

**UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE  
CAMPINAS**

*doutorado*

**BC/53539**

**IB/81941**

**INSTITUTO DE BIOLOGIA**

---

**PRODUÇÃO DOS HORMÔNIOS RECOMBINANTES  
DE CRESCIMENTO E PRÓ-INSULINA HUMANOS  
EM PLANTAS TRANSGÊNICAS DE MILHO**

**Paulo Cezar De Lucca**

Este exemplar corresponde à redação final  
da tese defendida pelo(a) candidato (a)  
*Paulo Cezar de Lucca*  
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Instituto de  
Biologia da UNICAMP, para a  
Obtenção do título de Doutor em  
Genética e Biologia Molecular na  
Área de Genética Vegetal e  
Melhoramento

*Adilson Leite*  
PP/ Orientador: Prof. Dr. Adilson Leite

2003

1

UNIDADE	IB81941
Nº CHAMADA	UNICAMP
	D388p
V	EX
TOMBO BCI	53539
PROC.	124103
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	30/04/03
Nº CPD	

II

CM00163378-0

Publ. 294010

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

D388p

~~L962p~~

**De Lucca, Paulo Cezar**

Produção dos hormônios recombinantes de crescimento e pró-insulina humanos em plantas transgênicas de milho/Paulo Cezar De Lucca. -- Campinas, SP:[s.n.], 2003.

Orientador: Adilson Leite

Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas.

Instituto de Biologia.

1.Hormônios. 2.Insulina. I. Leite, Adilson. II.Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

BANCA EXAMINADORA:



---

Prof. Dr. PAULO ARRUDA



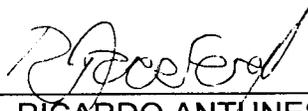
---

Prof. Dr. WAN DE GODOY MAIA



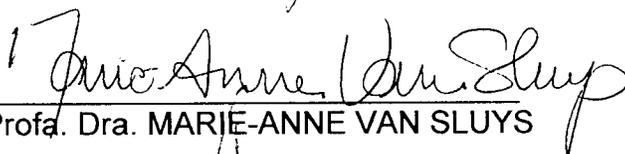
---

Prof. Dr. GONÇALO AMARANTE GUIMARÃES PEREIRA



---

Prof. Dr. RICARDO ANTUNES DE AZEVEDO



---

Profa. Dra. MARIE-ANNE VAN SLUYS



---

Prof. Dr. MICHEL G. A. VINCENTZ



---

Prof. Dr. CELSO EDUARDO BENEDETTI

*Esta tese é dedicada aos meus pais e a meus irmãos*

*A minha mãezinha Dona Chiquinha. Em sua dimensão conheces meu freqüente chorar de felicidade por ter vindo de seu ventre e de saudade. Agora saibas também que seu mucorongo venceu. Por você mamãe, somente por você e pelo Papai.*

*Ao meu Papai, que é o meu ideal de formação e caráter. Minha única missão na vida é querer ser exatamente como você. Seguirei sempre por seu caminho, Pai, atrás do trabalho e da benevolência. Sou completamente apaixonado por você...*

*Te Amo, Te Amo.....Te Amo.*

*A meus irmãos devo tudo:*

*Minha sobrevivência, todo o amor, carinho e cuidados maternos/paternos.*

## **Agradecimentos**

Ao povo brasileiro pelo sustento integral de minha formação.

Ao CNPq pelos sete anos de bolsa de iniciação científica e de mestrado e à FAPESP pelo grande apoio no doutorado.

Aos professores e funcionários da Universidade Federal de Santa Catarina e da Universidade Estadual de Campinas, em especial às tias dos bandejões.

Aos companheiros (e viva o Presidente Lula) do Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética/CBMEG, em especial ao Sr. Chico por ter ensinado a cultivar milho e às meninas da secretaria, Tânia, Fabiana, Andressa e Sandra. Vossa paciência com o cidadão rebelde, briguento e chato foi/é infinita.

Aos amigos do Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo pelos ensinamentos e amizade. Em especial ao Dr. Raymundo Diniz, Dr. Anderson Imolesi, Dra. Mariana, Dr. Carlos Henrique Carvalho, Dra. Andréa Carneiro e ao Dr. Newton Carneiro.

À Dra. Ana Cristina Muller Chagas do Serviço de Apoio ao estudante da Unicamp por ter me mostrado durante um ano que a vida é bem legal.

Às queridas comadres pós-doc Dra. Isabel Gerhardt e Dra. Alba Chiesse pelos conselhos e ajudas recebidos durante toda minha tese. Ao pós-doc Dr. Jiri também agradeço ao inglês. Às técnicas Daniela, Fabiana e Rafael, ao marido (Sr. Wilson), aos Doc. Mário Paniago, Letícia Jungmann e Paulo Schlögl pela grande ajuda e amizade.

Aos amigos do “gemoná” e do Lab. Plantas 2: Dr. Almir, Dra. Aninha, Dra. Juliana, Dra. Thaís, Dra. Natalia, Dr. Fabio, Dr. Vicenti, Dra. Suzan, Dra. Celli, Dra. Adriana, Dra. Luciana Dra. Carol, Dr. Paulino e Dr. Márcio, e aos velhos amigos Dr. Andres, Dr. André, Dr. Felipe, Dr. Germano, Dr. Fabio Papes, , Dra. Eneida e a Dra. Adriana Capella.

Aos amigos de bancada...ah, esses amigos: Dr. Rafael Cantú, razão de tudo... (UFSC/FPOLIS), Dr. Tiago Ipatinga (So man, so now....é ou não é!), Dr. Marcos Brandalise (meu amorzinho), Dr. Rodrigo Siloto (sujeito brabo e querido), Dr. Eduardo Kiyota (esse muito mais que um amigo) e ao Dr. Arnaldo da Silva. Vocês me conhecem muito mais que deviam....Thank You a Lot,

Ao Dr. Edson Kemper, amigo fiel. Cidadão grande responsável por minha carreira científica, iniciada ao seu lado em 1991. Por longos dez anos de sua enorme cabeça muitos ensinamentos vieram. Ao Prof. Dr. Miguel Guerra e ao Prof. Dr. Rubens Onofre Nodori pelos cinco anos de orientação em minha iniciação científica (UFSC/SC). Ao Dr. Éberson Calvo, meu primeiro orientador em minha especialização, pelos inúmeros ensinamentos e pela amizade.

Aos professores envolvidos em minha tese: Prof. Dr. Paulo Arruda, Profa. Dra. Anete Pereira de Souza, Prof. Dr. Ivan de Godoy Maia, Profa. Dra. Marie-Anne Van Sluys, Prof. Dr. Gonçalo Amarante Guimarães Pereira, Prof. Dr. Ricardo Antunes de Azevedo, Prof. Dr. Michel G. A. Vincentz, Prof. Dr. Marcelo Menossi, Dr. Celso Eduardo Benedetti, Dra. Claudia Guimarães e ao Dr. Edson Kemper. Muito obrigado pelos ensinamentos e atenção concedida.

A minhas alunas de iniciação científica: Dra. Flávia Furquim, Dra. Camila Barbosa, Dra. Camila Abbehausen e Dra. Camilla Agostinho. A experiência da orientação foi tão contagiante como minha tese. Muito obrigado por vossa paciência e vontade de aprender e trabalhar. Aos alunos do curso de férias Leonardo e Sidney pelo respeito e enquadramento à hierarquia Cebemeguiana.

#### ***Agradecimentos especiais***

***À ex-aluna e atual minha orientadora, Dra. Sylvia Morais. Professora, não posso agradecer sua majoritária participação na minha tese muito claramente. Mas valeu.....De coração. Você é a Miss Simpatia do Laboratório de Plantas e uma grande pesquisadora.***

***Ao grande homem chamado Prof. Dr. Adilson Leite. Cidadão único neste mundo, apaixonado pela ciência e por seus alunos. Agradeço sua confiança e amizade. Também aos trilhares de petelecos e outras xingos que recebi durante uma ardente relação diária por maravilhosos seis anos. Saiba que preparastes mais uma serpente voraz pela ciência...Serpente que te ama demais da conta. Que Deus lhe dê um novo laboratório para sua suprema, incansável e inquieta essência. A sua amável esposa Débora agradeço sua simpatia, carinho e consolos.***

***A minha família, pela qual vivo e trabalho. Por mais que eu tente, jamais merecerei todo carinho e amor que recebo. Meu DEUS todo poderoso, muito obrigado pelos meus nove irmãos e quinze sobrinhos. Em especial as minhas cinco irmãs/mães que tanto me cuidam e me amam. A meus irmãos agradeço a proteção e aos ensinamentos. A minha madrastra querida mãe Dina agradeço o afeto, as cucas de banana, as orações, ao carinho e por ter me dado a irmãzinha mais linda desse mundo, Bruninha De Lucca.***

***Eu devia estar sorrindo e orgulhoso  
Por ter finalmente vencido na vida,  
Mas eu acho isto uma grande piada  
E um tanto quanto perigosa.  
Eu devia estar contente  
Por ter conseguido o doutorado que eu tanto quis,  
Mas confesso abestalhado  
Que eu estou decepcionado.  
Porque foi tão fácil conseguir,  
E agora eu me pergunto, e daí?  
E tenho uma porção de outras coisas grandes  
Pra conquistar e eu não posso ficar aqui parado!....  
.....ah, mas que sujeito chato sou eu  
Que não acha nada engraçado,  
Macaco, Faustão, Rede Globo, Gugu, carro, FHC, ACM, jornal e tobogã,  
Eu acho tudo isso um **SACO!!!!!!!*****

*(adaptado de Ouro de Tolo, Raul Seixas)*

<b>ÍNDICE</b>	<i>página</i>
Abstract	1
Resumo	2
1. Introdução	
1.1. Cultura de tecidos e transformação de plantas	3
1.2. O uso de plantas transgênicas como biorreatores	5
1.3. Vantagens da utilização de plantas na produção de proteínas heterólogas	6
1.4. Estratégias para produção de proteínas heterólogas em plantas	8
1.5. A escolha do endosperma de milho para produção de proteínas heterólogas	9
1.6. Construção de um cassete de expressão de endosperma de cereais	13
1.7. Os hormônios protéicos do crescimento e insulina humano	15
2. Objetivos	21
3. Material e Métodos	
3.1. Material Vegetal	22
3.2. Plasmídios empregados	22
3.3. Transformação via Agrobactéria	24
3.4. Transformação via bombardeamento	26
3.5. Seleção	30
3.6. Germinação de embriões somáticos	31
3.8. Análise das plantas transformadas	32
3.9. Transferência do transgene para outros genótipos	37
3.10. Purificação da pró-insulina	37
4. Resultados	
4.1. Cultura de tecido e regeneração de plantas	43
4.2. Transformação via agrobactéria	44
4.3. Transformação via bombardeamento	47
4.4. Hormônio do crescimento	51
4.6. Pró-Insulina	52
4.7. Ensaios de bombardeamento com hGH em 2002	67
4.8 Análise do cruzamento QPM X eventos transgênicos	70
5. Discussão	75
6. Conclusão	89
7. Bibliografia	90

### Abstract

Based on previous research performed with genes encoding cereal seeds storage proteins (prolamins) an expression cassette for the production of heterologous proteins in cereal seeds was developed. This cassette contains a promoter region isolated from sorghum prolamin gene and a sequence encoding a signal peptide isolated from *Coix lacryma jobi* prolamin. The main purpose of this work was to produce human growth hormone (hGH) and human pro-insulin in transgenic maize using this expression cassette. The coding regions for these human hormones were introduced in this cassette and the constructions were used to transform maize embryos through *Agrobacterium* mediated and biolistic methods. Transgenic plants were selected using a phosphinothricin resistance marker. Southern blot analyses of the transgenic plants showed that some copies of the genes coding for either hGH or pro-insulin were incorporated in the maize genome. Northern blot analyses showed that the transcription of these genes is more intense in the period from 20 to 35 days after pollination. The production of proteins was monitored through western blot analyses. The recombinant proteins accumulated at a rate of approximately 2% of the total soluble seed protein and were targeted to the inclusion bodies, which are the organelles specialized in protein storage. The recombinant proteins were purified from maize seeds using ethanol differential extraction, followed by reversed phase liquid chromatography and gel filtration. Mass spectrometry of purified recombinant pro-insulin revealed that this protein was correctly processed in maize seed. We conclude that this cassette is efficient to produce heterologous proteins at relatively high levels in maize seeds representing a promising system for other proteins with pharmaceutical interest.

## Resumo

Trabalhos anteriores realizados no Laboratório de Plantas do CBMEG/UNICAMP resultaram no desenvolvimento de um cassete de expressão de proteínas heterólogas específico para sementes de cereais. Na construção desse cassete foi utilizado um promotor de proteínas de reserva isolado de sorgo e um peptídeo sinal de *Coix*. Este trabalho teve o objetivo de estabelecer biorreatores dos hormônios humano de crescimento (hGH) e insulina em sementes de milho transgênico.

As regiões codantes do hGH e da pró-insulina humana foram introduzidas no cassete de expressão, e as construções foram empregadas para transformar embriões de milho via bombardeamento de micropartículas e agrobactéria, empregando a fosfinotricina (PPT) como agente seletivo. Análises de Southern blot demonstraram a incorporação de algumas cópias dos transgenes hGH e pró-insulina no genoma de plantas transgênicas de milho. Northern blots mostraram que a expressão dos transgenes obedeceu ao modelo de expressão temporal das prolaminas.

A produção dos hormônios foi monitorada por meio de análises de western blot, que indicaram um nível de produção em relação à proteína total solúvel de 2% de pró-insulina e de 1% de hGH. A expressão dos transgenes ocorreu somente no endosperma das sementes, e os hormônios foram endereçados para armazenamento em corpúsculos protéicos. As proteínas recombinantes foram extraídas em diferentes tampões alcoólicos e purificadas em colunas de cromatografia de fase reversa e de filtração em gel. Adicionalmente, análises de espectrometria de massa da pró-insulina recombinante corroboraram com o peso molecular de 9,377 kDa da proteína nativa, mostrando que a proteína foi corretamente processada nas células do endosperma de milho transgênico.

Até onde foram estudados, os hormônios produzidos possuem características iguais a dos hormônios nativos do homem. Concluímos, portanto, que o cassete pode ser eficiente também para modular a produção em altos níveis de outras proteínas heterólogas com interesse farmacêutico e industrial em sementes de milho.

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Cultura de tecidos e transformação de plantas

A morfogênese de plantas *in vitro* tem como base o princípio de que as células vegetais podem ser cultivadas axenicamente e são totipotentes, ocorrendo a partir de organogênese ou de embriogênese somática (ES). No primeiro modelo, a regeneração de plantas inteiras ocorre através da neoformação de gemas apicais (estrutura monopolar) e posterior indução de raízes. Esta reorganização ocorre através de grupos celulares meristemáticos presentes no tecido original (Handro e Floh, 1990). O processo de ES consiste na formação adventícia de múltiplos embriões com eixo vascular próprio (estrutura bipolar), através de um processo similar à embriogênese zigótica (Sharp *et al.*, 1980). Esses dois modelos diferem também pela forma geral de indução: a ES responde ao estímulo de auxinas fortes, enquanto que a organogênese é modulada por citocininas (Guerra *et al.*, 1999).

Sistemas proliferativos de organogênese e ES estabelecem culturas cíclicas que permitem a obtenção contínua de tecidos para ensaios de transformação genética originários de uma mesma fonte. Estes dois modelos diferem quanto à origem dos novos tecidos: sempre multicelular e sub-epidérmica na organogênese, unicelular ou de poucas células, e superficial na ES. Para a transformação genética, a ES é um sistema mais atrativo por diminuir a ocorrência de plantas quiméricas (organismos multicelulares de origem não clonal) (Liu *et al.*, 1992; Sato *et al.*, 1993) e por ser mais fácil introduzir DNA em camadas celulares superficiais (Kemper *et al.*, 1996).

A descoberta da totipotência celular, o desenvolvimento de técnicas de cultura de tecidos vegetais, e por último, o advento da engenharia genética, permitiram a obtenção das primeiras plantas transgênicas no início da década de 80 (Fraley, *et al.*, 1983). Esse complexo processo ocorre a partir da introdução, integração e expressão de DNA em célula(s) potencialmente precursora(s) de um órgão ou de um embrião. Convencionalmente esta introdução tem sido feita por dois métodos: 1) por infecção com agrobactéria e 2) por bombardeamento de micropartículas. A transformação mediada por agrobactéria é fundamentada na capacidade desta bactéria de solo de transferir parte do DNA do seu plasmídeo Ti (*Tumor Inducing*) para o genoma de células de plantas hospedeiras (Hoekema *et al.*, 1983; Rogers *et al.*, 1986). Entretanto, uma grande variedade de plantas, especialmente as monocotiledôneas, apresenta recalcitrância à

agroinfecção, provavelmente por não serem hospedeiras naturais de agrobactérias (Klein *et al.*, 1987).

A transformação via bombardeamento de partículas foi proposta como um método de transfecção sem vetores biológicos intermediários, consistindo no disparo de partículas de ouro e/ou tungstênio contendo DNA adsorvido ou outras substâncias contra tecidos vegetais alvos da transformação (Sanford, 1990). Esse método, também referido como biolístico, foi inicialmente idealizado por Klein *et al.* (1987) ao acelerar DNA e RNA contra a epiderme de cebola e verificar posterior expressão de genes repórteres. Tal metodologia geralmente resulta na integração de múltiplas cópias do(s) gene(s) de interesse, podendo determinar o silenciamento do transgene ou ainda uma expressão anômala (Finnegan e McElroy, 1994; Flavell, 1994).

Quando comparada com o método biolístico, a transformação via agrobactéria normalmente produz plantas com maior estabilidade e herdabilidade da expressão da característica incorporada, provavelmente por mimetizar um processo de transfecção de ocorrência natural, onde acreditasse ocorrer a transferência de poucas cópias do T-DNA em sítios específicos na cromatina (Potrykus, 1991; Zupan e Zambryski, 1995). No entanto, o bombardeamento é genótipo-independente, não necessitando técnicas sofisticadas de cultura de tecidos. Para as espécies recalcitrantes à agroinfecção e para estudos genéticos e bioquímicos por meio de expressão transiente, esta técnica continua sendo a mais eficiente.

As primeiras plantas transgênicas de milho foram obtidas a partir do bombardeamento de culturas proliferativas em suspensão (Fromm *et al.*, 1990; Gondom-Kamm *et al.*, 1990; D'Halluin *et al.*, 1992) e de embriões zigóticos imaturos (Koziel *et al.*, 1993). Atualmente o tecido mais empregado na transformação de milho são culturas somáticas de calos embriogênicos geradas de embriões zigóticos imaturos. No entanto, a partir das transformações obtidas em arroz via agrobactéria com o emprego de cepas de bactérias mais virulentas com os plasmídeos super-binários (Hiei *et al.*, 1994; Aldemita *et al.*, 1996), esta estratégia voltou a ser estudada em cereais.

Em 1996, Ishida *et al.* descreveram o primeiro trabalho de transformação de milho via agrobactéria convincente, utilizando o gene repórter *uidA* que codifica a enzima  $\beta$ -glucoronidase (GUS). Genes repórteres são empregados principalmente para analisar a atividade de promotores e monitorar a eficiência de ensaios de transformação. O gene *uidA* (Jeferson *et al.*, 1986) é repórter mais empregado por sua simplicidade e

versatilidade de monitoramento. Estes autores relataram frequências de até 30% de transformação em tecidos epidérmicos do escutelo de embriões imaturos de milho. As células deste tecido em milho apresentam alta taxa de formação de calos embriogênicos *in vitro*. No entanto, poucos laboratórios têm descrito trabalhos com agrotransformação de cereais, e a metodologia mais empregada na transformação em milho ainda é o bombardeamento.

## 1.2. O uso de plantas transgênicas como biorreatores

O desenvolvimento de plantas transgênicas com novas características representa uma das principais práticas da tecnologia do DNA recombinante. Existem basicamente três classes dessas plantas. A primeira resume as plantas transformadas com um gene que confere uma propriedade agrônômica melhorada, como resistência a um herbicida ou a insetos. A segunda classe é a mais complexa, resultado da integração de dois ou mais genes que promovem a melhoria da qualidade do produto por alterações em vias metabólicas, como descreveram Ye *et al* (2000) com o “arroz dourado”, que possui uma alteração na biossíntese da pró-vitamina A. Por último são desenvolvidas plantas transgênicas para produção de proteínas heterólogas de aplicação industrial ou farmacêutica, onde se enquadra este trabalho de tese. Neste caso ocorre a integração de um gene seletivo, de um gene repórter e de um cassete de expressão especialmente desenvolvido para modular a expressão de um produto de interesse empregando a maquinaria de produção protéica da planta.

Dentre estas aplicações das plantas transgênicas, a produção de proteínas heterólogas é a que apresenta maior espectro de emprego. Atualmente são desenvolvidos processos de produção de enzimas e outras proteínas com aplicação industrial, e de interesse farmacêutico como, por exemplo, vacinas, anticorpos, e hormônios protéicos (Goddijn e Penn, 1995; Hood e Jilka, 1999; Parizotto *et al.*, 2001, Peeters *et al.*, 2001; Larrick e Thomas, 2001). As plantas transgênicas também estão sendo utilizadas para o desenvolvimento de alimentos enriquecidos com óleos insaturados (Ye *et al.*, 2000). Alterações em vias metabólicas dos vegetais também podem ser utilizadas na produção de compostos orgânicos de baixo peso molecular ou de polímeros (Nawrath *et al.*, 1994).

Várias formas de produção de proteínas heterólogas já foram descritas, empregando diversos modelos em vários tipos de organismos. Alguns trabalhos até são curiosos, como Meade e Ziomek (1998), que sugerem a produção do hGH em urina de camundongos. Staub *et al.* (2000) descrevem um rendimento de até 7% das proteínas solúveis na produção de hGH em cloroplastos de tabaco. Entretanto, o hormônio produzido continha um resíduo de prolina numa posição em que deveria ser uma fenilalanina. Em mamíferos uma interessante estratégia vem sendo estudada a partir da produção e secreção de anticorpos no leite, principalmente de bovinos, caprinos e ovinos (Pollock, *et al.*, 1999). O rendimento desse modelo foi, em caprinos, de 5 g da proteína recombinante por 800 L de leite (produção anual de um animal elite). Porém para ser economicamente viável, esse sistema necessita de vários fatores adicionais quando comparado à produção, extração e purificação de proteínas a partir de sementes de plantas. No entanto, para a produção de vacinas orais esse modelo apresenta interessantes propriedades.

### **1.3. Vantagens da utilização de plantas na produção de proteínas heterólogas**

A agricultura é o sistema mais econômico para a produção de biomassa em larga escala. Essa vantagem é devida à capacidade das plantas de aproveitarem diretamente a energia solar. Assim sendo, a agricultura é o método mais barato para a produção de proteínas em larga escala. Esta vantagem é aplicada também para a produção de proteínas heterólogas (também descritas como proteínas recombinantes).

A produção de proteínas heterólogas em plantas apresenta ainda outras vantagens em relação aos sistemas procariotos, fermentação microbiana, cultura de células animais e animais transgênicos. Dentre estas vantagens, podemos citar:

- a) As plantas, ao contrário dos organismos procariotos, realizam modificações pós-traducionais de proteínas eucarióticas que, na grande maioria dos casos, são essenciais para a atividade bioquímica destas proteínas (Hood e Jilka, 1999).
- b) A produção de proteínas de interesse farmacêutico em plantas apresenta riscos muito baixos ou desconhecidos de contaminação por agentes fitopatogênicos aos humanos.
- c) Os produtos de origem vegetal podem ter maior simpatia do consumidor em relação a produtos oriundos de microorganismos, culturas de células transformadas ou de animais

transgênicos. A aceitação das plantas transgênicas como biorreatores de fármacos ainda não foi testada e nosso trabalho poderá servir também para esse novo estudo.

d) O mais importante: as plantas apresentam órgãos especializados destinados ao armazenamento, como tubérculos, raízes especializadas e sementes. Esses órgãos podem ser utilizados para acumular altos níveis de proteínas recombinantes (Leite *et al.*, 2000). As sementes em especial são adaptadas para estocar grandes quantidades de proteína por longos períodos de tempo com níveis reduzidos de degradação à temperatura ambiente, o que torna a produção de proteínas heterólogas um sistema operacional menos complexo e mais econômico, com custos reduzidos de armazenamento (Jilka *et al.*, 1999).

Apesar dessas vantagens, poucos sistemas de produção de proteínas heterólogas foram desenvolvidos. A clonagem de promotores de proteínas de reserva não era uma tarefa fácil assim como a obtenção de um peptídeo de endereçamento das proteínas para corpúsculos de armazenamento. No entanto, com o volume crescente de informações genômicas principalmente dos cereais, é de se prever que o trabalho apresentado nesta tese possua uma pequena vantagem de tempo em relação a trabalhos similares desenvolvidos em diversos laboratórios de engenharia genética do mundo.

Como desvantagem, o milho em especial por ser uma planta alógama, necessita de extensivos cuidados no cultivo para não ocorrer à disseminação de pólen transgênico. Não existe nenhum estudo que indique exatamente a magnitude dessa disseminação. Um rigoroso controle individual da produção de pólen e da fertilização de cada planta dentro de casas de vegetação fechadas, tipo de manejo conduzido no CBMEG, elimina este problema. Porém o cultivo de plantas transgênicas em grandes áreas abertas teria que ser realizado dentro de um cinturão de alguns quilômetros livre de plantações de milho selvagem.

Os primeiros três produtos comerciais obtidos de semente de milho transgênico foram a avidina, que é uma proteína encontrada na clara de ovo, a hidrolase  $\beta$ -glucuronidase (GUS) (Hood *et al.*, 1999) e a aprotina (Zhong *et al.*, 1999), que é um inibidor de protease. Todas essas proteínas heterólogas são comercializadas pela Sigma® Chemical Co, sendo empregadas em diagnósticos laboratoriais e na indústria farmacêutica. Essas proteínas divergem quanto a suas características físicas e químicas básicas e tipo de organismo de origem: GUS é uma proteína de bactéria, a avidina é uma glicoproteína de aves e a aprotina é um inibidor de proteases de bovinos. Esses trabalhos

mostram um pouco da dinâmica e da versatilidade das sementes de milho na produção de proteínas heterólogas. Sobretudo porque em todos esses trabalhos foi empregado um promotor constitutivo isolado do próprio milho (ubiquitina), que concentrou a produção das proteínas aproximadamente em 90% na região do embrião das sementes.

#### **1.4. Estratégias para produção de proteínas heterólogas em plantas**

Existem basicamente duas estratégias para produção de proteínas heterólogas em plantas. Uma envolve integração do gene de interesse no genoma da planta enquanto a outra é transitória, não havendo integração permanente do transgene ao DNA da planta. A estratégia de expressão transitória envolve o uso de um fitovírus de RNA fita-simples, a partir da inserção do transgene no genoma do vírus, normalmente fusionado a uma proteína da capa viral. Após a infecção da planta hospedeira ocorre a replicação do genoma viral e a expressão de suas proteínas em conjunto com a proteína heteróloga, que é recuperada a partir de extratos de folhas da planta infectada. As partículas virais podem ainda funcionar como veículo de antígenos expressos na capa viral na produção de vacinas orais e nasais (Beachy *et al.*, 1996).

A outra estratégia consiste na introdução do gene de interesse no genoma da planta por meio de técnicas de transformação. Essa estratégia produz, portanto plantas transgênicas que são capazes de expressar permanentemente e transferir o gene inserido em seu genoma a sua progênie. A estratégia de expressão transiente mediada por vírus em geral determina a expressão em folhas enquanto a transformação permanente apresenta maior versatilidade, permitindo um direcionamento da expressão heteróloga para um determinado órgão ou tecido da planta, ou até mesmo que a expressão ocorra apenas por um período determinado. Essas alternativas estão relacionadas com a escolha da seqüência promotora que acompanhará o gene de interesse.

Enquanto a tecido-especificidade é determinada por promotores específicos, o direcionamento para compartimentos intracelulares pode ser feito através da inclusão de peptídeos-sinais na proteína recombinante. Esses peptídeos-sinais são encontrados em geral precedendo a seqüência de aminoácidos de proteínas que são naturalmente processadas e secretadas pelo retículo endoplasmático e aparelho de Golgi de células eucarióticas. Esses sistemas de endereçamento celular podem ser explorados em

sistemas de produção capazes de simplificar o armazenamento do material vegetal e a posterior extração e purificação da proteína recombinante.

Na maioria dos casos, o gene de interesse é incluído em um cassete de expressão onde se encontra precedido por um promotor que pode ser constitutivo ou tecido-específico seguido por um peptídeo-sinal e um sítio de poliadenilação. O promotor é responsável pela ativação ou inibição da expressão, sendo capaz de responder a diversos estímulos, controlando o nível de expressão do gene em função da natureza do tecido e seu estágio de desenvolvimento. Uma boa escolha de promotor é, portanto, determinante para o sucesso da utilização de plantas na produção de proteínas heterólogas.

### **1.5. A escolha do endosperma de milho para produção de proteínas heterólogas**

Os cereais são as plantas cultivadas mais importantes em relação à área plantada, produção e contribuição para alimentação animal e humana. Em 2002, cerca de 663 milhões de hectares foram cultivados com cereais, levando à produção mundial de pouco mais de dois bilhões de toneladas de grãos. Três culturas contribuíram com 86% desse total: milho (602 milhões de toneladas), arroz (579 milhões de toneladas) e trigo (568 milhões de toneladas) (FAO, 2002). O grande sucesso no cultivo de cereais é devido principalmente a sua alta produtividade, facilidade de colheita e à capacidade de adaptação dos cultivares a diferentes condições ambientais (Lazzeri e Shewry, 1993).

Sem dúvida, apesar de caules e folhas serem utilizados para silagem, o principal produto obtido do cultivo de cereais é o grão, que é uma cariopse, tipo de fruto em que a parede da semente (testa) encontra-se fundida com a parede do fruto (pericarpo) (Lazzeri e Shewry, 1993). A semente é composta de dois órgãos: o endosperma e o embrião (Figura 1.1). Esses órgãos são produzidos por meio de um processo de duas fertilizações, mecanismo exclusivo de plantas superiores (Russell, 1992). A fusão de um núcleo espermático com a célula-ovo origina o zigoto que resulta no embrião. Ao mesmo tempo, uma segunda célula espermática funde-se com uma célula binucleada central que resulta na origem do endosperma de natureza triploide. Subseqüentemente, esse núcleo sofre múltiplas divisões, resultando na formação de um sincício contendo centenas de núcleos (Randolf, 1936, Vijayaraghavan e Prabhakar, 1984).

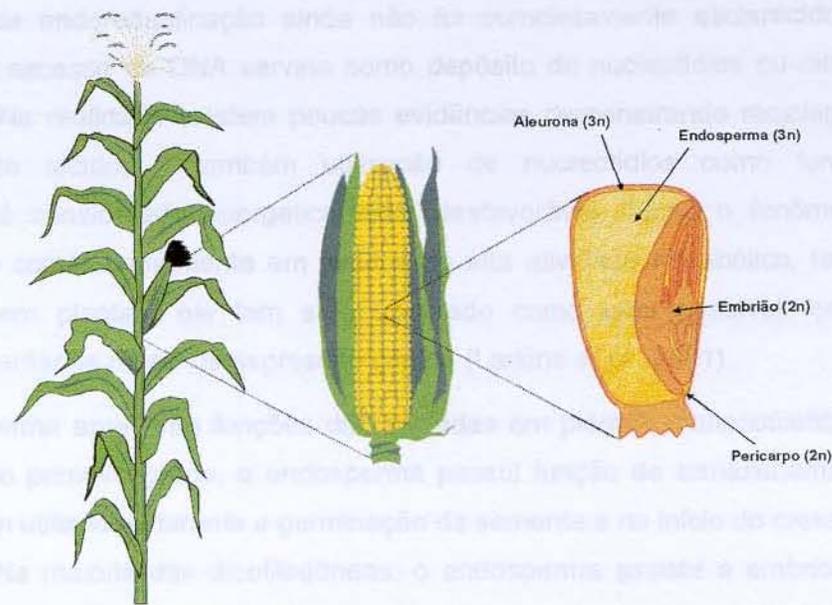


Figura 1.1: Representação esquemática dos principais órgãos que compõem a semente madura de milho.

As paredes celulares começam a formar-se no terceiro dia após polinização (DAP), completando-se no quinto DAP, quando o tecido torna-se completamente celularizado e uninucleado. O período de crescimento mais intenso do endosperma ocorre de 8 a 13 DAP, com a ocorrência simultânea de divisões celulares e aumento de volume das células. Com aproximadamente 12 DAP, o endosperma preenche a região central da semente, e neste estágio a camada externa de células, a aleurona, encontra-se completamente diferenciada. As divisões celulares cessam na região central do endosperma, e os núcleos iniciam um processo de endoreduplicação (duplicação cromossômica sem mitose), que eleva substancialmente o conteúdo de DNA (Randolf, 1936). No milho, entre 10 a 20 DAP o conteúdo de DNA aumenta de três vezes o conteúdo do genoma haplóide para até 600 vezes (Lopes e Larkins, 1993; Muller *et al*, 1995). Como o cruzamento conduzido de plantas de milho facilita muito a obtenção de inúmeros tipos de híbridos, existem materiais que apresentam um modelo de desenvolvimento que difere temporal e espacialmente do padrão apresentado, possuindo também diferente padrão de expressão protéica e composição de semente.

O papel da endoreduplicação ainda não foi completamente esclarecido. Uma hipótese é que o excesso de DNA serviria como depósito de nucleotídeos ou nitrogênio para o embrião. Na realidade existem poucas evidências demonstrando reciclagem de nucleotídeos neste tecido, e também utilização de nucleotídeos como forma de armazenamento é considerado energeticamente desfavorável. Como o fenômeno da endoreduplicação ocorre comumente em tecidos de alta atividade metabólica, tanto em animais quanto em plantas, ele tem sido apontado como uma possível forma de rapidamente aumentar os níveis de expressão gênica (Larkins *et al.*, 2001).

O endosperma apresenta funções diferenciadas em plantas monocotiledôneas e dicotiledôneas. No primeiro grupo, o endosperma possui função de armazenamento de nutrientes a serem utilizados durante a germinação da semente e no início do crescimento da nova planta. Na maioria das dicotiledôneas, o endosperma assiste a embriogênese nutrindo o embrião apenas nos estágios iniciais, sendo completamente assimilado durante o processo. Os cotilédones, folhas formadas durante a embriogênese, assumem a função de tecido de reserva de nutrientes a serem utilizados durante o processo de germinação (Lopes e Larkins, 1993).

No milho, o endosperma constitui a principal fonte de nutrientes para a germinação do embrião. A maioria do carbono utilizado nos estágios iniciais do desenvolvimento deriva-se de amido e de proteínas de reserva. O conjunto destes produtos de reserva compõe aproximadamente 90% do peso seco do endosperma maduro. Na semente madura, o endosperma é diferenciado em dois tecidos: o endosperma amiláceo e a camada de aleurona. As células da região central do endosperma acumulam amido de forma abundante, e as regiões periféricas são mais ricas em proteínas de reserva. No final da maturação da semente, endosperma amiláceo transforma-se num tecido mole e quebradiço, enquanto que a região protéica torna-se dura e translúcida (Shewry e Casey, 1999).

A camada celular mais externa do endosperma, a aleurona, é conservada durante os processos de maturação e dissecação da semente. É um tecido formado por células morfológica e funcionalmente distintas das outras células do endosperma. Quando as sementes começam a germinar, essas células são estimuladas por ácido giberélico produzido pelo embrião, e iniciam a produção de enzimas hidrolíticas. Essas enzimas catalisam a degradação das macromoléculas de reserva: amido, proteínas e DNA acumulados durante o desenvolvimento do endosperma.

O completo desenvolvimento da semente de milho parece depender de interações que ocorrem entre o endosperma e o embrião (Lopes e Larkins, 1993, Bommert e Werr, 2001). Assim como na grande maioria dos vegetais, o sucesso do desenvolvimento e da diferenciação do endosperma requer a regulação coordenada de vários conjuntos de genes envolvidos no controle da divisão celular, do metabolismo de aminoácidos e da síntese de amido, proteínas e lipídios.

As proteínas totais da semente seca de milho representam aproximadamente 10% do peso do grão, correspondendo a 20% da massa do embrião e a 8% do endosperma (Glover e Mertz, 1987). As prolaminas são as proteínas de reserva dos cereais solúveis em álcool, representando cerca de 60% das proteínas do endosperma. Essas proteínas, denominadas em milho (*Zea mays*) de zeínas, estão distribuídas em quatro diferentes classes de acordo com o nível de solubilidade em álcool, sendo também transcritas por um número bem variado de genes. As alfa-zeínas são codificadas por famílias multigênicas (entre 70 e 100 genes), enquanto que as beta-, gama- e delta-zeínas são codificadas por poucos genes, geralmente um ou dois (Coleman e Larkins, 1999).

A produção e o acúmulo de zeínas e de amido inicia-se de 10 a 14 DAP nas células da camada sub-aleurônica. O acúmulo de proteínas e amido ocorre segundo um gradiente crescente da região externa para o interior, coincidindo com diversos eventos de diferenciação celular, provavelmente disparado por um rápido decréscimo na razão entre os reguladores hormonais citocinina e auxina (Lur e Setter, 1993). Esses autores observaram que o aumento abrupto na concentração de ácido indol-acético (IAA) entre 9 a 11 DAP pode ser responsável pela elevação dos níveis de DNA devido à endoreduplicação e pela expressão de alguns genes de zeínas durante o desenvolvimento do endosperma de milho. A expressão dos vários genes de zeína é altamente regulada. A integração dos diferentes níveis de controle requer o envolvimento de vários elementos *cis* e *trans* que devem atuar de forma ordenada e coordenada para garantir a especificidade espacial e temporal da expressão dos genes de zeínas (Shewry e Casey, 1999).

### 1.6. Construção de um cassete de expressão específico de endosperma de cereais

Já foram identificados e caracterizados vários promotores específicos de genes de proteínas de reserva de sementes. Em particular, os promotores das prolaminas de milho, sorgo e *Coix*, assim como os diversos mecanismos de regulação da expressão gênica nas sementes desses cereais foram objeto de extensivos estudos no Laboratório de Plantas do CBMEG desde 1990. Esses trabalhos precederam os estudos agora apresentados sobre a habilidade de alguns promotores modularem a produção de proteínas heterólogas especificamente no endosperma de sementes em altos níveis. Como anteriormente mencionado, a expressão específica nas sementes pode trazer vantagens em termos de armazenamento do produto, custos de produção e purificação da proteína recombinante.

Seqüências originárias de genes de proteínas de reserva de cereais foram empregadas visando estabelecer um cassete de expressão gênica para produção de proteínas heterólogas em endosperma de sementes de milho (Leite *et al.*, 1998). Foi isolado e caracterizado o promotor do gene que codifica proteínas de reservas de sorgo denominadas  $\gamma$ -kafrina (Freitas *et al.*, 1994), e a seqüência nucleotídica codificadora do peptídio-sinal de uma  $\alpha$ -coixina (Ottononi *et al.*, 1993) de *Coix*. Inicialmente esse cassete foi testado na expressão dos hormônios humanos do crescimento (hGH) (Leite *et al.*, 2000) e da pró-insulina (Parizzoto, 2001) em tabaco transgênico.

Os resultados obtidos com o hGH demonstraram que o promotor utilizado foi capaz de dirigir a expressão especificamente em sementes. A análise da seqüência amino-terminal do hormônio recombinante purificado demonstrou que o peptídio-sinal foi capaz de endereçar corretamente a proteína para o retículo endoplasmático, onde ocorreu sua clivagem, resultando em uma proteína com o início da seqüência primária idêntica ao do hormônio natural, ao contrário do hormônio produzido em bactérias que possui uma metionina como primeiro aminoácido. Adicionalmente, estudos do comportamento eletroforético e das propriedades de ligação com receptores específicos indicaram que o hGH produzido em sementes de tabaco apresentava estrutura e função similares ao hormônio comercialmente disponível (Leite *et al.*, 2000).

O sistema de expressão descrito resultou no acúmulo de até 0,16% de hGH da fração da proteína solúvel total presente na semente madura. Esse rendimento constitui aproximadamente 25% do obtido por Fiedler e Conrad (1995) na expressão de imunoglobulina também em sementes de tabaco. Nesse caso, o promotor e o peptídio-

sinal empregados são originários de leguminina, uma proteína de reserva de dicotiledôneas, como é o tabaco. No nosso caso, o promotor e o peptídeo sinal são originários de monocotiledôneas. Essa discrepância pode explicar os níveis mais reduzidos de expressão de nosso cassete em sementes de tabaco.

A principal razão para a escolha do promotor de  $\gamma$ -kafirina na construção do cassete de expressão deve-se ao fato de um baixo número de cópias ser responsável por aproximadamente 5% das proteínas de reserva em sorgo, indicando portanto, tratar-se de um promotor de alta atividade em cereais (Watterson *et al.* 1993). Tais considerações nos permitiram antecipar maior rendimento na produção e acúmulo de proteínas heterólogas em sementes de cereais. É esperado que os níveis de rendimento do cassete de expressão seja muito maior em milho (uma monocotiledônea), sobretudo porque é uma planta muito aparentada com o sorgo e o Coix, pertencendo a uma mesma tribo (Claynton, 1973). Por último nesse sentido, as gramíneas apresentam um alto grau de homologia entre si, mantendo uma base genômica bastante parecida principalmente entre os cereais (Gale e Devos, 1998; Devos e Gale, 2000).

Visando maximizar a produção do cassete empregado em nosso laboratório, adicionalmente os transgenes são transferidos por cruzamento clássico para genótipos que apresentam um nível de expressão maior. Várias mutações naturais afetam o acúmulo de zeínas no endosperma do milho. O mutante opaco 2 (*o2*) é o mais conhecido, tendo sido descrito por Emerson *et al.*, em 1935. Esse nome deriva do aspecto opaco (não vítreo) do endosperma da semente. Nesse material as  $\alpha$ -zeínas praticamente não são transcritas, promovendo um acréscimo de duas a três vezes das  $\gamma$ -zeínas (Wallace *et al.*, 1990). Conforme descrito, o promotor empregado na construção de nosso cassete de expressão é derivado de uma  $\gamma$ -kafirina.

A proteína *o2* é um fator de transcrição do tipo bZIP (basic domain leucine zipper) e sua ausência gera uma redução parcial ou total de RNAs específicos das  $\alpha$ -zeínas (Pedersen *et al.*, 1980). A linhagem QPM (quality protein maize) é um material derivado *o2* que foi convertido por melhoramento clássico ao modelo selvagem, mantendo a característica do mutante *o2* de produzir altos níveis de  $\gamma$ -zeínas, o que promove um acúmulo dos aminoácidos essenciais lisina e triptofano (Geevers e Lake *et al.*, 1992). Está bem estabelecida a correlação entre a característica *o2* e o acúmulo desses aminoácidos no endosperma, porém não são bem conhecidos os mecanismos genéticos envolvidos (Ortega e Bates, 1983).



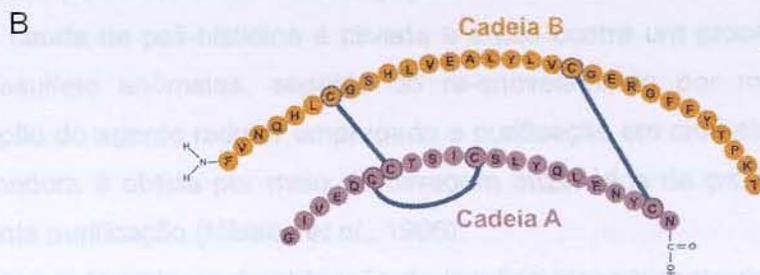


Figura 1.2: Representações esquemáticas: **A)** Pró-insulina humana, com os sítios alvos das convertases PC1 e PC2. As regiões das cadeias A e B do peptídeo estão indicadas em diferentes cores. Os resíduos de cisteína que participam da formação de pontes dissulfeto estão destacados. **B)** Insulina madura mostrando as cadeias A e B e as pontes dissulfeto.

Alguns trabalhos descreveram que essas enzimas apresentam especificidade endoproteolíticas para os sítios de clivagem. As convertases PC1 e PC2 clivam as terminações carboxila dos aminoácidos Arg 32 e Arg 65, respectivamente. Vollenweider *et al.* (1995) mostraram que somente a PC1 promove isoladamente as clivagens. Entretanto, trabalhos mais recentes demonstraram que tanto a PC1 quanto a PC2 são capazes *per se* de converter a pró-insulina em insulina (Kaufmann *et al.*, 1997).

Desde o início da década de 1920, o diabetes mellitus vem sendo tratado com insulina produzida em pâncreas de suínos ou bovinos. Porém, esses produtos vem sendo gradativamente substituídos por insulina recombinante, obtida de sistemas procariotos de *E. coli* estabelecidos em 1981 (Johnson, 1983). Mais recentemente, leveduras recombinantes começaram a ser empregadas como biorreatores de insulina humana (Kjeldsen *et al.*, 1999).

Esses sistemas empregam metodologias complexas e caras para purificação. Os sistemas procariotos apresentam um alto nível de produção, entretanto as bactérias não possuem mecanismos de endereçamento intracelular e de empacotamento. Essa alta produção em *E. coli* acaba resultando na formação de corpúsculos de inclusão, que são agregados constituídos de proteínas parcialmente desnaturadas. A solubilização desses agregados e a recuperação da estrutura nativa da insulina são etapas adicionais que oneram o processo.

Cowley e Mackin (1997) descreveram um sistema de expressão a partir da produção de uma proteína de fusão, constituído de uma cauda N-terminal de poli-histidina conectada à pró-insulina através de um resíduo de metionina. As proteínas de fusão

produzidas localizam-se em corpúsculos de inclusão, onde se encontram parcialmente enoveladas. Após sucessivas centrifugações e tratamentos químicos, a pró-insulina é isolada, a cauda de poli-histidina é clivada e então ocorre um processo de oxidação de pontes dissulfeto anômalas, seguido do re-enovelamento por meio da redução da concentração do agente redutor empregado e purificação em cromatografia. Por último, a insulina madura é obtida por meio da clivagem enzimática da pró-insulina enovelada e subsequente purificação (Nilsson *et al.*, 1996).

O segundo sistema de obtenção de insulina recombinante desenvolvido emprega a levedura *Saccharomyces cerevisiae* em sistemas de expressão secretória. Essa via em levedura assemelha-se com a dos mamíferos, em função de sua capacidade de enovelamento, processamento, glicosilação e secreção de proteínas, porém menos especializada. Esses sistemas são tão econômicos quanto os bacterianos, mas as proteínas são frequentemente hiper-glicosiladas, instáveis e insolúveis. Por último, Lee *et al.*, (2000) descrevem um vírus que expressa um análogo da cadeia única da insulina humana, o qual não requer conversão enzimática para atuar como insulina biologicamente ativa. Esse análogo foi construído através da retirada dos 35 aminoácidos do peptídeo C e da inclusão de um hepta-peptídeo. Esse material normalizou os níveis de glicose nos animais diabéticos por oito meses, sem aparentes efeitos colaterais.

A insulina empregada na terapia de diabéticos seja ela obtida de outros mamíferos ou recombinante, ainda não apresenta o mesmo padrão fisiológico da insulina humana nativa. A absorção dessas insulinas injetadas é extremamente variável, podendo resultar em hipo-glicemia ou hiper-glicemia noturna. Muitos análogos da insulina humana nativa estão sendo estudados por meio da engenharia genética, buscando uma insulina que simule exatamente os efeitos da proteína nativa. Os mecanismos pós-traducionais dos vegetais superiores são tão sofisticados quanto os dos mamíferos e mais complexos que os das leveduras e dos procariotos (Kusnadi *et al.*, 1997), portanto as plantas *a priori* apresentam condições de produzir uma molécula que promova exatamente as funções bioquímicas da insulina humana. A diabetes é uma doença de enorme impacto social, atingindo 3% da população mundial. Como não possui cura na grande maioria dos casos, a produção de uma insulina em biorreatores vegetais, que mimetize exatamente a insulina humana, poderá melhorar a qualidade de vida dos diabéticos e ser um produto de grande interesse comercial. Casos crônicos de diabetes em pacientes que não respondem a nenhum tipo de insulina podem resultar em infarto, derrame, insuficiência renal, cegueira, paralisia, amputação dos pés ou pernas e impotência sexual.

Este trabalho apresenta três estratégias para obtenção de insulina. A primeira aposta na capacidade das sementes *per se* de executar o processamento da pró-insulina em insulina. Foi encontrada na casca da semente em feijão-de-porco (*Canavalia ensiformis*) uma proteína com seqüência primária idêntica a da insulina bovina (Oliveira *et al.*, 1998). Em milho foi demonstrado que a insulina animal estimula a síntese de proteínas ribossomais durante a germinação *in vitro* de eixos embrionários (Sanches *et al.*, 1999). Também foi purificado de milho uma proteína que apresentou sinais de regulação na tradução parecidos com alguns associados à insulina de mamíferos, que foi reconhecida por um anticorpo monoclonal contra a insulina bovina (Flores *et al.*, 2001). Porém nenhum gene vegetal de insulina foi clonado, o que não parece óbvio, visto que se existe a seqüência protéica por que não se faz o isolamento do gene por PCR? A partir desses resultados podemos apostar na eventual possibilidade do milho ser capaz de processar a pró-insulina, produzindo a insulina madura utilizando mecanismos próprios de modificação pós-traducionais.

A segunda estratégia está sendo estudada em outra tese de doutorado. A partir de bancos de cDNA de cérebro de rato foram isolados duas seqüências nucleotídicas análogas que codificam a convertase PC1. Essas seqüências foram clonadas no mesmo cassete empregado com a pró-insulina e com o hGH, já tendo sido obtidas plantas de milho transgênicas isoladamente com essas construções, que foram cruzadas com outras plantas transgênicas expressando a pró-insulina. Com isto é esperado a co-produção das duas proteínas heterólogas e a conversão da pró-insulina em insulina nas sementes transgênicas obtidas desse cruzamento pela convertase PC1 recombinante. Por último, caso nenhuma das duas primeiras estratégias funcionem, a pró-insulina e a convertase PC1 seria extraída, purificada e o processamento da pró-insulina em insulina seria promovido *in vitro*.

### 1.7.2. O hormônio do crescimento humano

O hormônio de crescimento humano (hGH) possui 191 aminoácidos, sendo sintetizado e secretado por células *somatotrofs* na região anterior da glândula pituitária. Classicamente o hGH é conhecido porque pessoas que possuem deficiência na produção apresentam a doença chamada do nanismo, assim como sua produção em altos níveis na adolescência pode levar à doença do gigantismo. A nível celular o hGH é um dos reguladores chave do ciclo celular. Outro efeito primário desse hormônio é atuar em

receptores celulares da membrana onde ele promove a conversão de triglicerídeos, reduzindo o acúmulo de lipídeos e da gordura no sangue.

Esta proteína possui um valor comercial muito alto. Assim como muitos outros hormônios endócrinos como os estrógenos, a testosterona, a progesterona e a melatonina, sua produção decai aproximadamente a partir dos 20 anos de idade. Essa redução contribui para o envelhecimento do corpo humano. Nos estágios de sono mais profundo ocorre um incremento na produção do hGH, que decai com a perda natural da capacidade de alcance desses estágios observada no avanço da senilidade. Por isso, o estudo da produção e dos efeitos da suplementação do hGH possui um enorme valor. Entre os malefícios da baixa concentração de hGH encontramos as doenças cardiovasculares, a obesidade, a perda da massa muscular, o decréscimo da capacidade imune, a osteoporose, a calvície, o envelhecimento da epiderme facial, o decréscimo de energia, a redução das funções sexuais, a insônia, os problemas na execução de atividades físicas e perturbações psiquiátricas. Essas anomalias também são observadas em jovens com baixos níveis de produção de hGH (<http://www.hgh-human-growth-hormone-guide.com/human-growth-hormone-info.htm>).

Atualmente muitas pesquisas médicas vêm sendo conduzidas com a suplementação de hGH em pacientes adultos que tiveram níveis normais de produção na adolescência. Os resultados apresentados indicam que essa terapia pode reverter algumas das enfermidades descritas, como a redução da gordura e o incremento na massa muscular, a melhora no sistema imune e da atividade sexual, a regulação da pressão sanguínea, a redução dos níveis de colesterol, o incremento do tecido ósseo e da disposição para atividades físicas (<http://www.hgh-human-growth-hormone-guide.com/human-growth-hormone-info.htm>). Com o advento de pesquisas na área geriátrica, o produto hGH poderá ser alvo de grande procura pelas empresas farmacêuticas. No entanto, outras pesquisas pedem cautela sobre o entendimento das reais vantagens da suplementação do hGH em adultos (Cook 2002; Frobman 2002; Isley 2002).

Atualmente, esse hormônio é obtido comercialmente de biorreatores procariotos. Com a proibição da retirada do hGH de cadáveres humanos, a tecnologia do DNA recombinante supriu a necessidade de hGH do mercado. O Brasil consome um milhão de doses de hGH por ano, o que representa uma importação de 15 milhões de dólares. A partir de 2003, dois laboratórios de São Paulo em conjunto irão produzir hGH

comercialmente, também em *E. coli*, tornando-se o quinto lugar no mundo a atuar nesse campo da indústria farmacêutica (<http://revistapesquisa.fapesp.br:2222/transform.php>).

Assim como descrito para a pró-insulina, o sistema procarioto apresenta vários empecilhos na produção do hGH. Diversos procedimentos laboratoriais precisam ser realizados com o pró-hormônio produzido. Mesmo com várias etapas de purificação e renovelamento, parte das moléculas de hGH não recompõe sua estrutura espacial biologicamente ativa (Figura 1.3). O hGH comercial pode ter até dez partes de proteína de *E. coli* por milhão de proteína de origem e ainda ser considerado ultra-puro pela FAO. É de se supor que os potenciais riscos dessas proteínas de bactéria para a saúde humana não sejam desprezíveis, principalmente por ser um produto ministrado através de injeções subcutâneas. No Brasil atualmente existem 10 mil crianças que convalescem do hGH e precisam de terapia para reposição hormonal. Um tratamento de reposição hormonal de uma criança representa um custo mensal aproximado de 4 mil reais (Revista Fapesp, Dezembro/02, número 82). O valor da produção de hGH em milho não está ainda estabelecido, mas a expectativa é que seja um valor dezenas de vezes inferior devido a simplicidade do cultivo, extração e purificação.

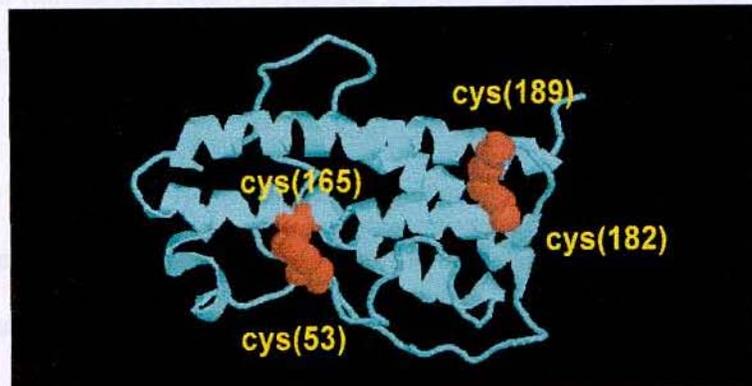


Figura 1.3: Estrutura tridimensional do hGH. Representações em vermelhos indicam as duas pontes de dissulfeto existentes na conformação ativa.

## 2. OBJETIVOS

1- Produzir os hormônios insulina e do crescimento humanos em sementes de milho transgênico e,

2- Desenvolver métodos de extração e purificação, caracterizar o processamento, as propriedades bioquímicas e o empacotamento dos hormônios recombinantes produzidos nas sementes.

### **Estratégia:**

Os cassetes de expressão previamente construídos em nosso laboratório, contendo o gene hGH (Leite *et al.*, 2000,) e o gene da pró-insulina (Parizotto, 2001), foram transferidos para vetores apropriados empregados nos sistemas de transformação de milho pelos métodos biolístico e via agrobactéria. Nesses plasmídeos, os cDNAs codificadores dos hormônios foram regulados por dois diferentes promotores: o promotor de  $\gamma$ -kafirina, endosperma-específico, e o promotor constitutivo de ubiquitina de milho (Christensen *et al.*, 1992). No laboratório de plantas do CBMEG/UNICAMP foi estabelecido um sistema de transformação genética de milho, que permitiu a realização de estudos sobre o nível de produção dos hormônios, maxi-extração, purificação, tecido-especificidade da expressão, empacotamento celular e o rendimento obtido.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

As técnicas rotineiras de um laboratório de biologia molecular e engenharia genética de plantas, tais como transformação de *Escherichia coli*, mini e maxi preparação de DNA plasmideal, digestão de DNA com enzimas de restrição e SDS-PAGE, empregadas neste trabalho estão descritas nos manuais Sambrook *et al.* (1989); Gelvin *et al.* (1993); Coligan *et al.* (1997), Ausubel *et al.* (1997).

#### 3.1. Material Vegetal

Plantas de milho da linhagem A188 do cruzamento Hy II-A x Hy II-B (Armstrong *et al.*, 1991) foram cultivadas em casa de vegetação do CBMEG/UNICAMP com fotoperíodo controlado de 14 horas de luz. As linhagens foram mantidas por autofecundação e por cruzamentos entre plantas parentais.

As plantas transgênicas foram autopolinizadas ou cruzadas com outras plantas pertencentes ao mesmo evento de transformação e com plantas da linhagem BR 451 QPM. Os cultivos foram conduzidos durante todo o ano, evitando-se o plantio nos meses de maio e junho.

#### 3.2. Plasmídios empregados

##### 3.2.1. Bombardeamento

**1) pBARGUS:** Esse plasmídeo foi construído por Fromm *et al.* (1990), apresentando o gene *bar* sob o controle do promotor 35S do vírus do mosaico-da-couve-flor (CAMV 35S), seguido do intron 1 do gene da álcool desidrogenase 1 (*Adh 1*) de milho. O plasmídeo possui ainda o gene *uidA* sob controle do promotor e do intron 1 do gene *adh 1*. Ambos os cassetes têm a seqüência terminadora de poliadenilação da nopalina sintetase (3' NOS) do plasmídeo pTiC58 de *Agrobacterium tumefaciens* (Fraley *et al.*, 1983). O gene *bar* codifica a enzima fosfinotricina acetil transferase (PAT) (Thompson *et al.*, 1987), que inativa a fosfinotricina (droga também descrita como glufosinato de amônio ou PPT) por acetilação.

**2) pPyKaf hGH:** Plasmídeo formado pelo promotor do gene que codifica uma  $\gamma$ -kafirina de 27 kDA (Freitas *et al.*, 1994), a seqüência nucleotídica do peptídeo-sinal de uma  $\alpha$ -coixina de 22 kDA (Ottoconi *et al.*, 1993), a região codificadora do gene do hormônio de crescimento humano (clonado a partir de cDNA de cérebro de cadáver humano pelo Dr. Hamza El-Dorry, USP) e o terminador 35S no vetor pRT 103 (Topfer *et al.*, 1987).

**3) pP $\gamma$ Kaf proins:** Esse plasmídeo difere do anterior por possuir como região codificadora a pró-insulina humana, isolada do plasmídeo pchi1-19 nos sítios *Nco* I/*Bam*H I. O plasmídeo pchi 1-19, obtido a partir de bibliotecas de cDNA, foi gentilmente cedido pelo Dr. Graeme I. Bell, Universidade de Chicago - USA.

A partir de 2001 o plasmídeo pCAMBIA3301 (Center for the Application of Molecular Biology to International Agriculture - Canberra, Austrália) tornou-se o único vetor das transformações via bombardeamento. Esse plasmídeo possui o gene *uidA* e o gene *bar* controlados pelo promotor 35S do CaMV e o gene de resistência ao antibiótico canamicina para clonagem em bactéria. Os cassetes P $\gamma$ Kaf hGH, PUBI hGH e P $\gamma$ Kaf proins anteriormente descritos, foram clonados no sítio de *Hind* III no pCAMBIA (Figura 3.1).

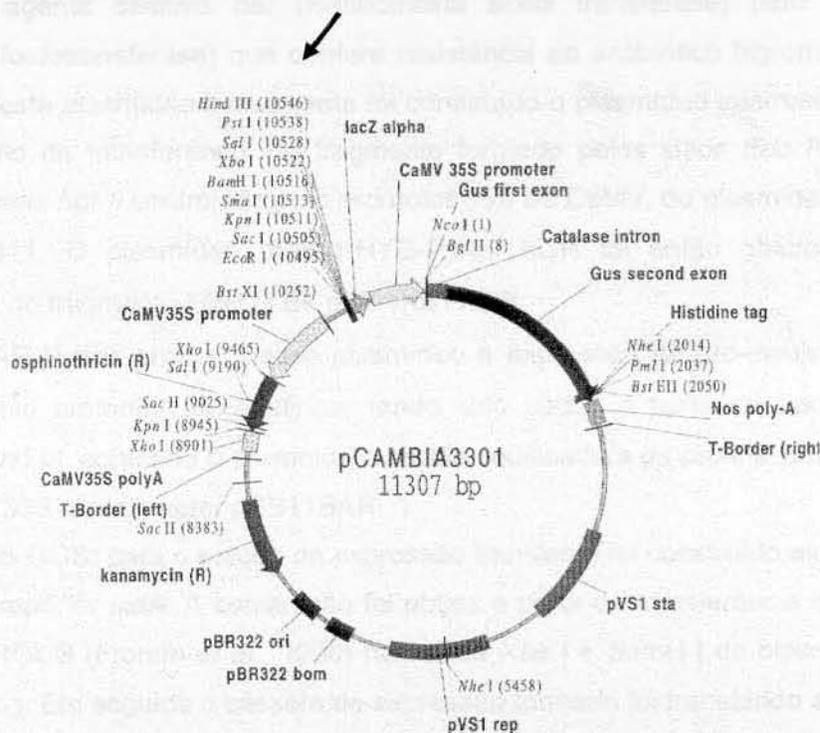


Figura 3.1: Plasmídeo pCAMBIA 3301 com os principais sítios de restrição. Os cassetes contendo cada seqüência codificadora dos hormônios foram incorporados no sítio *Hind* III, indicado pela seta.

### 3.2.2. Transformação via agrobactéria

1) **pSB11-BAR**: esse plasmídeo foi utilizado como base para as construções utilizadas nos ensaios de transformação de milho via agrobactéria de 1999 e de 2000. A partir do sistema superbinário pSB11/pSB1 (Hiei *et al.*, 1994; Ishida *et al.*, 1996) foi obtido este plasmídeo, transferindo o gene *bar* do plasmídeo pBARGUS (Fromm *et al.*, 1990) para o vetor pSB11 no sítio da enzima *Hind* III.

2) **pSB11-BAR-P $\gamma$ Kaf hGH**: esse plasmídeo foi obtido a partir da transferência do cassete formado pelo promotor de  $\gamma$ -kafirina, o peptídeo sinal de  $\alpha$ -coixina, a região codificadora do hGH e o terminador 35S originários do plasmídeo pRT-P $\gamma$ Kaf hGH (Leite *et al.*, 1999) para o vetor pSB11BAR, a partir de uma digestão parcial com a enzima *Hind* III.

3) **pSB11-HYG-P $\gamma$ Kaf hGH**: esse plasmídeo difere do anterior pela substituição do cassete do agente seletivo *bar* (fosfotricina acetil transferase) pelo gene *hpt II* (higromicina fosfotransferase) que confere resistência ao antibiótico higromicina. Para a construção deste plasmídeo inicialmente foi construído o plasmídeo intermediário pSB11-HYG por meio da transferência do fragmento formado pelos sítios *Eco* RI e *Bam* HI, contendo o gene *hpt II* controlado pelo promotor 35S do CaMV, do plasmídeo pHYG para o vetor pSB11. O plasmídeo pSB11-HYG-P $\gamma$ Kaf hGH foi então obtido a partir da transferência do fragmento *Hind* III de pRT- $\gamma$ Kaf hGH.

4) **pSB11-BAR-P $\gamma$ Kaf proins**: nesse plasmídeo a expressão da pró-insulina humana é controlada pelo promotor de  $\gamma$ -kafirina, tendo sido obtido a partir da transferência do fragmento *Hind* III, contendo o promotor, a região codificadora da pró-insulina humana e o terminador 3'35S, para o vetor pSB11BAR.

5) **pSB11-35S GUS**: para o estudo da expressão transiente foi construído esse plasmídeo com o gene repórter *uidA*. A construção foi obtida a partir da transferência do intron 1 de *adh* do pBARGUS (Fromm *et al.*, 1990) nos sítios *Xba* I e *Bam*H I do plasmídeo pBI221 (Clontec Inc.). Em seguida o cassete de expressão formado foi transferido ao pSB11 nos sítios *Hind* III e *Eco* RI.

### 3.3. Transformação via Agrobactéria

#### 3.3.1. Obtenção dos vetores de transformação

Foram empregados os vetores superbinários obtidos por meio da co-integração das construções dos cassetes de cada hormônio em pSB11 com o plasmídeo pSB1 presente na cepa de agrobactéria LBA4404 (pSB1). Esses vetores superbinários incluem

os genes *virB*, *virC* e *virG* da linhagem A281, que apresenta alta eficiência de transformação de plantas (Komari, 1990).

A introdução dos plasmídeos na agrobactéria visando a cointegração foi realizada por meio de conjugação triparental das bactérias: 1) *E. coli* LE392 contendo os cassetes P $\gamma$ Kaf hGH, PUBI hGH ou P $\gamma$ Kaf proins em pSB11; 2) *E. coli* MM294 contendo o plasmídeo de mobilização pRK2013; e 3) *A. tumefaciens* LBA4404 contendo o plasmídeo pSB1. Nesse tipo de conjugação, o plasmídeo pRK2013 é mobilizado para a bactéria contendo a construção em pSB11. Nesta bactéria, este plasmídeo fornece os fatores de transferência RK2 e a proteína Mob de ColE1 que agem no sítio *bom* da construção em pSB11 promovendo a transferência para a agrobactéria. Algumas poucas cópias do plasmídeo transferido integram no plasmídeo residente pSB1 através de recombinação homóloga (Rogers *et al.*, 1986).

Para a realização da conjugação triparental foram preparados os seguintes inóculos: (1) *A. Tumefaciens* LBA4404 (pSB1) em meio contendo 12,5 mg/L de tetraciclina; (2) *E. coli* LE392 com as respectivas construções em pSB11 em meio contendo 50 mg/L de espectinomicina e (3) *E. coli* MM294 (pRK2013) em meio com 50 mg/L de kanamicina. Foi preparada uma mistura equivalente das culturas de cada inóculo, que foi sedimentada, lavada e incubada em meio LB sem antibiótico por 16 horas, a 30 °C. Em seguida a conjugação foi submetida a seleção em meio contendo os antibióticos espectinomicina (50 mg/L) e tetraciclina (12,5 mg/L). A recombinação foi confirmada por meio de experimentos de Southern blot de DNA plasmidial segundo Hooykaas (1988).

### 3.3.2. Material vegetal e transformação

Embriões zigóticos de 12 a 14 DAP da linhagem A188, entre 1,0 a 1,2 mm de tamanho foram inoculados em meio de indução sólido (MI) seguindo os procedimentos de Gordon-Kamm (1990). Em seguida, os embriões foram transferidos para culturas de *Agrobacterium tumefaciens* cepa LBA4404 ( $\sim 1,0 \times 10^9$  células/mL em meio MI), agitados com vortex por 30 seg e mantidos incubados por mais 5 min. O material foi transferido para meio sólido MI suplementado com 100  $\mu$ M de acetoceringona (Ishida *et al.*, 1996), onde permaneceu por três dias em co-cultivo, na ausência de luz a 25 °C. Por último, o material foi submetido a três lavagens em meio líquido MI contendo 200 mg/L de carbenicilina ou de cefotaxima.

### 3.3.3. Sonicação de embriões zigóticos

Foram estudados os efeitos da sonicação (SAAT- *sonication assisted Agrobacterium-mediated transformation*) na transformação de embriões de milho mediada por agrobactéria. O método consiste em submeter tecidos vegetais imersos em suspensão de agrobactéria a intervalos de sonicação, para promover a formação de microfermentos.

Também foi estudado o efeito da sonicação na taxa de formação de calos. Embriões zigóticos foram submetidos a períodos de 3, 10, 30, 60, 120 e 300 seg de sonicação e avaliados quanto à taxa de formação de calos. Os embriões foram imersos em 1,0 mL de meio MI (sem agrobactéria) em microtubos de 1,5 mL, sonicados no Microson Ultrasonic Cell Disruptor (Bransonic Inc.) e transferidos para meio MI sólido. Esse material foi mantido no escuro a 25 °C por 30 dias. Por último foram realizados ensaios de transformação com o gene repórter *uidA*, empregando os mesmos períodos de sonicação descritos no ensaio de avaliação de calogênese. Os embriões foram incubados em meio de infecção com a agrobactéria contendo o plasmídeo pSB11-35S GUS ( $\sim 1,0 \times 10^9$  células/mL) e submetidos a sonicação. Em seguida o material foi transferido para MI onde permaneceu em co-cultivo por três dias e depois foi submetido ao ensaio histoquímico de GUS.

## 3.4. Transformação via bombardeamento

### 3.4.1. Estabelecimento das culturas embriogênicas

Embriões zigóticos imaturos com aproximadamente 12 DAP de 2 a 3 mm foram retirados de espigas com o emprego de bisturi e estilete de ponta arredondada e inoculados em meio MI (Tabela 1). Após 20 dias de cultura foram isolados calos embriogênicos dos explantes que responderam à morfogênese *in vitro* por meio do estímulo com o hormônio 2,4-D. Esse material foi repicado em intervalos quinzenais no mesmo meio MI, com a seleção visual dos setores mais vigorosos para ampliação do tamanho da cultura. Para evitar possíveis variações somaclonais e outros adventos comuns em culturas de células *in vitro*, o material selvagem era descartado após o quinto ciclo de cultivo. Na preparação das placas de bombardeamento, os calos embriogênicos que visualmente aparentaram encontrar-se no estado de embrióides dentro do ciclo de crescimento e divisão celular foram dispostos verticalmente em um círculo central de 4 cm de diâmetro em meio MB (Figura 3.2).

Tabela 1: Composição dos meios de culturas empregados:

Componente	mg/l	MI	MB	MS	MR1	MR2
Sais	N6	4000	4000	4000	-	-
	MS	-	-	-	4300	4300
Vitaminas	Inositol	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
	Nicotinamida	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50
	Piridoxina	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50
	Tiamina-HCl	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
	Glicina	2,00	2,00	2,00	2,00	-
Reguladores	2,4D	2,00	2,00	2,00	-	-
	ANA	-	-	-	0,25	-
Suplemento orgânico e geleificante	Prolina	2.900	-	-	-	-
	Sacarose	30.000	120.000	30.000	60.000	30.000
	Caseína	100,0	-	-	-	-
	Gelrite	2.500	2.500	2.500	2.500	2.500
Outros sais	AgNO <sub>3</sub>	1,70	0,85	0,85	-	-
pH		5,8	5,8	5,8	5,8	5,8

Sais MS: Murashige e Skoog, 1962.

Sais N6: Chu *et al*, 1975.

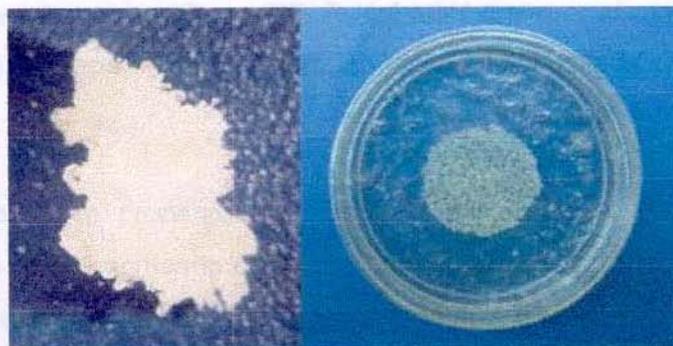


Figura 3.2: **Esquerda)** Calos em estágio de embrióides. Aumento de 10 vezes. **Direita)** Modelo de placa com calos embriogênicos que foi submetida ao bombardeamento.

### 3.4.2. Bombardeamento

Nos três primeiros anos de ensaios (entre 1998 e 2000) foi empregado um canhão construído no CBMEG pelo Dr. Marcio da Silva (Kemper *et al.*, 1996). No quarto ano (2001) foi empregado o canhão de hélio construído em série pelo EMBRAPA - Recurso Genéticos de Brasília (CENARGEM) (Aragão *et al.*, 1995) e no último ano (2002) foi empregado o canhão Biolistic® PDS-1000/He Particle Delivery System” (BioRad), adquirido por nosso laboratório em junho de 2002.

Em todos os ensaios foram empregados uma pressão de 1.200 psi de gás hélio e vácuo de 28 mm de Hg, seguindo as orientações básicas do fabricante de cada tipo de canhão. Os embriões foram transferidos para o meio de bombardeamento (MB) 6 horas antes dos disparos, tendo sido posicionados dentro da câmara de vácuo do canhão numa distância de 6 cm do disco de ruptura. Foram efetuados dois tiros por placa, com a inversão da posição do material em 180° dentro da câmara de bombardeamento entre cada disparo.

### 3.4.3. Preparação das partículas

#### **Ensaio entre 1998 e 2000**

Foram preparadas a partir da mistura de 50 µL de micropartículas de ouro de 1,6 µm de Ø (200 µg/µL de glicerol) e 5 µg de DNA plasmídeo (1,0 µL/µg) numa relação 2:1 em número de cópias dos plasmídeos pRT- PγKaf hGH (Leite *et al.*, 1999) e pBARGUS (Fromm *et al.*, 1990). A preparação das micropartículas foi depositada sob a superfície de telas de aço (Figura 3.3A).

#### **Ensaio em 2001 e 2002:**

As partículas foram preparadas a partir da mistura de 5,0 µL do plasmídeo pCAMBIA 3301 (1,0 µL/µg) contendo o cassete com o gene do hGH ou do gene da pró-insulina em 50 µL de micropartículas de tungstênio de 1 mm de Ø (60 µg/µL de glicerol). A preparação foi depositada em discos de “kapton” montados sob o aparato de bombardeamento (Figura 3.3B).

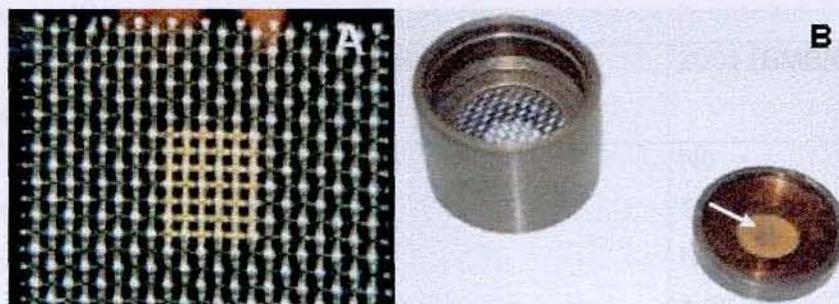


Figura 3.3. **A)** Tela de aço com a deposição das micropartículas de ouro com DNA adsorvido. **B)** Aparato de bombardeamento com a deposição das micropartículas de tungstênio sob o disco de “kapton” (seta).

Em todos os anos as micropartículas utilizadas no bombardeamento (10 mg de ouro ou 3 mg de tungstênio) foram preparadas a partir de uma lavagem em água, uma vez em etanol 70% e por último, uma lavagem em etanol anidro. O material foi centrifugado por 30 seg a 5.000 rpm e ressuscitado em 60  $\mu\text{L}$  de glicerol 50%. Na preparação, o DNA e as micropartículas foram homogeneizadas em vortex por 5 min e nesse material foram adicionados simultaneamente 20  $\mu\text{L}$  de espermidina 0,1 M e 50  $\mu\text{L}$  de  $\text{CaCl}_2$  2,5 M. A mistura continuou sendo homogeneizada por 3 min e depois permaneceu em repouso por mais 3 min. Em seguida o material foi centrifugado por 5 seg a 5.000 rpm, o sobrenadante descartado e o sedimento lavado uma vez com 200  $\mu\text{L}$  de etanol 70% a 4 °C e duas vezes com 200  $\mu\text{L}$  de etanol anidro a 4 °C (Kemper *et al.*, 1996). As micropartículas foram então ressuscitadas em 60  $\mu\text{L}$  de etanol anidro e 7  $\mu\text{L}$  dessa preparação foram depositados em cada tela de aço ou disco de “kapton”, que permaneceram secando em repouso sob fluxo laminar por duas horas.

A partir de 2001, além do novo plasmídeo vetor dos cassetes de expressão dos hormônios e do canhão, foram empregadas outras condições estabelecidas no Núcleo de Biologia Aplicada (NBA) da EMBRAPA Milho e Sorgo, que são descritas na Tabela 2 e 3.

Tabela 2: Condições empregadas no bombardeamento nos diferentes períodos de experimentação:

Meio de cultura (MB)	1998 a 2000 (CBMEG)	2001 (EMBRAPA) e 2002 (CBMEG)
Sais	MS	N6
Sacarose	30 g/L	<b>120 g/L</b>
Vitaminas	MS	N6
AgNO <sub>3</sub>	10,0 mg/L	1,70 mg/L
Prolina	700 mg/L	2.900 mg/L
Manitol	<b>140,0 g/L</b>	---

### 3.5. Seleção

Durante os anos de ensaios de bombardeamento foram empregados diferentes metodologias na seleção, descritas na tabela 3. As culturas foram mantidas na ausência de luz a 25 °C, em sub-cultivos de seleção de 20 dias.

Tabela 3: Condições empregadas na seleção:

	1998 a 2000 no CBMEG	2001 (EMBRAPA) e 2002 (CBMEG)
Meio de seleção (MS):	MB com a redução de manitol de 140 para 70 g/L e retirada da prolina e da caseína	MB com a redução de 12 para 3% de sacarose e retirada da prolina e caseína
Agente seletivo	Bialaphos, tripetideo análogo ao PPT, isolado do fungo <i>Streptomyces hygroscopicus</i>	Herbicida sintético Finale (Agrevo®) que contém 20% de PPT
Número de ciclos de seleção	Seis sub-cultivos, respectivamente em 1,0; 5,0; 15,0; 15,0; 15,0; 15,0 mg/L de PPT	Três sub-cultivos em 3,0; 6,0 e 9,0 mg/L em 2001 e 2 sub-cultivos 4,5 (MS1) e 9,0 mg/L (MS2) de PPT em 2002
Início da seleção	8 horas após o bombardeamento	15 dias após o bombardeamento. Nesse período os calos ficaram em meio MI sem seleção

Para os embriões zigóticos submetidos a agroinfecção, a seleção foi realizada também na ausência de luz a 25 °C por três sub-cultivos quinzenais em concentrações crescentes do herbicida Bialaphos (1,0; 5,0 e 15,0 mg/L) ou do antibiótico higromicina (5,0; 10,0; e 30,0 mg/L). Os calos resistentes à seleção no escuro foram regenerados a partir da transferência para meio MR1 suplementado com 5,0 mg/L de Bialaphos ou 30,0 mg/L de higromicina.

### 3.6 Germinação de embriões somáticos

O material transgênico resistente à seleção no escuro foi transferido para MR1 suplementado com 6,0 mg/L de PPT. Após 20 dias de indução da rediferenciação celular, os embriões maturados foram individualizados e transferidos para luz em meio MR2 suplementado com 3,0 mg/L de PPT. Aproximadamente após duas semanas sob iluminação a 25 °C, as plântulas que atingiram aproximadamente 10 cm de tamanho foram transferidas para vasos plásticos de 500 mL contendo o substrato agrícola Multiplant® saturado com uma solução de 1/1000 de adubo líquido Ouro Verde 06-06-08®. Esses vasos foram acondicionados em caixas plásticas de 100 x 60 x 40 cm, que foram completamente fechadas com filme de PVC. As plantas foram aclimatizadas as condições de umidade da sala de crescimento através da abertura gradual do filme de PVC a partir do terceiro dia da transferência. Após 10 dias de cultivo nos vasos, o material foi transferido para casa de vegetação, onde permaneceu por mais 10 dias antes de ser finalmente transferido para solo.

#### 3.6.1. Nomenclatura de identificação dos eventos de plantas transgênicas

Foi criada a seguinte forma de catalogar os eventos: Em itálico, são descritas as iniciais dos homônios *hGH* ou *proins*, o número do evento, e por último o número da geração. Por exemplo: *Ev proins 3 R2* corresponde a um evento de pró-insulina, número 3, da terceira geração (R0 é a primeira, R1 a segunda e R2 é a terceira geração). Todos os eventos de pró-insulina foram obtidos em 2001.

Para *hGH* adicionalmente é mencionado o ano da obtenção do evento. Exemplos: O *Ev00 hGH 42 R0*: corresponde a um evento obtido em 2000, com o gene do *hGH*, número 42 da primeira geração e o *Ev02 hGH 6 R1* corresponde a um evento obtido em 2002, com o gene do *hGH*, número 6 da segunda geração.

Um evento é definido nesse trabalho como o material vegetal oriundo de uma mesma colônia de células resistente aos ciclos de seleção com crescimento vigoroso (Fig.

4.13 dos resultados). Teoricamente essas células apresentam o mesmo padrão de integração dos transgenes. Em cada ciclo de seleção e de germinação essas células são sempre agrupadas e igualmente identificadas, assim como acontece no cultivo e produção de sementes transgênicas.

Os eventos que foram férteis (produziram plantas com sementes) foram ainda cruzados com plantas selvagens QPM. Esse material é identificado como cruzamento QPM ♀ X *Ev02 hGH 1 R0* ♂ F1 por exemplo, tendo sido cultivado gerando o QPM ♀ X *Ev02 hGH 1 R0* ♂ F2 ou retrocruzado com QPM selvagens, gerando o material QPM ♀ X *Ev02 hGH 1 R0* ♂ RC1.

### 3.7. Análise histoquímica de GUS:

A atividade da proteína β-glucoronidase foi analisada histoquimicamente de acordo com Jefferson (1987). Três dias após a infecção com agrobactéria ou 24 horas após os ensaios de bombardeamento os embriões foram incubados em uma solução contendo 10 mg de X-Gluc dissolvido em 40 mL de tampão de revelação (50 mM fosfato de sódio pH 7,0; 10 mM Na<sub>2</sub>EDTA; 0,1% sarcosyl; 0,1% de Triton X-100; 5 mM ferrocianato potássio, 5 mM ferricianato potássio e 10 mM de β-mercaptoetanol) por 36 horas a 30 °C no escuro. Eventualmente, nas agrotransformações esse tampão foi suplementado com 1,0 g/L do antibiótico carbenicilina ou com 25% de metanol. Os tecidos foram então observados em lupa Zeiss e fotografados com filme Kodak ISO100.

### 3.8. Análise das plantas transformadas

#### ***Plantas produzidas entre 1999 e 2000:***

Aproximadamente após duas semanas em casa de vegetação as plantas resistentes geradas de calos resistentes *in vitro* ao agente seletivo Bialaphos foram pulverizadas com o herbicida Basta<sup>®</sup> a 2%. A confirmação da integração dos transgenes nas plantas oriundas dos ensaios com agrobactéria onde empregou-se o antibiótico higromicina como agente seletivo, foi realizada por meio de análise de PCR.

#### ***Plantas produzidas entre 2001 e 2002:***

Foi isolado DNA genômico de folhas jovens aproximadamente após 30 dias de cultivo das plantas oriundas de calos resistentes *in vitro* ao PPT, e a confirmação da integração dos transgenes em tais plantas foi realizada por meio de análise de PCR e Southern blot.

### 3.8.1. Análise molecular por PCR

Foi extraído DNA genômico de cada evento de transformação a partir de 5,0 g de tecido foliar. O material foi macerado em nitrogênio líquido e transferido para tubos falcon de 50 mL com 15 mL de tampão de extração (2% de CTAB; 100 mM Tris-HCl pH 8,0; 20 mM EDTA; 1,4 M NaCl; 0,4% de  $\beta$ -mercaptoetanol). A extração foi incubada em banho a 60 °C por 60 min com branda homogeneização a cada 15 min. Em seguida, a extração ficou em repouso a temperatura por 15 min e então foi adicionada 15 mL de uma solução de clorofórmio-álcool isoamílico 24:1, que foi suavemente homogeneizada por 5 min e centrifugada por 10 min a 3.000 rpm. O sobrenadante foi transferido para novos tubos e o DNA foi precipitado pela adição de dois volumes de etanol absoluto gelado. O sedimento foi enovelado em uma pipeta Pasteur com a ponta em forma de anzol, lavado em 5,0 mL de etanol 70% a 4 °C e transferido para microtubos de 1,5 mL com 500  $\mu$ L de 10 mM de Tris-HCl, 0,1 mM de EDTA e 0,1 mg/mL de RNase.

A reação de PCR foi realizada com 100 ng de DNA e 25 pmol de cada primer (Tabela 3). A reação ocorreu a partir de 5 min de desnaturação inicial a 96 °C, seguida de 30 ciclos de 30 seg a 96 °C de desnaturação, 30 seg de anelamento a 55 °C e 60 seg de extensão a 72 °C.

Tabela 3: Seqüências de nucleotídeos dos primers empregados na amplificação dos transgenes por PCR:

Primer	Seqüência	região de aneling no cassette 5'p- $\gamma$ Kaf-35S 3'	Tamanho do fragmento
PIN-DIR	5' TGA ACC AAC ACC TGT CGC G 3'	1655	254pb
PIN-REV	5' GTT GCA GTA GTT CTC CAG3' 3'	1401	
hGH-INV	5' AGA GCG GCA CTG CAC GAT G 3'	1827	275pb
hGH-DIR	5' CTC AGG AGT GTC TTC GCC 3'	1552	

### 3.8.2. Southern blot

A integração do transgene no DNA genômico das plantas foi confirmada através de experimentos de hibridação de DNA (Hoykaas, 1988). Aproximadamente 20  $\mu$ g de DNA genômico foi digerido com a enzima *Hind* III ou com *Sac* I por 16 horas a 37 °C, submetido à eletroforese em gel de 1,0% de agarose a 30 V por 12 horas e transferido para membrana Hybond N seguindo as orientações do fabricante (Amersham Pharmacia

Biotech). A digestão com *Hind* III libera o cassete de expressão dos homônios do plasmídeo vetor e já a enzima *Sac* I possui um sítio no polilinker e nenhum no cassete de expressão. Dessa forma cada fragmento que *Sac* I produz indica uma cópia do transgene incorporada no genoma da planta.

A sonda foi preparada a partir de 30 ng do produto de PCR purificado com o Kit Sephaglas BandPrep (Amersham Pharmacia Biotech), que foi marcado com o isótopo [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] dCTP com o Kit Megaprime DNA labelling systems (Amersham Pharmacia Biotech). Os nucleotídeos não incorporados na marcação foram removidos por meio de uma purificação em Kit Concert gel extraction systems (Life Technologies). A incorporação da radioatividade foi analisada em Cintilômetro DisplayUnit 1217 RackBeta com alíquotas retiradas antes e depois da filtração.

As membranas foram pré-hibridadas por 4 horas em solução contendo 5X SSC; 5X Denhardt's; 200 mM Tris-HCl pH 7,5; 1% SDS; 50% de formamida e 1,0 µg/mL de DNA de esperma de salmão, previamente desnaturado por 5 min a 96 °C. Em seguida foi adicionada a sonda, previamente desnaturada por 5 min a 96 °C, e a hibridação foi realizada por 12 horas a 42 °C. As membranas foram lavadas a 50 °C em solução de 0,1% de SDS e 1,0% de SSC por 30 min e em 0,1% de SDS e 0,1% de SSC por mais 30 min e expostas à radiografia empregando o "Hyperfilm" (Amersham Pharmacia Biotech) à -70 °C. Os filmes foram revelados automaticamente no Macrotec MX-2.

### 3.8.3. Northern blot

Foram coletadas sementes de milho de uma mesma planta do *Ev proins 3 R1* com 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 e 40 DAP, das quais foi extraído o RNA total pelo método de cloreto de lítio. Dois gramas de sementes foram macerados em nitrogênio e o tecido foi homogenizado em 3 mL de tampão de extração (200 mM Tris-HCl pH 8,0; 0,1 M LiCl; 10 mM EDTA; 1% SDS; 1% PVP; 2% de  $\beta$ -Mercaptoetanol). Esse material foi submetido a uma extração com fenol:clorofórmio:álcool isoamílico [proporção 1:1 (24:1)] e o RNA foi precipitado pela adição de 1 volume de LiCl 6 M (~500µL). A extração foi mantida em gelo por 60 min e centrifugada a 10.000 rpm por 30 min a 4 °C.

O precipitado total de RNA foi lavado com 1 mL de LiCl 3 M e o sedimento foi suspenso em 300 µL de água tratada com DEPC. Em seguida a esse material foi adicionado 0,1 vol de NaAc 3 M pH 5,2 e 2 volumes de etanol absoluto. As amostras foram incubadas por 60 min a -20 °C e em seguida centrifugadas a 10.000 rpm por 30

min a 4 °C. O sedimento foi lavado e solubilizado em 50 µL de água tratada com DEPC. A quantificação da concentração do RNA foi realizada por espectrofotometria (GeneQuant da Pharmacia Biotech).

A análise de northern blot foi realizada a partir de uma eletroforese com 20 µg de RNA total em gel de 1% agarose por 6 horas a 50 volts em tampão MOPS desnaturante (5% de formaldeído). O RNA foi então transferido para membranas de Nylon Hybond™-N<sup>+</sup> (Amersham Pharmacia Biotech) durante 8 horas em tampão de transferência SSC 10X. A sonda foi obtida a partir da amplificação de um fragmento de 254 pb do gene de pró-insulina com os primers PIN-DIR e PIN-REV. As membranas foram pré-hibridadas por 4 horas em solução 5X SSPE, 10X Denhardt's, 1X SDS e 50% de formamida. Em seguida foi adicionada a sonda, previamente desnaturada por 5 min a 96°C. Todos os demais procedimentos repetem aqueles descritos para Southern blot.

#### 3.8.4. Imunohistoquímica

Sementes de 17 DAP do *Ev proins 3 R1* e de plantas selvagens A188 foram coletadas e congeladas em nitrogênio líquido. Esse material foi embebido no crio composto e seccionadas a 9 µm no Micron criostato (Microm Laborgerate Waldorf). Os cortes foram coletados em lâminas silanizadas, pós-fixados por 15 min em acetona e secados rapidamente.

A reação foi feita com o emprego dos kits Vectastain ABC e DAB Substrate kit for Peroxidase (Vector Laboratories, Burlingame, CA). As lâminas foram lavadas em 3 banhos de 3 min em PBS 50 mM pH 7,3 (150 mM NaCl; 25 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 25 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O) e incubado por 5 min em H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,1% em PBS. Em seguida o material foi lavado em dois banhos de 3 min em PBS e bloqueado com soro de carneiro anti IgG de camundongo (75 µL em 5 mL de PBS-BSA 0,3% e 0,3% de Tween) por 20 min a 4 °C em câmara úmida. As lâminas foram incubadas por 12 horas a 4°C em câmara úmida com o anticorpo primário monoclonal anti pró-insulina humana (Research Diagonotics Inc clone 3A1), em uma diluição 1:100 em PBS-BSA 0,3%.

Em seguida os cortes foram secos, lavados em PBS e incubados com o anticorpo secundário (75 µL solução bloqueadora, 5 mL PBS-BSA e 37,5 µL anticorpo biotinizado anti-IgG de camundongo) por 35 min à temperatura ambiente. Depois os cortes foram lavados em 3 banhos de PBS por 3 min e incubados em solução ABC por 40 min à temperatura ambiente. Por último, as lâminas foram lavadas três vezes por 3 min em PBS e incubadas na solução de DAB (5 mL de H<sub>2</sub>O, 4 gotas de DAB, 2 gotas de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e 2

gotas de tampão). A reação foi interrompida por meio da incubação das lâminas em água destilada por 5 min. A contra-coloração foi feita com azul de toluidina 0,1 M pH 4,7 por 5 min e paralisada com água. As lâminas foram montadas com Permount®, e os cortes foram analisados em microscópio Olympus PM-30 e fotografados com filme Prolmage 100.

### 3.8.5. Western blot

Em 1999 e 2000 a farinha de milho de cada amostra foi obtida a partir de seis sementes inteiras que foram trituradas juntas em moinhos de bolas (Tecnal/Marconi, modelo 350) por 2 min. A partir de 2001, parte do endosperma de cada semente foi retirado por meio do emprego de uma furadeira fixa, do lado contrário do embrião, preservando a fertilidade da semente (Figura 3.4).

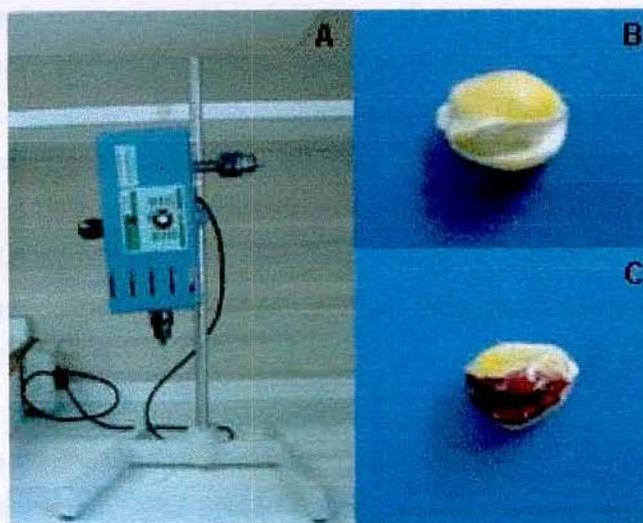


Figura 3.4: **A)** Aparato empregado para isolar parte do endosperma das sementes transgênicas. **B)** Semente da qual foi retirada 100 mg de farinha. **C)** Semente reparada com esmalte comercial para unhas.

Os extratos de proteína foram obtidos a partir de 100 mg de farinha em 1,0 mL de tampão de extração (0,2% Triton X-100; 50 mM Tris-HCl pH 8,5; 2,0 mM EDTA, 5,0 mM benzamidina; 5,0 mM DDT). Nos ensaios com calos e folhas foram utilizados 200 mg de material vegetal para 1,0 mL do tampão de extração. O material foi macerado no próprio tampão e em seguida, homogeneizado por duas horas a temperatura ambiente em agitador orbital. Por último, foram obtidas alíquotas com a mistura de 20  $\mu$ L da extração e

de 10 µL de tampão de amostra (50 mM Tris-HCl pH 8,0; 1% SDS; 20% glicerol; 0,025% de azul de bromofenol; 5% de β-mercaptoetanol).

O material foi fervido por 5 min e submetido à eletroforese em géis SDS-PAGE de 15%. As proteínas foram transferidas para membranas de nylon Hybond-N (Ausubel *et al.*, 1997) e bloqueadas em solução contendo 5% de leite em pó desnatado, 1X TBS e 0,05% de Tween por 3 horas a temperatura ambiente. Em seguida as membranas foram incubadas por 3 horas em 1X TBS e 5% de leite em pó desnatado Molico com o anticorpo policlonal primário anti-hGH produzido em coelho, em uma diluição 1:3.000 ou com anticorpo monoclonal anti-pró-insulina clone RDI-TPK2P9-3A1 produzido em camudongos (Research Diagnostics Inc) em uma diluição 1:5.000.

Após a incubação com o anticorpo primário, as membranas foram lavadas duas vezes por 10 min em solução de lavagem (1X TBS e 0,1% de Tween) e novamente incubadas com o anticorpo secundário IgG de coelho conjugado com a fosfatase alcalina da Sigma por 3 horas em uma diluição 1:5.000 nos estudos com hGH ou com anticorpo secundário anti-IgC conjugado com a fosfatase alcalina (Santa Cruz Biotechnonology) no estudos de pró-insulina. Por fim, as membranas foram novamente lavadas e incubadas em uma diluição 1:5.000 com o substrato quimioluminescente CSPD (Tropix Inc.) por 8 min em tampão de equilíbrio (100 mM Tris-HCl pH 9,5; 100 mM NaCl), expostas à radiografia empregando o "Hyperfilm" (Amersham Pharmacia Biotech) por 5 min ou o T-Mat (Kodak) por 20 min e reveladas automaticamente no Macrotec MX-2.

### **3.9. Transferência do transgene para outros genótipos**

Plantas da linhagem QPM BR451 (*Quality protein maize*) foram cultivadas em casa de vegetação juntamente com plantas dos *Ev proins 3 R1*, *Ev proins 5 R1*, *Ev02 hGH 1 R0* e *Ev02 hGh 2 R0*. Na época reprodutiva, foi retirado o pendão das plantas QPM, que então foram polinizadas por três dias consecutivos com pólen coletado de plantas transgênicas. As sementes geradas desse cruzamento foram analisadas por western blot. Esse material F1 foi autopolinizado e retrocruzado com plantas QPM selvagens.

### **3.10. Purificação da pró-insulina**

#### **3.10.1. Maxi-extração de proteínas do endosperma de milho**

A região do embrião das sementes foi retirada manualmente com o emprego de uma espátula e o restante da semente foi triturado por 2 min em moinho de bolas Tecnal/Marconi modelo 350. A farinha obtida foi desengordurada através da extração com

um volume de n-hexano por 30 min sob agitação. A suspensão foi centrifugada a 3.000 rpm por 5 min à temperatura ambiente e o sobrenadante descartado. A farinha foi espalhada em uma bandeja de pirex, onde ficou em repouso por 30 min na capela para a evaporação do n-hexano. Em seguida o material foi homogeneizada no Omimixer (SuperOhn) por 2 min em 5 volumes de tampão de extração (m/v) (50 mM glicina pH 3,0; 70% etanol e 5 mM DTT) e homogeneizado por 3 horas a 10 °C , centrifugado a 10.000 rpm por 15 min a 4 °C e o sobrenadante recuperado.

### **3.10.2. Precipitação da pró-insulina**

Foram realizados testes de precipitação da pró-insulina no tampão de extração por meio da redução da concentração do etanol de 70% para 50, 30, 10 e 5%. Um grama de farinha previamente seca e desengordurada foi homogeneizada em 5 mL de tampão de extração por 3 horas a 10 °C. Depois esse material foi dividido em 5 microtubos de 1,5 mL e a cada um, adicionado um volume de tampão 50 mM de glicina pH 3,0 suficiente para reduzir as concentrações finais de etanol de 70% para 50, 30, 10 e 5% (v/v). As alíquotas foram homogeneizadas em um misturador orbital (Marconi modelo AP22) por 60 min a 10 °C em geladeira. Após centrifugação a 13.000 rpm por 30 min a 4 °C, os sobrenadantes foram isolados e os sedimentos solubilizados em 40 µL de tampão de amostra (100 mM Tris-HCl pH 6,8; 2% SDS; 45% glicerol; 2% de β-mercaptoetanol). Alíquotas de 200 µL do sobrenadante foram submetidas à precipitação por meio da adição de 10% de TCA e os sedimentos obtidos foram solubilizados em 40 µL de tampão de amostra.

Para confirmar os resultados dos primeiros ensaios da precipitação da pró-insulina com a redução de etanol, o processo foi repetido desta forma: o primeiro sedimento obtido com a redução de etanol de 70% para 50% foi ressuscitado em 1,0 mL do tampão empregado na extração que possui 70% de etanol e novamente precipitado por meio da redução do etanol para 50%. Esses processos de precipitação em 50% e solubilização em 70% de etanol da pró-insulina foram repetidos cinco vezes, com a retirada de alíquotas dos sedimentos e do sobrenadante de cada etapa para análise de SDS/PAGE de 15% e western blot.

### 3.10.3. Solubilização da pró-insulina

Tentativas de solubilizar a pró-insulina recombinante solidificada por meio da redução da concentração de etanol de 70% para 50% demonstraram a necessidade da utilização de detergentes ou de agentes caotrópicos. Entretanto para os processos de cromatografia os detergentes normalmente empregados representam um empecilho na purificação. Por isso, foram testadas quatro diferentes concentrações de uréia (1,0; 2,0; 4,0 e 7,0 M) em 50 mM Tris-HCl pH 8,5 e 5,0 mM de DTT para solubilizar a pró-insulina obtida a partir de um grama de farinha de endosperma. O intuito foi determinar a concentração em que o rendimento era maior, tentando minimizar o uso desse agente caotrópico para evitar a solubilização de contaminantes e/ou a desnaturação irreversível do hormônio.

### 3.10.4. Cromatografia

A partir de 21 g de farinha de endosperma de milho sem lipídios foi realizada a primeira maxi-purificação em colunas de HRLC. Esse material foi submetido a homogeneização em 80 mL de tampão de extração (50 mM glicina pH 3,0; 70% etanol e 5 mM DTT) e agitado por 3 horas a 10 °C, e em seguida foi centrifugada por 30 min a 12.000 rpm a 4 °C.

A concentração de etanol foi reduzida de 70% para 50% através do gotejamento de 24 mL de tampão 50 mM glicina pH 3,0 com 5 mM de DDT a 10 °C aos 60 mL de extrato protéico obtidos. O material permaneceu em homogeneização por 30 min e depois foi centrifugado a 13.000 rpm por 30 min a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi submetido à solubilização por homogeneização em Potter (Super Rohn Inc.) em 25 mL de tampão de solubilização (50 mM Tris-HCl pH 8,5; 4 M uréia e 5 mM DTT). Esse material foi centrifugado a 11.500 rpm por 20 min à temperatura ambiente, e o sobrenadante filtrado a vácuo em filtro 45 µm. Foram obtidos 22 mL da mistura protéica pré-purificada, que foi submetida a uma cromatografia de fase reversa.

Foi utilizada uma coluna modelo Waters - AP1 (Millipore) contendo 5,7 mL de Resina Fase Reversa 50RR, conectada a um cromatógrafo líquido de alta pressão HRLC (BioRad). Esse equipamento possui um sistema de distribuição de solvente modelo 2700, detector UV/Vis modelo 1790 e um coletor de frações modelo 2128 (BioRad).

A resina foi equilibrada com 30% de Tampão A (0,065% ácido trifluoroacético, 2% acetonitrila em água) e 70% de Tampão B (0,05% de ácido trifluoroacético em 100% de acetonitrila) por 10 min, a um fluxo de 0,2 mL/min. Esse fluxo foi aumentado para 2 mL/min por mais 15 min, quando se mudou a concentração de Tampão A para 100%.

A amostra foi então toda injetada e a coluna lavada com 5 volumes (30 mL) de solução 100% Tampão A. O gradiente para a eluição da amostra começou com 15 min de 100% Tampão A, fluxo de 2 mL/min. A concentração de Tampão A variou de 100% a 30% e, conseqüentemente, a de Tampão B de 0% a 70% num intervalo de 20 min, a um fluxo de 2 mL/min. Finalmente manteve-se o fluxo de 30% de Tampão A e 70% Tampão B por 10 min, procedendo-se posteriormente a lavagem padrão da coluna visando sua reutilização.

Foram coletadas amostras somente dos picos do gradiente em frações de 1 mL. Uma alíquota de 50  $\mu$ L de cada fração foi liofilizada (Concentrator Eppendorf 5301), e o sedimento protéico foi ressuscitado em 40  $\mu$ L de tampão de amostra (300 mM Tris-HCl pH 6,8; 0,67% SDS; 15% glicerol; 1,6% de  $\beta$ -Mercaptoetanol) para realização de análise de SDS-PAGE 15% e western blot.

### **3.11. Análise da tecido-especificidade da expressão dos hormônios nas sementes**

Foram obtidos extratos protéicos a partir de 200 mg de: a) farinha de endosperma livre de embrião, b) embriões e c) farinha obtida a partir da semente inteira (endosperma + embrião) de plantas geneticamente transformadas e controles selvagens, em 1,0 mL de tampão de extração (50 mM Tris-HCl pH 8,5; 2,0 mM EDTA; 5,0 mM benzamidina; 5,0 mM de DDT e 0,2% Triton X-100®). Os tubos foram vigorosamente agitados por 10 min, centrifugados por 2 min a 10.000 rpm e o sobrenadante transferido para microtubos de 1,5 mL. Os extratos foram analisados por SDS/PAGE 15% e western blot.

### **3.12. Isolamento de corpúsculos protéicos em gradiente de sacarose**

O endosperma de sementes de 30 DAP foi isolado e macerado em nitrogênio líquido e ao pó obtido foi adicionados cinco volumes do tampão de extração de corpúsculos (200 mM Tris-HCl pH 8,5; 60 mM KCl; 50 mM  $MgCl_2$ ; 200 mM sacarose). Em seguida, a extração foi homogeneizada por 5 min sob agitação moderada e o material centrifugado a 3.000 rpm por 5 min a 15 °C.

Um gradiente descontínuo com alíquotas de 3 mL de 0,5; 1,5 e 2,0 M de sacarose dissolvida em tampão de centrifugação (40 mM Tris-HCl pH 8,5; 20 mM KCl e 10 mM MgCl<sub>2</sub>) foi montado em tubos de ultracentrifuga Beckman 331372, onde foi depositado 2 mL da extração. Esse material foi centrifugado por 2 horas a 25.000 rpm em rotor SW-41 a 15 °C. Os corpúsculos localizados entre 1,5 e 2,0 M foram recolhidos, lavados em tampão de extração sem sacarose e suspensos em 100 mM de Tris-HCl pH 8,5 e 10 mM de EDTA. Alíquotas do material, previamente tratadas em 55% de isopropanol e 2% de β-mercaptoetanol para rompimento das membranas dos corpúsculos, foram analisadas por SDS-PAGE de 15% e western blot.

### **3.13. Seleção de calos bombardeados por borrifamento**

Foram estabelecidos no último trimestre de 2002 estudos sobre a viabilidade de um sistema de seleção de calos submetidos ao bombardeamento pela aplicação direta do agente seletivo por borrifação. O objetivo é diminuir o número de sub-cultivos de seleção. Previamente foram realizados ensaios com culturas transgênicas resistentes do *Ev proins 3* e *Ev proins 7* e com culturas selvagens não resistentes. Esse material foi submetido a uma aplicação de 2 ou 5 mL de uma solução do herbicida Finale® com 1,0; 5,0 ou 10,0 mg/L de PPT, por meio do emprego de um borrifador de 500 ml (cada borrifada corresponde aproximadamente a 1 mL).

Após 12 dias dos ensaios de transformação, calos bombardeados com o pCAMBIA 3301 hGH foram transferidos para o meio MS suplementado com 4,5 mg/L de PPT. Após 10 dias nessa cultura de seleção, esse material foi submetido ao borrifamento de 4 mL de uma solução do herbicida finale com 5,0 mg/L de PPT.

### **3.14. Estudo da influência de aminoácidos sobre a totipotência celular**

As fontes reduzidas de nitrogênio prolina e caseína, empregadas na indução e multiplicação de calos embriogênicos somáticos, são retiradas do meio de seleção por interferirem negativamente nesse processo porque esses aminoácidos competem com o PPT por sítios de reconhecimento na membrana plasmática das células vegetais (Dekeyser *et al.*, 1989). A qualidade da cultura sem esses nutrientes decai consideravelmente, reduzindo a capacidade regenerativa após os ciclos de seleção. Para confirmar tal interferência foram realizados cultivos de calos selvagens em meio com 9,0 mg/L de PPT, suplementado ou não com a metade da concentração original de prolina e caseína do MI.

Adicionalmente, nos ensaios de bombardeamento com o gene do hGH realizados em 2002 foi implementado um tratamento intermediário entre a seleção e a regeneração em meio MS suplementado com 9,0 mg/L; 1,45 g/L de prolina e 50 mg/L de caseína. A intenção foi de melhorar a qualidade da cultura e por consequência aumentar a totipotência (taxa de regeneração de plantas férteis) dos calos embriogênicos resistentes aos dois ciclos de seleção sem prolina e caseína.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Cultura de tecido e regeneração de plantas

Foi observada a formação de calos embriogênicos em aproximadamente 50% dos embriões zigóticos inoculados em meio de indução (MI). Esse material foi multiplicado em sub-cultivos de 15 a 20 dias no meio MI, tendo sido descartado a partir do sexto ciclo de crescimento. Os calos embriogênicos, após permanecerem em média de 6 a 10 meses em cultura *in vitro* no escuro, quando foram submetidos à germinação apresentaram síntese de clorofila após o quinto dia sob luz (Figura 4.1C). Posteriormente os embriões foram isolados e transferidos para novos meios de germinação, onde ocorreu a formação das primeiras folhas e raízes (Figura 4.2). Essa rediferenciação celular é modulada em milho pela retirada do regulador 2,4D e aumento da concentração de sacarose de 3% para 6% do meio de cultura, e posterior transferência de calos em estágio de embriões para luz.

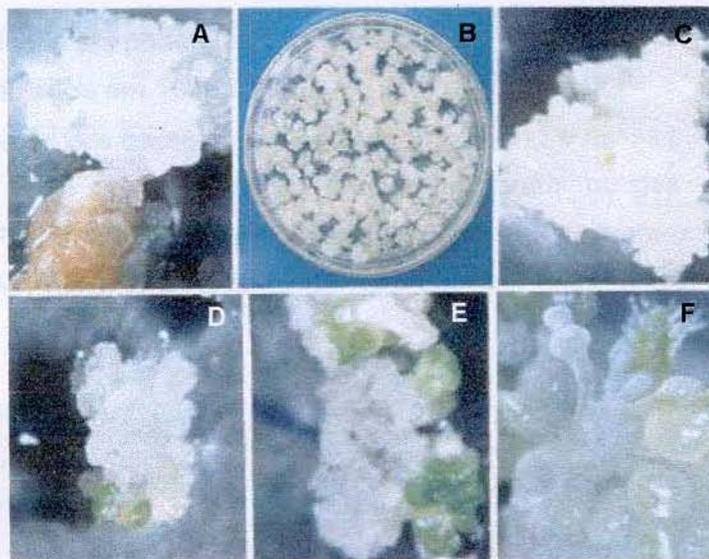


Figura 4.1: Sistema morfofisiológico de calos de milho: **A)** Embrião zigótico em cultura de indução de calogênese no escuro. **B)** Multiplicação das culturas. **C)** Calos após o quinto dia de cultura na luz. **D e E)** Calos com 15 dias sob indução de germinação. **F)** Embriões em destaque com 10 dias de luz.



Figura 4.2: Germinação de embriões somáticos submetidos à transformação, incubados 30 dias sob luz. **No centro e à esquerda:** Controles negativos. **Direita:** Plântulas em meio MR2 suplementado com 3,0 mg/L de PPT.

## 4.2. Transformação via agrobactéria

### 4.2.1. Ensaios realizados em 1998 e 1999

Após a inserção dos cassetes de expressão no pSB11 e desse plasmídeo vetor na agrobactéria por meio de conjugação triparental foram obtidos os vetores de transformação. A Figura 4.3 mostra um dos resultados de experimentos de Southern blot realizados com DNA plasmidial extraído de agrobactérias empregadas nos ensaios de transformação.

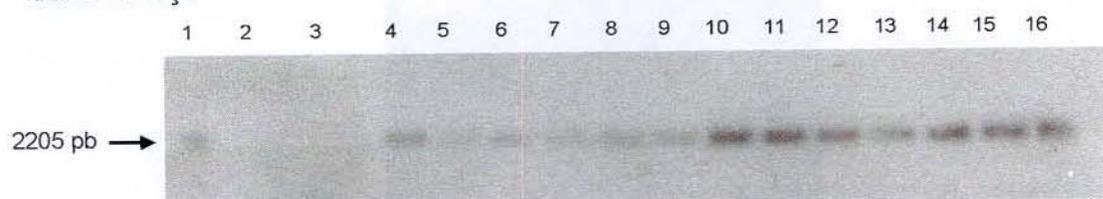


Figura 4.3: Southern blot de DNA plasmidial de agrobactéria digerido com *Hind* III que libera um segmento correspondente ao cassete de expressão, do vetor de transformação contendo a construção pSB11-BAR-P $\gamma$ Kaf hGH ou a construção pSB11-HYG-P $\gamma$ Kaf hGH. **1)** C+: 10 pg do plasmídeo pRT-p $\gamma$ Kaf hGH. **2 e 3)** Controle negativo: DNA de agrobactéria não recombinante. **4 a 9)** Eventos obtidos da recombinação com a construção com o gene *bar*. **10 a 16)** Eventos obtidos da recombinação com a construção com o gene *npt* (resistência a higromicina). Foi empregada uma sonda construída a partir do produto de PCR com os primers hGH INV e hGH DIR, tendo sido empregados os dois primeiros clones de cada evento para os ensaios de transformação.

Para cada uma das construções pSB11-BAR-P $\gamma$ Kaf hGH, pSB11-HYG-P $\gamma$ Kaf hGH e pSB11-BAR-P $\gamma$ Kaf proins, trezentos embriões zigóticos foram submetidos à transformação via agrobactéria. Os calos embriogênicos resistentes aos seis ciclos de seleção no escuro com PPT foram submetidos à germinação, e produziram aproximadamente 4.000 plantas, das quais 2.500 com construção de hGH e 1.500 com a construção de pró-insulina. Nenhuma dessas plantas apresentou resistência à pulverização com uma solução de 0,2% do herbicida Basta. Entre as 200 plantas que apresentaram resistência à higromicina nenhuma apresentou amplificação por PCR do segmento correspondente ao gene hGH.

#### 4.2.2. Ensaio realizado em 2000

Nesse ano foi trabalhado somente com ensaios de expressão transiente empregando o gene repórter *uidA*. Foram realizados cinco ensaios com a construção pSB11-35S GUS, empregando-se 50 embriões zigóticos em cada um deles. Em alguns casos isolados alguns embriões foram transformados em quase toda sua extensão (Figura 4.4), porém não houve uma repetição nos resultados, tendo ocorrido moderada expressão da proteína GUS somente em dois dos cinco ensaios.



Figura 4.4: Ensaio histoquímico com embriões zigóticos submetidos à transformação com o vetor derivado do plasmídeo pSB11-35SGUS. **Superior)** Embrião transformado. **Inferior)** Controle negativo: Embrião submetido a transformação com uma agrobactéria não recombinada. Aumento de 10 vezes.

Os ensaios de sonicação de embriões zigóticos submetidos à transformação com agrobactéria mostraram que há um incremento na taxa de expressão de GUS com os microferimentos. A expressão de GUS apresentou um aumento até 60 segundos de sonicação, sendo que depois desse tempo o incremento na expressão pareceu decair (Figura 4.5). A taxa de calogênese também parece estar relacionada com a sonicação. Conforme mostra a Figura 4.6, ocorreu uma sensível redução na formação de calos já a partir de 10 segundos de sonicação.

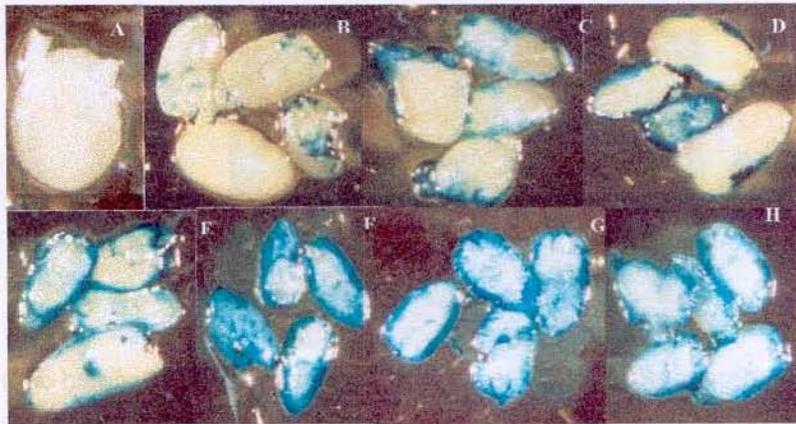


Figura 4.5: Embriões submetidos à transformação com o vetor pSB11-35SGUS, analisados histoquimicamente. A) Embrião não transformado. B) Embriões transformados sem sonicação. C) Embriões submetidos a 10 seg de sonicação. D) 20 seg de sonicação. E) 30 seg F) 60 seg. G) 120 seg e H) 300 seg.

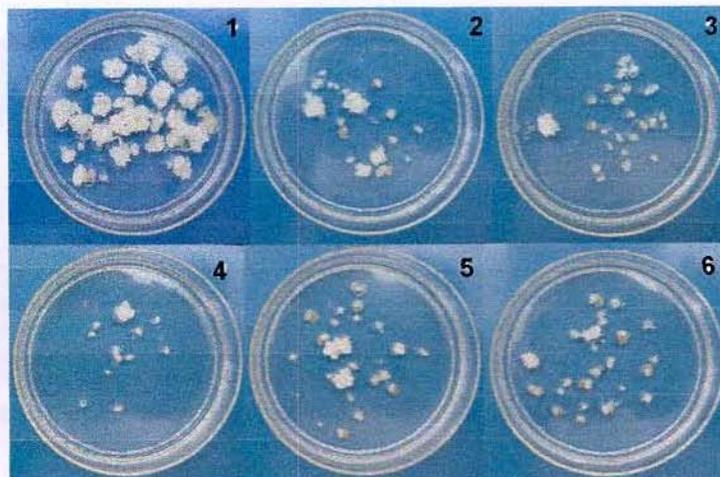


Figura 4.6: Embriões submetidos a sonicação após 30 dias de indução de calogênese em meio MI. 1) Embriões não sonicados, 2) 10 seg de sonicação. 3) 30 seg. 4) 60 seg 5) 120 seg. 6) 300 seg.

### 4.3. Transformação via bombardeamento

#### 4.3.1. Ensaios realizados em 1999

Foram realizados no primeiro ano de transformação três ensaios de bombardeamento, com a preparação de 40 placas para cada experimento. Esse material foi bombardeado com uma mistura 1/1 dos plasmídeos pRT-P $\gamma$ Kaf hGH e p35SBAR GUS. Análises histoquímicas da proteína GUS demonstraram a expressão transiente em alguns dos calos bombardeados conforme mostra a Figura 4.7.

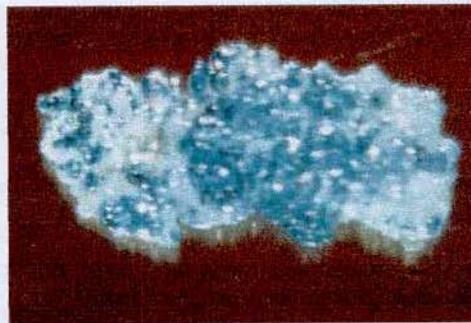


Figura 4.7: Calo bombardeado demonstrando a expressão transiente do gene *uidA*.

Foram realizados seis ciclos de seleção no escuro, não tendo sido adicionado agente seletivo na fase de germinação no claro. Esse material produziu 4.000 plantas, que foram submetidas à pulverização de uma solução de 0,2% do herbicida Basta. Nenhuma dessas plantas resistiu à seleção (Figura 4.8).

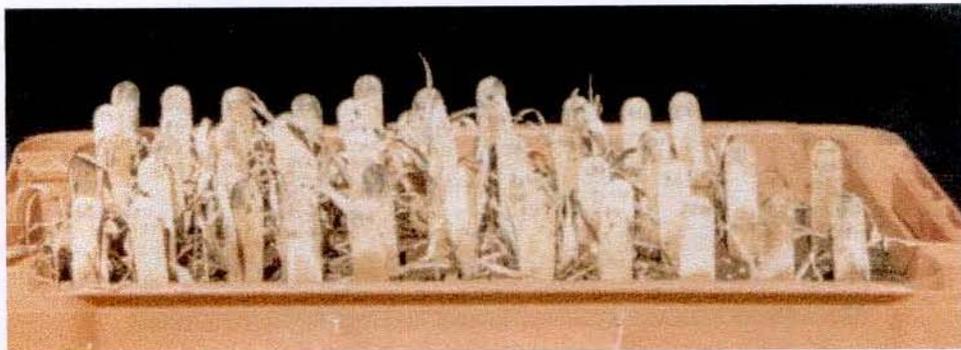


Figura 4.8: Fenótipo de plantas produzidas em 1999, 30 dias após a aplicação do herbicida Basta.

#### 4.3.2. Ensaios realizados em 2000

Nesse ano foram realizados três ensaios de bombardeamento com a preparação de 40 placas para cada experimento. Esse material foi bombardeado com uma mistura

1/1 dos plasmídeos pRT-P $\gamma$ Kaf hGH e p35S $\overline{\text{B}}\text{AR GUS}$ . Foi adotado um critério de seleção visual mais rigoroso nos seis ciclos de seleção no escuro e foi adicionado agente seletivo também na fase de germinação. Foram obtidas aproximadamente 450 plantas, das quais 90 apresentaram resistência à aplicação do herbicida (Figura 4.9), e dessas, 42 plantas produziram sementes. Essas sementes foram analisadas por western blot, que mostrou a produção do hormônio recombinante em uma das 42 plantas – *Ev00 hGH 42 R0* (Figuras 4.10 e 4.11).



Figura 4.9: **Esquerda)** Fenótipo das plantas submetidas à transformação 15 dias após a aplicação do herbicida. **Direita)** Plantas controle negativo.

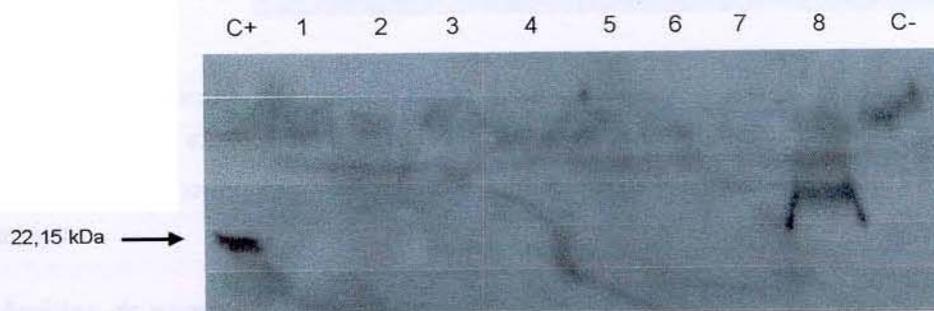


Figura 4.10: Western blot de sementes empregando um anticorpo policlonal anti-hGH. Controle positivo (C+): 100 ng de hGH comercial. 1 a 8) *Ev-00 hGH 35 a 42 R0* e Controle negativo (C-): extrato de planta não transformada. Foram aplicados 20  $\mu\text{L}$  do extrato protéico obtido de 100 mg de farinha em 1,0 mL de tampão de extração.

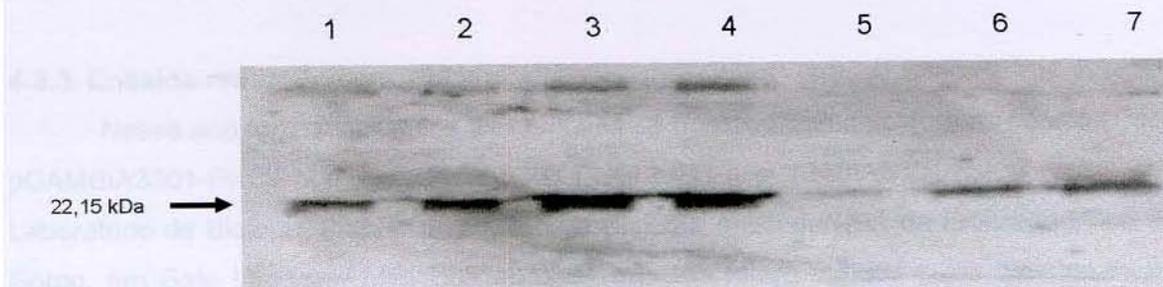


Figura 4.11: Western blot demonstrando a concentração de hGH produzido nas sementes do *Ev00 hGH 42 R0*. **1 a 4)** C+: 10, 25, 50 e 100 ng de hGH comercial. **5 a 7)** 0,1; 0,5 e 1,0  $\mu$ L de extrato total.

A formação das pontes de dissulfeto do hGH produzido nas sementes foi investigada a partir da incubação com os agentes redutores  $\beta$ -mercaptoetanol e DTT. Conforme mostra a Figura 4.12, tanto o hGH de milho quanto o hGH comercial apresentaram um retardamento na mobilidade eletroforética quando tratados com os agentes redutores.

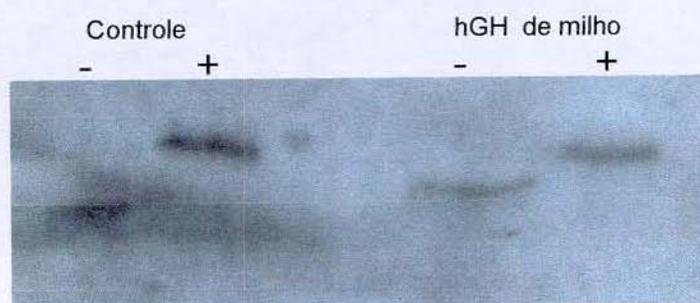


Figura 4.12: Western blot demonstrando a formação das pontes de dissulfeto no hGH produzido pelo *EB00 hGH 42 R0*. Foram carregados 100 ng de hGH produzido em milho (aproximadamente 5  $\mu$ L) e 50 ng do hormônio comercial como controle. Sinal (+): material tratado. Sinal (-): material não tratado.

#### **Análise da segunda geração do *Ev00 hGH 42***

Das 52 sementes produzidas pelo único clone que expressou hGH, somente 12 germinaram e 11 foram férteis. Essas 11 plantas da geração R1 foram analisadas por PCR, Southern blot e western blot e foi constatado que nenhuma apresentava o transgene hGH ou a proteína hGH. No entanto, a pulverização do herbicida mostrou que as plantas eram resistentes ao PPT.

### 4.3.3. Ensaios realizados em 2001:

Nesse ano foram realizados três ensaios de bombardeamento com as construções pCAMBIA3301-P $\gamma$ Kaf hGH, pCAMBIA3301-PUBI hGH e pCAMBIA3301-P $\gamma$ Kaf proins no Laboratório de Biologia Celular do Núcleo de Biologia Aplicada/NBA da Embrapa Milho e Sorgo, em Sete Lagoas - MG. Em todos os ensaios foram obtidos calos resistentes à seleção (Figura 4.13 e Tabela 4.1), que foram submetidos à germinação e produziram plantas transgênicas férteis.

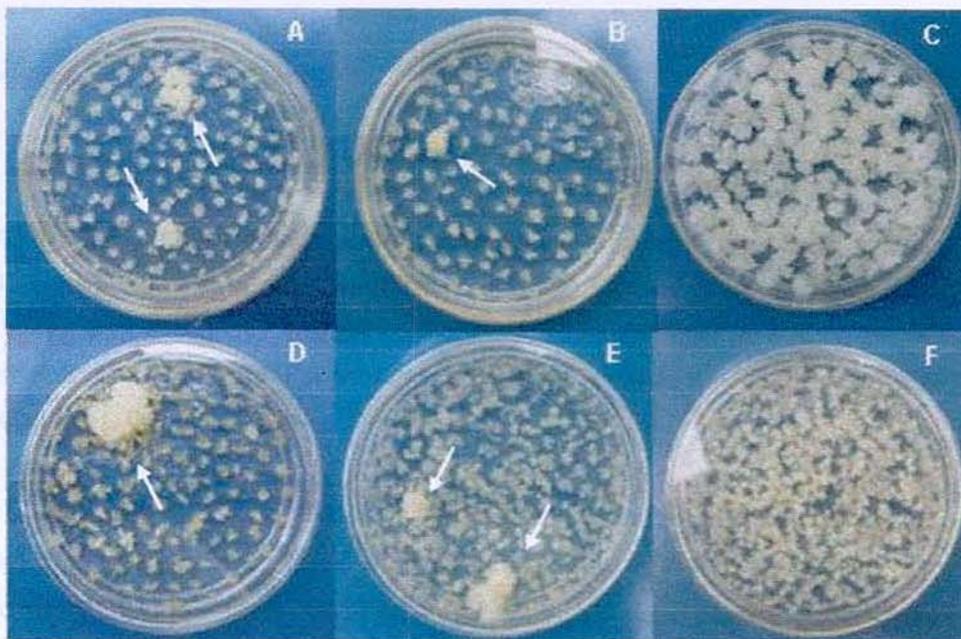


Figura 4.13: Sistema de seleção *in vitro* de calos bombardeados. A, B, D e E) Colônias indicadas pelas setas com 30 dias em meio de seleção com 9 mg/L de glufosinato de amônio (PPT). C) Material não transformado em meio MI sem herbicida. F) Controle negativo: material não bombardeado em meio MS suplementado com 9,0 mg/L de PPT.

Tabela 4.1: Número de placas bombardeadas e de colônias resistentes obtidas, sendo que cada colônia corresponde a um evento de transformação.

Construções:	P $\gamma$ -Kaf hGH	PUBI hGH	P $\gamma$ -Kaf proins.
Número de placas bombardeadas	48	24	22
Número de colônias resistentes	88	40	32

**Análise das plantas transgênicas produzidas em 2001**

**4.4. Hormônio do crescimento humano com promotor de sementes**

Das 88 colônias resistentes aos três ciclos de seleção no escuro, 35 produziram plantas, das quais 16 foram férteis. A análise da presença do transgene hGH em 15 dos 16 eventos que produziram sementes demonstrou a integração em todos os eventos analisados conforme mostra a Figura 4.14.

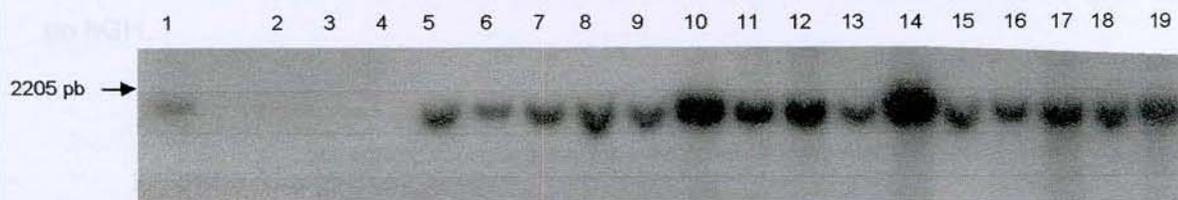


Figura 4.14: Southern blot de DNA genômico digerido com a enzima *Hind* III de plantas produzidas em 2001 com a construção pCAMBIA3301-P $\gamma$ Kaf hGH. 1) C+: 10 pg do plasmídeo pRT-P $\gamma$ Kaf hGH. 2 e 4) Controle negativo: plantas selvagens. 3) Controle negativo: Evento *Ev proins* 6 e 5 a 19) Eventos *Ev01 hGH* 1 a 15. Foi empregada uma sonda obtida a partir do produto de PCR com os primers hGH DIR e hGH INV.

A análise de western para avaliar a presença do hGH nos eventos positivos para Southern não mostrou o hormônio em nenhum evento. A região do cassete com o cDNA hGH do plasmídeo pCAMBIA 3301-hGH foi seqüenciada e constatou-se a presença de uma deleção, que resultou na formação de um *stop codon* já no peptídeo sinal (Figura 4.15). O sequenciamento foi repetido e o problema no cassete foi confirmado.

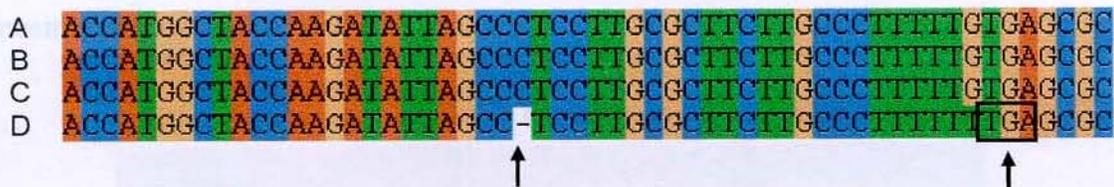


Figura 4.15: Alinhamento das seqüências dos plasmídeos utilizados no bombardeamento hGH em 2001 e em 2002. A e B) Novas construções empregadas em 2002: pCAMBIA3301 hGH A e pCAMBIA3301 hGH B. C) pRT- $\gamma$ Kaf hGH preparado a partir do estoque de glicerol original e D) Construção empregada em 2001. As setas indicam a deleção e o *stop codon* formado.

#### 4.5. Hormônio do crescimento humano com promotor de Ubiquitina

Foram obtidas plantas férteis de oito dos 40 calos resistentes aos três ciclos de seleção no escuro. Esses calos foram analisados por western para verificar a habilidade do promotor de ubiquitina de expressar o hGH nesse material somático. Conforme mostra a Figura 4.16, dos oito eventos férteis, dois expressaram em quantidades detectáveis por western blot uma banda com o mesmo peso molecular do hGH em calos. As análises de western blot realizadas com folhas e sementes dessas plantas não revelaram a presença do hGH.

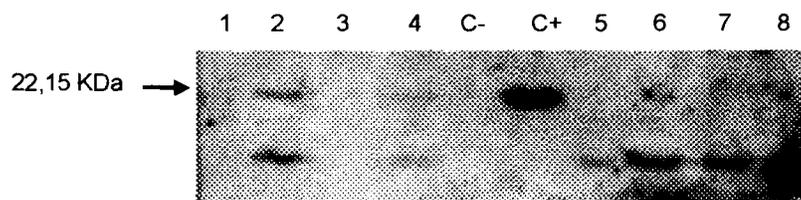


Figura 4.16: Western blot de extratos protéicos obtidos a partir de 200 mg de calos de eventos *Ev01 UBI hGH* em 1,0 mL de tampão de extração. Foram carregados 20  $\mu$ L da extração por canaleta. 1 - 4) Eventos 1 a 4 e 5- 8) Eventos 5 a 8.

#### 4.6. Pró-Insulina

##### 4.6.1. Análise da geração R0:

###### - Southern blot

Foram analisados 15 dos 18 eventos de pró-insulina que produziram sementes, que mostraram a integração do transgene em dez eventos (Figura 4.17). Este resultado foi coerente com a análise da presença do transgene por PCR realizada com as mesmas amostras (Figura 4.18).

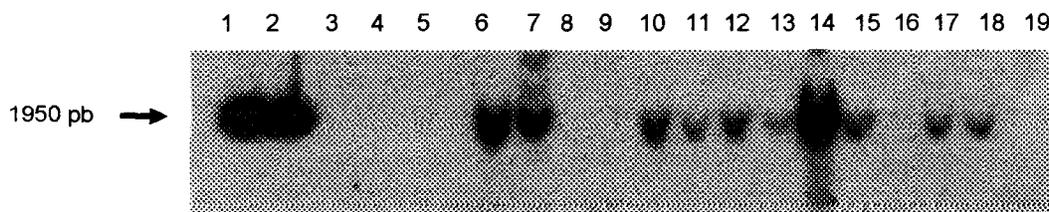


Figura 4.17: Southern blot de DNA genômico de plantas de pró-insulina. 1 e 2) C+: 100 e 10 pg do plasmídeo pRT $\gamma$ -Kaf proins digerido com *Hind* III. 3) Controle negativo: planta selvagem. 4) Planta do evento *Ev01 hGH 4 R0* e 5 a 19) Eventos *Ev proins 1 a 15 R0*. Foi empregada uma sonda construída a partir do produto de PCR com os primers PIN-DIR e PIN-REV.

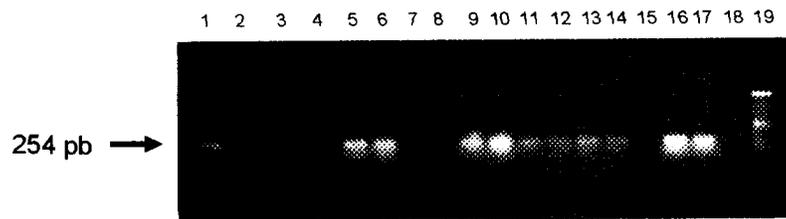
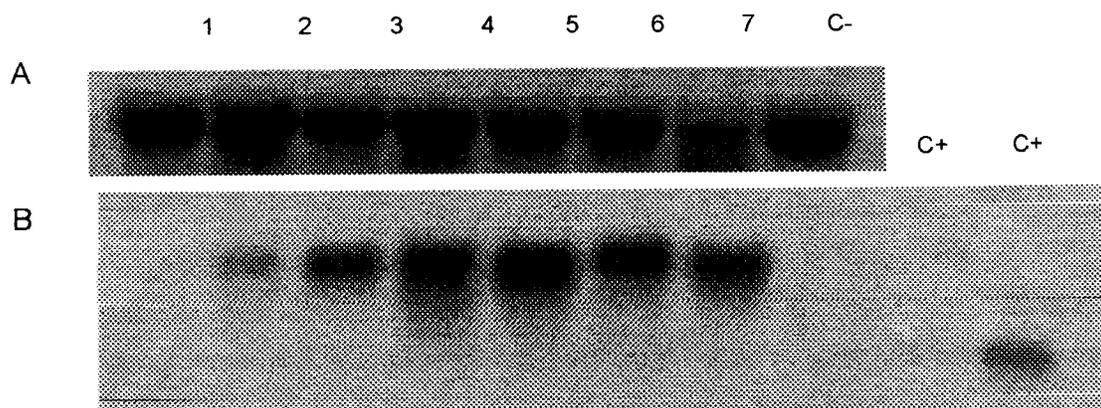


Figura 4.18: PCR de DNA genômico de plantas transgênicas de pró-insulina empregando os primers PIN-DIR e PIN-VER, que produzem um fragmento de 254 pb. 1) C+: plasmídeo pCAMBIA 3301 $\gamma$ -Kaf proins, 2) Controle negativo: planta não transformada, 3) Controle negativo: reação sem DNA. 4 a 18) Eventos *Ev proins 1 a 15 R0*. 19) Ladder 100 pb Gibco.

#### - Northern blot

A expressão do transgene foi analisada a partir do quinto DAP e apresentou um padrão semelhante a uma parábola, com um pico no vigésimo dia. Aparentemente a expressão do material *Ev proins 3 R1* ocorreu em níveis significativos até o trigésimo quinto DAP (Figura 4.19). As tentativas de extração de RNA total de material com 42 e 50 dias após polinização demonstraram que não ocorre mais a expressão gênica, o RNA é degradado nesse período ou, mais provavelmente, a metodologia de extração não foi adequada para esse tipo de material.



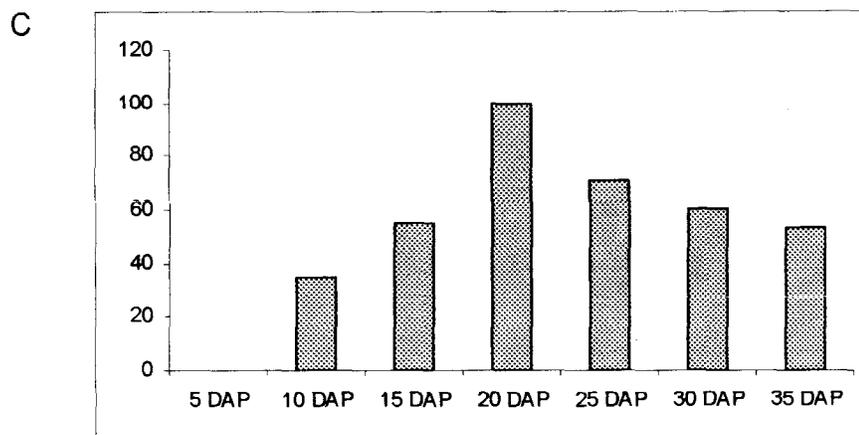


Figura 4.19: **A e B)** Northern blot de sementes de milho do *Ev proins 3 R1* com diferentes DAP. 1) 5 DAP, 2) 10 DAP, 3) 15 DAP, 4) 20 DAP, 5) 25 DAP, 6) 30 DAP, 7) 35 DAP, **C-)** RNA extraído de plantas selvagens. **C+)** 5 e 50 pg do pRT-pγKaf proins digerido com *Bam* HI e *Nco* I que libera um fragmento de 507 pb correspondente ao peptídeo sinal e o cDNA da pró-insulina. **A:** Hibridização contra a sonda 26S-ribossomal. **B:** hibridização contra uma a sonda construída a partir do produto de PCR com os primers PIN-DIR e PIN-VER. **C)** Curva do acúmulo de transcritos a partir da quantificação da intensidade das bandas do northern blot obtida por meio do programa Kodak 1D-versão 2.03- Scientific Images System. A hibridização contra o RNA 26S foi empregada para correção da quantidade de RNA total carregado em cada amostra. Cada barra está abaixo da canaleta correspondente das amostras de RNA.

#### - Western blot

O hormônio pró-insulina recombinante foi encontrado em 12 dos 16 eventos que produziram sementes outrora resistentes à seleção *in vitro* (Fig. 4.20). As sementes positivas que tiveram parte do endosperma retirado para análise de western foram reparadas com esmalte comercial para unhas (Figura 3.4 do matérias e métodos), germinadas em solo estéril e cultivadas em casa de vegetação para a geração de plantas R1. Foram analisadas aproximadamente 100 mg de farinha de endosperma obtida de quatro a cinco sementes de cada evento. A pró-insulina empregada como controle positivo tem 10,6 kDa porque tem uma calda de poli-histidina e a proteína nativa humana possui 9,4 kDa.

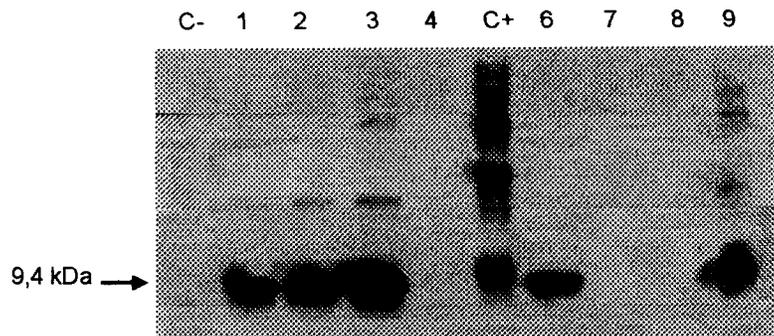
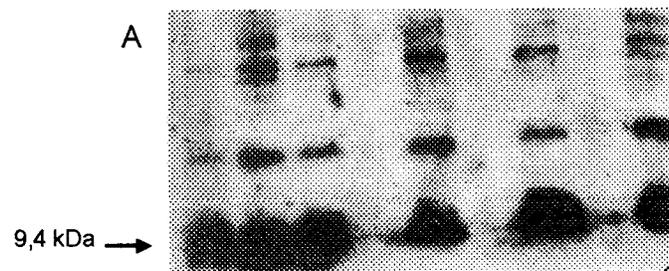


Figura 4.20: Western blot dos eventos de pró-insulina. Foram aplicados 20  $\mu$ L do extrato protéico de 100 mg de farinha de milho obtida de seis sementes de cada evento em 1,0 mL de tampão de extração. 1) Controle negativo: extrato de sementes selvagens. 2 a 5) Eventos 1 a 4. C+: 500 ng de pró-insulina. 6) Evento 17. 7 a 10) Eventos 5 a 7. A eletroforese foi realizada em gel SDS-PAGE de 15%.

#### 4.6.2. Análise da geração R1 de pró-insulina:

A partir do nível de expressão observado e do número de sementes produzidas na geração R0 foram cultivadas somente sementes que produziram a pró-insulina para obtenção do material em larga escala dos eventos *Ev proins 3 R0* e *Ev proins 7 R0*. A segunda geração desses clones demonstrou a herança da característica incorporada, produzindo a pró-insulina na maioria das sementes. Assim como foi observado nos eventos na geração R0, algumas sementes da geração R1 não produziram o hormônio recombinante (Fig. 4.21).



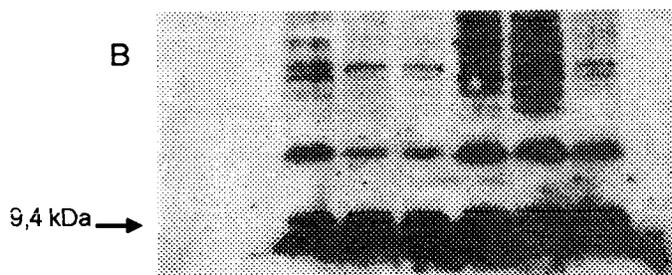


Figura 4.21: Western blot da segunda geração transgênica de pró-insulina. **A:** Dez sementes do *Ev proins 3 R1 espiga 1* e **B:** Dez sementes do *Ev proins 7 R1 espiga 1*.

#### 4.6.3. Análise da geração R2 de pró-insulina:

Foram cultivadas 100 sementes de uma única espiga do *Ev proins 3 R1 espiga 1* (Figura 4.22), das quais 95 foram férteis e produtivas. Primeiramente foram analisadas 20 espigas da geração R2 (terceira geração), das quais somente quatro apresentaram a expressão do hormônio. A Figura 4.23 apresenta o nível de expressão do material positivo dessa geração. A Figura 4.24 mostra uma análise de Southern blot quantitativo do número de cópias do transgene nas três gerações obtidas com o clone *Ev proins 3*. Aparentemente foram incorporados duas cópias do transgene que parecem estar segregando conjuntamente.

As espigas R2 apresentaram uma grande variedade de fenótipos, que demonstraram uma relação direta com a expressão do hormônio. O material que expressou o hormônio apresentou falhas na granação das espigas e conseqüente formato arredondado das sementes, com padrão de diferentes cores (Figuras 4.25 e 4.26). Outras dez espigas com essas características foram analisadas e todas apresentaram a produção do hormônio em altos níveis. Mais dez espigas bem granadas e com diferentes fenótipos foram analisadas e foi certificado que esse material realmente não produziu a pró-insulina. Das 95 espigas produzidas, 45 apresentaram o fenótipo produtivo. Foram cultivadas 100 plantas desse material para obtenção da quarta geração de sementes, que atualmente estão sendo analisadas.

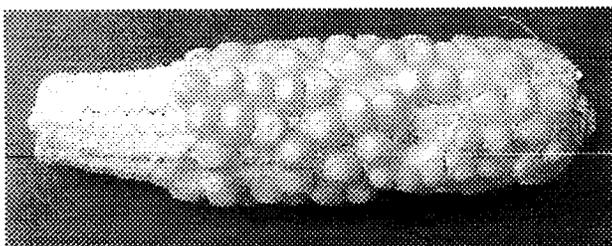


Figura 4.22: Espiga do clone *Ev proins 3 R1* escolhida para obtenção da terceira geração (R2).

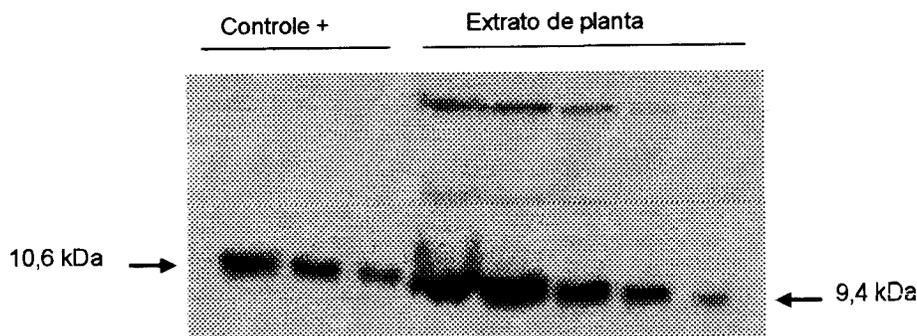


Figura 4.23: Western blot quantitativo do material da terceira geração do *Ev proins 3*. **Esquerda)** C+: 200, 100 e 50 ng da pró-insulina comercial. **Direita)** 30, 20, 10, 5,0 e 2,5  $\mu$ L da extração obtida de 100 mg da farinha em 1,0 mL de tampão.

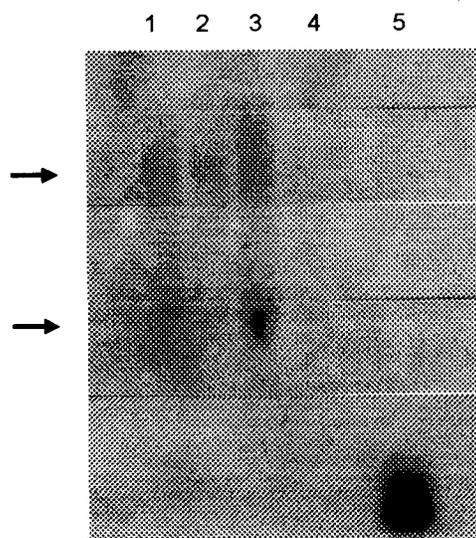


Figura 4.24: Southern blot de DNA genômico digerido com a enzima *Sac I* que possui somente um sítio no plasmídeo bombardeado, obtido de plantas das gerações R0, R1 e R2 do *Ev proins 3* (respectivamente nas canaletas 1, 2 e 3. 4) Controle negativo: DNA de planta não transformada. 5) C+: 100 pg do plasmídeo pRT-p $\gamma$ Kaf proins digerido com *Hind III*. Foi empregada uma sonda construída a partir do produto de PCR com os primers PIN-DIR e PIN-VER, que anela dentro do cDNA da pró-insulina. As setas indicam a posição das bandas obtidas.

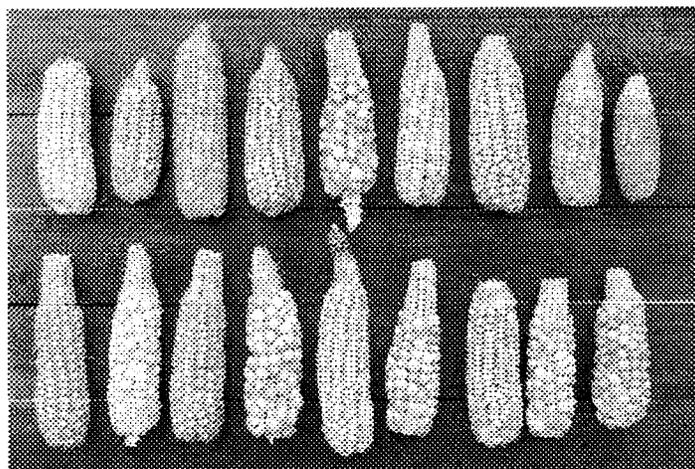


Figura 4.25: Amostra das 95 espigas do *Ev proins 3 R2*. A primeira espiga de cada linha corresponde ao genótipo A188 (**superior**) e à linhagem BR CTV (desenvolvida para Cultura de Tecidos Vegetais) (**inferior**). Excepcionalmente, os calos que deram origem ao evento *Ev proins 3* foram obtidos da F1 do cruzamento A188 ♂ X BR CTV ♀.

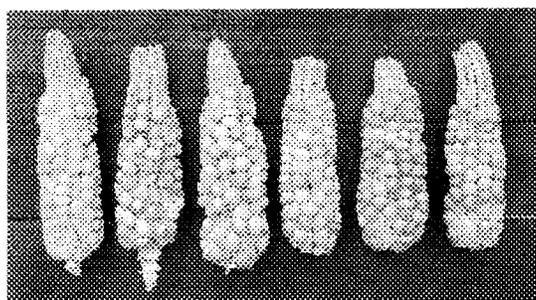


Figura 4.26: Espigas do *Ev proins 3 R2* que apresentaram falha na granação e produziram a pró-insulina.

#### 4.6.4. Imunohistoquímica

Esses ensaios demonstraram que a pró-insulina é encontrada somente na região do endosperma da semente (Figura 4.27). A diferença entre o material transgênico com as amostras negativas é observada pela coloração marrom. Essa coloração é devida à reação do substrato DAB com o anticorpo empregado, portanto, ocorrendo somente naqueles casos onde ocorreu a imunodeteção da pró-insulina.

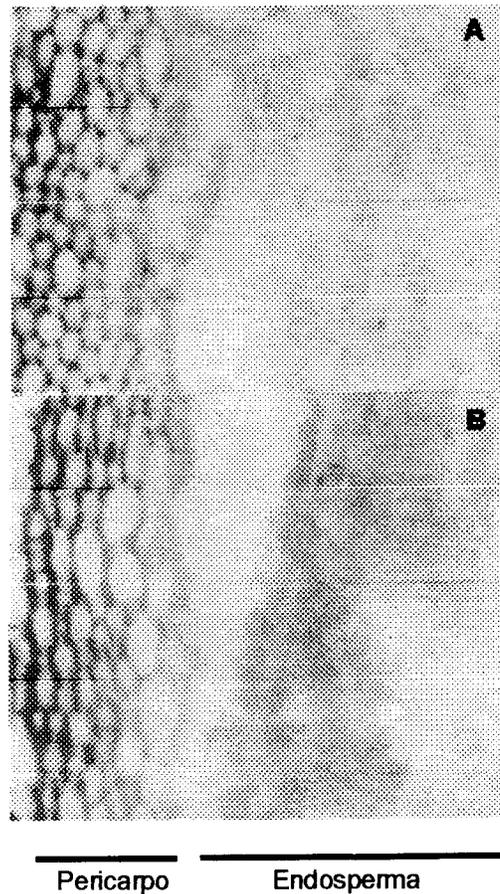


Figura 4.27: Imunohistoquímica de cortes de sementes de milho. A) Controle negativo. B) Semente de milho transgênico do evento *Ev proins 3 R1*. O material foi fotografado no microscópio Olympus PM-30, filme Prolmage 100 com o emprego de um filtro azul e aumento de 20 vezes

#### 4.6.5. Análise da tecido-especificidade da produção de pró-insulina

A Figura 4.28A demonstra que a produção da pró-insulina humana ocorreu somente no endosperma de sementes das plantas transgênicas. Esse resultado ratifica os primeiros estudos realizados com o promotor  $\gamma$ -Kafirina, por meio de ensaios de expressão transiente iniciados em 1990 (Freitas *et al*, 1994). A Figura 4.28B mostra ainda que a complexidade da mistura protéica no embrião é bem maior que no endosperma.

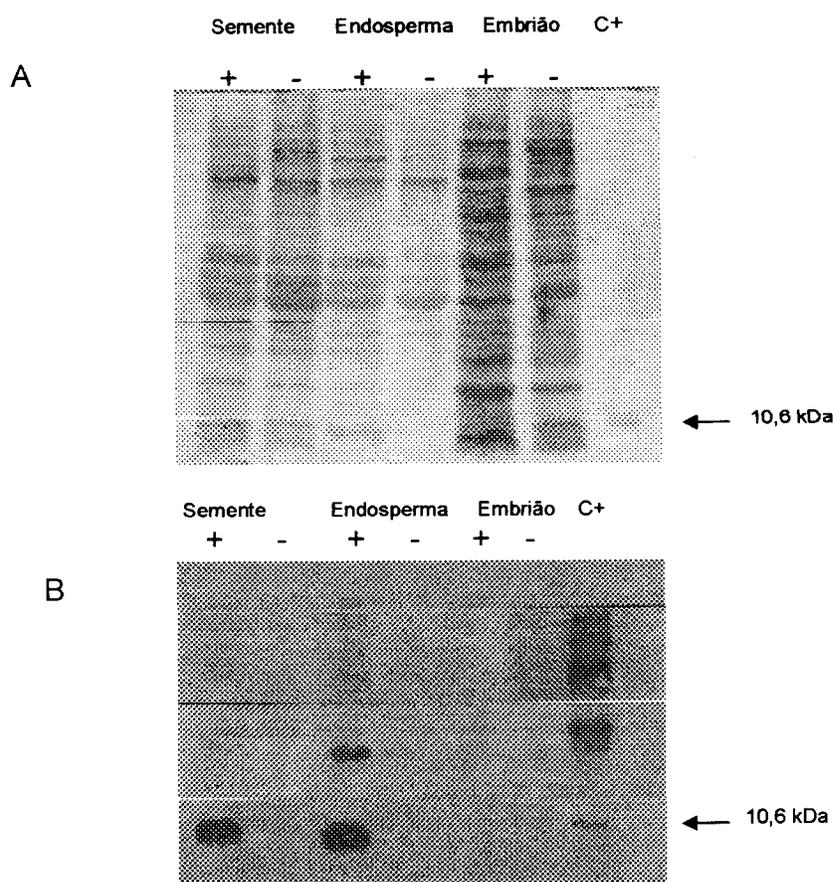


Figura 4.28 – Análise da tecido-especificidade da expressão da pró-insulina humana em sementes. Sinal (+): sementes transgênicas do *Ev proins 3 R1*. Sinal (-): sementes não transformadas. Foram carregados 5  $\mu$ L de um extrato protéico obtido de 100 mg de farinha de semente inteira ou de endosperma e de 50 mg de embriões, em 1 mL de tampão de extração. **A:** SDS-PAGE 14% corado com comassie blue. **B:** Western blot. C+) Pró-insulina comercial (Biobrás): 500 ng no gel corado e 200 ng no western blot.

#### 4.6.6. Isolamento de corpúsculos protéicos de endosperma de milho

A Figura 4.29 mostra o resultado obtido quando foi submetido um extrato protéico de endosperma de sementes *Ev proins 3 R1* a um gradiente descontínuo de sacarose por ultracentrifugação. A fração rica em lipídios ficou localizada na superfície do gradiente, a fração solúvel ficou difusa na região entre 0,2 e 0,5 M e um material mais denso, provavelmente correspondente aos corpúsculos protéicos, ficou localizado na interface basal entre 1,5 e 2,0 M de sacarose.

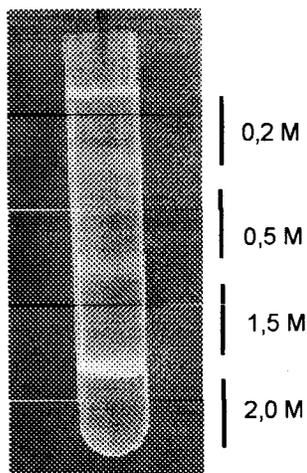


Figura 4.29: Gradiente de sacarose para isolamento de corpúsculos protéicos.

A análise da complexidade protéica das frações obtidas do gradiente em SDS/PAGE indica que a fração que ficou localizada na interface entre 1,5 e 2,0 M de sacarose demonstra um perfil de corpúsculos protéicos. A Figura 4.30 mostra que esse material possui uma baixa complexidade protéica, com uma grande quantidade de proteína (canaletas 6, 7 e 8). Já a fração solúvel mostra uma grande complexidade protéica, com alto peso molecular e baixa quantidade de proteína (canaletas 3, 4 e 5).

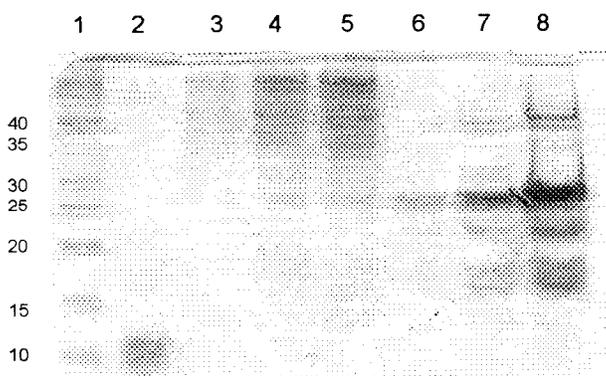


Figura 4.30: Gel SDS/PAGE das diferentes frações obtidas no gradiente. 1) Marcador de peso molecular em kDa. 2) C+: 1,0  $\mu\text{g}$  da pró-insulina comercial. 3 a 5) 5; 10 e 20  $\mu\text{L}$  da fração solúvel. 6 a 8) 5; 10 e 20  $\mu\text{L}$  da fração mais densa, provavelmente corresponde aos corpúsculos protéicos.

Os hormônios foram localizados na fração obtida na interface de 1,5 a 2,0 M de sacarose. Conforme mostra a Figura 4.31, somente as alíquotas correspondentes à fração onde provavelmente encontravam-se os corpúsculos protéicos apresentou a pró-insulina. Esse material teve que ser tratado com uma solução de 55% de isopropanol e

2% de  $\beta$ -mercaptoetanol para que fosse identificado o hormônio na análise de western blot. Esse tratamento teve como objetivo solubilizar as zeínas dos corpúsculos protéicos, liberando assim o hormônio armazenado, fato que reafirma o empacotamento da proteína heteróloga em estruturas organizadas.

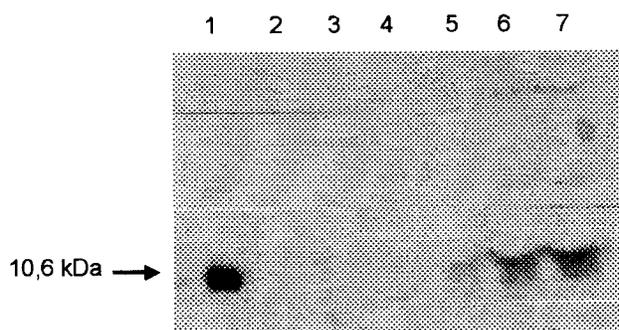
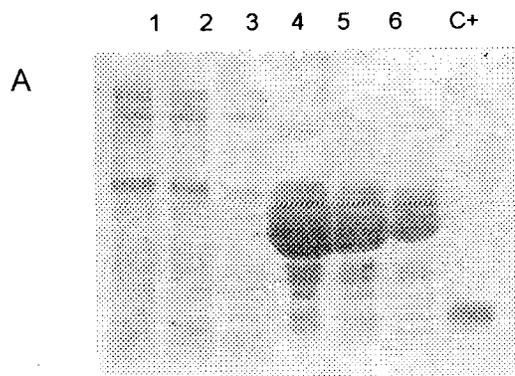


Figura 4.31: Western blot das frações obtidas do gradiente de sacarose: 1) Controle positivo: 200 ng da pró-insulina comercial 2 a 4) 5, 10 e 20  $\mu$ L da fração solúvel e 5 a 7) 5, 10 e 20  $\mu$ L da fração mais densa.

#### 4.6.7. Purificação da pró-insulina

##### 4.6.7.1. Extração

Para a maxi-extração da pró-insulina foi testado um tampão contendo 70% de etanol em 100 mM de glicina pH 3,0 e 5 mM de DTT. A Figura 4.32 mostra a diferença do rendimento e da complexidade protéica entre o tampão contendo detergente empregado nas análises de western e o tampão alcoólico.



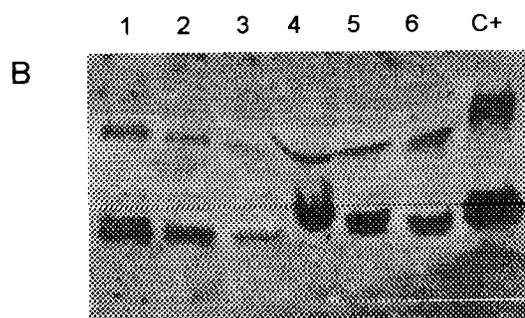
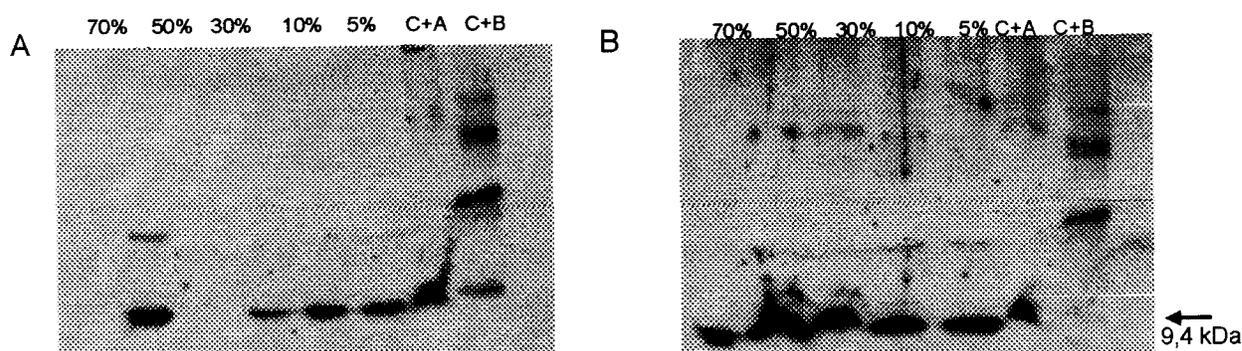


Figura 4.32: A) SDS/PAGE gel corado. B) Western blot. 1 a 3) tampão a base de detergente empregado na análise das sementes transgênicas. 4 a 6) tampão alcoólico, empregado na máxima extração de pró-insulina. Foram carregados respectivamente 20, 10 e 5  $\mu$ L das extrações. C+): 500 ng no SDS/PAGE e 200 ng western blot.

#### 4.6.7.2 Precipitação

A pró-insulina extraída de sementes de milho apresentou um perfil descontínuo de solubilidade em etanol. Depois de ter sido extraída em 70% de etanol, os ensaios de redução da concentração alcoólica mostraram que em 50% de etanol a pró-insulina torna-se insolúvel. Em outras concentrações o hormônio se divide entre a fração solúvel e o sedimento, conforme mostra a Figura 4.33. Esse resultado foi confirmado por um ensaio que precipitou a pró-insulina por meio da redução do etanol de 70% para 50%, e ressuspendeu a pró-insulina em 70% continuamente por cinco vezes, com a retirada e a análise de aliquotas em cada etapa (Figura 4.34). Conforme mostra essa figura, a cada precipitação em 50% de etanol, o material ficou mais puro com o descarte do sobrenadante. A partir da quarta precipitação percebe-se uma grande redução na concentração protéica desse descarte (canaleta 5 do Gel A da figura 4.34).



4.33: Western blot do ensaio de precipitação da pró-insulina de milho por meio da redução da concentração de etanol a partir da concentração de 70% empregada na extração. **A:** Fração solúvel da redução (sobrenadante). **B:** Fração insolúvel da redução (sedimento). **C+A:** extrato obtido pelo tampão de extração a base de detergente empregando a mesma relação de volume de tampão pela massa de farinha de milho da extração alcoólica. **C+B:** 50 ng de pró-insulina recombinante produzida pela Biobrás. A amostra 70% do gel A (gel dos sedimentos) foi obtida de uma extração com o tampão a base de detergente da farinha já submetida a extração com tampão alcoólico.

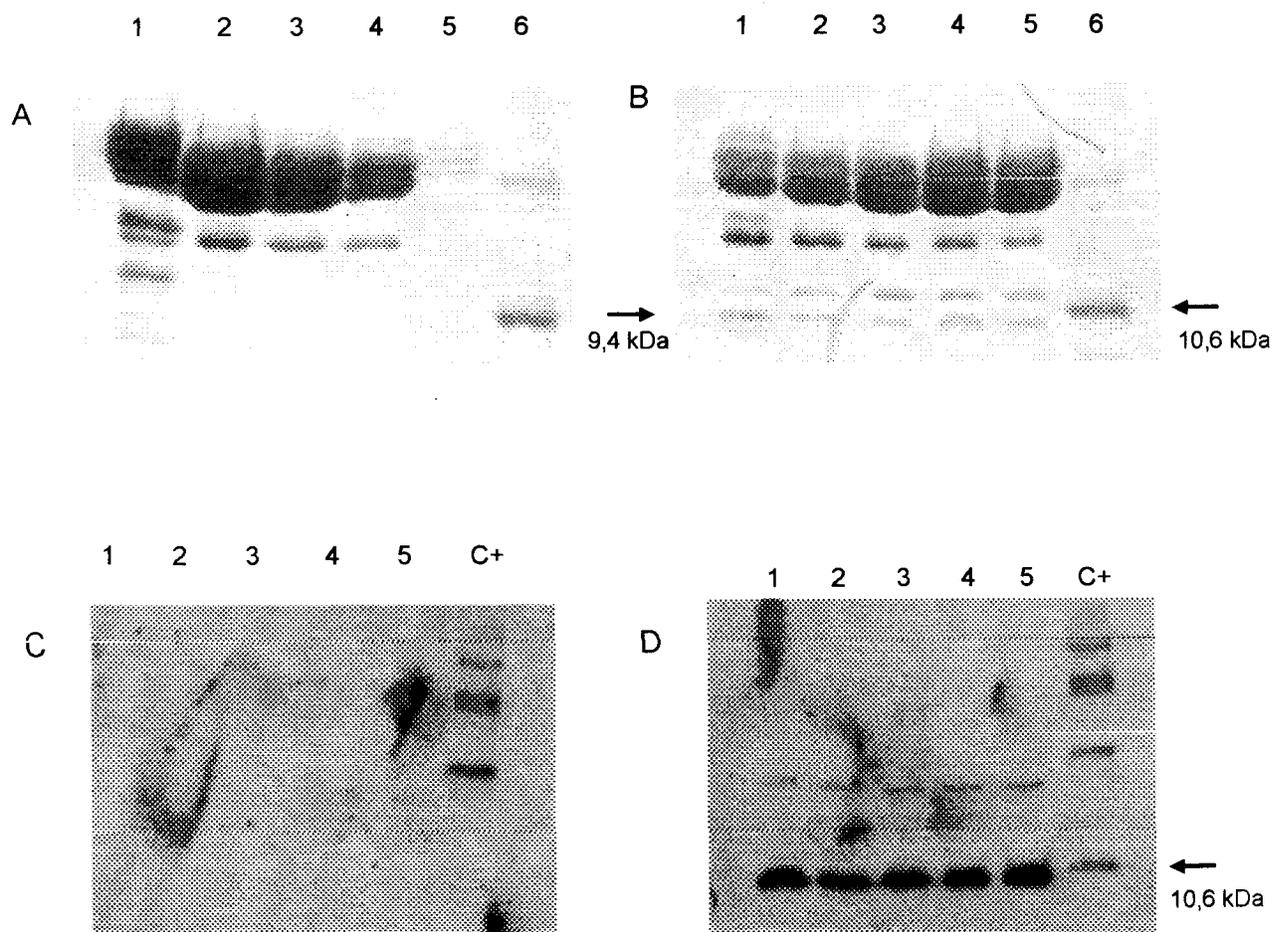


Figura 4.34: Ensaio de precipitação da pró-insulina por meio da redução da concentração de etanol de 70% para 50%. Figuras **A** e **C**: Sobrenadante da amostra em 50% de álcool. **B** e **D**: sedimento da amostra em 50% de etanol. Os números das canaletas correspondem ao número de vezes que a precipitação pela redução para 50% e solubilização do sedimento em 70% foi realizada. **C+**: 1,0  $\mu$ g nos géis corados (A e B) e 100 ng nos westerns (C e D) de pró-insulina comercial. Foram carregados 20  $\mu$ L do extrato de cada etapa do ensaio, obtido de 100 mg de farinha de sementes em 1,0 mL de tampão de extração.

### 4.6.7.3. Solubilização

O emprego de 4 M de uréia demonstrou ser o mais indicado para solubilizar a pró-insulina precipitada pela redução do etanol de 70% para 50% (Figura 4.35). O uso de 7 M de uréia parece não ter aumentado a quantidade de pró-insulina solubilizada, porém aumentou a complexidade protéica do extrato.

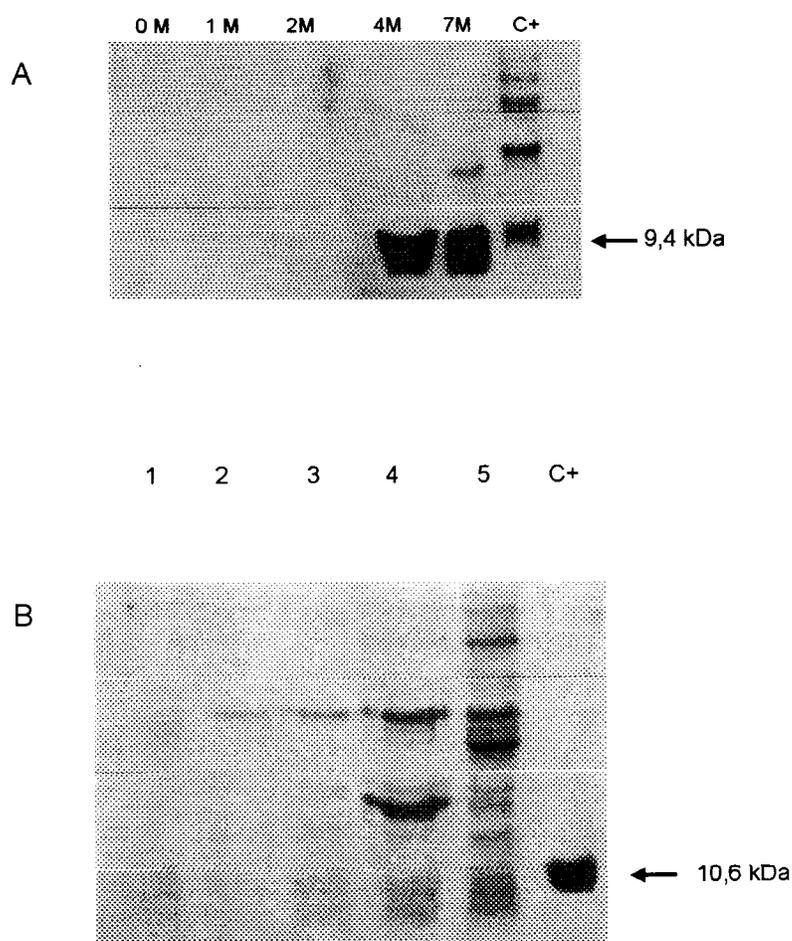


Figura 4.35: Ensaio de solubilização da pró-insulina em diferentes concentrações de uréia. **Gel A:** western blot. **Gel B:** SDS/PAGE de 15% corado. **1)** controle sem uréia. **2)** 1,0 M **3)** 2,0 M. **4)** 4,0 M **5)** 7,0 M de uréia. **C+)** Pró-insulina comercial: 200 ng no western blot, e 1,0 µg no SDS/PAGE.

#### 4.6.7.4. Cromatografia de troca iônica

A Figura 4.36 mostra o perfil de eluição obtido da cromatografia de troca iônica realizada com um extrato de sementes R1 do *Ev proins 3 R1*. As frações coletadas foram analisadas por meio de eletroforese em SDS-PAGE e western blot (Figura 4.37). As frações 40 a 47 indicadas no western correspondem às amostras coletadas no intervalo de 20 a 25 min. As frações imunorreativas apresentaram o mesmo tempo de retenção demonstrado pela pró-insulina padrão da BioBras.

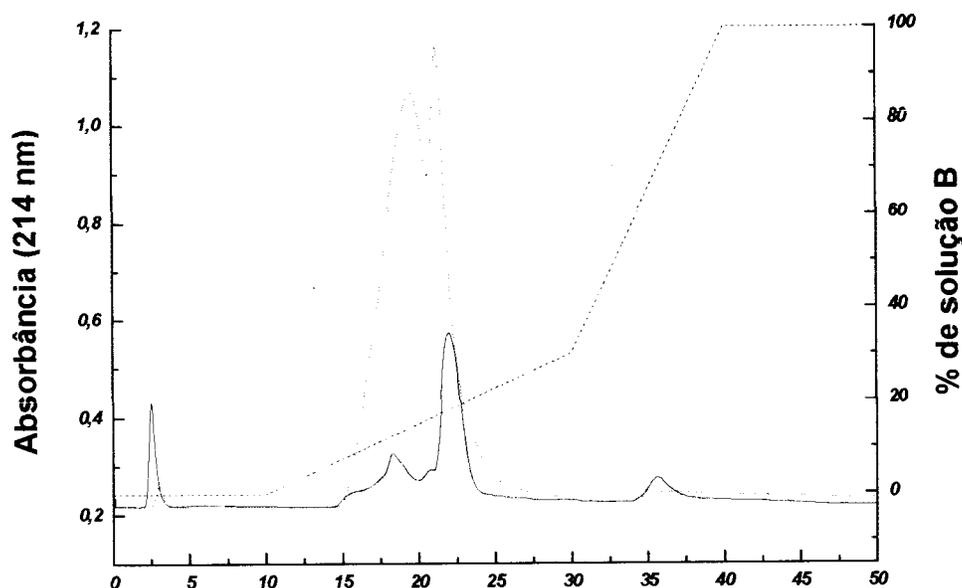


Figura 4.36: Perfil de eluição da cromatografia de troca iônica do evento *Ev proins 3 R1*. As linhas pontilhada e cheia representam os perfis de eluição de uma amostra de 2,0  $\mu\text{g}$  de pró-insulina (BioBras) e do extrato de endosperma de planta transgênica, respectivamente. A linha tracejada representa o percentual de solução B utilizado durante o processo cromatográfico.

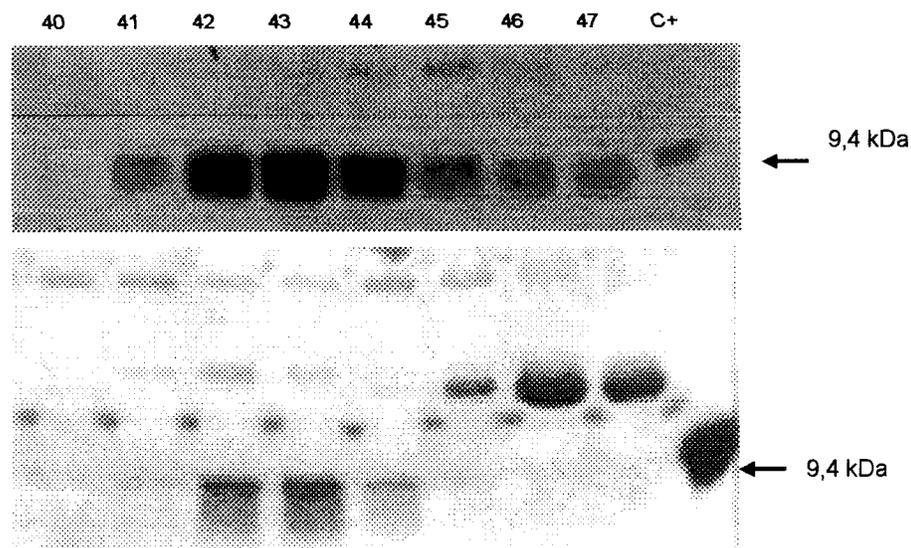


Figura 4.37: Análise da cromatografia de troca iônica do *Ev proins 3 R1*: A) Western blot B) Gel corado SDS/PAGE. Foram carregadas alíquotas de 20  $\mu$ L das frações correspondentes aos picos do cromatograma da figura 4.44. C+: 200 ng de pró-insulina no western e 3,0  $\mu$ g no gel corado.

#### 4.7. Ensaio de bombardeamento realizados em 2002 com o hGH:

Nesse último ano foi realizado um ensaio de transformação somente com a construção do hGH regulado pelo promotor específico de endosperma de semente, empregando calos do cruzamento Hy II-A x Hy II-B. Repetindo os mesmos sítios de clonagem no pCAMBIA 3301 foram obtidas duas novas construções a partir do estoque de glicerol, que diferem em relação à orientação 5' - 3' do cassete do hGH em relação aos outros três cassetes do plasmídeo (gene repórter *uidA*, resistência ao PPT e resistência à kanamicina).

Para cada nova construção foram preparadas 20 placas de bombardeamento que foram selecionadas em apenas dois ciclos. Entre a seleção e a germinação foi realizado um novo ciclo de cultivo de 20 dias em meio MS dos calos resistentes aos dois ciclos de seleção no escuro, suplementado com 9,0 mg/l de PPT e a metade da concentração de prolina e caseína do meio MI, com o objetivo de aumentar a taxa de regeneração e a qualidade das plântulas. Previamente foi testada a influência dessas fontes de nitrogênio reduzido na seleção e foi certificada a interferência negativa delas nesse processo (Figura 4.38).

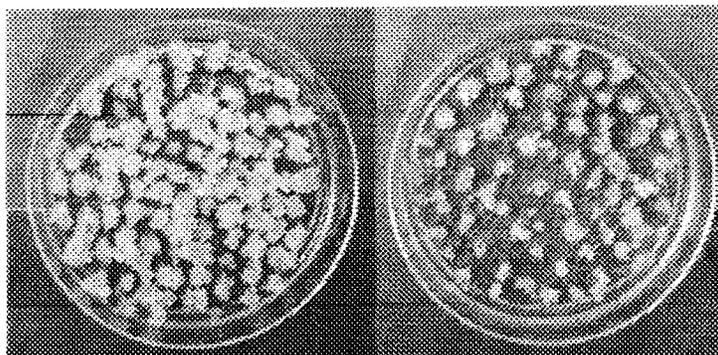


Figura 4.38: Análise da influência da prolina e da caseína na seleção com fosfotricina após 30 dias. **Esquerda)** Cultura selvagem em seleção com 9,0 mg/L de PPT em meio suplementado com 1,45 mg/L de prolina e 50 mg/L de caseína. **Direita)** Cultura selvagem em meio com 9,0 mg/L de PPT sem prolina e caseína.

#### - Southern blot

Foram obtidos 18 eventos com a construção do hGH A e 12 eventos com a construção hGH B. Desses 30 eventos, 25 regeneraram plantas, das quais 21 foram férteis. Até a data da confecção dessa tese foram analisados a integração do transgene hGH em 10 eventos. Conforme mostra a Figura 4.39 provavelmente desses dez eventos, cinco apresentaram o gene do hGH (canaletas 1, 2, 6, 7 e 9).

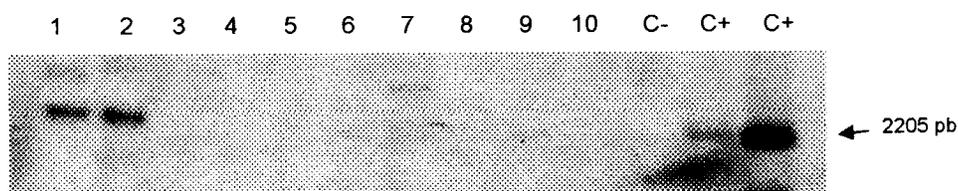


Figura 4.39: Southern blot de DNA genômico de plantas produzidas em 2002 com as construções pCAMBIA  $p\gamma$ -Kaf hGH A e B, digerido com a enzima *Hind* III que libera o cassete de expressão com o cDNA do hGH,. 1-10) Eventos *Ev02 hGH 1 a 10*. C-: DNA de planta selvagem. C+: 10 e 100 pg do plasmídeo pRT- $p\gamma$ Kaf hGH digerido. Foi empregada uma sonda obtida a partir do produto de PCR com os primers hGH DIR e hGH INV.

#### - Análise da primeira geração por Western blot

A produção do hGH foi analisada em três eventos negativos para o Southern blot e em nenhum deles foi encontrada a proteína. Todos os cinco eventos que apresentaram a integração do transgene produziram o hGH. Primeiramente foram realizados ensaios com

sementes de 20 DAP dos eventos *Ev02 hGH 1 R0* e *Ev02 hGH 2 R0* (Figura 4.40). Uma segunda banda reativa ao anticorpo policlonal empregado com tamanho menor ao esperado foi observada. Os eventos *Ev02 hGH 6, 7 e 9* também produziram hGH (analisados com sementes maduras) e demonstraram essa segunda banda reativa ao hormônio empregado com um intensidade parecida a observada com o material analisado com 20 DAP, não existentes nos controles negativos.

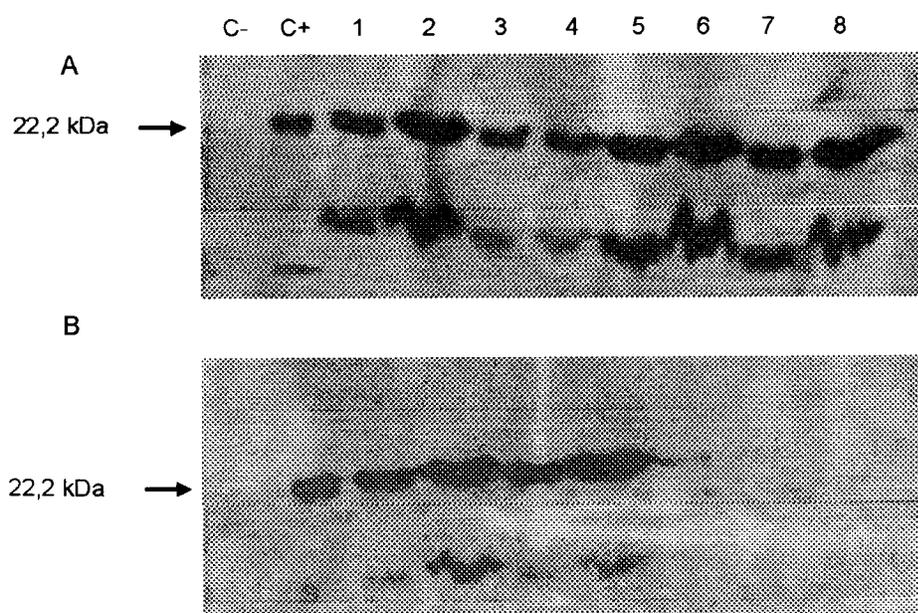


Figura 4.40: Western blot dos eventos *Ev02 hGH 1* (A) e *Ev02 hGH 2* (B). C-: extrato de plantas selvagens. C+: 100 ng do hGH comercial. 1 a 8) Quatro sementes de 20 DAP, carregados 10 e 20  $\mu$ L alternadamente de uma amostra obtida de 100 mg de endosperma em 1,0 mL de tampão de extração.

#### **- Análise da segunda geração por Western blot**

Foi analisado a herança do transgene e da expressão em uma espiga do evento *Ev02 hGH 1* com 20 DAP. A Figura 4.41 mostra que houve a produção de hGH e altos níveis nesse material.

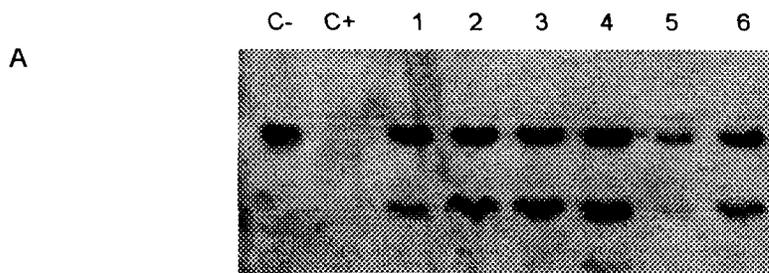


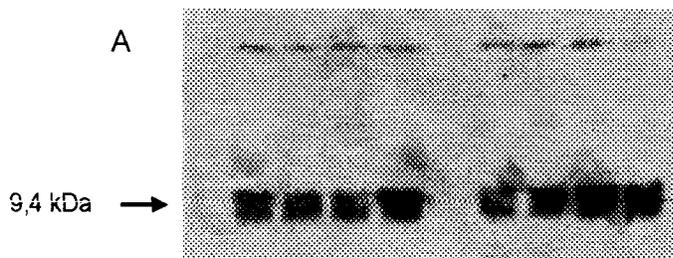
Figura 4.41: Western blot do evento *Ev02 hGH 1 R*. **C+**: 100 ng do hGH comercial **C-**: extrato de plantas selvagens. **1 a 6)** seis sementes de 20 DAP da segunda geração de uma mesma espiga. Foram carregados 20  $\mu$ L da amostra obtida de 100 mg de endosperma em 1,0 mL de tampão de extração.

#### 4.8. Análise do cruzamento QPM X eventos transgênicos

##### 4.8.1. QPM X Pró-insulina

As sementes obtidas do cruzamento do *Ev proins 3 R1* e do *Ev proins 7 R1* com plantas selvagens da linhagem QPM BR 451 expressaram a pró-insulina já na F1 (Figura 4.42). As plantas F2 foram analisadas por PCR e apresentaram a amplificação de um fragmento com tamanho esperado (Figura 4.43).

Somente o material cruzado com *Ev proins 3 R1* foi retrocruzado com plantas selvagens QPM ou autofecundado. A Figura 4.44 mostra o nível de expressão da segunda geração do material obtido do cruzamento autofecundado (geração F2). Nesse material também foi observado o mesmo tipo de relação entre o fenótipo da espiga e a expressão da pró-insulina na segunda geração do material QPM. As espigas com falhas na granação de sementes e de forma arredondada produziram altos níveis a pró-insulina, já a espigas com fenótipo do material QPM selvagem não produziram o hormônio (Figura 4.45).



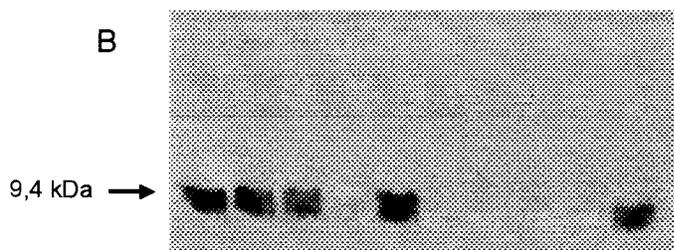


Figura 4.42: Western blot do cruzamento QPM ♀ X linhagem transgênica ♂ F1. Foram analisadas 10 sementes de cada cruzamento. A: QPM ♀ X *Ev proins 3* ♂. B: QPM ♀ X *Ev proins 7* ♂. Foram carregados 20  $\mu$ L do extrato total de sementes obtido de 100 mg de farinha de sementes maduras em 1,0 mL de tampão de extração em SDS-PAGE com 15% de acrilamida.

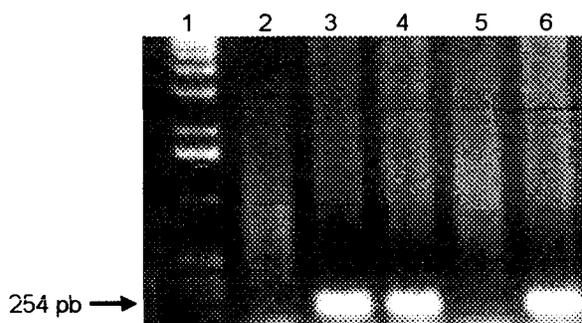
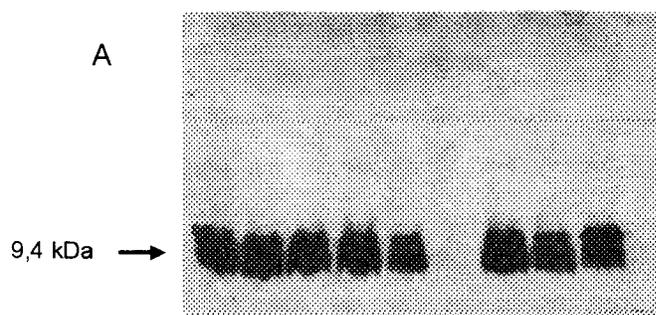


Figura 4.43: PCR de DNA genômico do material híbrido da geração F2. 1) Ladder 1 Kb Gibco, 2 e 5) Controle negativo, DNA de plantas não transformadas, 3) QPM X *Ev proins 3 R1*. 4) QPM X *Ev proins 7 R1*. 6) C+: plasmídeo pCAMBIA3301  $\gamma$ -Kaf proins. Foram empregados os primers PIN-DIR que produzem um fragmento de 254 pb.



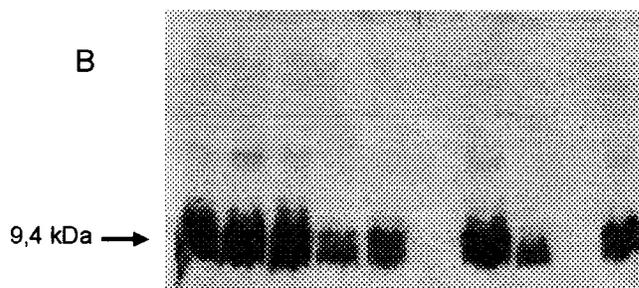


Figura 4.44: Western blot da F2 do cruzamento QPM ♀ X *Ev proins 3 R1* ♂. Foram analisadas 10 sementes com as mesmas condições do western blot 4.25. **A:** QPM ♀ X *Ev proins 3 R1* ♂ **espiga** **Ã.** **B:** QPM ♀ X *Ev proins 3 R1* ♂ **espiga B** da figura 4.34.

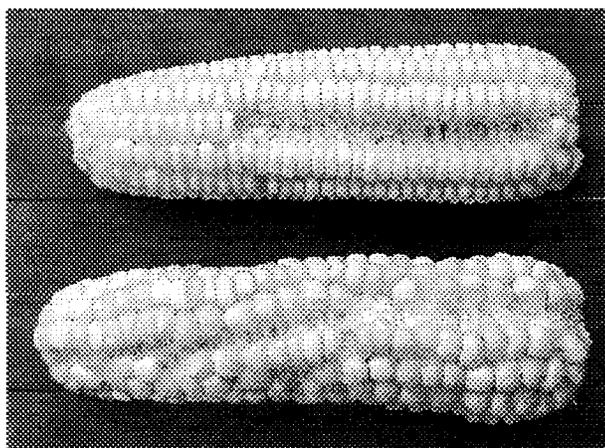


Figura 4.45: Espigas da F2 do material QPM ♀ X *Ev proins 3 R1*: **Superior)** QPM ♀ X *EB01 proins 3 R1* ♂ **espiga C**, que não produziu a pró-insulina. **Inferior)** QPM ♀ X *EB01 proins 3 R1* ♂ **espiga B**. As sementes retiradas foram analisadas individualmente por western blot, como mostra a Figura 4.33. Existem aproximadamente 30 sementes por linha na espiga superior e 20 sementes por linha na espiga inferior.

#### 4.8.2. QPM X Hormônio de crescimento humano

Foram realizados cruzamentos com a linhagem QPM de todos os cinco eventos que produziram o hGH obtidos em 2002 (*Ev02 hGH 1, 2, 6, 7 e 9 R0*). Desse material por enquanto foi analisado a produção do hGH dos híbridos obtido com os eventos *Ev02 hGH 1 R0* e *Ev02 hGH 2 R0*. A Figura 4.46 mostra a produção do hGH em sementes com 50 DAP do QPM ♀ X *Ev02 hGH 1 R0* ♂ e a Figura 4.47 mostra a expressão estimada por western quantitativo no QPM ♀ X *Ev02 hGH 2 R0* ♂.

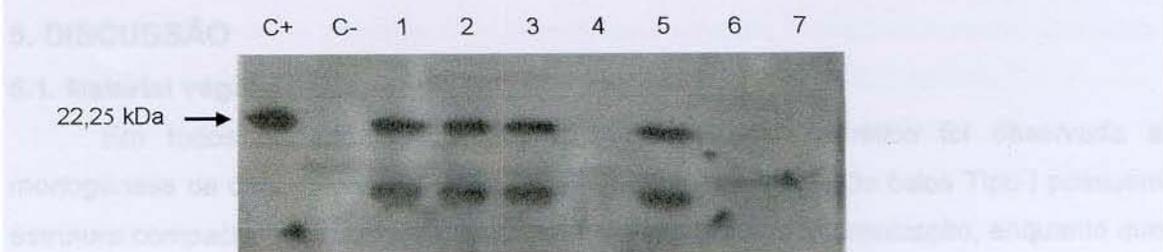


Figura 4.46: Western blot do QPM ♀ X *Ev02 hGH 1 R0* ♂ F1. Extrato obtido de 100 mg de farinha de sementes maduras em 1,0 mL de tampão de extração. **C+**: 100 ng do hGH comercial. **C-**: extrato de plantas não transformadas. **1 a 7)** respectivamente sete sementes da F1.

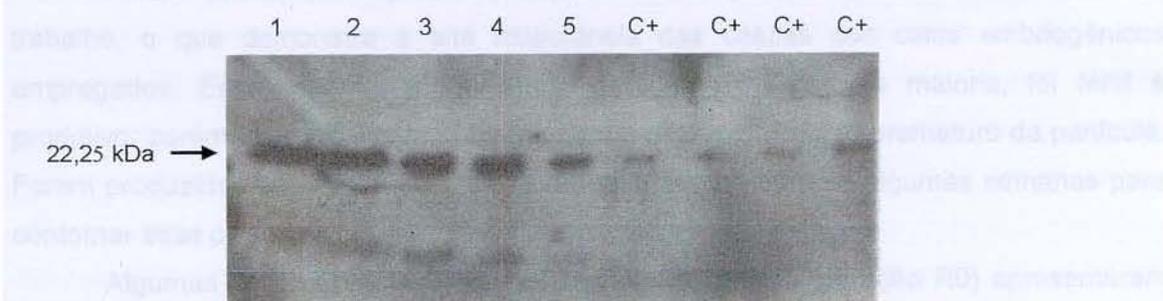


Figura 4.47: Western blot quantitativo do evento QPM ♀ X *Ev02 hGH 2 R0* ♂ F1. Extrato obtido de uma semente madura da mesma forma realizada no ensaio anterior. **À esquerda** foram carregados 30; 25; 20; 15 e 10,0  $\mu$ L da amostra. **À direita** foram carregados 12,5; 25; 50 e 100 ng do hGH comercial.

## 5. DISCUSSÃO

### 5.1. Material vegetal

Em todos os ensaios de obtenção de material somático foi observada a morfogênese de dois grupos de calos, denominados Tipo I e II. Os calos Tipo I possuem estrutura compacta, baixa taxa de crescimento e alto grau de diferenciação, enquanto que os calos Tipo II apresentam estruturas altamente friáveis, pouco diferenciadas e com alta taxa de crescimento (Claparols, 1993; Armstrong, 1994). Devido principalmente ao grau de totipotência e transfectibilidade de suas células, esse segundo tipo de calo é o mais empregado na transformação genética de plantas de milho, tendo sido, portanto, empregado neste trabalho.

Foram produzidas aproximadamente 20.000 plantas durante os 5 anos de trabalho, o que demonstra a alta totipotência das células dos calos embriogênicos empregados. Esse material (denominado geração R0), na sua maioria, foi fértil e produtivo, porém foi normalmente observado um desenvolvimento prematuro da panícula. Foram produzidas entre 20 a 30 plantas de cada evento durante algumas semanas para contornar esse problema.

Algumas poucas plantas geradas de culturas *in vitro* (geração R0) apresentaram um fenótipo atípico, como inflorescência feminina apical, plantas anãs e/ou múltiplas espigas oriundas do local de uma mesma gema lateral. No entanto, normalmente o fenótipo selvagem era reconstituído naturalmente na geração seguinte desse material. As sementes que tiveram parte do endosperma retirada para análise de western blot não apresentaram problemas de germinação e também foram férteis.

### 5.2. Transformação via agrobactéria

A transformação envolvendo cereais por agrobactéria foi muito especulada quando foram publicados os primeiros trabalhos convincentes com transformação em arroz (Hiei *et al.*, 1994) e principalmente com milho (Ishida *et al.*, 1996). Nessa tese foram empregados os mesmos vetores super-binários de transformação, o mesmo material vegetal e exatamente a mesma metodologia descrita por esses autores e nenhum transgênico foi obtido. Sequer um calo realmente resistente à seleção *in vitro* foi estabelecido.

Os pesquisadores da EMBRAPA - Milho e Sorgo trabalharam exaustivamente com esse modelo de transformação por alguns anos e também não obtiveram nem ao menos calos resistentes (Carvalho, CHS - comunicação pessoal). Atualmente esse estudo em

milho foi abandonado e somente o modelo direto de transformação está sendo conduzido naquele que é o centro de transformação de milho mais desenvolvido no Brasil.

Desde que foram publicados os primeiros trabalhos com transformação indireta de cereais, alguns poucos autores repetiram esse modelo, sem repetir a mesma eficiência descrita por Ishida *et al.* em 1996. Provavelmente o mais eficiente tenha sido Frame *et al.*, (2002) que descreveram uma taxa de 5,5% de transformação de embriões zigóticos imaturos empregando apenas um vetor binário. Esses vetores diferem pelo grau de virulência dos genes das cepas de agrobactéria empregados. Talvez alguns detalhes não tenham sido meticulosamente descritos pelo grupo japonês ou o acaso esteve envolvido em todos os ensaios de agrotransformação permanente realizados em nosso laboratório e na EMBRAPA – Milho e Sorgo.

Os ensaios de expressão transiente com agrobactéria realizados em 2001 que tiveram o intuito de resolver algumas questões trouxeram ainda mais dúvidas. Alguns poucos casos de expressão de GUS foram observados. Os ensaios eram repetidos sem nenhuma variação, mas nenhuma repetição dos resultados foi observada. Pode ser que esse problema seja decorrente dos explantes empregados. É muito comum em ensaios de cultura de tecidos de plantas a ocorrência de variação significativa dentro de um mesmo tratamento quando são empregados explantes vegetais cultivados em diferentes épocas (Altman e Goren, 1974). O milho é uma planta sazonal, apresentando uma grande variação fenotípica entre plantas cultivadas no verão e no inverno, mesmo em casa de vegetação.

O emprego da sonicação em embriões zigóticos de milho na expressão transiente mediada por agrobactéria mostrou incrementar a produção da proteína GUS, indicando melhora na eficiência de transformação, corroborando com os resultados descritos com soja e outras dicotiledôneas (Trick e Finer, 1998). Essa técnica mimetiza as condições naturais de agrotransformação, com a produção de microferimentos. Dessa forma as células epidérmicas tornam-se mais susceptíveis à transformação, devido provavelmente ao aumento da porosidade da parede celular e/ou indução da síntese de fatores envolvidos na virulência da agrobactéria resultante do estímulo produzido por compostos fenólicos exudados do ferimento vegetal. Porém, em soja o modelo morfogênico de multiplicação *in vitro* mais empregado é a organogênese. Em milho, que não apresenta resposta convincente à organogênese, a sonicação diminui significativamente a taxa de embriogênese conforme demonstrado.

Para desestímulo final, adicionalmente em alguns ensaios com agrobactéria ocorreram problemas com a expressão de GUS em controles negativos, que foram parcialmente contornados pela adição de metanol e/ou carbenicilina no tampão de revelação com o substrato de GUS. No início de 2001 essa tese tinha apenas mais dois anos para ser definida e até então nenhum objetivo tinha sido concretamente alcançado. Diante de tal fato, da escassez de trabalhos na literatura de agrotransformação em cereais e dos problemas decorrentes da transformação via agrobactéria observados em nosso laboratório e em Sete Lagoas na Embrapa, apenas o modelo direto continuou a ser conduzido no Laboratório de Plantas do CBMEG para transformação de milho.

### **5.3. Bombardeamento**

#### **5.3.1. Ensaio realizado em 1999 e 2000**

No primeiro ano de bombardeamento não foi produzida nenhuma planta transgênica. A estratégia adotada de seleção não incluía agente seletivo na fase de germinação e, como a seleção não foi efetiva na fase escura, foram produzidas 4.000 plantas. No ano seguinte foi estendido o período de seleção até o segundo ciclo de germinação. O agente seletivo fosfinotricina é mais efetivo na inibição do crescimento de tecidos verdes porque a isoforma da enzima glutamato-sintase produzida em cloroplastos apresenta maior sensibilidade a esse agente seletivo, por isso a seleção na luz é mais efetiva (Dennehey *et al.*, 1994).

No segundo ano de transformação foi adotado um critério mais rígido na escolha visual dos setores embriogênicos bombardeados a cada sub-cultura de seleção. Desta forma foram também descartados setores que aparentemente apresentaram estresse médio ao agente seletivo, aumentando assim a qualidade da cultura e diminuindo o número de escapes.

Nesses primeiros três anos de trabalho (entre 1998 e 2000) foi utilizado somente o plasmídeo com o cDNA do hGH nas transformações. O fato de apenas uma das 42 plantas transgênicas obtidas nesse período ter produzido o hGH possivelmente foi devida à estratégia de co-transformação. Nesse tipo de transformação, o sucesso depende da ocorrência de dois eventos de integração simultâneos na mesma célula. Não foi determinada a origem dos calos que geraram essas 42 plantas, pois naquela época os calos não eram individualizados a cada ciclo de seleção devido ao grande número de sub-cultivos feitos (seis) e do volume do material trabalhado. Dessa forma pode ser que todas

as outras 41 plantas produzidas ou parte delas fossem oriundas de um só evento, podendo ter ocorrido na verdade entre 2 e 42 eventos de transformação genética.

### **5.3.2. Ensaio realizado em 2001**

Tomando conhecimento da eficiência de transformação de milho obtida pelos pesquisadores da EMBRAPA – Milho e Sorgo, em Sete Lagoas - MG, foi estabelecida uma colaboração com esse centro de pesquisa. Nos três primeiros anos de transformação foi empregado um acelerador de partículas construído no próprio CBMEG. Em Sete Lagoas é empregado um acelerador de partículas produzido em série pelos pesquisadores da EMBRAPA – Recursos Genéticos, Brasília -DF.

Por muito tempo o acelerador de partículas do CBMEG foi extremamente útil na análise de promotores e no estudo da regulação da expressão gênica, onde ocorria apenas expressão transiente de genes repórteres. Entretanto, efetivamente para a transformação estável de calos de milho e produção de plantas transgênicas, em mais de dez anos de trabalho, só houve o ensaio ocorrido em 2000 com hGH.

Provavelmente a velocidade aplicada nas micropartículas pelo antigo aparelho provocava danos irreparáveis aos calos, que eram freqüentemente lançados para fora da placa de bombardeamento com o disparo. As micropartículas não dispersavam quando a força era reduzida, ocasionando aglomeração dos projéteis em poucos pontos da placa. Nos ensaios com o bombardeador da EMBRAPA foi observada uma dispersão das micropartículas muito maior com o emprego da mesma força de disparo, sem mover os calos da placa de bombardeamento. O emprego de micropartículas de tungstênio devido a sua cor cinza, permite uma rápida observação visual da dispersão do material. Adicionalmente, o uso das membranas “kapton” ao invés das telas de aço como base da preparação de micropartículas provavelmente colaborou para o aumento da dispersão.

Em 2001 foram gerados a partir de 86 placas de bombardeamento 160 calos resistentes à seleção (Tabela 4.1 dos resultados), contra um evento gerado com o hGH em 2000 e nenhum em 1999. As demais diferenças das metodologias empregadas na transformação de milho em nosso laboratório e no Laboratório de Biologia Celular do Núcleo de Biologia Aplicada - NBA de Sete Lagoas provavelmente colaboraram para a grande eficiência na obtenção de eventos resistentes à seleção obtida a partir de 2001. Além do novo acelerador de partículas, a troca do agente seletivo melhorou a eficiência da seleção. O sal Bialaphos (Sigma) não demonstrava um efeito severo aos calos selvagens como foi observado pelo produto agropecuário Finale. A seleção era executada

por 120 dias, em seis sub-cultivos com doses de até 25 mg/L de Bialaphos. Com o Finale em 2002 foram conduzidos apenas dois sub-cultivos de 20 dias em 4,5 e 9,0 mg/L de fosfinotricina. Essa diferença pode ser oriunda de um problema específico da amostra do sal Bialaphos de nosso laboratório ou que realmente a molécula sintética glufosinato de amônio (PPT) seja mais eficiente que o produto obtido de fungos na seleção de calos de milho.

A partir de 2001 o sistema de co-integração foi substituído pelo sistema de integração simples, no qual todos os cassetes estão reunidos em um só plasmídeo. Desta forma, a transformação depende de um só evento de integração, porém com o emprego de um plasmídeo maior. A estratégia de co-transformação permite a obtenção de plantas somente com o gene de interesse por meio da segregação diferencial dos diferentes cassetes entre as gerações. No entanto, essa vantagem não se aplica ao nosso tipo de pesquisa. O decorrer desse trabalho demonstra que a estratégia de integração simples parece ser muito mais efetiva.

Somente os ensaios de bombardeamento foram executados em Sete Lagoas. O cultivo de plantas selvagens, a produção de calos (na grande maioria dos ensaios), a seleção, a germinação dos embriões somáticos e o cultivo e a análise das plantas transgênicas foram realizados no Laboratório de Plantas do CBMEG. O material foi cuidadosamente transportado de carro, não tendo sido observado nenhum problema na qualidade das culturas oriundo desse tipo de transporte.

### **5.3.3. Ensaios realizados em 2002**

A partir de julho de 2002 o bombardeamento voltou a ser executado no CBMEG com o emprego do canhão da BioRad. Nesse aparelho, o disparo ocorre com o estouro dos três discos de "kapton" pela pressão do hélio. No aparelho da EMBRAPA existe uma agulha que perfura os discos liberando o gás. Esse mecanismo de agulha proporciona um disparo mais preciso. Nos ensaios realizados em 2002 não foi observada a mesma dispersão das micropartículas outrora obtida em Sete Lagoas. É importante salientar que muitas variáveis podem influenciar a qualidade de um disparo, desde a pureza do DNA até a umidade do ambiente de trabalho.

Foram preparadas 40 placas de bombardeamento, que geraram 28 eventos resistentes à seleção *in vitro*, dos quais 23 foram férteis. A relação do número de calos resistentes obtidos pelo número de placas bombardeadas em Sete Lagoas em 2001 foi mais do dobro que o obtido com o novo canhão em 2002 no CBMEG. Baseado nesses

resultados e na taxa de transformação comumente obtida pelos pesquisadores de Sete Lagoas (Carvalho, CHS – comunicação pessoal), o aparelho produzido pela Embrapa parece ser mais eficiente que o da BioRad.

Em 2002 foi implementado um sub-cultivo de 20 dias em meio de seleção com 9,0 mg/L do agente seletivo com a metade da concentração original de caseína e prolina, antes da transferência do material para a germinação. Essas fontes de nitrogênio reduzido interferem negativamente na seleção conforme mostrado nos resultados e descrito por Dekeyser *et al.*, (1989) e Wilmink e Dons (1993). No entanto foi observada uma sensível melhora na taxa de rediferenciação dos calos, na fertilidade e na produção de sementes das plantas na primeira geração.

#### **5.4. Hormônio do crescimento humano:**

##### **5.4.1. Ensaio realizado em 2000**

A análise da intensidade das bandas obtida pelo western blot quantitativo do único clone produtivo (*Ev00 hGH 42 R0*) entre as 42 plantas transgênicas obtidas permitiu estimar o rendimento de produção do hormônio em 1% da proteína solúvel total presente na farinha de milho. Como para cada 1,0  $\mu$ L temos aproximadamente 1.000 ng de proteína total solúvel e a banda de 1,0  $\mu$ L do extrato apresenta aproximadamente 10 ng de hGH (a partir da comparação visual da intensidade das bandas controles positivos com as do extrato), estimamos uma produção de 1% da proteína total solúvel. Esse valor corresponde a 10  $\mu$ g do hormônio no volume de 1,0 mL empregado para 100 mg de farinha, logo temos uma produção de 1,0 mg de hGH por 10 g de semente. Esse raciocínio para estimar o nível de produção a partir de western blot é repetido no decorrer da discussão dos outros anos de transformação.

A concentração do extrato protéico obtido com um tampão contendo detergente provavelmente impediu a migração do hGH do milho da mesma forma que ocorreu com o hGH comercial. Dessa forma, somente por meio de diluições do extrato, o hormônio apresentou o mesmo peso molecular por SDS/PAGE. Essa similaridade na mobilidade eletroforética do hormônio comercial com a do produzido em milho sugere que houve o correto processamento do peptídeo sinal na semente, que totaliza 2,107 kDa, que é um tamanho diferenciável por SDS/PAGE. Adicionalmente, tanto o hormônio comercial quanto o de milho apresentaram o mesmo padrão de retardamento na mobilidade eletroforética quando tratados com agentes redutores, indicando que o hormônio produzido apresentava ponte(s) de dissulfeto(s).

A geração R1 desse material não apresentou o transgene, porém foi resistente a aplicação do herbicida. Pode ser que algum advento na segregação sucumbiu a herança do cassete com o hGH. Com apenas uma planta, pouco se pode especular sobre o porquê da seleção tenha sido herdada e o transgene hGH não. Foi obtida a geração R2, onde também não foi encontrado o hormônio.

#### **5.4.2. Ensaio realizado em 2001**

Pelo terceiro ano consecutivo foram obtidas plantas transgênicas com hGH com o promotor de sementes, mas não foi estabelecida uma linhagem produtiva fértil. Houve muita surpresa com o resultado do sequenciamento do plasmídeo bombardeado. A deleção, que resultou em um *stop codon*, foi constatada dentro de um cassete que já havia sido seqüenciado e empregado com sucesso em tabaco e em milho. Trata-se provavelmente de um advento oriundo da transferência e clonagem do cassete do gene hGH no plasmídeo pCAMBIA3301, embora nessa clonagem tenham sido utilizados somente sítios de restrição existentes nas bordas da construção. Por fim, esse material serviu apenas como um extensivo treinamento de geração, cultivo e análise de plantas transgênicas de milho, pois foram cultivadas 1.500 plantas até o fim do ciclo natural do milho.

Com o material transformado com o promotor de ubiquitina também não foi estabelecida uma linhagem produtora de hGH, apesar do resultado de western blot de calos ter apresentado uma proteína com o mesmo peso molecular do controle positivo. Como a presença de tal banda não foi constatada no material controle negativo, provavelmente a produção do hGH nos calos ocorreu em baixos níveis. Não é possível saber, entretanto, o porquê desse material não ter expressado o hGH em folhas e nas sementes.

#### **5.4.3. Ensaio realizado em 2002**

O canhão da BioRad chegou no CBMEG no início de julho. Primeiramente foram feitos alguns ensaios de expressão transiente com o gene *gus* e, em seguida, ensaios com as construções pCAMBIA3301 hGH A e B, que diferem na orientação do cassete de expressão em relação a posição 5' e 3' dos outros cassetes do plasmídeo bombardeado. Cada metade do material foi bombardeada com uma das novas construções em pCambia3301. É prematuro afirmar que não existiu relação no nível de produção de hGH com a orientação do cassete do transgene no pCAMBIA3301, no entanto os cinco

eventos positivos já analisados, oriundos quase igualmente das duas construções, apresentaram um nível de produção bem parecido. De acordo com Finnegan e McElroy (1994) e Xie *et al.*, (2001), existe uma forte relação entre a orientação dos promotores e o nível de expressão de cassetes incorporados próximos em genomas de plantas.

Quatro meses depois dos primeiros ensaios de bombardeamento, as primeiras sementes transgênicas com 20 DAP de dois eventos positivos para Southern blot começaram a ser analisadas por western. A seleção em dois ciclos diminuiu o tempo de obtenção de plantas, mas aumentou o número de escapes (aproximadamente a metade dos eventos foram escapes). Porém até o momento nenhum trabalho de transformação de milho foi descrito com a obtenção e análise de sementes de plantas adultas em apenas quatro meses, tão pouco com a análise da segunda geração em 7 meses. Ishida *et al.*, (1996) considera seu modelo de obtenção de plantas transgênicas de milho rápido, descrevendo a análise das sementes da primeira geração em oito meses.

Não foi determinada a origem da segunda banda observada nos ensaios de western. Não parece ser fruto de uma degradação ou de uma clivagem específica do peptídeo. Uma hipótese para tal evento seria uma interrupção da tradução do mRNA do transgene hGH por baixa abundância de um tRNA específico. Existe uma pequena diferença dos *codon usage* entre mamíferos e plantas no geral, porém para alguns aminoácidos específicos a preferência do *codon usage* e a abundância de algum tRNA é mais significativa e poderia propiciar tal fato. Essa segunda banda foi estimada em 14 kDa, 7 kDa menor que o hGH. Se fosse um problema após a tradução, diante ao fato de usarmos um anticorpo policlonal que reconhece o hGH em vários segmentos, teríamos que obter duas bandas, uma de 14 kDa e outra de 7 kDa. Como é observada apenas a banda de 14 kDa, essa hipótese da preferência do *códon usage* faz sentido. Sementes maduras obtidas do cruzamento com o genótipo QPM apresentaram uma intensidade menor dessa banda, principalmente no cruzamento QPM ♀ X Ev02 hGH 2 R0 ♂ (Figura 4.47 do resultados). Portanto, pode ser que haja uma relação da concentração da segunda banda com o tipo de material, ainda que, sabidamente a abundância de tRNAs é genótipo específico.

Foram analisados dez dos 21 eventos que produziram sementes. Por enquanto a produção foi estimada somente do cruzamento QPM ♀ X Ev02 hGH 2 R0 ♂ da primeira geração (F1). A partir da intensidade das bandas observadas no western quantitativo, podemos estimar que 10 µL do extrato protéico possuem aproximadamente 100 ng. Aparentemente esse material apresenta o mesmo nível de produção do evento obtido em

2000, ou seja, 1% da proteína solúvel total e a partir de 1 kg de semente poderíamos obter 100 mg de hGH. Atualmente estão sendo cultivadas dos cinco eventos positivos 500 plantas para a obtenção da segunda geração do material transformado, e mais 500 plantas do híbrido transgênico QPM.

O novo cultivo implementado dos calos em meio suplementado com prolina e caseína entre a seleção e a germinação dos calos transgênicos aumentou consideravelmente a totipotência celular das culturas. A relação do número de calos resistentes aos ciclos de seleção sem caseína e prolina no escuro, pelo número de eventos com plantas férteis foi mais que o dobro que a do sistema convencional. Dos 160 calos resistentes em 2001, 40 produziram plantas férteis. Em 2002, com o sub-cultivo intermediário, dos 30 eventos obtidos, 21 foram férteis. Adicionalmente a qualidade e a produtividade das plantas também foram bem superiores às observadas nos outros anos.

O trabalho de análise da produção do hGH nesse novo material transgênico está apenas começando. Outros 11 eventos produtivos estão sendo analisados por Southern, northern e western blots. Adicionalmente, experimentos de imunohistoquímica, maxi-extração e purificação também já estão sendo estabelecidos.

Um dos pesquisadores responsáveis pela construção do cassete empregado nesse trabalho, Dr. Hamza El-Dorry da USP / São Paulo, pertence ao grupo proprietário dos laboratórios que estão começando a produção comercial de hGH no Brasil em *E. coli* (discutido na Introdução), sendo um dos proprietários da patente do cassete empregado nessa tese. A partir disso, posso especular que o hGH produzido em milho, depois de extraído e purificado no Laboratório de Plantas do CBMEG, terá menos empecilhos para ter sua atividade biológica estudada na cidade de São Paulo.

## 5.5 Pró-insulina

A expressão da insulina humana recombinante foi inicialmente investigada em nosso laboratório a partir de 1997 em plantas de tabaco. Foi descrita a expressão de uma proteína de 20 kDa expressa em níveis de até 10 ng por grama de semente (Parizotto, 2001). Essa proteína foi reconhecida nas análises de western blot pelo mesmo anticorpo monoclonal empregado em milho. Esse nível de produção foi obtido por meio de radioimunoensaios.

As análises de western blot em milho demonstraram um rendimento de produção de até 2% da proteína solúvel, pois na Figura 4.23 a banda do controle positivo

equivalente a 200 ng assemelha-se com a banda observada quando aplicados 10  $\mu$ L do extrato. Esse valor representa uma produção muitas vezes maior do que a descrita em tabaco (Parizotto, 2001). Assim como detalhado para hGH, esse valor significaria uma produção de 200 mg do hormônio por 1 kg de farinha de milho. Mesmo que o valor da produção de pró-insulina tenha sido superestimado em milho ou subestimado em tabaco por problemas experimentais, o cassete com seqüências originárias de cereais foi muito mais ativo em milho do que em tabaco. É importante ressaltar que tabaco não apresenta grande acúmulo de proteínas de reserva, sobretudo por ter sido selecionado pelo homem para produzir folhas e não sementes.

Quando comparado com o sistema desenvolvido em bactérias, a produção de proteínas em plantas segundo Kusnaldi *et al.*, (1997) é de 10 a 50 vezes mais econômica. As três proteínas recombinantes produzidas comercialmente em sementes de milho, todas produzidas pela Prodigene Inc, apresentaram o rendimento em relação à proteína solúvel total em tampão a base de detergente de 0,1% de aprotina, 0,5%  $\beta$ -Glucoronidade e 3% de avidina. Estamos descrevendo uma produção de 2% de pró-insulina e de 1% do hGH somente no endosperma de sementes de milho, que corresponde a 85% da massa da semente. É importante salientar que empregamos o dobro do volume do tampão de extração em relação à massa de farinha empregada na Prodigene Inc (Hoods *et al.*, 1999). Como foi padronizado estimar o nível de produção pela porcentagem da proteína heteróloga em relação à proteína total solúvel, podemos crer que a nossa produção seria maior se empregássemos a metodologia de Hoods *et al.*, (1999).

Em 2001 foram obtidos 31 calos resistentes à seleção *in vitro*, dos quais 18 regeneraram plantas. Desse material, 15 clones foram férteis, 10 apresentaram a integração do transgene e 8 a produção da pró-insulina. Houve uma grande variação no nível da produção entre os clones. Foi escolhido o clone número 3, que apresentou a integração de duas cópias do cassete para a continuidade do trabalho. A análise das 95 sementes produzidas por esse clone na geração R0, mostrou que 65 produziram a pró-insulina. Para as demais gerações, foram escolhidas aquelas sementes analisadas positivamente por western blot.

Não foi observada variação na produção do hormônio entre as quatro gerações já obtidas. Essas plantas foram sempre autofecundadas ou polinizadas por plantas dentro do mesmo evento. Não foi possível esclarecer porque algumas sementes transgênicas de espigas produtivas da quarta geração do *Ev proins 3 R3* continuam não produzindo o hormônio. Pode ser um advento de segregação do transgene, ou que essas sementes

simplesmente silenciem a expressão, deixando de realizar alguma etapa da transcrição, da tradução, do processamento ou do empacotamento, ou ainda, que alguma protease tenha degradado o hormônio.

A relação do fenótipo das espigas com a presença de pró-insulina no *Ev proins 3 R2* pode ser oriunda do aborto do endosperma de sementes que entraram em homozigose da característica incorporada. Foi observada a pré-formação do embrião nessas sementes sem o desenvolvimento do endosperma. Esse aborto poderia ser fruto do local de integração do transgene. A forma arredondada derivaria do espaço deixado por essas sementes abortadas. Essa também poderia ser a razão pela qual algumas sementes da quarta geração do *Ev proins 3* não tenham produzido o hormônio, conforme discutido no parágrafo anterior. O cultivo de sementes da primeira geração de cinco novos eventos (que já está sendo conduzido) poderá esclarecer essas dúvidas.

A pró-insulina padrão empregada como controle positivo nos ensaios de western blot, produzida pela Biobrás, é um produto intermediário do processo de produção de insulina humana madura conforme descrito na introdução. Esta proteína foi produzida em *E. coli* com uma cauda N-terminal de poli-histidina (M-A-H-H-H-H-H-H-M-G-R) conectada à pró-insulina humana, possuindo 10,6 kDa. A pró-insulina humana possui 9,4 kDa. Isto explica a pequena diferença de tamanho observada nos western blots entre o controle positivo (1,2 kDa maior) e as amostras obtidas de plantas. A alta especificidade do anticorpo monoclonal empregado nos western blots sugere que as outras bandas detectadas (principalmente no controle positivo) são peptídeos dimerizados ou produtos intermediários da pró-insulina, que compartilham sítio(s) de reconhecimento com a pró-insulina de 9,4 kDa.

O objetivo central dessa linha de pesquisa é produzir a insulina madura convertida diretamente no endosperma das sementes. Os ensaios de detecção desse hormônio processado nas sementes dos *Ev proins 3 R1* e *Ev proins 5 R1* não mostraram a conversão. Apesar de existirem mais oito eventos de pró-insulina ainda não analisados em relação a esse processamento, a princípio a primeira estratégia de obtenção de insulina descrita na introdução não foi efetiva. No decorrer desse trabalho já foram realizados experimentos de co-transformação da pró-insulina e da convertase PC1 responsáveis pelo processamento da pró-insulina (colaboração com o doutorando Mário Paniago). Separadamente também já foram obtidas plantas híbridas F1 do cruzamento *Ev proins 3* ♂ X ♀ plantas transgênicas R0 com a convertase. Atualmente esse material está sendo cultivado para a obtenção da segunda geração, que será analisada para verificar a

presença da insulina madura ou ainda da convertase PC1. Caso não ocorra a produção de insulina madura nas sementes, uma terceira estratégia em estudo seria conduzida a partir da purificação da convertase e da pró-insulina e posterior clivagem *in vitro*.

#### **5.5.1. Tecido-especificidade, dinâmica da expressão e do empacotamento da pró-insulina:**

Foi comprovada por western blot a habilidade do promotor  $\gamma$ -kafirina em direcionar a produção do hGH e da pró-insulina somente para o endosperma das sementes. Os ensaios de imunohistoquímica realizados com o material transgênico de pró-insulina confirmaram a tecido-especificidade da produção e a existência de um gradiente crescente da expressão em direção a região periférica do endosperma. Como discutido na introdução, nessa região predomina o acúmulo de proteínas de reserva enquanto que na região central do endosperma há um acúmulo maior de amido.

A produção de proteínas heterólogas somente no endosperma apresenta as seguintes vantagens em relação à produção no embrião ou na semente inteira de milho:

1) O endosperma é um tecido especializado no armazenamento de proteínas e de amido, correspondendo na semente madura a aproximadamente 85% de sua massa, possuindo 75% da proteína total da semente (Glover e Mertz, 1987).

2) O acúmulo de proteínas heterólogas somente no endosperma reduz a possibilidade de ocorrer efeitos adversos na germinação e no desenvolvimento do embrião.

3) O endosperma apresenta baixo conteúdo de óleo, o que facilita os processos cromatográficos de purificação (Leite *et al.*, 2000). Por outro lado, o embrião possui 85% do óleo da semente (Glover e Mertz, 1987).

A expressão do transgene de pró-insulina do *Ev proins 3 R1* obedeceu ao modelo temporal das  $\gamma$ -zeínas conforme mostram os ensaios de northern blot realizados. Foi definida uma curva crescente até o vigésimo dia após a polinização (DAP), que decresce até o trigésimo quinto dia, configurando uma parábola. O pico de expressão da  $\gamma$ -zeínas ocorre entre 15 e 25 DAP de acordo com Woo *et al.*, (2001) e com os resultados de sequenciamento de bibliotecas de cDNA obtidas a partir de sementes de milho em desenvolvimento realizados no CBMEG (Projeto MAIZEST).

Adicionalmente, obtiveram-se fortes evidências de que os hormônios foram estocados apenas nos corpúsculos protéicos. As análises de western blot das alíquotas obtidas por meio do gradiente de sacarose mostraram a presença da pró-insulina somente na fração correspondente aos corpúsculos protéicos. De acordo com Targon *et al.*, (1992), é nessa região do gradiente que os corpúsculos protéicos obtidos de *Coix* se localizam. Após dois anos armazenado a temperatura ambiente, o material foi analisado por western e apresentou o mesmo nível de acúmulo de pró-insulina nas sementes observado após a colheita. Provavelmente, o empacotamento do hormônio em corpúsculo protéicos deve ser a razão para tal estabilidade. Kusnadi *et al.*, (1998) e Hoods *et al.*, (1999) descrevem que as sementes de milho podem ficar até duas semanas a temperatura ambiente sem uma degradação significativa das proteínas heterólogas. Esse grupo da Prodigene Inc. emprega um peptídeo sinal da  $\alpha$ -amilase, que endereça a proteína para o espaço intercelular.

#### **5.5.2. Purificação da pró-insulina**

Nas análises da produção dos hormônios pelas plantas transgênicas foi empregado um tampão contendo detergente que solubiliza uma grande quantidade de proteínas das sementes. Para a purificação, além de o detergente ser um empecilho para as colunas cromatográficas, a complexidade protéica obtida dificulta os processos de purificação. Davoren *et al.* (1962) trabalharam com a extração de pró-insulina de tecido de origem animal, empregando um tampão com 70% de etanol. Com base nesse trabalho, foram iniciados experimentos de extração da pró-insulina de farinha de endosperma de semente madura empregando um tampão alcoólico.

Postulando que a pró-insulina poderia ser solúvel na concentração de etanol utilizada no processo de extração, porém insolúvel em concentrações menores, foi estudada uma maneira de precipitar o hormônio pela redução dessa concentração alcoólica. As análises desenvolvidas mostraram que das concentrações estudadas, somente em 50% de etanol a pró-insulina é completamente insolúvel. Não é conhecida a razão desse comportamento bioquímico, tendo em vista que em 70, 30, 15, e 5% de etanol a pró-insulina de milho demonstrou ser solúvel. No entanto, esse mesmo padrão de solubilidade em etanol foi constatado com o hormônio empregado como controle positivo (BioBras).

Com a metodologia de extração e precipitação definidas, foi estudada a melhor forma de solubilizar a pró-insulina em um tampão que não comprometesse os passos de

cromatografia. Até então, para suspender o material obtido dos ensaios de extração e de precipitação alcoólica ainda era empregado o tampão a base de detergente. A uréia, um conhecido agente solubilizador caotrópico, foi testada, e a concentração de 4 M pareceu ser aquela que menos solubilizou as prolaminas e a que mais solubilizou a pró-insulina.

As cromatografias foram inicialmente realizadas com pró-insulina recombinante da Biobrás para avaliação do tempo de retenção desta proteína na coluna. As frações correspondentes aos picos dos cromatogramas da amostra obtida de planta foram analisadas por western blot e as bandas obtidas corresponderam aos picos observados nos cromatogramas da amostra controle, confirmando a produção de pró-insulina humana recombinante em sementes de milho transgênico reativa com o anticorpo monoclonal produzido em camundongo.

A purificação da pró-insulina humana produzida em endosperma de sementes de milho transgênico não está totalmente concluída, porém está bem encaminhada. De acordo com as análises, tendo como enfoque a relação pureza/rendimento, o melhor tampão é composto por 70% de etanol. Uma importante etapa de purificação antes da cromatografia pode ser realizada reduzindo-se a concentração de etanol para 50%, precipitando a pró-insulina e reduzindo a quantidade de zeínas no meio.

Uma segunda cromatografia das frações onde foi encontrada a pró-insulina foi realizada, desta vez empregando uma coluna de filtração em gel. O material obtido dessa segunda coluna foi submetido a novos ensaios de western blot, que mostraram uma proteína praticamente pura. Essa proteína foi submetida a ensaios de espectrometria de massa que indicaram o correto peso molecular de 9,377 kDa do hormônio recombinante. Esses dados ainda não fazem parte do material e métodos e dos resultados dessa tese, uma vez que tais ensaios estão em andamento.

## 5.6. Material transgênico QPM

As sementes obtidas do cruzamento da linhagem QPM ♀ X *Ev proins 3* ♂ produziram a proteína em níveis elevados já na F1. Essa alta produção não é oriunda da característica opaco 2 do QPM pois trata-se de um alelo mutante recessivo. Provavelmente esse rendimento é devido ao grande vigor observado das plantas obtidas do cruzamento ou/e porque QPM acumula mais proteína. As linhagens empregadas para transformação foram escolhidas por sua transfectibilidade e totipotência de suas células somáticas e não pelo grau de acúmulo de proteínas de reserva. A natureza das células

que formam o endosperma dos cereais é triploide, sendo dois conjuntos cromossômicos maternos e um paterno. Desta forma como era esperado, as sementes da geração F2 do QPM ♀ X *Ev proins 3* ♂ produziram a proteína heteróloga em níveis mais elevados que a primeira geração. Em termos de produção por massa do grão, estimamos produzir até 2 kg do hGH ou 4 Kg de pró-insulina por hectare cultivando o material obtido de culturas *in vitro*. Com a linhagem QPM transgênica esta produção deve ser multiplicada em algumas vezes.

Parte das sementes produzidas está sendo destinada a um grupo da faculdade da engenharia química da UNICAMP que possui um projeto de dissertação de mestrado e uma tese de doutorado envolvendo a maxi-extração e a purificação da pró-insulina produzida em milho. Atualmente estão sendo cultivadas 100 plantas para a obtenção da geração F3 e sendo conduzido o segundo ciclo de retrocruzamento com plantas QPM ♀ selvagem.

Os cruzamentos transgênicos com o gene hGH também deram bons resultados. Além do alto nível de expressão já na F1, as sementes obtidas desse cruzamento apresentam uma intensidade da segunda banda reativa ao anticorpo menos intensa que a observada no material transformado. Conforme já discutido é prematuro fazer essa associação, mas o western quantitativo realizado com material QPM ♀ X *Ev02 hGH 2 R0* ♂ F1 (Figura 4.47 dos resultados) mostra claramente uma baixa intensidade dessa banda. Foram cruzados com o material QPM dez eventos de hGH positivos para western obtidos em 2002. Atualmente esse material está sendo cultivado para o estabelecimento do primeiro retrocruzamento.

## 6. CONCLUSÕES:

1) O cassete de expressão construído com seqüências originárias de cereais foi eficiente para modular a produção dos hormônios recombinantes de crescimento e insulina humanos em plantas transgênicas de milho:

- A região promotora direcionou a expressão dos hormônios somente na região do endosperma,
- O peptídeo sinal foi capaz de endereçar as proteínas nas células para dentro de corpúsculos protéicos e,
- Os valores do nível de expressão dos hormônios mostrados indicam que o cassete é muito eficiente para produção de proteínas heterólogas em sementes de milho.

2) O bombardeamento ainda é o mais eficiente método para transformação de milho. A partir da experiência obtida nos ensaios apresentados e de outras referências foi escolhido apenas esse método para a continuidade dos trabalhos com o sistema de produção de proteínas heterólogas em nosso laboratório.

3) O aparelho *gene gun* da EMBRAPA / CENARGEN foi mais eficiente que o desenvolvido no CBMEG e o do produzido em série pela BioRad.

4) O sistema de borrifamento de herbicida diretamente nos calos submetidos ao bombardeamento no sistema de seleção indica que a metodologia de obtenção de milho transgênico pode diminuir em até 60 dias.

5) O incremento de um sub-cultivo intermediário entre a seleção e a germinação com fontes de carbono reduzido incrementou a totipotência celular dos embriões somáticos, a fertilidade e a produtividade das planta da primeira geração.

6) Os trabalhos de purificação mostraram que a baixa complexidade protéica do endosperma realmente facilita o estabelecimento de um processo de purificação dos hormônios recombinantes produzidos.

## 7. BIBLIOGRAFIA

- Aldemita, R. R. and Hodges, T. K. (1996). *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *japonica* and *indica* rice varieties. *Planta* 199: 612-617.
- Altman, A. e Goren, R. (1974). Growth and dormancy cycles in *Citrus* bud cultures and their hormonal control. *Physiol. Plant.* 30: 240-245.
- Aragão F.J.L., Barros L.M.G., Brasileiro A.C.M., Ribeiro G., Smith F.D., Sanford J.C., Faria J.C., Rech E.L. (1995) Inheritance of foreign genes in transgenic bean (*Phaseolus vulgaris* L.) co-transformed via particle bombardment. *Theoretical and Applied Genetics* 93:142-150.
- Armstrong, C.L. (1994). Regeneration of plants from somatic cell cultures: Applications for in vitro genetic manipulation. In: Freeling M, Walbot, V. (eds). *The Maize Handbook*, 663-671. Springer-Verlag, New York.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K. (1997). *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc, A.
- Beachy, R.N., Fitch, J.H., Hein, M.B. (1996). Use of plant viruses of delivery of vaccine epitopes. *Ann. NY Acad. Sci.* 796:43-49.
- Bommert, P. and Werr, W. (2001). Gene expression patterns in the maize caryopsis: clues to decisions in embryo and endosperm development. *Gene* 271: 131-142.
- Chu, C.C., Wang, C.C., Sun, C.C., Hsu, C., Yin, K.C., Chu C.Y., Bi, F.Y. (1975). Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on the nitrogen sources. *Sci. Sin.* 18:659-68.
- Claparois, I., Santos, M.A., Torné, J.M. (1993). Influence of some exogenous amino acids on the production of maize embryogenic callus and on endogenous amino acid content. *Plant Cell, Tiss. Org. Cult.* 34:1-11.
- Clayton, W.D. (1983). Notes on tribe Andropogoneae (Gramineae). *Kew. Bull.* pp. 813-8
- Coleman, C.E. & Larkins, B.A. (1999). The prolamins of maize. In "Seed Proteins", eds. Shewry PR & Casey R, 109-139, Kluwer Academic Publishers.
- Coligan, J.E., Dunn, B.M., Ploegh, H.L., Speicher, D.W., Wingfield, P.T. (1997). *Current Protocols in Protein Science*, John Wiley.
- Cook, M.D. (2002). Shouldn't Adults with Growth Hormone Deficiency Be Offered Growth Hormone Replacement Therapy?. *Ann Intern Med.* 137:197-201
- Cowley, D.J. and Mackin, R.B. (1997). Expression, purification and characterization of recombinant human proinsulin. *FEBS Lett.* 402:124-130.
- Cristensen, A.M., Sharrock, R.A., Quail, P.H. (1992). Maize polyubiquitin genes: structure, thermal perturbation of expression and transcrip splicing, and promoter activity following transfer to protoplasts by electroporation. *Plant Mol. Biol* 18:675-689.
- Cristou, P. (1992). Genetic transformation of crop plantas using microprojectile bombardment. *Plant J.* 2:275-81.
- Davoren, P.R. (1962). *Biochim. Biophys. Acta* 63, 150.
- Dekeyser, R., Claes, B., Marichal, M., Van Montagu, M., Caplan, A. (1989). Evaluation of selectable markers for rice transformation. *Plant Physiol.* 90:217-223.
- Dennehey, B.K., Petersen, W.L., Ford-Santino, C., Pajeau, M., Armstrong, C.L. (1994). Comparison of selective agents for use with the selectable marker gene bar in maize transformation. *Plant Cell Tiss Cult* 36: 1-7.
- Devos, K.M. and Gale, M.D. (2000) Genome relationships: The grass model in current research. *The Plant Cell* 12:637-646
- D'Halluin, K., Bonne, E., Bossut, M., De Beuckeleer, M. and Leemans, L. (1992). Transgenic maize plants by tissue electroporation. *Plant Cell* 4: 1495-1505.
- Emerson, R.A., Beadle, G.W. and Frazer, A.C. (1935). A summary of linkage studies in maize. *Cornell University Agricultural Experimental Station Report* 180.
- FAO (2002) FAO Statistical Database: <http://apps.fao.org/>
- Finnegan, J. and McElroy, D. (1994). Transgene inactivation: Plants fight back. *Bio/Technology* 12:883-888.
- Fialay, R.T., Rogers, S.G., Horsch, R.B., Sanders, P.R., Flick, J.S., Fink, C., Hoffman, N. and Sanders, P. (1983). Expression of bacterial genes in plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:4803-4807.
- Flavell, R.B. (1994). Inactivation of gene expression in plants as a consequence of specific sequence duplication. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 3490-3496.
- Flores, C.G., Aguilar, R., Cruz, H.R., Albores, M. and Jiménez, E.S. (2001). A maize insulin-like growth factor signals to a transduction pathway that regulates protein synthesis in maize. *Departamentos de Bioquímica, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM)*, 95-100
- Fiedler, U. and Conrad, U. (1995). High-level production and long-term storage of engineered antibodies in transgenic tobacco seeds. *Bio/Technology* 13: 1090-1093.
- Frame, B.R., Shou, H., Chikwamba, R.K., Zahng, Z., Xiang, C., Fonger, T.M., Pegg, S.E.K.P., Baochun, L., Nettleton, d.S., Pei, d. And Wang, K. (2002). *Agrobacterium tumefaciens*-Mediated Transformation of Maize Embryos Using a Standart Binary Vector System. *Plant Physiology* 129:13-22.
- Frank, M. and Schmülling, T. (1999) Cytokinin cycles cells. *Trends in Plant Sciences* 4:243-244.
- Freitas, F.A., Yunes, J.A., da Silva, M.J., Amuda, P., Leite, A. (1994). Structural characterization and promoter activity analysis of the  $\gamma$ -kafin gene from sorghum. *Mol. Gen. Genet.* 245:177-186.
- Frohman, L.A. (2002). Controversy about Treatment of Growth Hormone-deficient Adults: A Commentary. *Ann Intern Med.*, 137:202-204.
- Fromm, M.E., Morrish, F., Armstrong, C., Willians, R., Thomas, J. and Klein, T.M. (1990). Inheritance and expression of chimeric genes in the progeny of transgenic maize plants. *Bio/Technology* 8:883-889.
- Gale, M.D. and Devos, K.M. (1998). Comparative genetics in the grasses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:1971-1974.
- Geevers, H.O., and Lake, J.K. (1992). Development of modified opaque-2 maize in South Africa, in *Quality Protein Maize* (ed. E.T. Mertz), American Society of Cereal Chemists, St. Paul, Minnesota., pp. 49-78.
- Geetha, K.B., Lending, C.R., Lopes, M.A., Wallace, J.C., and Larkins, B.A. (1991). Opaque- 2 modifiers increase  $\gamma$ -zein synthesis and alter its spatial distribution in maize endosperm. *Plant Cell*, 1207-19.
- Gelvin, S.B., Schilperrott, R.A., Verma, D.P.S. (1993). *Plant Molecular Biology Manual*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Holanda.
- Glover, D.V.; Mertz, E.T. Com. In: Olson, R.A.; Frey, K.L. (1987). eds. *Nutritional quality of cereal grains*. Madison: American society of Agronomy. pp. 183-336.

- Goddijn, O.J.M. and Pen, J. (1995). Plants as bioreactors. *TIBTECH* 13: 379-387.
- Gordom-Kamm, W.J., Spencer, T.M., Mangano, M.L., Adams, T.R., Daines, R.J., Start, W.G., O'Brien, J.V., Chambers, S.A., Adams, Jr W.R., Willetts, N.G., Rice, T.B., Mackey, C.J., Krueger, R.W., Kausch, A.P. and Lemaux, P.G. (1990). Transformation of maize cells and regeneration of fertile transgenic plants. *The Plant Cell* 2:603-2619.
- Guerra, M.P., Torres, A.C. and Teixeira, J.B. (1999). *Cultura de tecidos e transformação Genética de Plantas* ed. Torres, A.C., Caldas, L.S. Buso, J.A. Embrapa-CNPq e SPI. pp 864.
- Handro, W. and Floh, E.I.S. (1990). Aspectos básicos do controle da morfogênese in vitro. Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas. Torres, AC. CNP hortaliças-Brasília-DF.
- Hiei, Y., Ohta, S., Komari, T., Kumashiro, T. (1994). Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *Plant J* 6: 271-282.
- Hood, E.E., Witcher, D.R., Maddock, S., Meyer, T., Baszczynski, C., Bailey, M., Flynn, P., Register, J., Marshall, L., Kulisek, E., Kusnadi, A., Evangelista, R., Nikolov, Z., Wooge, C., Mehig, R.J., Herman, R., Kappel, W.K., Ritland, D., Li, C.P., Howard, J.A. (1997). Commercial production of avidin from transgenic maize: characterization of transformant, production, processing, extraction and purification. *Mol Breeding* 3: 291-306.
- Hood, E.E. and Jilka, J.M. (1999). Plant-based production of xenogenic proteins. *Current Opinion in Biotechnology*. Pp. 382-386.
- Hoekema, A., Hirsch, P.R., Hooykaas, P.J.J. and Schilperoort, R.A. (1983). A binary plant vector strategy based on separation of vir- and T-region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid. *Nature* 303: 179-180.
- Hooykaas, P.J. (1988). *Agrobacterium* molecular genetics. in *Plant Molecular Biology Manual A4*:1-13, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Holanda.
- Ishida, Y., Saito, H., Ohta, S., Hiei, Y., Komari, T. and Kumashiro, T. (1996). High efficiency transformation of maize (*Zea Mays* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Nature Biotechnology*, 14: 745-750.
- Isley, W.L. (2002). Growth hormone therapy for adults: not ready for prime time? *Ann Intern Med*. 137:190-6
- Jefferson, R.A. (1987). Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system. *Plant Mol. Biol.* 5:387-405.
- Jilka, J.M. Hood, E.E., Dose, R. and Howard, J. (1999). The benefits of proteins produced transgenic plants. *AgBiotechNet*.
- Johnson, I. (1983). Human insulin from recombinant DNA technology. *Nature* 219:632-637.
- Kaufmann, J.E., Irminger, J.C., Mungall, J., Halban, P.A. (1997). Proinsulin with conversion in GH3 cells after coexpression of human proinsulin with the endoproteases PC2 and/or PC3. *Diabetes* 46:978-982.
- Kemper, E.L., da Silva, M.J. and Arruda, P. (1996). Effect of microprojectile bomb. parameters and osmotic treatment on particle penetration and tissue damage in transiently transformed cultured immature maize (*Zea mays* L.) embryos. *Plant science* 121:85-93.
- Kjeldsen, T., Pettersson, A.F., Hach, M. (1999). The role of leaders in intracellular transport and secretion of the insulin precursor in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biotechnol.* 75:195-208.
- Klein, T.M., Wolf, E.D., Wu, R. and Sanford, J.C. (1987). High velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells.
- Komari, T. (1990) Transformation of cultured cells of *Chenopodium quinoa* by binary vectors that carry a fragment of DNA from the virulence region of pTiBo542. *Plant Cell Rep* 9:303-306.
- Kosiel, M.G., Beland, G.L., Bowman, C., Carozzi, N.B., Crenshaw, R., Crossland, L., Dawson, J., Desai, N., Hill, M., Kadwell, s., Launis, K., Lewis, K., Maddox, D., McPherson, K., Meghji, m.R., Merlin, E., Rhodes, R., Warren, G.W., Wright, M. And Evola, S.V. (1993). Field performance of elite transgenic plants expressing an insecticidal protein derived from *Bacillus thuringiensis*. *BioTechnology* 11:194-200.
- Kusnadi, A.R., Nikolov, Z.L. and Howard, J.A. (1997). Production of recombinant proteins in transgenic plants: practical considerations. *Biotech. Bioeng.* 56:473-484.
- Kusnadi, A.R., Hood, E.E., Witcher, D.R., Howard, J.A. and Nikolov, Z.L. (1998). Production and purification of two recombinant proteins from transgenic corn. *Biotechnol. Prog.* 14(1):149-155.
- Larkins, B.A., Dilkes, B.P., Dante, R.A., Coelho, C.M. (2001) Investigating the hows and whys of DNA endoreplication. *Jour. Exper. Botany*, 52:183-192, 2001.
- Larick, J.W. and Thomas, D.W. (2001). Producing proteins in transgenic plants and animals. *Current Opinion in Biotechnology* 12:411-418.
- Lazzeri, E.L. and Shewry, P.R. (1993) *Biotechnology of cereals*. *Biotechnol Genet Eng Rev* 11:79-146.
- Lee, H.C., Kim, S.J., Kim, K.S., Shin, H.C., Yoon, J.W. (2000) Remission in models of type 1 diabetes by gene therapy using a single-chain insulin analogue. *Nature* 408:483-488.
- Leite, A., Arruda, P., El-Dorry, H.F., Kemper, E., da Silva, M.J. (1998). Desenvolvimento de um cassete de expressão de proteínas heterólogas especificamente em sementes de plantas trans. Pedido de Patente junto ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial - I.N.P.I., PI9805166-0, em 09/11/98.
- Leite, A., Kemper, E.L., da Silva, M.J., Luchessi, A.D., Siloto, R.M.P., Bonaccorsi, E.D., El-Dorry, H.F. and Arruda, P. (2000) Expression of correctly processed human growth hormone in seeds of transgenic tobacco plants. *Molecular Breeding* 6:47-53.
- Liu, W., Moore, P.J. and Collins, G.B. (1992). Somatic embryogenesis in soybean via somatic embryo cycling. *In Vitro Cell Dev Biol* 28P:153-160. Sato S, Newell C, Kolacz K, Tredo L, Finer J and Hinchee M. (1993). Stable transformation via particle bombardment in two different soybean regeneration systems. *Plant Cell Rep.* 12:408-413.
- Lopes, M.A. and Larkins, B.A. (1993). Endosperm origin, development and function. *Plant Cell* 5:1383-1389.
- Lur, H. S. and Setter, T.L. (1993). Role of auxin in maize endosperm development (timing of nuclear DNA endoreduplication, zein expression, and cytokinin). *Plant Physiol.* 103:273-280.
- Mackin, R.B. (1998). Proinsulin: recent observations and controversies. *CMLS* 54:696-702.
- Mead, H., Ziomeck, C. (1998). Urine as a substitute for milk? *Nat Biotechnol* 16:21-22.
- Muller, M., Muth, J.R., Gallusci, P., Knudsen, S., Maddaloni, M., Motto, M., Schmitz, D., Sorensen, M.B., Salamini, F., von Wettstein, D. And Thompson, R.D. (1995). Regulation of storage protein synthesis in cereal seeds: Developmental and nutritional aspects. *J. Plant. Physiol.* 145:606-613.
- Murashige, T., Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15:473-97.

- Nawrath, C.; Poirier, Y. and Somerville, C. (1994). Targeting of the polyhydroxybutyrate biosynthetic pathway to the plastids of *Aranbidopsis thaliana* result in high level of polymer accumulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 12760-12764
- Nilsson, J., Jonasson, P., Samuelsson, E., Stahl, S., Uhlén, M. (1996). Integrated production of human insulin and its C-peptide. *J. Biotechnol.* 48:241-250.
- Oliveira, A.E.A., Machado, O.L.T., Gomes, V.M., Vieira, J.G.H., Fernandes, K.V.S., Xavier-Filho, J. (1998). Plant insulin. *In: REUNIÃO ANNUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR*, Caxambu, 1998. *Anais* p. 42.
- Oliveira, A.E.A., Machado, O.L.T., Gomes, V.M., Xavier-Neto, J., Pereira, A.C., Vieira, J.G.H., Fernandes, K.V.S., Xavier-Filho, J. (1999). Jack bean seed coat contains a protein with complete sequence homology to bovine insulin. *Protein Peptide Lett.* 6:15-21.
- Ortega, E.I., and Bates, L.S. (1983). Biochemical and agronomic studies of two modified hard-endosperm opaque-2 maize (*Zea mays* L.) populations. *Cereal Chemistry*, 107-111.
- Ottoboni, L.M.M., Leite, A., Yunes, J.A., Targon, M.L.P.N., Souza-Filho, G.A. and Arruda, P. (1993). Sequence analysis of 22Kd-like  $\alpha$ -prolamin genes from *Coix*, maize and *Sorghum* reveals a highly conserved protein structure and regulatory elements. *Plant Mol. Biol.* 21: 765-778.
- Pollock, D.P., Kutsko, J.P., Birck-Wilson, E., Williams, J.L., Echelard Y, Meade, H.M. (1999). Transgenic milk as a method for the production of recombinant antibodies. *J Immunol Methodes* 231:147-157.
- Parizotto, E.A., De Lucca, P.C., Jungmann, L., Kemper, E.L., da Silva, A.C. and Leite, A. (2000). Plantas como Biorreatores. *Biotechnologia Ciência & Desenvolvimento*
- Parizotto, E.A. (2001). Expressão de um cDNA da proinsulina humana em sementes de tabaco transgênico. Tese de Doutorado apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas.
- Pedersen, K., Bloom, K.S., anderson, J.N., Glover, D.V., Larkins, B.A. (1980). Analysis of the complexity and frequency of zein genes in the maize genome. *Biochemistry* 19:1644-1650.
- Peeters, K., Wilde, C.D., Jaeger, G.D., Angenon, G., Depicker, A. (2001). Production of antibodies and antibody fragments in plants. *Vaccine* 19:2756-2761.
- Potrykus, I. (1991). Gene transfer to plants: Assessment of published approaches and results. *Annu. Rev. Plant Physiology*.
- Randolph, L.F. (1936). Developmental morphology of the caryopsis in maize. *J.Agric. Res.* 53:881-916.
- Rogers, S.G., Horsch, R.B., Fraley, R.T. (1986). Gene transfer in plants: production of transformed plants using Ti plasmid vectors. *Methods Enzymol* 118: 627-641.
- Russell, S.D. (1992). Double fertilization. *Int. Rev. Cytol.* 140:357-388.
- Sánchez de Jiménez, E., Beltrán-Peña, E. and Ortiz-López, A. (1999). Insulin-stimulated ribosomal protein synthesis in maize embryonic axes during germination. *Physiol. Plant.* 105:148-154.
- Sanford, J.C. (1990). Biolistic plant transformation. *Physiol. Plant* 79:206-9.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A laboratory Manual*. 2<sup>nd</sup> ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- Sato, S., Newell, C., Kolacz, K., Tredo, L., Finer, J. and Hinchee, M. (1993). Stable transformation via particle bombardment in two different soybean regeneration systems. *Plant Cell Rep.* 12:408-413.
- Sharp, W.R., Sondahl, M.R., Caldas, L.S., Maraffa, S.B. (1980). The physiology of in vitro asexual embryogenesis. *Horticultural Review* 2:268-310.
- Shewry, P.R. and Casey, R. (1999). *Seed Proteins*. Kluwer Academic Publishers. 1st edition p. 1096.
- Staub, J.M.; Garcia, B.; Graves, J.; Hajdukiewicz, P.T.J.; Hunter, P.; Nehra, N.; Paradkar, V.; Schlittler, M.; Carrol, J.A.; Spatola, K.L.; Ward, D.; Ye, G.; Russel, D.A. (2000). High-yield production of a human therapeutic protein in tobacco chloroplasts. *Nat. Biotechnol.* Pp. 333-338.
- Steiner, D.F., Rouillé, Y., Gong, Q., Martin, S., Carroll, R., Chan, S.J. (1996). The role of prohormone convertases in insulin biosynthesis: evidence for inherited defects in their action in man and experimental animals. *Diabetes & Metabolism* 22, 94-104.
- Targon, M.L.P.N., Ottoboni, L.M.M., Leite, A., Ludevid, D., Puigdomenech, P. And Arruda, P. (1992). Synthesis and deposition of coixin in seeds of *Coix lacryma-jobi*. *Plant Science* 83:169-180.
- Thompson, C.J., Movva, N.R., Tizard, R., Cramer, R., Davies, J.E., Lauwerys, M., Botterman, J. (1987). Characterization of the herbicide-resistant *bar* gene from *Streptomyces hygroscopicus*. *EMBO J.* 6:2519-23.
- Topfer, R. Maizeit, V., Gronenbom, B., Schell, J. And Steinbiss, H.H. (1987). A set of plant expression vectors for transcriptional and translational fusions. *Nucleic Acids Research* 15(14):5890.
- Trick, H.N., Finer, J.J. (1998). Sonication-assisted *Agrobacterium* -mediated transformation of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] embryogenic suspension culture tissue. *Plant Cell Reports* 17: 482-488.
- Vandekerckhove, J., Van Damme, J., Van Lijsebettens, M., Botterman, J., de Block, M., Vandewiele, M., De Clerq, A., Leemans, J., Van Montagu, M., Krebbers, E. (1989). Enkephalins produced in transgenic plants using modified 2S seed storage proteins. *Bio/Technology* 7: 929-932.
- Vijayaraghavan, M.R. and Prabhakar, K. (1984). The endosperm. In John, B.M., ed. *Embryology of angiosperms*. Berlin, Springer-Verlag, pp 319-376.
- Vollendweider, F., Kaufmann, J., Irminger, J., J.C., Halban, P.A. (1995). Processing of proinsulin by furin, PC2, and PC3 in (co)transfected COS (monkey kidney) cells. *Diabetes* 44:1075-1080.
- Xie, M., He, Y. And Gan, S. (2001). Bidirectionalization of polar promoters in plants. *Nature Biotechnology* 19:677-679.
- Ye, X., Al-Babili, S. Kloti, A., Zhang, J., Lucca, P., Beyer, P. And Potrykus, I. (2000). Engineering the provitamin A ( $\beta$ -carotene) biosynthetic pathway into (carotenoid-free) rice endosperm. *Science* 287:303-305.
- Wallace, J.C., Gallii, G., Kawata, E.E., Cuellar, R.E., Shotwell, M.A. and Larkins, B.A. (1988). Aggregation of lysine-containing zeins in protein oodies in *Xenopus* oocytes. *Science* 240:662-4.
- Watterson, J.J., Shull, J.M. and Kirleis, A.W. (1993). Quantification of  $\alpha$ -,  $\beta$ -, and  $\gamma$ -kafirins in vitreous and opaque endosperm of *Sorghum bicolor*. *Cereal chemistry* 70:452-457.
- White, J., Chang, S.Y.P., Bibb, M.J., Bibb, M.J. (1990). A cassette containing the *bar* gene of *Streptomyces hygroscopicus*: a selectable marker for plant transformation. *Nucleic Acids Res* 18: 1062.
- Wilmink, A., Dons, J.J.M. (1993). Selective agents and marker genes for use intrasformation of monocotyledonous plants. *Plant Mol. Biol. Rep.* 11:165-85.
- Woo, Y.M., Hu, D.W.N., Larkins, B.A. and Jung, R. (2001). Genomics analysis of genes expressed in maize endosperm identifies novel seed proteins and clarifies patterns of zeins gene expression. *The Plant Cell* 13: 2297-2317.
- Zhong, G.Y., Peterson, D., Delaney, D.E., Bailey, M., Witcher, D.R., Register, J.C. III, Bond, D., Li, C.P., Marshall, L., Kulisek, E., Ritland, D., Meyer, T, Hood, E.E. and Howard, J.A. (1999). Commercial production of aprotinin in transgenic maize seeds. *Molecular Breeding*. pp. 345-356
- Zupan, J.R. and Zambrysky, P. (1995). Transfer of t-DNA *Agrobacterium* to plant cell. *Plant Physi.* 107:1041-7.