mais utilizado em cromatografias de fase reversa de biomoléculas é o ácido trifluoracético (TFA).

A resina Poros 50 R2 utilizada na cromatografia de fase reversa é constituída por uma matriz de perfusão. Este tipo de resina é formado por partículas que, além de apresentar os poros de

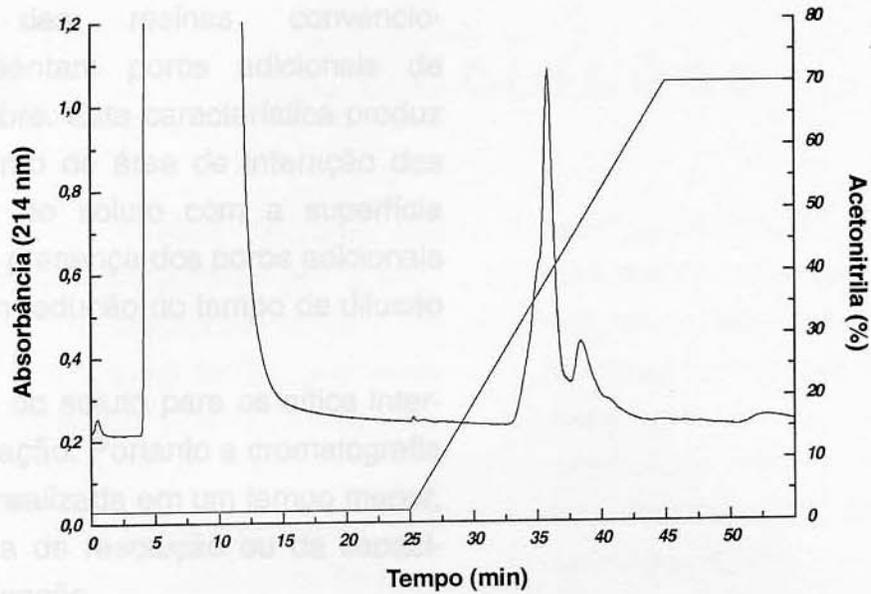


Figura 29: Perfil de eluição da cromatografia de fase reversa realizada com a amostra de scFvINV obtida a partir da reunião das frações 38 a 47 eluídas na cromatografia IMAC.

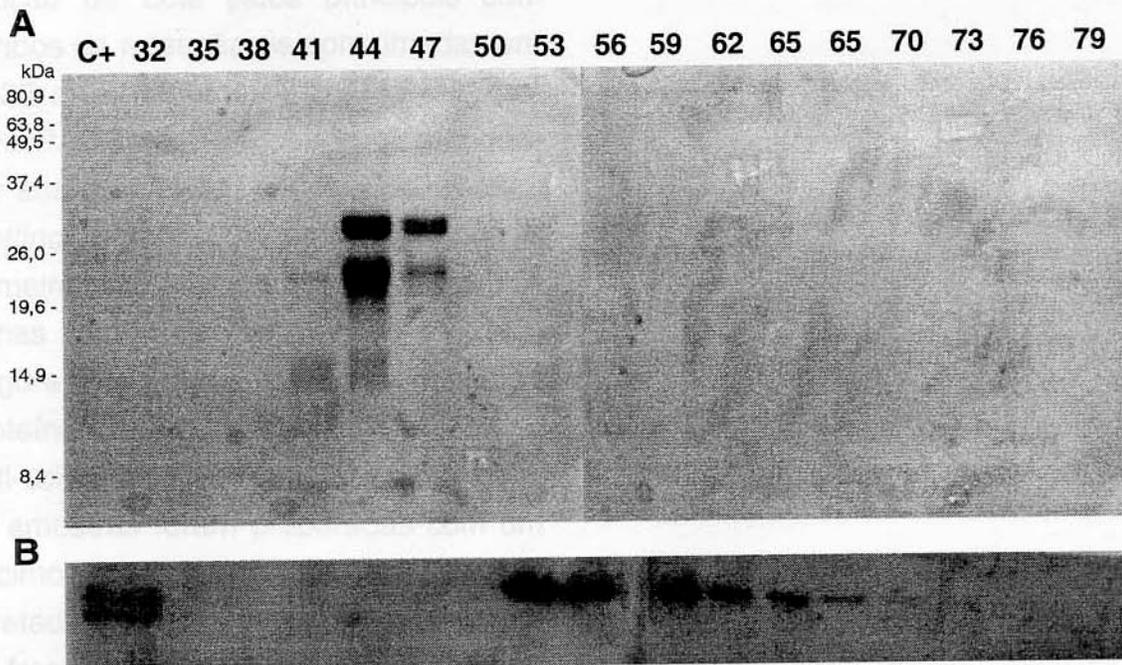


Figura 30: Análise eletroforética das frações obtidas na cromatografia de fase reversa. Em A observa-se o SDS-PAGE 15% corado com *comassie blue*; em B observa-se o *western blotting* revelado com anticorpo anti-scFvINV.C⁺: controle positivo(scFvINV produzido em bactéria). Os números representam as frações coletadas após o início do gradiente de acetonitrila utilizado na eluição.

difusão das resinas convencionais, apresentam poros adicionais de maior calibre. Esta característica produz um aumento de área de interação das partículas do soluto com a superfície interna. A presença dos poros adicionais resulta em redução do tempo de difusão das partículas do soluto para os sítios internos de ligação. Portanto a cromatografia pode ser realizada em um tempo menor, sem perda de resolução ou da capacidade de ligação.

A Figura 29 mostra o perfil de eluição da cromatografia de fase reversa. O gradiente de acetonitrila resultou na eluição de dois picos principais com tempos de retenção de aproximadamente 36 e 38 minutos. A análise feita por SDS-PAGE das frações correspondentes aos dois picos, seguida de *western blotting* (Figura 30), demonstra que o primeiro pico eluído corresponde a proteínas contaminantes (frações 41 a 47) (Figura 30A), uma vez que nenhuma proteína foi detectada pelo anticorpo anti-scFvINV. Para realização dos géis, as amostras foram preparadas com um décimo do volume total das frações coletadas. Nas colunas correspondentes às frações que representam o segundo pico, nenhuma proteína foi visualizada. No entanto, um polipeptídeo de massa aparente 30 kDa foi imunodetectado, evidenciando a presença do scFvINV nestas frações (Figura 30B).

O objetivo do presente trabalho era obter plantas transgênicas de tabaco expressando o fragmento scFvINV do anticorpo monoclonal 83D4, que reconhece um antígeno altamente expresso em células de câncer de mama.

Foi obtida uma construção contendo a seqüência codificadora do fragmento scFvINV do anticorpo monoclonal 83D4 sob controle do promotor de γ -kafirina, específico para expressão, em endosperma de sementes, e do terminador 35S. O anticorpo monoclonal 83D4 reconhece antígeno Tn, altamente expresso em células de câncer de mama e de outros cânceres. O cassete de expressão contém ainda um peptídeo sinal para endereçamento para o retículo endoplasmático.

Esta construção foi seqüenciada e verificou-se que, apesar da fase de leitura ter sido mantida após a realização das etapas de clonagem, a seqüência do fragmento scFvINV não corresponde à esperada. Várias das mutações encontradas resultam em mudança de aminoácidos.

A comparação da seqüência obtida com a seqüência esperada e a análise de dados previamente publicados, relativos ao fragmento Fv do anticorpo

monoclonal 83D4, indicaram que as substituições de aminoácidos verificadas, aparentemente, são críticas para a funcionalidade deste fragmento de anticorpo, uma vez que vários dos resíduos substituídos estão localizados nas regiões determinantes de complementaridade ao antígeno.

O fragmento scFvINV foi produzido em bactéria e acumulou-se na fração insolúvel do extrato bacteriano. Foi estabelecida uma metodologia para purificação baseada em duas etapas cromatográficas (IMAC e filtração em gel).

Dois polipeptídeos de aproximadamente 30 kDa foram co-purificados e são reconhecidos por anticorpos policlonais anti scFvINV.

A proteína pura foi enviada ao Laboratório de Oncologia Básica, Departamento de Bioquímica, Faculdade de Medicina, Montevideú, Uruguai, para ser testada contra o antígeno Tn. Os Elis as realizados mostraram que o fragmento de anticorpo testado não reconheceu mucinas desializadas.

Foram obtidas plantas transgênicas de tabaco. Estas plantas foram avaliadas quanto à expressão em se-

mentes e, através de *western blotting* a maioria mostrou estar produzindo o fragmento scfvINV, o que indica que o promotor de γ -kafirina foi capaz de promover a expressão da seqüência codificadora do fragmento scFvINV em sementes de tabaco.

O fragmento scFvINV produzido em plantas apresentou mobilidade eletroforética um pouco menor que o produzido em bactérias, em condições redutoras.

Foi estabelecida uma metodologia para purificação desta molécula a partir de extratos protéicos de sementes.

Algumas caracterizações bioquímicas do scFvINV produzido em bactéria e em plantas precisam ser realizadas. O fragmento de anticorpo, produzido em bactérias, deve ser avaliado através de SDS-PAGE em condições não redutoras para esclarecer se o comportamento apresentado por esta molécula no processo de filtração em gel (eluição como um dímero) é consequência da ocorrência de dimerização.

Em colaboração com o grupo do Dr. Eduardo Osinaga serão realizados ensaios de imunohistoquímica visando a provável identificação da especificidade do fragmento de anticorpo scFvINV.

Caracterizações bioquímicas do scFvINV produzido em sementes de plantas deverão ser realizadas.

A obtenção do scFvINV de origem vegetal na forma pura permite ainda a realização de uma comparação entre os sistemas bacteriano e vegetal, quanto à eficiência de processamento glicolítico deste fragmento de anticorpo. Radha & Wold (1997) descrevem em sua revisão de 1997 algumas técnicas úteis na identificação de modificações pós-traducionais comuns em proteínas. Deverão ser utilizadas técnicas cromatográficas utilizando HPLC e espectro-

metria de massa (Jensen *et al.*, 1997) para avaliar qualitativamente o padrão de glicosilação dos produtos bacteriano e vegetal.

Uma vez que foram detectadas as discrepâncias entre as seqüências de V_H e V_L do AcM 83D4 e do scFvINV produzido em plantas, os colaboradores do Uruguai nos enviaram clones do scFvDIR. Foram feitas construções para transformação de plantas com esta molécula, utilizando o mesmo cassete de expressão específico de sementes. Foram realizados ensaios de transformação de discos foliares de tabaco e plantas selecionadas com kanamicina foram regeneradas e estão em casa de vegetação. Estas plantas serão analisadas da mesma forma.

O cassete de expressão PGK-gene de interesse-T35S contém o promotor de γ -kafirina, que é um promotor específico de endosperma de sorgo. Em dicotiledôneas, geralmente o endosperma é reduzido, quando não está ausente. Nesta grupo vegetal um dos principais tecidos de reserva é o cotilédone.

Na maioria das monocotiledôneas, o endosperma consiste no principal tecido de reserva e representa

grande porcentagem da massa total da semente. Assim, a utilização de um promotor específico de endosperma para expressão de proteínas heterólogas em monocotiledôneas representa uma vantagem em relação à produção em dicotiledôneas.

Plantas de tabaco geralmente são usadas porque a transformação de *Nicotiana* é relativamente simples e geralmente é realizada através de ensaios com *A. tumefaciens*. Monocotiledôneas, por sua vez, não são facilmente transformáveis por agrobactéria, mas sim por processos de biobalística.

Na tentativa de produzir plantas transgênicas de milho contendo o cassete de expressão PGK-PSscFvDIR-T35S, uma colaboração com pesquisadores da Embrapa Milho e Sorgo (Embrapa, Sete Lagoas, MG). Calos embriogênicos de milho foram bombardeados com construções contendo o cassete de expressão mencionado. Estes calos estão sendo submetidos a processos de seleção para a regeneração de possíveis transformantes.

Diante da utilização de animais transgênicos como uma possibilidade promissora para produzir proteínas de interesse farmacêutico, uma colaboração com pesquisadores da Embrapa Recursos genéticos e Biotecnologia (Embrapa, Brasília, DF) foi estabelecida. O scFvINV 83D4 será produzido em

fibroblastos transfectados sob o controle de seqüências promotoras específicas. Além disso, serão gerados animais transgênicos contendo este fragmento de anticorpo clonado sob controle do promotor de β -caseína, que é específico de glândulas mamárias. Os plasmídeos necessários para a realização deste trabalho estão, neste momento, sendo produzidos em nosso laboratório.

Plantas de tabaco foram transformadas com vetores de expressão contendo a região codificadora do fragmento scFvINV precedida por um peptídeo sinal de endereçamento ao RE, sob controle de um promotor específico de sementes.

Plantas transgênicas expressando o fragmento de anticorpo foram produzidas.

No entanto, a análise da seqüência dos clones recebidos mostrou discrepâncias em relação à seqüência esperada para o fragmento scFvINV. Para avaliar a especificidade deste fragmento contra o antígeno reconhecido pelo AcM 83D4, o mesmo foi produzido em bactéria e posteriormente purificado.

O teste de especificidade (Elisa) mostrou que o fragmento produzido não reconhece o antígeno Tn.

Teste adicionais para tentar determinar a especificidade do scFvINV deverão ser realizados no Uruguai.

Mesmo que o fragmento scFvINV não apresente atividade contra outro antígeno produzido por células tumorais de mama, o sistema estabelecido poderá servir como um modelo para avaliação de processamentos pós-traducionais realizados por plantas em proteínas de origem animal. Deverão ser avaliadas a eficiência de clivagem do PS de endereçamento ao RE e o padrão de glicosilação do fragmento scFvINV.

O mesmo trabalho está sendo realizado para o fragmento scFvDIR, que não apresenta discrepâncias na sequência observada em relação à esperada.

A possibilidade de expressão do scFvDIR em sementes de plantas transgênicas, em sistemas bacterianos e em células animais tornará possível a realização de uma comparação entre os três sistemas. Poderão ser comparados (1) os níveis de produção da proteína heteróloga; (2) a eficiência de processamento pós-traducional, (3) a qualidade dos processamentos realizados e (5) a especificidade contra o antígeno Tn do scFvINV produzido em cada um destes sistemas.

- Adams GP, Schier R. (1999) Generating improved single-chain Fv molecules for tumor targeting. *Journal of Immunological Methods* **231**: 249-260.
- Amersham Pharmacia Biotech (2000) Recombinant Phage Antibody System. *Technical Bulletin*.
- Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K (1997) Current Protocols in Molecular Biology, *John Wiley & Sons, Inc, USA*.
- Babino A, Pritsch O, Oppezso P, Du Pasquier R, Roseto A, Osinaga E, Alzari PM. (1997) Molecular cloning of a monoclonal anti-tumor antibody specific for the Tn antigen and expression of an active single-chain Fv fragment. *Hybridoma* **16(4)**: 317-324.
- Babino A, Oppezso P, Bianco S, Barrios E, Berois N, Navarrete H, Osinaga E. (2000) Tn antigen is a pre-cancerous biomarker in breast tissue and serum in N-Nitrosomethylurea-induced rat mammary carcinogenesis. *International Journal of Cancer* **86(6)**:753-759.
- Bakker H, Bardor M, Molthoff JW, Gomord V, Elbers I, Stevens LH, Jordi W, Lommen A, Faye L, Lerouge P, Bosch D. (2001) Galactose-extended glycans of antibodies produced by transgenic plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **98**: 2899-2904.
- Bardor M, Faye L, Lerouge P. (1999) Analysis of the N-glycosylation of recombinant glycoproteins produced in transgenic plants. *Trends in Plant Science* **4**: 376-380.
- Beachy RN, Fitchen JH, Hein MB. (1996) Use of plant viruses for delivery of vaccine epitopes. *Annals of the New York Academy of Sciences* **792**:43-49.
- Better M, Chang CP, Robinson RR, Horwitz AH. (1988) *Escherichia coli* secretion of an active chimeric antibody fragment. *Science* **240**: 1041-1043.
- Bird GWG, Shinton NK, Wingham J. (1971) Persistent mixed-field polyagglutination. *British Journal of Haematology* **21**: 443-453.
- Borisjuk NV, Borisjuk LG, Logendra S, Petersen F, Gleba Y, Raskin I. (1999) Production of recombinant proteins in plant root exudates. *Nature Biotechnology* **17**: 466-469.
- Bradford MM. (1976) A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**: 248-254.
- Bradley MK. (1990) Overexpression of proteins in eukaryotes. *Methods in Enzymology* **182**: 112-143.
- Brasileiro ACM & Carneiro VTC (eds.). (1998) Manual de transformação genética de plantas. *Embrapa, Brasília*.
- Burdick MD, Harris A, Reid CJ, Iwamura T, Hollingsworth MA. (1997) Oligosaccha-

- rides expressed on MUC1 produced by pancreatic and colon tumor cell lines. *Journal of Biological Chemistry* **272**: 24198-24202.
- Cabanes-Macheteau M, Fitchette-Laine AC, Loutelier-Bourhis C, Lange C, Vine ND, Ma JKC, Lerouge P, Faye L. (1999) N-glycosylation of a mouse IgG expressed in transgenic tobacco plants. *Glycobiology* **9(4)**: 365-372.
- Cao Y, Karsten UR, Liebrich W, Haensch W, Springer GF, Schlag PM. (1995) Expression of Thomsen-Friedenreich-related antigens in primary and metastatic colorectal carcinomas. A reevaluation. *Cancer* **76**: 1700-1708.
- Chames P & Baty D. (2000) Antibody engineering and its applications in tumor targeting and intracellular immunization. *FEMS Microbiology Letters* **189**: 1-8.
- Chargelegue D, Vine ND, van Dolleweerd CJ, Drake PMW, Ma JKC. (2000) A murine monoclonal antibody produced in transgenic plants with plant-specific glycans is not immunogenic in mice. *Transgenic Research* **9(3)**: 187-194.
- Charpin C, Pancino G, Osinaga E, Bonnier P, Lavaut MN, Allasia C, Roseto A. (1992) Monoclonal antibody 83D4 immunoreactivity in human tissues: cellular distribution, and microcytometric analysis of immunoprecipitates on tissue sections. *Anticancer Research* **12**: 209-224.
- Cho SH, Sahin A, Hortobaguy G, Hittelman WN, Dhingra K. (1994) Sialyl-Tn antigen expression occurs early during human mammary carcinogenesis and is associated with high nuclear grade and aneuploidy. *Cancer Research* **54**: 6302-6305.
- Chung Y, Yamashita Y, Kato Y, Nakata B, Sawada T, Sowa M. (1996) Prognostic significance of T antigen expression in patients with gastric carcinoma. *Cancer* **77**: 1768-1773.
- Clark AJ, Archibald AL, Bessos H, Harris S, McClenaghan M, Prowse C, Simons JP, Whitelaw. (1989) The molecular manipulation of milk composition. *Genome* **31**: 950-955.
- Daniell H, Streatfield SJ, Wycoff K. (2001) Medical molecular farming: production of antibodies, biopharmaceuticals and edible vaccines in plants. *Trends in Plant Science* **6**: 219-226.
- De Clerq A, Vandewiele M, De Rycke R, Van Damme J, Van Montagu M, Krebbers E, Vandkerckhove J. (1989) Expression and processing of an *Arabidopsis* 2S albumin in transgenic tobacco. *Journal of Plant Physiology* **92**: 899-907.
- De Neve M, De Buck S, De Wilde C, Van Houdt H, Strobbe I, Jacobs A, Van Montagu M, Depicker A. (1999) Gene silencing results in instability of antibody production in transgenic plants. *Molecular and General Genetics* **260**: 582-592.
- De Neve M, De Loose M, Jacobs A, Van Houdt H, Kaluza B, Weidle U, Van Montagu M, Depicker A. (1993) Assembly of an antibody and its derived antibody fragment in *Nicotiana* and *Arabidopsis*. *Transgenic Research* **2**: 227-237.
- Depicker A & Van Montagu M. (1997) Post-transcriptional gene silencing in plants. *Current Opinion in Cell Biology* **9**: 373-

- 382.
- Desai PR, Ujjainwala LH, Carlstedt SC, Springer GF. (1997) Antibodies to pancreatic carcinoma Tn epitope: their altered levels in breast carcinoma patients. *Onkologie* **20**: 472-477.
- Ding L, Lalani E-N, Reddish M, Koganty R, Wong T, Samuel J, Yacyshyn MB, Meikle A, Fung PYS, Taylor-Papadimitriou J, Longenecker BM. (1993) Immunogenicity of synthetic peptides related to the core peptide sequence encoded by the human MUC1 mucin gene: effect of immunisation on the growth of murine mammary adenocarcinoma cells transfected with the human MUC1 gene. *Cancer Immunology Immunotherapy* **36**: 9-17.
- Dunn-Walters D, Bousier L, Spencer J. (2000) Effect of hypermutation on potential N-glycosylation sites in human immunoglobulin heavy chain variable regions. *Molecular Immunology* **37**: 107-113.
- During K, Hipper S, Kreuzaler F, Schell J. (1990) Synthesis and self-assembly of a functional monoclonal antibody in transgenic *Nicotiana tabacum*. *Plant Molecular Biology* **15**: 281-293.
- Dyck MK, Gagné D, Oullet M, Sénéchal J-F, Bélanger E, Lacroix D, Sirard M-A, Pothier F. (1999) Seminal vesicle production and secretion of growth hormone into seminal fluid. *Nature Biotechnology* **17**: 1087-1090.
- Fiedler U & Conrad U. (1995) High level production and long term-storage of engineered antibodies in transgenic tobacco seeds. *Bio/Technology* **13**: 1090-1093.
- Firek S, Draper J, Owen MRL, Gandecha A, Cockburn W, Whitelan GC. (1993) Secretion of a functional single-chain Fv protein in transgenic tobacco plants and cell suspension cultures. *Plant Molecular Biology* **23**: 861-870.
- Flavell RB. (1994) Inactivation of gene expression in plants as a consequence of specific sequence duplication. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **91**: 3490-34-96.
- Folha de São Paulo. (1992) Novo manual da redação. *Folha de São Paulo, São Paulo, Brasil*.
- Franchi A & Gallo O. (1996) Prognostic implications of sialosyl-Tn antigen expression in sinonasal intestinal-type adenocarcinoma. *European Journal of Cancer. Part B. Oral Oncology*. **32B**: 123-127.
- Freitas FA, Yunes JA, da Silva MJ, Arruda P, Leite A. (1994) Structural characterization and promoter activity analysis of the γ -kafirin gene from sorghum. *Molecular and General Genetics* **245**: 177-186.
- Frigerio L, Vine ND, Pedrazzini E, Hein MB, Wang F, Ma JK-C, Vitale A. (2000) Assembly, secretion and vacuolar delivery of a hybrid immunoglobulin in plants. *Plant Physiology* **123**: 1483-1493.
- Georgiou G. (1988) Optimizing the production of recombinant proteins in microorganism. *AIChE J.* **34**: 1233-1248.
- Georgiou G & Bowden GA. (1991) Inclusion body formation and the recovery of aggregated recombinant proteins. 333-356 In: Ho C, Prokop A, Bajpaj R (eds.). *Recombinant DNA technology and applica-*

- tions. *McGraw-Hill, New York, EUA*.
- Ghazizadeh M, Ogawa H, Sasaki Y, Araki T, Aihara K. (1997) Mucin carbohydrate antigens (T, Tn, sialyl-Tn) in human ovarian carcinomas: relationship with histopathology and prognosis. *Human Pathology* **28**: 960-966.
- Giddings G, Allison G, Brooks D, Carter A. (2000) Transgenic plants as factories for biopharmaceuticals. *Nature Biotechnology* **18**: 1151-1155.
- Giddings G. (2001) Transgenic plants as protein factories. *Current Opinion in Biotechnology* **12**: 450-454.
- Gilliland DG, Steplewski Z, Collier RJ, Mitchell KF, Chang TH, Koprowski H. (1980) Antibody-directed cytotoxicity agents: use of monoclonal antibody to direct the action of toxin A chains to colorectal carcinoma cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **77**: 4539-4543.
- Goddijn OJM & Pen J. (1995) Plants as bioreactors. *Tibtech* **13**: 379-387.
- Goosen MFA. (1993) Insect cell culture engineering: an overview. 1-16 In: Goosen MFA, Baugulis A, Faulkner P (eds.) Insect cell culture engineering. *Marcel Dekker, New York*.
- Gordon K, Lee E, Vitale JA, Smith AE, Westphal H, Hennighausen L. (1987) Production of human tissue plasminogen activator in transgenic mouse milk. *Bio/Technology* **5**: 1183-1187.
- Hadden JW. (1999) The immunology and immunotherapy of breast cancer: an update. *International Journal of Immunopharmacology* **21**: 79-101.
- Hakomori S. (1989) Aberrant glycosylation in tumors and tumor-associated carbohydrate antigens. *Advances in Cancer Research* **52**: 257-331.
- Haq TA, Mason HS, Clements JD, Arntzen CJ. (1995) Oral immunization with a recombinant bacterial antigen produced in transgenic plants. *Science* **268**: 714-716.
- Harvey AJ, Speksnijder G, Baugh LR, Morris JA, Ivarie R (2002) Expression of exogenous protein in the egg white of transgenic chickens. *Nature Biotechnology* **20**: 396-399.
- Hein MB, Tang Y, McLeod DA, Janda KD, Hiatt A. (1991) Evaluation of immunoglobulins from plant cells. *Biotechnology Progress* **7**: 455-461.
- Hiatt A, Cafferkey R, Bowdish K. (1989) Production of antibodies in transgenic plants. *Nature* **342**: 76-78.
- Hiatt A (1990). Antibodies produced in plants. *Nature* **344**: 469-470.
- Higgins DR. (1995) Culture of yeast for the production of heterologous proteins. 5.7.1-5.7.16 In: Coligan JE, Dunn BM, Ploegh HL, Speicher DW, Wingfield PT, (eds.) Current Protocols in Protein Science. *John Wiley & Sons, Inc, USA*.
- Hirao T, Sakamoto Y, Kamada M, Hamada S, Aono T. (1993) Tn antigen, a marker of potential for metastasis of uterine cervix cancer cells. *Cancer* **72**: 154-159.
- Hood EE, Witcher DR, Maddock S, Meyer T, Baszczynski C, Bailey M, Flynn P, Register J, Marshall L, Kulisek E, Kusnadi A, Enavgelista R, Nikolov Z, Wooge C, Mehigh RJ, Hernan R, Kappel WK, Ritland D, Li CP, Howard JA. (1997) Commercial production of avidin from trans-

- genic maize: characterization of transformant, production, processing, extraction and purification. *Molecular Breeding*, **3**: 291-306.
- Hooykaas PJ. (1988) *Agrobacterium* molecular genetics. In: Plant Molecular Biology Manual A4:1-13, *Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Holanda*.
- Horsch RB, Fry J, Hoffmann N, Neidermeyer J, Rogers SG, Fraley RT. (1988). Leaf disc transformation. In Gelvin SB, Schiperoort RA, Verma DPS (eds.) Plant Molecular Biology Manual, pp. A5: 1-9, *Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Holanda*.
- Horvath H, Huang J, Wong O, Kohl E, Okita T, Kannangara G, von Wettstein D. (2000) The production of recombinant proteins in transgenic barley grains. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **97**: 1914-1919.
- Hudson PJ, Kortt AA. (1999) High avidity scFv multimers; diabodies and triabodies. *Journal of Immunological Methods* **231**: 177-189.
- Hunt AG. (1994) Messenger RNA 3' end formation in plants. *Annual Review of Plant Molecular Physiology and Plant Molecular Biology* **43**: 177-200.
- Imperiali B & O'Connor S. (1999) Effect of N-linked glycosylation on glycopeptide and glycoprotein structure. *Current Opinion in Chemical Biology* **3**: 643-649.
- Iitzkowitz SH, Yuan M, Montgomery CK, Kjeldsen T, Takahashi HK, Bigbee WL, Kim YS. (1989) Expression of Tn, sialosyl-Tn and T antigens in human colon cancer. *Cancer Research* **49**: 197-204.
- Iitzkowitz SH, Bloom EJ, Kokal WA, Modin G, Hakomori S, Kim YS. (1990) Sialosyl-Tn. A novel mucin antigen associated with prognosis in colorectal cancer patients. *Cancer* **66**: 1960-1966.
- Jefferson RA. (1987) Assaying chimeric genes in plants: the *gus* gene fusion system. *Plant Molecular Biology* **5**: 387-405.
- Jense, ON, Shevchenko, Namm Matthias. (1997) Protein analysis by mass spectrometry. 29-56 In: Creighton TE (ed.) Protein structure: a practical approach. *Oxford University Press Inc., New York, USA*.
- Kerr DE, Liang F, Bondioli KR, Zhao H, Kreibich G, Wall RJ, Sun T-T. (1998) The bladder as a biorreactor: urothelium production and secretion of growth hormone into urine. *Nature Biotechnology* **16**: 75-79.
- Kinney AY, Sahin A, Vernon SW, Frankowski RF, Annegers JF, Hortobagyi GN, Buzdar AU, Frye DK, Dhingra K. (1997) The prognostic significance of sialyl-Tn antigen in women treated with adjuvant chemotherapy. *Cancer* **80**:2240-2249.
- Kobayashi H, Terao T, Kawashima Y. (1992) Serum sialyl-Tn as an independent predictor of poor prognosis in patients with epithelial ovarian cancer. *Journal of Clinical Oncology*, **10**: 95-101.
- Köhler G & Milstein C. (1975) Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* **256**: 495-497.
- Konska G, Guillot J, De Latour M, Fonck Y. (1998) Expression of Tn antigen and N-acetyllactosamine residues in malignant and benign human breast tumors de-

- ected by lectins and monoclonal antibody 83D4. *International Journal of Oncology* **12**: 361-367.
- Kozak M. (1987) An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNA sequences: intimations of translational control. *Nucleic Acids Research* **15**: 8125-8148.
- Krishna RG & Wold F. (1997) Identification of common post-translational modifications. 91-113 In: Creighton TE (ed.) Protein structure: a practical approach. *Oxford University Press Inc., New York, USA*.
- Kuby J. (1997) Immunology. 3rd ed. *W. H. Freeman and Company, USA*.
- Kusnadi AR, Nikolov ZL, Howard JÁ. (1997) Production of Recombinant proteins in transgenic plants: practical considerations. *Biotechnology and Bioengineering* **56(5)**: 473-484.
- Larrick JW & Thomas DW. (2001) Producing proteins in transgenic plants and animals. *Current Opinion in Biotechnology* **12**: 411-418.
- Leite A, Kemper EL, da Silva MJ, Luchessi AD, Siloto RMP, Bonaccorsi ED, EL-Dorry HF, Arruda P. (1999) Expression of correctly processed human growth hormone in seeds of transgenic tobacco plants. *Molecular Breeding* **6**: 47-53.
- Leite A. (2001) Expressão de proteínas heterólogas em plantas. 1057-1083. In: Nass LL, Valois ACC, de Melo IS, Valadares-Inglis MC (eds.) Recursos genéticos & melhoramento – Plantas. *Fundação MT, Rondonópolis*.
- Lerouge P, Cabanes-Macheteau M, Catherine R, Fischette-Lainé A-C, Gomord V, Faye L. (1998) N-glycoprotein biosynthesis in plants: recent developments and future trends. *Plant Molecular Biology* **38**: 31-48.
- Li L, Qu RD, Kochko A, Fauquet C, Beauchy RN. (1993) Na improved rice transformation system using the biolistic method. *Plant Cell Reports* **12**: 250-255.
- Lo-Man R, Bay S, Vichier-Guerre S, Deriaud E, Cantacuzene D, Leclere C. (1999) A fully synthetic immnogen carrying a carcinoma-associated carbohydrate for active specific immunotherapy. *Cancer Research* **59**: 1520-1524.
- Longenecker BM, Reddish M, Koganty R, MacLean GD. (1994) Specificity of IgG response in mice and human breast cancer patients following immunization against synthetic sialyl-Tn, an epitope with possible functional significance in metastasis. *Advances in Experimental Medicine and Biology* **353**: 105-124.
- Lubon H, Paleyanda RK, Velandar WH, Drohan WN. (1996) Blood proteins from transgenic animal biorreactors. *Transfus. Med. Ver.* **10**: 131-143.
- Ma JK-C, Hiatt A, Hein M, Vine ND, Wang F, Stabila P, van Dolleweerd C, Mostov K, Lehner T. (1995) Generation and assembly of secretory antibodies in plants. *Science* **268**: 716-719.
- Makowski GS & Ramsby ML. (1997) Protein molecular weight determination by sodium dodecil sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. 1-27 In: Creighton TE (ed.) Protein structure: a practical approach. *Oxford University Press Inc., New York, USA*.
- Mason HS & Arntzen CJ. (1995) Transgenic

- plants as vaccine production systems. *Tibtech* **13**: 388-397.
- Mason HS, Haq TA, Clements JD, Arntzen CJ. (1998) Edible vaccine protects mice against *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin (LT): potatoes expressing a synthetic LT-B gene. *Vaccine* **16**: 1336-1343.
- Mason HS, Lam DM-K, Arntzen CJ. (1992) Expression of hepatitis B surface antigen in transgenic plants. *Proceedings of National Academy of Sciences USA* **89**: 11745-11749.
- Matsumoto S, Ikura K, Ueda M, Sasaki R. (1995) Characterization of a human glycoprotein (erythropoietin) produced in cultured tobacco cells. *Plant Molecular Biology* **27**: 1163-1172.
- Matzke AJM & Matzke MA. (1998) Position effects and epigenetic silencing of plant transgenes. *Current Opinion in Plant Biology* **1**: 142-148.
- Meade J, Gates L, Lacy E, Lonberg N. (1990) Bovine alpha-S1-casein gene-sequences direct high level expression of active human urokinase in mouse milk. *Bio/Technology* **8**: 443-446.
- Mestecky K & McGhee JR. (1987) Immunoglobulin A (IgA) molecular and cellular interactions involved in IgA biosynthesis and immune response. *Advances in Immunology* **40**: 153-245.
- Meyer P (1996) Repeat-induced gene silencing: common mechanisms in plants and fungi. *Biological Chemistry Hoppe-Seyler* **377**: 87-95.
- Meyer P & Saedler H. (1996) Homology-dependent gene silencing in plants. *Annual Reviews Plant Physiology Plant Molecular Biology* **47**: 23-48.
- Meynial-Salles I & Combes D. (1996) In vitro glycosylation: an enzymatic approach. *Journal of Biotechnology* **46**: 1-14.
- Miles DW & Taylor-Papadimitriou J. (1999) Therapeutic aspects of polymorphic epithelial mucin in adenocarcinoma. *Pharmacology & Therapeutics* **82**: 97-106.
- Miles DW, Towilson KE, Graham R, Reddish M, Longenecker BM, Taylor-Papadimitriou J, Rubens RD. (1996) A randomized, phase II study of sialyl-Tn and Detox-B adjuvant with or without cyclophosphamide pretreatment for the active specific immunotherapy of breast cancer. *British Journal of Cancer* **74**: 1292-1296.
- Moniaux N, Escande F, Porchet N, Aubert JP, Batra SK. (2001) Structural organization and classification of the human mucin genes. *Frontiers in Biosciences* **6**: 1192-1206.
- Murashige T & Skoog F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Plant Physiology* **15**: 473-497.
- Murray EE, Lotzer J, Eberle M. (1989) Codon usage in plant genes. *Nucleic Acids Research* **17**: 477-498.
- Nicholls A, Sharp KA, Honig B. (1991) Protein folding and association: insights from the interfacial and thermodynamic properties of hydrocarbons. *Proteins* **11**: 281-296.
- Osinaga E, Pancino G, Beuzelin M, Babino A, Rodriguez D, Robello C, Tiscornia A, Phillips E, Bourguignat A, Roseto A. (1992) Detection of a soluble antigen

- defined by monoclonal antibody 83D4 in serous effusions associated with breast carcinoma. *Cancer* **69**(7): 1746-1749.
- Osinaga E, Pancino G, Porchet N, Berois N, De Cremoux P, Mistro D, Aubert JP, Calvo F, Roseto A (1994) Analysis of a heterogeneous group of breast-carcinoma-associated glycoproteins bearing Tn determinant. *Breast Cancer Research and Treatment* **32**: 139-152.
- Osinaga E, Bay S, Tello D, Babino A, Pritsch O, Assemat K, Cantacuzene D, Nakada H, Alzari P. (2000) Analysis of the fine specificity of Tn-binding proteins using synthetic glycopeptide epitopes and a biosensor based on surface plasmon resonance spectroscopy. *FEBS Letters* **469**(1): 24- 28.
- Ottoboni LMM, Leite A, Yunes JA, Targon MLPN, de Souza Filho GA, Arruda P. (1993) Sequence analysis of 22kDa-like α -coixin genes and their comparison with homologous zein and kafirina genes reveals highly conserved protein structure and regulatory elements. *Plant Molecular Biology* **21**: 765-778.
- Owen M, Gandechea A, Cockburn B, White-lan G. (1992) Synthesis of a functional anti-phytochrome single-chain Fv protein in transgenic tobacco. *Bio/Technology* **10**: 790-794.
- Palacpac NQ, Yoshida S, Sakai H, Kimura Y, Fujiyama K, Yoshida T, Seki T. (1999) Stable expression of human β 1,4-galactosyltransferase in plant cells modifies N-linked glycosylation patterns. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **96**: 4692-4697.
- Pancino G, Osinaga E, Vorauer W, Kakouch A, Mistro D, Charpin C, Roseto A. (1990) Production of a monoclonal antibody as an immunohistochemical marker on paraffin embedded tissues using a new immunization method. *Hybridoma* **9**: 389-395.
- Pancino G, Osinaga, E, Charpin C, Mistro D, Barque JPh, Roseto A. (1991) Purification and characterization of a breast-cancer-associated glycoprotein not expressed in normal breast and identified by monoclonal antibody 83D4. *British Journal of Cancer* **63**: 390-398.
- Parizotto EA, De Lucca PC, Jungmann L, Kemper EL, da Silva AC, Leite A. (2000) Plantas como biorreatores. *Biotechnologia Ciência e Desenvolvimento* **17**: 12-17.
- Peeters K, De Wilde Chris, De Jaeger G, Angenon G, Deepicker A. (2001) Production of antibodies and antibody fragments in plants. *Vaccine* **19**: 2756-2761.
- Perlak FJ, Fuchs RL, Dean DF, McPherson SL, Fischhoff DA. (1991) Modification of the coding sequences enhances plant expression of insect control protein genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **88**: 3324-3328.
- Petrakou E, Murray A, Price MR. Epitope Mapping of Anti-MUC1 Mucin Protein Core Monoclonal Antibodies. (1998) *Tumor Biology* **19**(1): 21-29.
- Pittius CW, Hennighause L, Lee E, Westphal H, Nicols E, Vitale J, Gordon K. (1988) A milk protein gene promoter directs the expression of human-tissue plasminogen-activator cDNA to the mammary-gland in transgenic mice.

- Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **85**: 5874-5878.
- Pollock DP, Kutzko JP, Birck-Wilson E, Williams JL, Echelard Y, Meade HM. (1999) Transgenic milk as a method for the production of recombinant antibodies. *Journal of Immunological Methods* **231**: 147-157.
- Potrykus I. (1990) Gene transfer to plants: assesment and perspectives. *Physiologia Plantarum* **79**: 125-134.
- Ragupathi G, Howard L, Cappeloo S, Koganty RR, Qiu D, Longenecker BM, Reddish MA, Lloyd KO, Livingston PO. (1999) Vacines prepared with silayl-Tn and sialyl-Tn trimers using the 4-(4-maleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxyl hydrazide linker group result in optimal antibody titers against ovine submaxillary mucin and sialyl-Tn positive tumor cells. *Cancer Immunology Immunotherapy* **48**: 1-8.
- Ratner M. (1989) Protein expression in yeast. *Bio/Technology* **15**: 141-146.
- Rayon C, Lerouge P, Faye L. (1998) The protein N-glycosylation in plants. *Journal of Experimental Botany* **49**: 1463-1472.
- Reiter Y, Brinkmann U, Webber KO, Jung SH, Lee B, Pastan I. (1994) Engineering interchain disulfide bonds into conserved framework regions of Fv fragments: improved biochemical characteristics of recombinant immunotoxins containing disulfide-stabilized Fv. *Protein Engineering* **7**: 697-704.
- Reiter Y & Pastan I. (1998) Recombinant Fv immunotoxins and Fv fragments as novel agents for cancer therapy and diagnosis. *Tibtech* **16**: 513-520.
- Romanos MA, Scorer CA, Clare JJ. (1992) Foreign gene expression in yeast a review. *Yeast* **8**: 423-488.
- Saghai-Maroofof MA, Soliman KM, Jorgensen RA, Allard RW. (1984) *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. **81(24)**: 8014-8018.
- Sakamoto H; Yonezawa S, Utsunomiya T, Tanaka S, Kim YS, Sato E. (1997) Mucin antigen expression in gastric carcinomas of young and old adults. *Human Pathology* **28**: 1056-1065.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. (1989) Molecular Cloning. A laboratory Manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA*.
- Schachter H & Williams D. (1982) Biosynthesis of mucus glycoproteins. 3-28 In: Chantler EN, Elder JB, Eltein M (eds.) Mucus in health and disease II. *Plenum Publishing Corporation, New York, USA*.
- Schein CH. (1989) Production of soluble recombinant proteins in bacteria. *Bio/Technology* **7**: 1141-1149.
- Shinghal A, Fohn M, Hakomori S. (1991) Induction of N-acetylgalactosamine-O-serine/threonine (Tn) antigen-mediated cellular immune response for active immunotherapy in mice. *Cancer Research* **51**: 1406-1411.
- Shewry PR, Nappier JA, Tatham AS. (1995) Seed storage proteins: structures and biosynthesis. *The Plant Cell* **7**: 945-956.
- Sijmons PC, Peter CS, Dekker BMM, Schrammeijer B, Verwoerd TC, Van den Eizen PJM, Hoekema A. (1990) Production of correctly processed human serum albumin in transgenic plants. *Bio/Technology* **8**: 217-221.

- Skerra A & Pluckthun A. (1988) Assembly of a functional immunoglobulin Fv fragment in *Escherichia coli*. *Science* **240**: 1038-1041.
- Smith MD. (1996) Antibody production in plants. *Biotechnology Advances* **14**(3): 267-281.
- Smith MD & Glick BR. (2000) The production of antibodies in plants: an idea whose time has come? *Biotechnology Advances* **18**: 85-89.
- Springer G. (1984) T and Tn, general carcinoma auto-antigens. *Science* **224**: 1198-1206.
- Stam M, de Bruin R, Kenter S, van der Hoorn RAL, van Blokland R, Mol JNM, Kooter JM. (1997) Post-transcriptional silencing of chalcone synthase in *Petunia* by inverted transgen repeats. *The Plant Journal* **12**: 63-82.
- Staub JM, Garcia B, Graves J, Hajdukiewicz PTJ, Hunter P, Nehra N, Paradkar V, Schlittler M, Carroll JÁ, Spatola L, Wrad D, Ye G, Russel DA. (2000) High-yield production of a human therapeutic protein in tobacco chloroplasts. *Nature Biotechnology* **18**: 333-338.
- Sullivan ML & Green PJ. (1993) Post-transcriptional regulation of nuclear-encoded genes in higher plants: the roles of nRNMA stability and translation. *Plant Molecular Biology* **23**: 1091-1104.
- Scott SE & Wilkinson MJ. (1999) Low probability of chloroplast movement from oil-seed rape (*Brassica napus*) into wild *Brassica rapa*. *Nature Biotechnology* **17**: 390-392.
- Tackaberry ES, Dudani AK, Prior F, Tocchi M, Sardana R, Altosaar I, Ganz PR. (1999) Development of biopharmaceuticals in plant expression systems: cloning, expression and immunological reactivity of human cytomegalovirus glycoprotein B (UL55) in seeds of transgenic tobacco. *Vaccine* **17**: 3020-3029.
- Tavladoraki P, Benvenuto E, Trinca S, De Martinis D, Cattaneo A, Galeffi P. (1993) Transgenic plants expressing a functional single-chain Fv antibody are specifically protected from virus attack. *Nature* **366**: 469-472.
- Taylor-Papadimitriou T, Burchell J, Miles DW, Dalziel M. (1999) MUC1 and cancer. *Biochimica et Biophysica Acta* **1455**: 301-313.
- Terasawa K, Furumoto H, Kamada M, Aono T. (1996) Expression of Tn and sialyl-Tn antigens in the neoplastic transformation of uterine cervical epithelial cells. *Cancer Research* **56**(9): 2229-2232.
- Therkildsen MH, Mandel U, Christensen M, Dabelsteen E. (1993) Simple mucin-type Tn and sialosyl-Tn carbohydrate antigens in salivary gland carcinomas. *Cancer* **72**: 1147-1154.
- Therkildsen MH, Andersen LJ, Christensen M, Hansen HS, Schiodt T, Dabelsteen E. (1998) Salivary gland carcinomas: prognostic significance of simple mucin-type carbohydrate antigens. *Oral Oncology* **34**: 44-51.
- Van den Steen P, Rudd PM, Dwek RA, Opdenakker G. (1998) Concepts and principles of O-Linked glycosylation. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* **33**(3): 151-208.
- van Dijk MA, van de Winkel (2001) Human

- antibodies as next generation therapeutics. *Current Opinion in Chemical Biology* **5**: 368-374.
- Velander WH, Lubin H, Drohan WN. (1997) Transgenic livestock as drug factories. *Scientific American* **276**: 70-74.
- Verma R, Boleti E, George AJT. (1998) Antibody engineering: Comparison of bacterial, yeast, insect and mammalian expression systems. *Journal of Immunological Methods* **216**: 165-181.
- Vitale A & Denecke J. (1999) The endoplasmic reticulum gateway of the secretory pathway. *Plant Cell* **11**: 615-628.
- von Mensdorff-Pouilly S, Snijdewint FG, Verstraeten AA, Verheijen RH, Kenemans P. (2000) Human MUC1 mucin: a multifaceted glycoprotein. *International Journal of Biological Markers* **15(4)**: 343-356.
- Yacyshyn MB, Poppema S, Berg A, MacLean GD, Reddish MA, Meikle A, Longenecker BM. (1995) CD69+ and HLA-DR+ activation antigens on peripheral blood lymphocyte populations in metastatic breast and ovarian cancer patients. Correlations with survival following active specific immunotherapy. *International Journal of Cancer* **61**: 470-474.
- Witcher DR, Hood EE, Peterson D, Bailey M, Bond D, Kusnadi A, Evangelista R, Nikolov Z, Wooge C, Mehig R, Kappe W, Register J, Howard JA. (1998) Commercial production of β -glucuronidase (GUS): a model system for the production of protein in plants. *Molecular Breeding* **4**: 301-312.
- Zhong G-Y, Peterson D, Delaney DE, Bailey M, Witcher DR, Register J, Bond D, Li C-P, Marshall L, Kulisek E, Ritland D, Meyer T, Hood EE, Howard JA. (1999) Commercial production of aprotinin in transgenic maize seeds. *Molecular Breeding* **5**: 345-356.