

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA**

**CLONAGEM MOLECULAR E EXPRESSÃO INTRA- E
EXTRACELULAR EM *Pichia pastoris* DO GENE L1 DE
PAPILOMAVÍRUS BOVINO TIPO 2**

**RECIFE
PERNAMBUCO – BRASIL
2010**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA**

**CLONAGEM MOLECULAR E EXPRESSÃO INTRA- E
EXTRACELULAR EM *Pichia pastoris* DO GENE L1 DE
PAPILOMAVÍRUS BOVINO TIPO 2**

Aluno: MARCELO NAZÁRIO CORDEIRO

- Graduação: Biomedicina

Orientador: Dr. ANTONIO CARLOS de FREITAS

- Prof. Adjunto I – Depto. Genética – UFPE

- Líder do Laboratório de Estudos Moleculares e Terapia Experimental

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de
Pernambuco, como parte das
exigências do Programa de
Pós-Graduação em Inovação
Terapêutica para obtenção do
título de *Magister Scientiae*.

**RECIFE
PERNAMBUCO – BRASIL**

2010

Cordeiro, Marcelo Nazário

Clonagem molecular e expressão em *Pichia pastoris* do gene L1 de papilomavírus bovino tipo 2/ Marcelo Nazário Cordeiro. – Recife: O Autor, 2010.

87 folhas : il., fig., tab.

Orientador: Antonio Carlos de Freitas

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas. Inovação Terapêutica, 2012.

Inclui bibliografia e anexos

- 1. Papilomavírus 2. Leveduras 3. Proteínas I. Freitas, Antonio Carlos de II. Título.**

579.2445

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2012-096

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA

CLONAGEM MOLECULAR E EXPRESSÃO INTRA- E
EXTRACELULAR EM *Pichia pastoris* DO GENE L1 DE
PAPILOMAVÍRUS BOVINO TIPO 2

Marcelo Nazário Cordeiro

Dissertação aprovada, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco para obtenção do título de *Magister Scientiae*, sob orientação de:

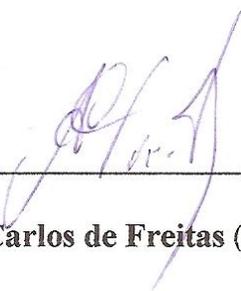
De acordo com avaliação da banca examinadora composta por:



Prof. Dra. Danyelly Bruneska Gondim Martins (Membro Externo)



Prof. Dr. José Luiz de Lima Filho (Membro Externo)



Prof. Dr. Antonio Carlos de Freitas (Membro Interno/Orientador)

Recife/ Pernambuco

27 de Setembro de 2010.

“Onde não falta vontade existe sempre um caminho”
John Ronald Reuel Tolkien - Filósofo e escritor inglês

“Meu pai um dia me disse que há dois tipos de pessoa: as que fazem o trabalho e as que ficam com os louros. Ele me disse para tentar ficar no primeiro grupo, pois há menos competição lá.”

Indira Gandhi – Primeira-ministra da Índia de 1966 a 1980 e de 1980 a 1984

“Nada de grande se faz sem paixão”
Friedrich Hegel – Filósofo alemão

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por sempre ter cuidado de mim, com orientação proveniente da maior de todas as sabedorias, guiando-me e protegendo-me a cada passo em minha vida.

Agradeço aos meus pais, Elias e Débora, sempre presentes com amor e suporte para todos os meus desafios e planos, dificuldades e alegrias. Agradeço a meus irmãos, Éric, Diego e Vanessa, cada um ao seu modo com seu apoio incondicional. Agradeço a Milady, por seu carinho e atenção, qualquer que fosse o meu momento.

Sou grato a minha Avó, Agenora, pelas orações constantes por minha proteção. Agradeço a todos do “Clã Nazário e Cordeiro”, tios e primos, que mesmo à distância, cercaram-me de votos de sucesso.

Muito agradeço a meu orientador, Prof. Dr. Antonio Carlos Freitas, que, com sua paciência e determinação, idealizou e acompanhou meu trabalho, contribuindo com sua instrução essencial à minha formação acadêmica.

Aos meus amigos de longa data, presentes nos meus “altos e baixos”, em especial Nadja Graciele, que me ensinou o valoroso significado de “nadificar”, Fernanda Paula, Elza Lorena, Camylla Carvalho, Eliane Figueiredo, Lucas Leite, Naedson e Antonio, meus agradecimentos. Aos companheiros de “games e fuleragens” Guilherme, Diego “Animal”, Emily, Carlos “Zé Ruela”, aquele obrigado pelos bons momentos que somente grandes amigos podem compartilhar.

Meus mais sinceros agradecimentos a toda a equipe do Laboratório de Estudos Moleculares e Terapia Experimental (LEMTE) e Laboratório de Genética dos Microrganismos (LGM), a todos, que, além de exemplares colegas de trabalho, se tornaram amigos a quem respeito e aprecio. Agradeço a André, por sua constante, obsessiva e compulsiva cobrança sobre minha pessoa e pelo seu memorável “Se garante!”, de vez em quando. Agradeço muito a Eliane por sua compreensão e prestatividade, sempre disposta a me ajudar em qualquer problema. Sou grato a Filipe “Demolidor”, meu grande parceiro, cuja presença merece os devidos créditos e sem o qual metade deste trabalho não se realizaria. Muito tenho a agradecer a todos os demais amigos e colaboradores, como Janaíne “Menina Ruim”, uma cúmplice para qualquer coisa, Élyda e Felipe “Barbosinha”, Billy e Cíntia, que tornaram meus dias mais

alegres e produtivos no laboratório, Bárbara, Cybelle, Luciana, Karem e Karim, grandes exemplos de postura e determinação, assim como as “meninas de João Pessoa e afins”, Angélica, Carol, Jackeline Rafaelle e Pavla, nossa mais recente aquisição, e juntas a Nayara, se tornaram companheiras imprescindíveis ao trabalho.

Agradeço a toda equipe do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), em especial a Monique, Érik, Maria da Conceição “Ceça”, Marcela, Kátia, Marina e Andréia, pessoas que estiveram ao meu lado na execução deste trabalho.

Aos funcionários do Departamento de Genética, Dona Zizi e Seu Romildo “O Tricolor”, profissionais de grande valor e dedicação essenciais para a logística e suporte de todo o meu trabalho, meu mais sincero obrigado.

Toda a minha gratidão à Coordenação da Pós-Graduação em Inovação Terapêutica e professores, especialmente à prof. Suelly, pelo voto de confiança, fé e dedicação ao programa do qual tive o mais profundo orgulho de pertencer como mestrando.

LISTA DE FIGURAS

Revisão de Literatura

- Figura 1.** Representação do Papilomavírus Humano. (p. 3)
- Figura 2.** Mapa genômico característico dos Papilomavírus. (p.6)
- Figura 3.** Ciclo de infecção do PV. (p.7)
- Figura 4.** Ilustração da estrutura viral do PV. (p.9)
- Figura 5.** Monômero de L1.(p.10)
- Figura 6 .(A)** Interação entre as α -hélices interpentaméricas, **(B)** Interações de h4 com h2 e h3 entre 3 subunidades de pentâmeros adjacentes. (p.10)
- Figura 7.** Modelo estrutural do Papilomavírus Bovino. (p.11)
- Figura 8.** Árvore filogenética dos tipos de papilomavírus. Os semicírculos externos identificam gêneros de papilomavírus. (p.13)
- Figura 9.** Árvore filogenética apresentando a disposição dos grupos de papilomavírus bovinos. (p.14)
- Figura 10.** Representação da papilomatose bovina (A e B), câncer no trato gastrointestinal superior (C) e câncer na bexiga urinária (D). (p.14)
- Figura 11.** Fotografia de samambaia da espécie *Pteridium aquilinum*. (p.15)
- Figura 12.** Estrutura de VLPs para uma variedade de vírus. (p.20)
- Figura 13.** Mapas gênicos dos vetores de expressão pPICZA e pPICZA α . (p.27)
- Figura 14.** Cassete de expressão. Integração de um cassete de expressão por inserção nos *locus AOX1* ou *aox1:ARG4*. (p.28)

Métodos

- Figura 15.** Ilustração da amplificação de L1 a partir do genoma de BPV-2 clonado em pAT153. (p.35)
- Figura 16.** Ilustração da ligação pGEM-T ao fragmento purificado L1. (p.36)
- Figura 17.** Ilustração da reação de ligação entre o vetor pPICZA α e o fragmento L1, ambos digeridos com *EcoRI* e *Sall*. (p.40)
- Figura 18.** Ilustração de uma digestão com *EcoRI* a qual foi submetida a construção pPICZA α L1B2. (p.42)
- Figura 19.** Ilustração de uma digestão dupla com *EcoRI* e *Sall* da construção pPICZA α L1B2. (p.42)

Figura 20. Eppendorf® Multiporator e cubetas de 1, 2 e 3mm; equipamento utilizado para transformação das células de *P. pastoris*. (p.43)

Figura 21. (A) Placa *deep-weel* de 96 poços; (B) Dispositivo *immunoblotter*; (p.46)

Figura 22. Esquema ilustrativo do ensaio de cultivo, com fase de crescimento e de indução, aos quais foram submetidos os clones portadores das construções pPICZAL1B2 ou pPICZA α L1B2. (p.46)

Resultados

Figura 23. Produto da amplificação do gene L1 de BPV 2. (p.49)

Figura 24. PCR de três possíveis clones pGEMTL1B2. (p.49)

Figura 25. Digestão dupla da construção pGEMTL1B2 com *EcoRI/SalI*, liberando o fragmento de 1,5 kb (L1 de BPV2). (p.50)

Figura 26. Digestão com as enzimas *EcoRI* e *XhoI* de DNA plasmidial pGEMTL1B2. (p.50)

Figura 27. (A) PCR de colônias de quatro possíveis clones contendo a construção pPICZA α L1B2; (B) Confirmação da presença do inserto L1 na construção pPICZAL1B2. (p.51)

Figura 28. Confirmação da obtenção de bactérias recombinantes portadoras da construção pPICZAL1B2 por digestão enzimática. (p.52)

Figura 29. Construção pPICZA α L1B2 linearizada por digestão com *EcoRI*. (p.52)

Figura 30. Digestão dupla *EcoRI/SalI* dos clones pPICZA α L1B2. (p.53)

Figura 31. Repiques das colônias de leveduras eletroporadas com a construção pPICZAL1B2 e pPICZA α L1B2 em placa YPDS. (p. 53)

Figura 32. PCR de colônia para confirmação da integração do cassete de expressão no genoma das leveduras recombinantes, utilizando *primers* para o gene *AOX1*. (p.54)

Figura 33. Clones 1 e 2 (clones pPICZ α L1B2), fragmentos amplificados com *primer forward* interno ao gene L1B2 e *primer reverse* AOX1 a partir do *template* integrado ao genoma de *P. pastoris*. (p.54)

Figura 34. Análise da atividade transcricional do gene L1 por RT-PCR a partir de material proveniente dos recombinantes de *P. pastoris* X-33/pPICZAL1B2, X-33/pPICZA α L1B2 e X-33/pPICZA após 120 horas de indução com metanol a 2%. (p.55)

Figura 35. Eletroforese em gel SDS-PAGE 12.5%: material proveniente do extrato protéico solúvel dos recombinantes de *P. pastoris* após 120 horas de indução com metanol a 2%. (p.56)

Figura 36. Eletroforese em gel SDS-PAGE 12.5%: material proveniente do sobrenadante bruto de recombinante de *P. pastoris*, transformada com a construção pPICZA α HSA, após 24, 48 e 72 horas de indução com metanol a 2%. (p.56)

Figura 37. *Dot blotting* usando anti-HIS (1;10000) conjugado à fosfatase alcalina com 100 μ L do sobrenadante de 48 clones pPICZA α L1B2. (p.57)

Figura 38. *Dot blotting* com anticorpo anti-His conjugado à fosfatase alcalina (1:10000), com amostras de extrato protéico de um clone transformado com pPICZAL1B2, de um clone portador da construção pPICZA, de um clone transformado compPICZALacZ e amostras provenientes de meio de cultura liofilizado de um clone transformado com pPICZA α L1B2 e de um clone pPICZA. (p.58)

Figura 39. *Dot blotting* usando anti-HIS (1;10000) conjugado à fosfatase alcalina, com sobrenadante bruto coletado por centrifugação após indução por 72 horas, com metanol a 1% e temperatura constante de 23°C. (p.59)

Figura 40. *Dot blotting* usando anti-HIS (1;10000) conjugado à fosfatase alcalina, com 50 μ L do concentrado protéico (3mL do sobrenadante precipitado com acetona gelada e ressuspendido em 400 μ L de tampão fosfato) aplicados sobre membrana de nitrocelulose. (p.59)

LISTA DE QUADROS

- Quadro 1.** Componentes da PCR para amplificação do gene L1 com enzima *Taq* comum (p.35)
- Quadro 2.** Componentes da PCR para amplificação do gene L1 com enzima *Taq High Fidelity*. (p.35)
- Quadro 3.** Componentes da reação de ligação para montagem vetor pGEM-T carregando o gene L1. (p.36)
- Quadro 4.** Componentes da reação de digestão do fragmento L1 para subclonagem em **pPICZA**. (p.38)
- Quadro 5.** Componentes da reação de digestão do fragmento L1 para subclonagem em **pPICZA α** . (p.39)
- Quadros 6 e 7.** Componentes das reações de digestão dos vetores **pPICZA** e **pPICZA α** para subclonagem do fragmento L1. (p.39)
- Quadros 8 e 9.** Componentes das reações de ligação dos vetores **pPICZA** e **pPICZA α** ao fragmento L1. (p.40)
- Quadro 10.** Componentes da PCR de colônias portadoras das construções **pPICZAL1B2** ou **pPICZA α L1B2**. (p.41)
- Quadro 11.** Vantagens e desvantagens do uso do promotor AOX1 para expressão heteróloga; Adaptado de Macauley-Patrick, 2005. (p.61)

LISTA DE ABREVIATURAS

- APC** – Célula apresentadora de antígenos
- BPV** – *Bovine Papillomavirus* - Papilomavírus Bovino
- BTV** – vírus da língua azul
- CMV** – Citomegalovírus
- COPV** - *Canine Oral Papillomavirus* – Papilomavírus oral canino
- CRPV** - *Cottontail Rabbit Papillomavirus* – Papilomavírus do coelho *cottontail*
- CTL** – Linfócitos T Citotóxicos
- DCs** – Células dendríticas
- DNA** – Ácido desoxirribonucléico
- DO600** - Densidade ótica a 600 nm
- E** – Gene que codifica proteína Early ou imediata
- EDTA** – *Ethylenediamine tetraacetic acid* ou ácido etilenodiamino tetra-acético
- HEV** – vírus da hepatite E
- HIV** – Vírus da Imunodeficiência Humana
- HCV** – vírus da hepatite C
- HPV** – Papilomavírus humano
- IFN** – Interferon
- IL-12** – Interleucina-12
- Kb** – Kilobase
- kDa** – Kilodalton
- L** – Gene que codifica proteína Late ou tardia
- LC** – Células de Langerhans
- LCR** – Região longa de controle
- MHC I** – Complexo maior de histocompatibilidade de classe I
- mRNA** – RNA mensageiro
- Mut^s** – *Methanol utilization slow phenotype* – fenótipo de utilização lenta de metanol
- Mut⁺** – *Methanol utilization plus phenotype* – fenótipo de alta utilização de metanol
- Mut⁻** - *Methanol utilization minus phenotype* - fenótipo de menor utilização do metanol
- ORF** – *Open reading frame* ou quadro aberto de leitura
- p53** - Proteína 53 – Fator de transcrição que regula o ciclo celular
- PBS** – Phosphate buffered saline
- PCR** – Reação em cadeia da polimerase
- pRb** - Proteína do retinoblastoma – supressora de tumor
- PV** – Papilomavírus

RNA – Ácido ribonucléico

RT-PCR – Reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa

SIV HIV – VLP híbrida entre vírus da imunodeficiência dos símios (gag) e vírus da imunodeficiência humana (env)

TCD4+ - Célula T auxiliar

TCD8+ - Célula T citotóxica

tRNA – RNA transportador

TMB – Tetrametil dihidrocloro de benzidina

VLP – “*virus-like particle*” – partícula semelhante a vírus

RESUMO

Os papilomavírus são um grupo de pequenos vírus DNA dupla fita caracterizado por induzir a formação de lesões que, normalmente, são benignas e podem regredir naturalmente, mas também apresentam o potencial para se tornarem tumores malignos. O papilomavírus humano (HPV) está fortemente relacionado às doenças sexualmente transmissíveis (DST) e é uma das principais causas de câncer cervical. O papilomavírus bovino (BPV), por sua vez, representa um grave problema econômico em termos de pecuária. Em bovinos, são mais comuns as papilomatoses cutâneas e mucosas nas regiões genital e orofaríngea. Existem bem caracterizados seis tipos diferentes de BPV (BPV 1 ao 6) e, recentemente, quatro novos tipos (BPVs 7 ao 10) foram seqüenciados. No Nordeste, especialmente no estado de Pernambuco (Zona da Mata), a incidência da papilomatose bovina é muito alta, causando grandes perdas econômicas para os criadores. Não há tratamento com eficácia comprovada. Proteção contra a infecção é conferida por anticorpos neutralizantes dirigidos contra os epítomos conformacionais de proteínas estruturais L1. Esses anticorpos podem ser eficientemente induzidos pela imunização com *virus-like particles* (VLP) que se formam espontaneamente, após a expressão de L1 em sistemas heterólogos. Nos últimos anos, a levedura metilotrófica *Pichia pastoris* emergiu como um sistema eficaz e barato para produzir altos níveis de proteína recombinante. O foco deste trabalho foi construir e avaliar dois plasmídeos (pPICZA α L1B2 e pPICZAL1B2), como vetores para expressão do gene L1BPV-2 em células de *P. pastoris*. Um deles (pPICZA α L1B2) insere na proteína recombinante um sinal de secreção (α -*matig*). Assim, esperou-se comparar a eficiência da expressão heteróloga através das vias intra e extracelulares. O gene L1 foi amplificado por PCR do genoma completo BPV-2, foi clonado em vetor pGEM-T (Promega ®) e, posteriormente, foi subclonado nos vetores de expressão pPICZA e pPICZA α (Invitrogen ®). PCR e análise de restrição indicaram a inserção correta do gene L1 em ambos os vetores, bem como o seqüenciamento. Por eletroporação, *P. pastoris* (cepa de levedura X-33) foi transformada com a construção pPICZAL1B2 ou pPICZA α L1B2, cuja integração no genoma de levedura pode ser identificada por PCR da colônia. As leveduras transformadas foram selecionadas para experimentos de cultura com indução com metanol. A expressão de L1 foi indicada por RT-PCR e análise de proteínas. A proteína recombinante L1 foi detectada em células de levedura, que sofreram tratamento com solução de lise (via intracelular) e em meio de cultura submetido a precipitação com acetona (via extracelular). Este estudo fornece um caminho para uma estratégia de vacina com VLP contra papilomavíroses bovina e apresenta um modelo experimental para estudos de papilomatoses similares, além de mostrar um modelo experimental interessante para futuras aplicações em seres humanos.

PALAVRAS-CHAVE: papilomavírus; vetor de expressão; proteína L1; *virus-like particles*;

ABSTRACT

Papillomaviruses are a group of small double-stranded DNA viruses characterized by inducing the formation of lesions that are usually benign and may regress naturally, but also have the potential to become malignant tumors. The human papillomavirus (HPV) is strongly related to sexually transmitted diseases (STDs) and is a major cause of cervical cancer. The bovine papillomavirus (BPV), in turn, represents a serious economic problem in terms of livestock. In cattle, cutaneous and mucosal papillomatosis at genital and oropharyngeal regions are the most common. There are six different types of BPV (BPV 1-6) well characterized and, recently, four new types (BPVs 7-10) have been sequenced. In the Northeast, especially in the state of Pernambuco (Zona da Mata), the incidence of bovine papillomatosis is very high, causing great economic losses for breeders. There is no treatment with proven efficacy. Protection against infection is conferred by neutralizing antibodies directed against structural L1 protein conformational epitopes. These antibodies can be efficiently induced by immunization with virus-like particles (VLP) that are formed spontaneously after L1 expression in heterologous systems. In recent years, the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* has emerged as an efficient and inexpensive heterologous system to produce high protein levels. The focus of this paper is to construct and evaluate two plasmids (pPICZA α L1B2 and pPICZAL1B2), as vectors to gene expression of L1BPV-2 in cells of *P. pastoris*. One of them (pPICZA α L1B2) inserts a secretion signal (α -matting) on recombinant protein. Thus, it had been expected to compare the heterologous expression via intracellular and extracellular pathway efficiency. L1 gene has been amplified by PCR from the complete BPV-2 genome, has been cloned into pGEM-T vector (Promega®) and, subsequently, has been sub cloned into pPICZA and pPICZA α expression vectors (Invitrogen®). PCR and restriction analysis have indicated the correct insertion of the L1 gene in both vectors, as well as sequencing. By electroporation, *P. pastoris* (strain X-33 yeast) has been transformed with pPICZAL1B2 or pPICZA α L1B2 constructions, whose integration into yeast genome could be identified by colony PCR. Transformed yeast has been selected to culture experiments with methanol induction. L1 expression has been indicated by RT-PCR and protein analysis. L1 recombinant protein has been detected in yeast cells that has undergone lysis solution treatment (intracellular pathway) and from the culture medium acetone precipitation submitted (extracellular pathway). This study provides a way for a VLP-vaccine strategy against bovine papillomaviruses and exhibits an experimental model for similar papillomatosis studies, while showing an interesting experimental model for future applications in humans.

KEY-WORDS: papillomavirus; expression vector; L1 protein; virus-like particle;

SUMÁRIO

Agradecimentos	i
Lista de figuras	iii
Lista de tabelas	vi
Lista de abreviaturas	vii
Resumo	ix
Abstract	x
Introdução	1
Revisão de Literatura	3
Objetivos	30
Materiais e Métodos	31
Resultados	50
Discussão	61
Conclusão	72
Referências Bibliográficas	73
Anexo I	85
Anexo II	86
Anexo III	87

1. INTRODUÇÃO

Os papilomavírus são vírus de DNA amplamente difundidos no mundo entre tipos e variantes, cuja principal característica clínica é a presença de lesões papilomatosas. Estes vírus apresentam especial tropismo pelos tecidos cutâneo e mucoso e são bem conhecidos na etiologia de várias doenças em homens e animais, capazes de infectar células basais, induzindo a formação de tumores que, por vezes, regredem naturalmente, mas, a depender de interações ambientais e genéticas com o hospedeiro, podem gerar um processo maligno e potencialmente fatal. A infecção pelo papilomavírus humano (HPV) é uma das doenças sexualmente transmissíveis (DST) mais prevalentes em todo o mundo.

O papilomavírus bovino (BPV) representa um problema econômico importante do ponto de vista pecuário devido a sua epidemiologia pouco documentada e à ausência de qualquer tratamento ou regime de prevenção comprovadamente eficaz. Dentre os papilomavírus bovino, são bem caracterizados seis diferentes tipos de BPV (BPV de 1 a 6) e recentemente outros quatro novos tipos (BPVs 7 a 10) tiveram seu genoma seqüenciado. Muitos estudos adotam a papilomatose bovina como modelo de infecção para o esclarecimento da biologia viral dos papilomavírus em outras espécies, inclusive no ser humano.

Promover medidas profiláticas para lidar com as doenças causadas pelos papilomavírus humanos e bovinos constitui estratégia de grande interesse tanto de saúde pública como de sanidade animal. Em vista disso, uma das opções que poderiam contornar esta situação de maneira eficaz, seria a vacinação. Atualmente, tecnologias promissoras para obtenção de vacinas têm sido bastante estudadas, e no caso do papilomavírus, a produção da proteína L1, que forma o capsídeo viral, sem poder infectante ou transformante, mas capaz de ativar a resposta imunológica quando inoculada, seria a melhor estratégia. A proteção contra a infecção é conferida por anticorpos neutralizantes direcionados contra epítopos conformacionais da proteína estrutural L1. Estes anticorpos podem ser eficientemente induzidos por imunização com *virus-like particles* (partículas semelhantes a vírus ou VLPs), que se formam espontaneamente após a expressão de L1 em vetores recombinantes.

Para tanto, torna-se primordial o estabelecimento um sistemas de expressão heterólogo viável e eficiente, o qual deve fornecer quantidades apreciáveis de proteína L1 corretamente sintetizada a um custo/benefício compatível. Diversos parâmetros

podem interferir na praticidade de um sistema de expressão e adaptações do modelo podem ser necessárias a depender da proteína recombinante desejada. A produção recombinante em microrganismos transformados pode seguir a via intracelular ou extracelular, conforme o vetor de expressão no qual o gene estiver clonado.

A levedura metilotrófica *Pichia pastoris* representa uma opção de sistema heterólogo, eficiente e de baixo custo para a produção de altos níveis de proteínas recombinantes. Vetores de expressão na levedura *P. pastoris* estão bem estabelecidos e têm sido utilizados com sucesso para produção de diferentes tipos de proteínas heterólogas, no entanto, ainda são muito escassas as informações sobre a expressão recombinante de genes de BPV.

Os plasmídeos pPICZA e pPICZA α (Invitrogen®) reúnem as características de suportar bem o gene L1, transformar células de levedura *P. pastoris* por integração ao genoma e carregam marcas de seleção de clones estáveis. Em especial, o vetor pPICZA α insere a sinalização necessária para a exportação da proteína recombinante, caracterizando a via de produção extracelular, o que otimiza a sua recuperação.

Uma vez estabelecida a clonagem do gene L1BPV-2 em *P. pastoris*, a comparação entre as vias de expressão intra e extracelular representa um passo importante para uma estratégia de destaque na produção da proteína L1 para fins de vacinação. Recorrendo a técnicas moleculares válidas, esse estudo comparativo fornece indícios de otimização de técnicas para a expressão recombinante os quais podem ser adaptados para a produção vacinal contra qualquer tipo de papilomavírus. Nesse ponto, a construção e a avaliação de vetores de expressão, portadores do gene L1, contribuem com um modelo experimental viável, interessante e aplicável a todos os outros tipos de papilomavírus, abrangendo interesses econômicos e de saúde pública.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Papilomavírus

Os papilomavírus (PV) pertencem a um grupo muito heterogêneo de vírus DNA, que, comumente, infectam células basais nos epitélios cutâneo e mucoso induzindo-as à formação de lesões tumorais, conhecidas como papilomas ou verrugas (Howley & Lowy, 2001). As lesões causadas são geralmente benignas e a infecção é normalmente eliminada pela resposta celular imuno-mediada, a qual é direcionada contra antígenos virais (O'Brien & Campo, 2002), mas sob a ação da integração viral ou co-fatores ambientais, podem progredir para tumores malignos (Nicholls & Stanley, 2000; Zur Hausen, 2002; Campo, 2006). A papilomatose cutânea é amplamente disseminada em todo o mundo e ocorre em diversas espécies de mamíferos e aves (Lancaster & Olson 1982, Campo & Jarrett 1986, Hopkins 1986). Os tipos que infectam o ser humano são denominados abreviadamente de HPV, mas também são bem conhecidos os que infectam bovinos – BPV (Papilomavírus Bovino), coelhos – CRPV (*Cottontail Rabbit Papillomavirus* – Papilomavírus do coelho *cottontail*) e cães – COPV (*Cannine Oral Papillomavirus* – Papilomavírus oral canino). Outros animais susceptíveis à infecção por papilomavírus são os veados, alguns equinos, touros, búfalos, hamsters e macacos (Ozbun, 2002; Ferreira *et al.*, 2002).

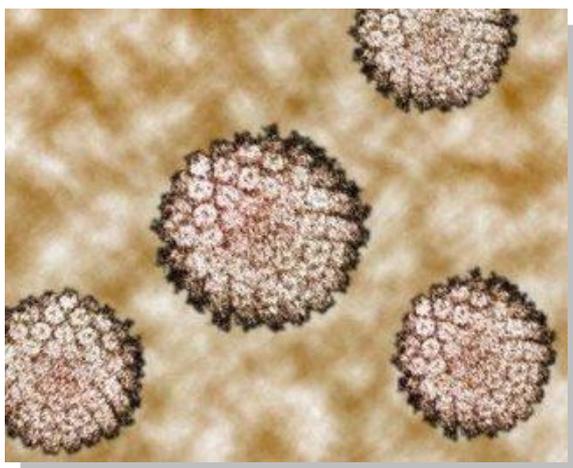


Figura 1. Representação do Papilomavírus Humano (Bosch, *et al.* 2002)

O PV é um pequeno vírus oncogênico, não envelopado, com morfologia icosaédrica e diâmetro variável de 55–60nm. O capsídeo apresenta 72 capsômeros, formado pelos pentâmeros de 360 cópias de uma proteína designada L1, além de 12 cópias de outra proteína, denominada L2, (Baker *et al.*, 1991; Modis *et al.*, 2002) que

atravessa o capsídeo e liga-se ao genoma viral. O ácido nucléico apresenta-se como um DNA circular de dupla fita, com massa molecular de $5,0 \times 10^6$ daltons e tamanho de cerca de 8kpb (Stringfellow et al., 1988, de Villiers *et al.*, 2004). As histonas celulares condensam o genoma viral em um minicromossomo (Howley, 1996; Modis *et al.*, 2002). Este genoma é constituído de 10 seqüências abertas de leitura (*open reading frames* – ORF), distribuídas em duas regiões principais (E e L), conforme o momento da transcrição. O segmento inicial (*early* - E) é constituído por oito ORFs e o segmento tardio (*late* – L) contém duas ORFs. Os genes L e E seguem um padrão temporal de expressão. Entre os segmentos E e L existe ainda um outro segmento denominado LCR (*long control region*).

O segmento E, incluindo genes da fase precoce de transcrição, que representam 45% do genoma viral, codifica proteínas não-estruturais, necessárias para os processos de controle da replicação e transcrição viral e para a transformação da célula hospedeira.

O produto do gene E1 possui uma atividade helicase dependente de ATP, responsável pela fase inicial de replicação do DNA viral. A replicação do DNA viral é iniciada após a ligação da proteína E1 a seqüências ricas em AT da origem de replicação (Wilson et al, 2002). A proteína E2 está envolvida no controle da transcrição e, também, da replicação viral. Em baixos níveis, E2 ativa a transcrição viral, enquanto que, em altas concentrações, a transcrição é reprimida. Isto sugere que E2 atue como um regulador de atividades do ciclo celular, mediadas por E6 e E7, além de contribuir para o número de cópias.

A perda da expressão de E2 está correlacionada com o aumento da proliferação celular induzido por E6 e E7 (Hedge, 2002). A proteína codificada pelo gene E4 associa-se com a rede de queratina celular, provocando sua desestabilização, o que sugere um papel na liberação de partículas virais (Doorbar, 2004). A proteína E4 é formada pelo *splicing* de seqüências de RNA codificando os cinco primeiros aminoácidos de E1 com a janela de leitura E4, formando os transcritos E1^{E4}, que são expressos durante todo o ciclo do PV, porém, em maior grau, nas camadas suprabasais diferenciadas.

Além das proteínas precoces citadas, o segmento gênico E do BPV codifica 3 proteínas indispensáveis para o processo carcinogênico sendo, por isso, designadas oncoproteínas: E5, a principal oncoproteína viral, E6 e E7, esta última desempenhando um papel mais modesto no processo carcinogênico induzido pelo papilomavírus (Nasir & Campo, 2008).

E5 é uma proteína hidrofóbica de membrana expressa nos estágios iniciais de infecção viral. Sua expressão modifica a resposta celular a fatores de crescimento e bloqueia a expressão na superfície de moléculas de MHC I (Complexo principal de histocompatibilidade) (Bravo et al. 2005.). Trata-se de uma proteína viral que provoca notável perturbação nos mecanismos de inibição do crescimento e no controle do ciclo celular. Seu sítio de ação são os compartimentos das endomembranas da célula, particularmente o aparelho de Golgi, onde ela liga-se a uma subunidade da ATPase H⁺ vacuolar. Esta interação provoca a inibição da comunicação intercelular a partir das junções gap e ausência de acidificação dos endossomos e aparelho de Golgi (Faccini *et al.*, 1996; Schapiro *et al.*, 2000; Borzacchiello & Roperto, 2008; Nasir & Campo, 2008).

As junções gap constituem canais intercelulares para mensageiros secundários de baixo peso molecular, importantes no controle homeostático dos tecidos; caso uma célula transformada esteja livre do controle fornecido pelas células normais que a rodeiam, ela poderá proliferar descontroladamente, dando origem a um clone transformado em expansão. Portanto, a ausência da comunicação fornecida pelas junções gap nas células transformadas por papilomavírus provavelmente corroboram para a tumorigênese impedindo o contato entre as células infectadas e as normais (Nasir & Campo, 2008).

Por outro lado, a inibição da acidificação dos endossomos e do aparelho de Golgi conduz a uma interrupção do processamento de proteínas celulares, resultando na retenção e reciclagem dos receptores de fatores de crescimento não degradados presentes nos compartimentos endossômicos (Straight *et al.*, 1995). Adicionalmente, a proteína E5 de BPV interage diretamente com o receptor do fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGF-R). Essa interação potencializa a mitose, tendo em vista que ativa uma cascata de sinalização intracelular e provoca uma desregulação generalizada do programa de proliferação celular (Borzacchiello *et al.*, 2006; Nasir & Campo, 2008 apud O'Brien *et al.*, 1999; Zago *et al.*, 2004).

A proteína E6 do BPV constitui um ativador transcricional, uma vez que se liga ao co-ativador de transcrição CBP/p300 e inibe sua ação. Através dessa interação, E6 inibe a função do supressor de tumor p53. Ademais, a proteína E6 afeta os processos celulares envolvendo vias de tráfego mediado por clatrina através de sua interação com o complexo AP-1 (Tong *et al.*, 1998). Apesar disso, é importante salientar que os Xi-papilomavírus tem o gene E6 substituído por um gene semelhante a E5 (Nasir & Campo, 2008). Para este grupo de vírus, a proteína E6 não é necessária para um ciclo

infeccioso bem sucedido, ou mesmo para a progressão do papiloma até carcinoma, no caso do BPV 4 (Campo, 2006).

A oncoproteína E7 coopera com E5 e E6 na transformação celular e, portanto, a co-expressão desses três genes provoca significativo aumento na capacidade de transformação viral (Bohl *et al.*, 2001). Isto pode ser constatado quando se observa que a ausência da ORF E7 em mutantes resulta em uma menor eficiência na indução da transformação celular (Sarver *et al.*, 1984). O gene E7 de BPV-1 codifica uma proteína fixadora de zinco com 127 aminoácidos. Em células infectadas naturalmente, a expressão do gene E7 de BPV 1 é observada tanto no citoplasma quanto no núcleo das células nas camadas basais e inferiores da camada espinhosa, enquanto que a expressão de E7 em BPV 4 é observada em todas as camadas de papilomas, em todos os estágios (Bohl *et al.*, 2001; Anderson *et al.*, 1997).

Recentemente foi demonstrado que a proteína E7 de BPV 1 pode inibir um tipo de apoptose induzido pelo desprendimento celular, denominado *anoikis*. A inibição desse mecanismo está parcialmente correlacionada com a habilidade das células transformadas pela proteína E6 em se desprender com sucesso das demais células normais (Demasi *et al.*, 2007).

A proteína E6 dos papilomavirus humano de alto risco inativa a proteína de supressão de tumor p53, facilitando sua degradação (Howley *et al.* 2002). Outros potenciais alvos celulares da proteína E6 foram identificados e, aparentemente, estão também envolvidos no processo de transformação celular. A proteína E7, entre outras funções, liga-se à forma hipofosforilada da proteína do retinoblastoma (pRB), resultando na inativação desta última, o que permite a progressão para a fase S do ciclo celular. Foi demonstrado que a proteína E7 de papilomavírus de alto risco liga-se com maior eficiência à pRB do que a proteína E7 dos papilomavírus de baixo risco. O rompimento da região E1 – E2 é necessário para o evento de integração ao genoma do hospedeiro e tem como consequência a desregulação do controle transcricional dos genes virais, mais criticamente, dos oncogenes E6 e E7 (Peña, 2002).

O segmento L, correspondente a 40% do genoma viral, é transcrito na etapa tardia do ciclo reprodutivo do vírus e codifica as proteínas estruturais L1 (proteína principal) e L2 (proteína menor), as quais compõem o capsídeo viral. Os epítomos de neutralização imunodominantes estão localizados na proteína L1, enquanto a proteína L2 participa da encapsidação do genoma viral. A proteína capsídial L1 compõe 90% do capsídeo e possui um peso molecular aparente de 54-58 kDa, enquanto a proteína L2

encontra-se associada à proteína L1 e tem um peso molecular aparente de 68-76 kDa (Frazer, 1996; Han *et al.*, 1999; Nicholls & Stanley, 2000; Munger & Howley, 2002; Buck *et al.*, 2005).

A região LCR contém elementos promotores e reguladores da replicação viral, correspondendo a 15% do genoma (Campo *et al.*, 1994). É uma área não-codificante do genoma viral, de aproximadamente 500-1000 nucleotídeos, dependendo do tipo do papilomavírus, situada entre o terminal 3' da ORF tardia e o terminal 5' da ORF precoce. Essa região possui inúmeros locais de ligações para os repressores e ativadores da transcrição, além da origem de replicação (Nicholls & Stanley, 2000; Munger & Howley, 2002; Borzacchiello & Roperto, 2008). A LCR dos BPV-1, BPV-2 e BPV-5 contém 12 sítios de ligação à E2, enquanto que nos tipos 3, 4 e 6, são reconhecidos apenas quatro sítios de ligação à E2. A proteína E2 é a reguladora da transcrição viral, e sua ligação à LCR pode ativar ou reprimir a transcrição dos genes virais (Borzacchiello & Roperto, 2008). No entanto, a LCR de BPV-4 possui múltiplos elementos regulatórios positivos e negativos capazes de agir independentemente da presença de E2 (Jackson & Campo, 1995).

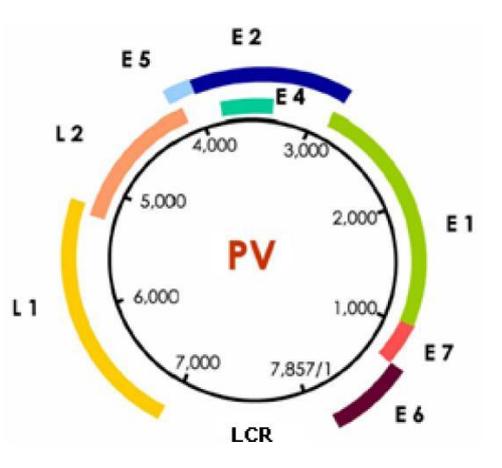


Figura 2. Mapa genômico geral dos Papilomavírus (PV)

Embora esta seja a organização convencional para o genoma viral dos PVs (Figura 2), há alguma variação quanto a presença e ausência de ORFs, a depender do tipo viral considerado. Por exemplo, os genomas de BPV-3, BPV-4 e BPV-6 perderam a ORF E6, que foi substituída por E5 (originalmente definida como E8), enquanto que a maioria dos tipos de PV, BPV-1, BPV-2 e BPV-5 ainda mantêm esse gene (Borzacchiello & Roperto, 2008).

2.2. Ciclo viral dos papilomavírus

Os papilomavírus que infectam animais têm tido grande importância na investigação da biologia do vírus, na sua relação com o hospedeiro e na resposta imune contra o vírus, além de contribuírem com o desenvolvimento de vacinas anti-papilomavírus. (Kirnbauer et al. 1996).

O ciclo de vida dos papilomavírus está intimamente ligado à diferenciação epitelial, já que se replicam no epitélio escamoso estratificado da pele e mucosas (Campo, 1997; Stanley, 2001). A liberação dos vírions não envelopados depende da desintegração celular normal, tipicamente observada próxima à superfície do epitélio. A dificuldade de mimetizar a diferenciação do epitélio estratificado em culturas de células tem sido um desafio para o estudo *in vitro* do ciclo viral. Dessa forma, muito do que se sabe sobre a morfogênese deriva do estudo de versões recombinantes das proteínas estruturais L1 e L2 (Buck *et al.*, 2005). Além disso, o complexo ciclo de replicação dos papilomavírus dificulta a montagem de um sistema de propagação em laboratório que permita a produção de vírions para fins vacinais (da Silva *et al.*, 2001).

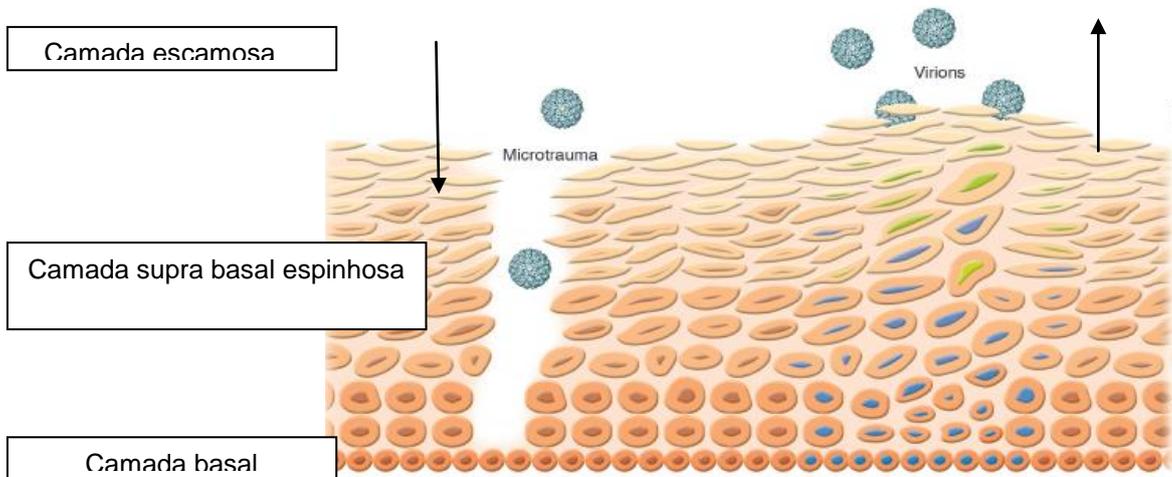


Figura 3. Ciclo de infecção do PV. Entrada do vírus no tecido epitelial através de microtrauma e estabelecimento da infecção na camada basal (células com núcleo em azul). As células de núcleo verde indicam a expressão das proteínas L1 e L2 para montagem dos vírions que são liberados posteriormente (adaptado de Lowy & Schiller, 2006).

Os papilomavírus infectam queratinócitos basais primitivos, onde sofrem três estágios de replicação. O processo infeccioso inicial ocorre na camada basal do epitélio, através de microlesões e/ou abrasão, mas os primeiros sinais de transcrição do genoma viral só aparecem cerca de 4 semanas após a infecção (Buck *et al.*, 2005). Dentro das camadas epidérmicas basal e primeira suprabasal, o DNA viral é replicado para um

número de 50 a 100 cópias por célula. Durante o segundo estágio, o estágio de manutenção, a replicação do DNA viral é realizada em sincronia com a diferenciação celular do hospedeiro, ocorrendo apenas durante a fase S do ciclo celular deste último. Durante ambos os estágios, o DNA do PV é mantido como plasmídeo episossomal nos núcleos das células infectadas. O terceiro e último estágio é o estágio vegetativo de replicação viral. Este estágio ocorre apenas em tecidos com diferenciação terminal e incluem tanto um aumento no número de cópias do genoma viral, como a expressão dos genes tardios e formação de um novo vírus (Bedell et al. 1991, Campo, 1997).

Foi demonstrado que, para o papilomavírus humano, o genoma viral encontra-se integrado ao genoma do hospedeiro nas linhagens celulares do carcinoma do colo uterino, porém encontra-se na forma episossomal extracromossômico nas lesões benignas (Choo et al. 1997). Esse achado sugere que, para o HPV, a inserção do genoma viral no genoma da célula hospedeira é, pelo menos, uma das maneiras de desencadear o processo maligno.

Uma característica interessante apresentada pela grande maioria de tipos de PV é a capacidade de permanecer em longos ciclos de latência. Após algum dano no epitélio infectado, ocorre a indução da expressão dos genes virais resultando na formação do papiloma, possivelmente pela produção de citocinas inflamatórias e estimulação da proliferação celular (Campo, 2006). Frequentemente, o genoma viral pode ser encontrado no epitélio histologicamente normal, sem nenhum sinal clínico da doença (Ogawa *et al.*, 2004).

2.3. A proteína L1

A ORF L1 é a mais conservada no genoma do papilomavírus, justificando o seu uso para a identificação de novos tipos virais. Desta forma, os papilomavírus são genotipados e não sorotipados.

A proteína gênero-específica L1 é a principal proteína do capsídeo, com peso molecular de cerca de 54-58 kDa, representando cerca de 90%, contém epítomos que induzem anticorpos neutralizantes e, mesmo na ausência do genoma e da proteína L2, pode formar partículas semelhantes a vírus (VLP) espontaneamente (Campo 1995, David et al. 2001). Além de sua função estrutural, L1, e provavelmente, L2, promovem a ligação do vírus a receptores celulares (Campo 1997). A proteína L2 por sua vez, tem peso molecular entre 68-76 kDa (da Silva *et al.*, 2001). Apesar de ser encontrada em

menor quantidade, a proteína L2 é importante para o encapsidamento do genoma viral (Roden *et al.*, 1996), pois durante a morfogênese do virion liga-se ao DNA favorecendo seu encapsidamento (Fay *et al.*, 2004).

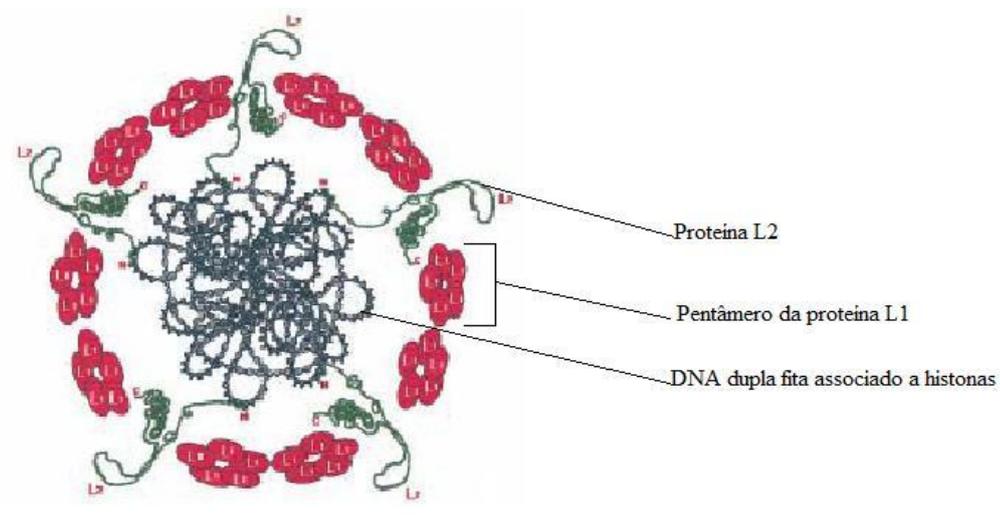


Figura 4. Ilustração da estrutura viral apresentando a proteína L2 ligada ao DNA viral e atravessando o capsídeo; os monômeros da proteína L1 organizados em pentâmeros formando o capsídeo; o DNA dupla fita circular condensado por histonas (Trus, et al. 1997).

A proteína L1 possui cerca de 500 aminoácidos (Belnap *et al.*, 1996; Chen *et al.*, 2000), enquanto L2 possui 469 aminoácidos (aa). Os primeiros 60 aa de L2 ficam dentro do capsídeo formado por L1 e ligam-se ao DNA viral, a seqüência de 61 a 123 aa está exposta na superfície do vírus e a porção C-terminal localiza-se internamente (Liu *et al.*, 1997).

Existem evidências bioquímicas que pontes dissulfeto estabilizam o capsídeo dos papilomavírus (Sapp *et al.*, 1995; Fligge *et al.*, 2001). Experimentos de mutagêneses com HPV 16 realizados por Li *et al.* (1998) e Sapp *et al.* (1998) identificaram que os resíduos Cys175 e Cys428 de L1 são prováveis parceiros em ligações dissulfeto, pois são as únicas cisteínas expostas em L1. As interações inter pentaméricas ocorrem através da porção C-terminal de L1, onde cada braço C-terminal invade o pentâmero adjacente (Modis *et al.*, 2002).

Os monômeros de L1 contém 12 β -fitas, 6 *loops* e 5 α -hélices (h1-h5). Estudos realizados por Bishop *et al.* (2007) demonstram que as α -hélices h2, h3 e h4 localizadas próximas a porção C-terminal de L1 são responsáveis pelas interações inter pentaméricas requeridas para montagem do capsídeo (Figura 5). Caracterizações

bioquímicas e estruturais de L1 mostram que as α -hélices na região C-terminal tem papel importante no dobramento e montagem do capsídio. As α -hélices h2, h3 e h5 são essenciais para o dobramento de L1 e formação do pentâmero, enquanto a h4 é indispensável para montagem do capsídio viral, devido seu papel na interação entre os pentâmeros adjacentes (Bishop *et al.*, 2007).

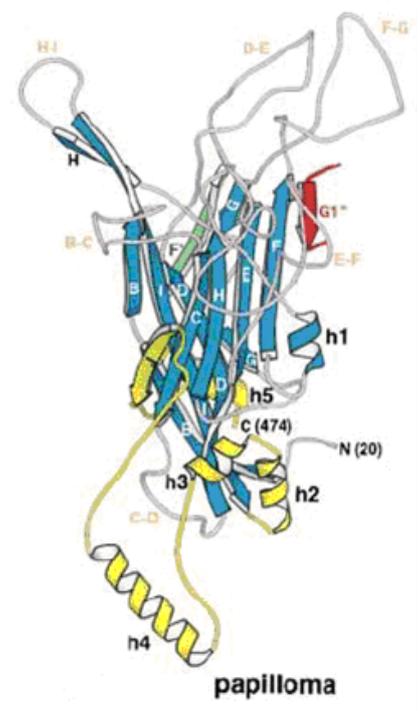


Figura 5. Monômero de L1. A estrutura inclui os aminoácidos de 20 a 474, o primeiro é indicado por N (20) e o último por C (474). Os elementos estruturais são marcados, B-I para β -fitas e h1-h5 para as cinco α -hélices. Os loops entre as β -fitas são indicados por B-C, C-D, etc (Chen *et al.*, 2000).

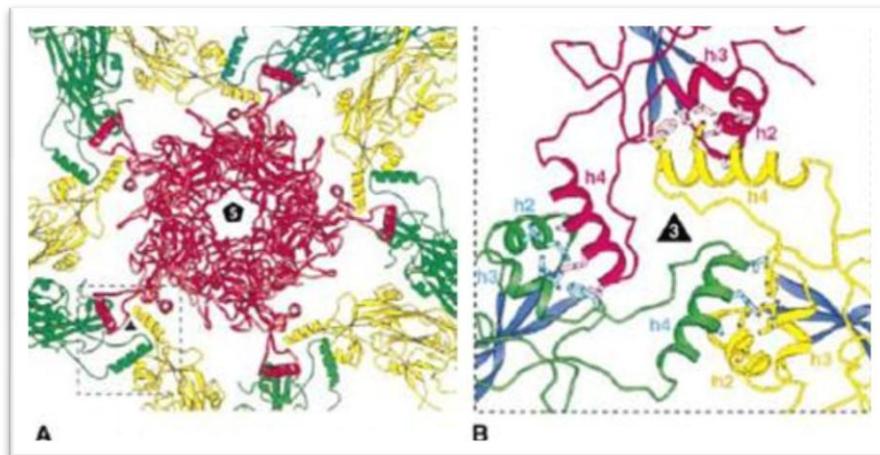


Figura 6. (A) Interação entre as α -hélices interpentaméricas. Mostra como a α -hélice 4 (h4) de cada subunidade do pentâmero em vermelho projeta-se e permanece no arcabouço formado pelas α -hélices h2 e h3 dos pentâmeros adjacentes; (B) Mostra com detalhes as interações de h4 com h2 e h3 entre 3 subunidades de pentâmeros adjacentes (Chen *et al.*, 2000).

Conforme seu potencial imunogênico, precisamente, por ser capaz de ativar a resposta imune humoral, a proteína L1 é uma das mais fortes candidatas à aplicação de vacinas profiláticas contra a papilomatose (Kirnbauer et al. 1992). Recentemente, foi possível sintetizar VLPs consistindo de L1/L2 e de uma das proteínas precoces que se dispõe internamente à estrutura do capsídeo viral. Essas partículas passaram a ser chamadas de VLP quiméricas, constituindo-se em um antígeno vacinal muito atraente, já que poderia ser utilizado tanto na profilaxia quanto no tratamento das lesões associadas ao HPV. Modelos experimentais empregando a indução de tumores causados por HPV 16 em camundongos comprovam sua eficácia terapêutica, o que estimulou alguns grupos a proporem sua utilização em humanos como vacinas ao mesmo tempo profiláticas e terapêuticas (Gissmann et al. 2002). As vacinas compostas pelas partículas semelhantes ao vírus (VLP) do HPV, produzidas em sistemas recombinantes, induzem forte resposta humoral com anticorpos neutralizadores (Nadal et al. 2006).

2.4. Papilomavírus bovino

Os vírus do papiloma bovino (BPV) têm sido associados a diversas formas de câncer em diferentes espécies animais. Dada a intensa disseminação da papilomatose nos rebanhos, a pesquisa à luz de metodologias moleculares lança novos parâmetros de investigação, em particular, na busca por imunização eficaz. Não apenas em vista do grande impacto econômico, a pesquisa nesse sentido fornece subsídios para aplicação dos mesmos princípios para o controle ou tratamento de infecções pelo papilomavirus humano (HPV) (Campo, 2002).

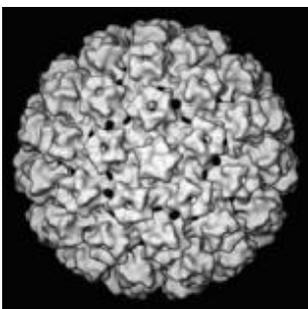


Figura 7. Modelo estrutural do papilomavírus bovino (Trus *et al.*, 1997);

Seis diferentes tipos de papilomavírus bovino (BPV 1 - 6) são bem descritos e caracterizados. Originalmente os BPVs foram classificados em dois subgrupos, A e B, classificação esta baseada na estrutura do seu genoma e no tipo de patologia causada. O

subgrupo A foi formado pelos tipos 1, 2 e 5, os quais eram definidos como fibropapilomavírus por infectarem tanto o epitélio quanto a camada subdérmica, formando fibropapilomas. O subgrupo B compreendia os tipos 3, 4 e 6, estritamente epiteliotrópicos, infectando somente as células epiteliais (queratinócitos) e induzindo a formação de papilomas (Jarrett et al, 1984; Campo, 2002; Campo, 2006).

Recentemente, os papilomavírus foram re-classificados seguindo a nomenclatura baseada em letras gregas, usada para outras famílias virais (de Villiers et al., 2004). Dessa forma, de acordo com a nomenclatura atual, que leva em consideração as propriedades biológicas e organização do genoma, os epiteliotrópicos (BPVs 3, 4 e 6) são definidos como *Xi-papilomavírus*, os BPVs 1 e 2 como *Delta-papilomavírus*, e o BPV 5 é membro único do gênero *Epsilon-papilomavírus* (de Villiers et al., 2004). Para identificação de novos tipos de PV, o gene L1 tem sido utilizado por ser o mais conservado do genoma. Um novo PV isolado é reconhecido como tal se a seqüência de DNA da ORF L1 divergir em mais de 10% do tipo de PV conhecido mais próximo. Diferenças entre 2% e 10% na homologia definem um subtipo e menor que 2% um variante (de Villiers et al., 2004).

Ogawa et al. (2004) relataram 13 prováveis novos tipos de BPV no Japão, com base em análises de PCR. Recentemente, dois novos tipos de BPVs foram caracterizados. Análises filogenéticas baseadas na ORF L1 classificaram um isolado de BPV no Japão como BPV 7, originando um novo gênero na família *Papillomaviridae* (Ogawa et al., 2007). O BPV 8 também foi isolado no Japão e análises filogenéticas foram usadas para classificar esse novo tipo no gênero *Epsilon-papilomavírus*, junto ao BPV 5 (Tomita et al., 2007). Outros dois tipos foram isolados de lesões no epitélio e de acordo com a organização do seu genoma e sua composição, ambos os vírus são filogeneticamente próximos ao BPV- 3, -4 e -6. Desta forma, os novos tipos são classificados no gênero *Xi-papilomavírus* e designados BPV-9 e BPV-10 (Hatama et al., 2008).

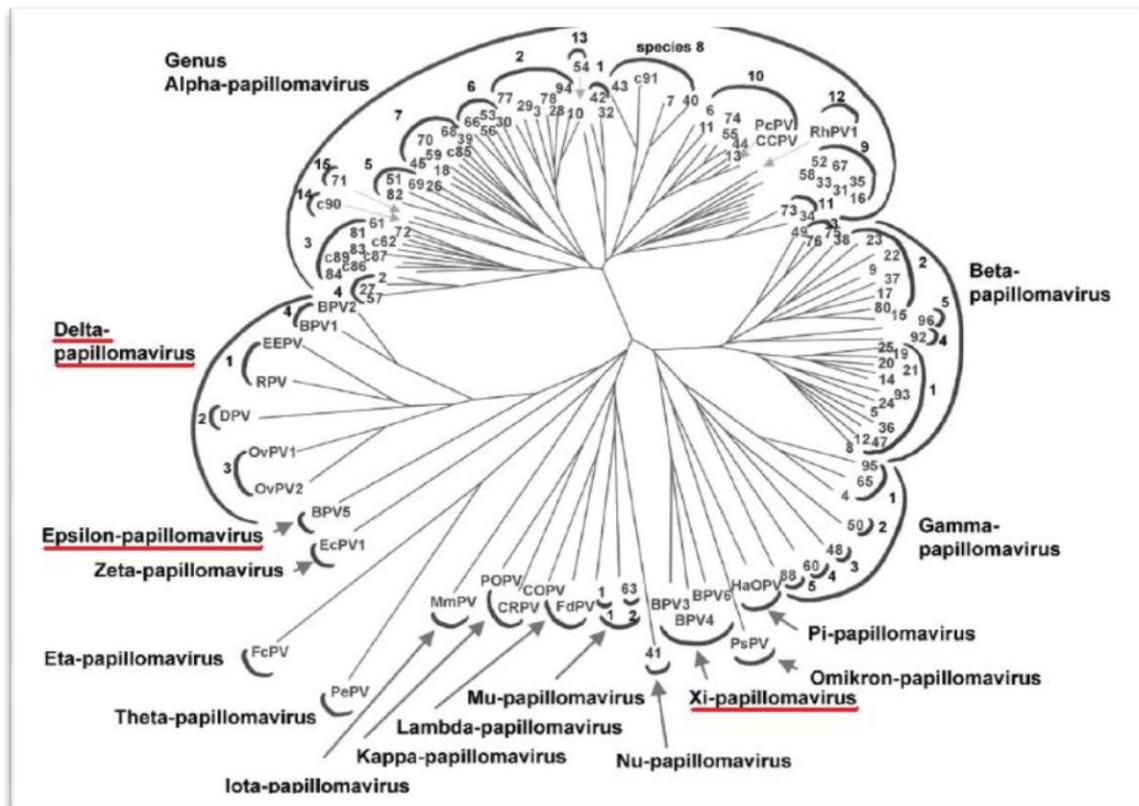


Figura 8. Árvore filogenética dos tipos de papilomavírus. Os semicírculos externos identificam gêneros de papilomavírus (por exemplo, alfa). Os números nos semicírculos internos se referem às espécies. Fonte: de Villiers *et al* (2004).

O BPV-1 e o BPV-2 são os principais agentes de fibropapilomas cutâneos. O BPV-1 também pode causar fibropapilomas nos tetos e no pênis e, o BPV-2, fibropapilomas no trato digestório. O BPV-5 causa fibropapilomas em forma de grão de arroz no úbere; e os BPV-3, 4 e 6 foram isolados de papilomas epiteliais cutâneos, papilomas do epitélio do trato digestório e papiloma epitelial de tetos, respectivamente (Campo, 1987; Bloch, 1997; Spradbrow, 1994; Campo, 1997; Schuch, 1998; van Regenmortel et al., 2000).

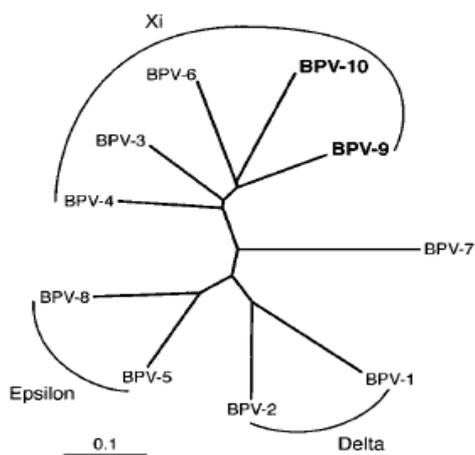


Figura 9. Árvore filogenética apresentando a disposição dos grupos de papilomavírus bovinos. Fonte: Hatama *et al* (2008).

O BPV é adquirido por inoculação cutânea direta ou por soluções de continuidade da pele. A replicação viral ocorre nas células basais do epitélio estimulando a divisão celular, hiperproliferação e também induzindo o crescimento excessivo dessas células, formando as verrugas ou papilomas que geralmente regridem sem causar problemas clínicos em seus hospedeiros. O BPV induz tumores benignos e, eventualmente, quando fatores genéticos ou ambientais estão envolvidos, pode resultar em conversão maligna (Campo, 1987; Stringfellow *et al.*, 1988).

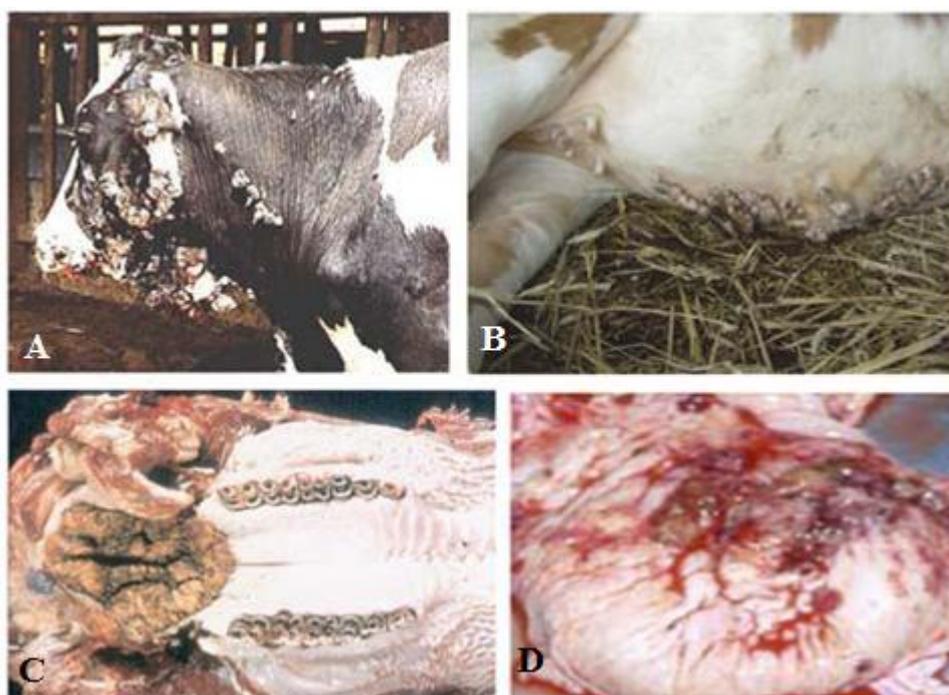


Figura 10. Representação da papilomatose bovina (A e B), câncer no trato gastrointestinal superior (C) e câncer na bexiga urinária (D) (adaptado de Campo, 2002; Borzacchiello, 2008).

Dependendo da intensidade das lesões, poderão ocorrer debilitação e alterações funcionais orgânicas ocasionadas pelos tumores. Infecções bacterianas secundárias podem resultar em perda de condição corporal. A supuração das verrugas traumatizadas pode resultar em dermatite necrótica. A hemorragia e miíase de verrugas traumatizadas também não são incomuns e podem resultar na morte do animal. Interferências na lactação e no coito também são relatadas, devido à obstrução física. A mastite, devido à infecção ascendente e o trauma de papilomas múltiplos na base da teta foram relatados como possíveis causas de perda produtiva nos animais (William et al., 1992). A doença é cosmopolita e, em determinadas formas, acomete principalmente animais de até 2 anos de idade, embora todas as faixas sejam atingidas (Mello & Leite, 2003). Para a transmissão da forma cutânea, é necessário haver solução de continuidade na pele e a infecção pode ocorrer por contato direto (animal-animal) ou indireto (fomites).

Foram descritas lesões neoplásicas na bexiga e no trato digestório superior de bovinos também associadas com a infecção pelo BPV-2 e BPV-4, respectivamente, em associação com cofatores oncogênicos presentes numa espécie de samambaia (*Pteridium aquilinum*) (Campo et al. 1992, Borzacchiello et al. 2001) largamente distribuída nos trópicos. Historicamente, devido à forte associação geográfica que existe entre a presença da samambaia nas pastagens e o aparecimento da hematúria enzoótica (HE), esta doença sempre esteve associada com a alimentação dos bovinos em pastagens infestadas por esta planta.



Figura 11. Fotografia de samambaia da espécie *Pteridium aquilinum*, por Russ Kleinman & Adela Lente, 27 de junho de 2007

No Brasil, a papilomatose bovina é um grave problema econômico para os criadores, existindo regiões em que a papilomatose é endêmica (Vale do Paraíba – SP). Na região Nordeste, em especial no Estado de Pernambuco (região da Zona da Mata), a

incidência de papilomatose bovina é muito alta provocando grandes perdas econômicas para os criadores, podendo atingir 30% do plantel em algumas propriedades, de acordo com a Sociedade Nordestina de Criadores de Gado. A papilomatose cutânea geralmente está relacionada aos BPVs 1, 2, 3, 5 e 6, sendo os tipos 3, 5 e 6 restritos ao úbere (Campo, 1997; 2002).

O DNA do BPV-2 já foi detectado em amostras de sangue total (Stocco dos Santos et al., 1998; Freitas et al., 2003; Freitas et al., 2007), em tumores de bexiga de animais exibindo sinais clínicos de HE, assim como em tecido do trato reprodutivo e em gametas (Carvalho et al. 2003, Wosiacki et al. 2005, 2006; Yagui et al, 2006; Freitas et al., 2007)). O quadro anatomopatológico da HE caracteriza-se por lesões hemorrágicas e hiperplásicas da mucosa vesical que, com frequência, evoluem para neoplasias (Olson et al., 1959; Polack, 1990; Campo et al., 1992; Durão et al., 1995). As primeiras manifestações clínicas da HE ocorrem em animais adultos, após um longo período de exposição à samambaia. A HE pode ainda ocorrer em associação com neoplasias do trato digestório. Esta forma clínica está também etiologicamente associada à infecção pelo BPV-2 (Rajendran et al., 1983; Hopkins, 1986; Durão et al., 1995).

A presença do BPV-2 em papilomas e carcinomas na bexiga de bovinos, associados à HE, foi inicialmente sugerida com base na detecção de corpúsculos de inclusão, característicos do vírus, em células tumorais. Posteriormente foi relatado que tumores de bexiga induzem lesões similares quando injetados em animais saudáveis e que animais com carcinoma do trato digestório apresentam alta prevalência de papilomas na região tumoral. No entanto, as toxinas da samambaia também são capazes de produzir tumores em animais de laboratório livres da infecção pelo BPV-2, e este, isoladamente, foi capaz de produzir neoplasias na bexiga de bezerros que não tinham acesso à samambaia (Hopkins et al. 1990).

Resultados de vários experimentos confirmaram que tanto o vírus quanto a samambaia estão envolvidos na carcinogênese da bexiga (Jarrett, 1978; Pachauri; Sharma; Joshi, 1981; Hopkins, 1986; Moura et al., 1988; Polack, 1990, Campo et al., 1992; Santos et al., 1998). Reddy e Fialkow (1983) descreveram que, diferentemente das induções por carcinógenos isolados, o BPV induz a iniciação e a promoção dos tumores em conjunto com compostos da samambaia. A rota da infecção do BPV-2 para a bexiga ainda não é conhecida, mas já foi comprovado que o BPV-2 pode ser transmitido de forma vertical (Stocco dos Santos et.al., 1998).

Apesar de poucos estudos envolvendo o BPV-2 terem sido realizados em bexiga, a partir de casos de HE, existe uma ligação etiológica entre os compostos tóxicos da samambaia e o BPV-2. A análise citogenética de células do sangue periférico de animais alimentados em pastagens infestadas com samambaia demonstra aumento significativo na frequência de aberrações na estrutura dos cromossomos, quando comparados com animais em pastagens não infestadas. Como os linfócitos são os prováveis alvos da infecção latente pelo BPV, sugere-se que o vírus possa contribuir com a produção de anormalidades cromossômicas nestas células (Moura et al., 1988; Santos et al., 1998). O DNA do BPV-2 já foi detectado em tumores de bexigas, tanto de origem natural quanto induzido experimentalmente, sugerindo que o vírus presente na forma latente possa estar envolvido em transformações malignas (Stocco dos Santos et al., 1998; Borzachiello et al., 2001). Acredita-se que a imunodepressão ativa o papilomavírus latente, provocando lesões pré-malignas e que o sinergismo entre o vírus e fatores co-carcinogênicos resulte na progressão tumoral. Esta reativação pode ocorrer pela imunodepressão causada por compostos da samambaia ou trauma físico, manifestando-se clinicamente por verrugas de pele e tumores de bexiga.

Campo *et al.* (1992), utilizando a hibridação de *Southern Blot*, encontraram o DNA do BPV-2 em 46% (7/15) dos casos naturais de tumores e em 69% (9/13) das lesões induzidas experimentalmente, sugerindo estreita associação entre este vírus e as neoplasias da bexiga de bovinos. Paralelamente, o DNA do BPV-2 também foi detectado em animais de experimento, mantidos em isolamento, que não foram inoculados com este vírus, ou que foram desafiados com um outro tipo de papilomavírus. Estes resultados sugerem que o BPV pode persistir na forma latente e ser ativado quando o animal é exposto a fatores co-carcinogênicos e imunodepressivos da samambaia. Em contraste, 20% dos animais controle também apresentaram o BPV-2. Estes dados são semelhantes aos descritos nos papilomas associados com o câncer genital em humanos. Com a comprovação do envolvimento do BPV-2 na etiologia da HE, abrem-se a perspectiva do emprego de vacinas específicas no controle imunoprolático desta importante doença dos bovinos (Hopkins, 1986; Polack, 1990).

2.5. Resposta Imune ao Papilomavírus Bovino

A resposta imune dos bovinos ao BPV é muito pobre (Campo, 1998). Animais podem carregar tumores grandes, produzindo vírus ativamente em grandes quantidades, mas não respondem facilmente aos antígenos de BPV durante o curso da infecção e anticorpos anti-BPV são raramente detectados. A falha do sistema imune em reconhecer tanto o vírus infectante como a progênie viral, é devido ao fato do ciclo de vida do vírus ser restrito ao epitélio e não existir contato com o sistema imune do hospedeiro (O'Brien & Campo, 2002; Tindle, 2002).

Fortes evidências indicam que o processo de regressão dos papilomas seja mediado por uma resposta imune celular, enquanto que a proteção contra a infecção seja devida a anticorpos neutralizantes (Campo, 1997b). Animais com tumores ulcerados e hemorrágicos têm níveis altos de anticorpos anti-BPV e uma boa resposta humoral pode ser obtida após a inoculação intramuscular de vírus purificados ou proteínas virais, confirmando que apenas quando o papiloma é danificado ou via imunização, antígenos virais entram em contato com células imunes. Em estágios tardios de infecção, pode-se observar uma resposta celular e humoral fraca, contra proteínas do capsídio e/ou contra a proteína transformante E7, a qual parece está associada com a rejeição do papiloma (Campo, 1998).

Alguns tipos de HPV, principalmente os de alto risco, empregam diversas estratégias para escapar do sistema imune do hospedeiro, como a produção de baixos níveis de proteínas virais. Outros estudos demonstram que os HPV são capazes de alterar as respostas do sistema imune inato, diminuindo a expressão e inibindo a função de genes induzidos por interferon. Os interferons tipo I, α e β são citocinas produzidas por células infectadas por vírus em resposta ao reconhecimento de componentes virais. Entre suas ações, estão a sinalização para a interrupção do ciclo celular e acionamento de vias apoptóticas. (Mims, 1985)

A pobre resposta imune contra o BPV é provavelmente a principal razão para persistência da infecção, até mesmo em hospedeiros imunocompetentes, os papilomas persistem por muitos meses antes que a regressão aconteça. Recentemente, tem se tornado claro que, além da imunoevasão passiva, devido ao ciclo de vida do vírus ser confinado ao epitélio, os papilomavírus têm desenvolvido vias ativas para esquivar-se do sistema imune do hospedeiro. Entre elas encontra-se a *down-regulation* (menor

expressão) do Complexo Maior de Histocompatibilidade de Classe I - MHC I (O'Brien & Campo, 2002).

O MHC I é responsável pela apresentação de peptídeos antigênicos a células-T efetoras, e desempenha um papel crítico na vigilância imune (Gromme *et al.*, 1999). A *down-regulation* do MHC I é realizada pela ação da proteína E5 do BPV, a qual impede o transporte do MHC I para superfície da célula, seqüestra o MHC I no aparelho de Golgi e reduz a transcrição do gene da cadeia pesada do MHC I (Ashrafi *et al.*, 2002; Marchetti *et al.*, 2002; Araibi *et al.*, 2006).

2.6. Vacinas e *virus-like particles*

Segundo Hopkins (1986), futuras possibilidades de imunoprofilaxia das lesões causadas pelos papilomavírus devem incluir o uso de vacinas, que teriam grande importância econômica para regiões de pecuária bovina onde a papilomatose bovina constitui um problema sanitário. Paralelamente, uma técnica vacinal para BPV forneceria princípios semelhantes de aplicação em seres humanos, especificamente, na profilaxia das variantes do papilomavírus humano, tendo nos animais um modelo experimental válido.

Inicialmente, dois tipos de vacinas foram considerados: i) vacinas profiláticas que produziriam anticorpos vírus-neutralizantes prevenindo a infecção e ii) vacinas terapêuticas que induziriam a regressão das lesões já estabelecidas antes do início da progressão maligna (Campo, 1991; Campo 1995; Jarrett, 1994). O primeiro estudo com a vacinação contra diferentes tipos de BPV foi realizado por Jarrett et al. (1990), que sugeriram que a imunidade para o papilomavírus é tipo-específica. A clonagem das proteínas L1 e L2 do BPV-2 foi empregada para a produção de vacinas tanto profiláticas quanto terapêuticas (Jarrett et al., 1991; Campo, 1995). As vacinas compostas pela proteína L1, devido a suas características antigênicas similares às dos vírions nativos, preveniram a formação de tumores quando administradas antes do desafio. Já as vacinas compostas pela proteína L2 promoveram a rejeição dos tumores, independente se a administração foi realizada anterior ou posteriormente ao desafio. Animais vacinados com a proteína L1, mas não com a L2, responderam rapidamente com a produção de anticorpos séricos neutralizantes, mostrando que este peptídeo contém epitopos que especificamente ativam os linfócitos B. A grande infiltração de linfócitos nos tumores

dos animais vacinados com a proteína L2 sugere que os determinantes antigênicos deste peptídeo são mais específicos na ativação de linfócitos T. (Campo et al. 1991)

A vacina autógena, preparada com homogeneizado de verrugas, tem sido usada em bovinos e outras espécies animais. Em alguns casos as lesões podem regredir espontaneamente, mas alguns experimentos já indicaram os efeitos desta imunização podem ser variados, a depender do tipo de verruga utilizado no preparo e o período em que se encontra o ciclo viral (Pachauri et al., 1981). Outra possibilidade ainda mais promissora de vacina é destacada pela imunização com partículas semelhantes ao vírus (VLPs) preparadas por clonagem dos genes das principais proteínas virais em vetores para expressão em células eucariotas. (Harro et al. 2001)

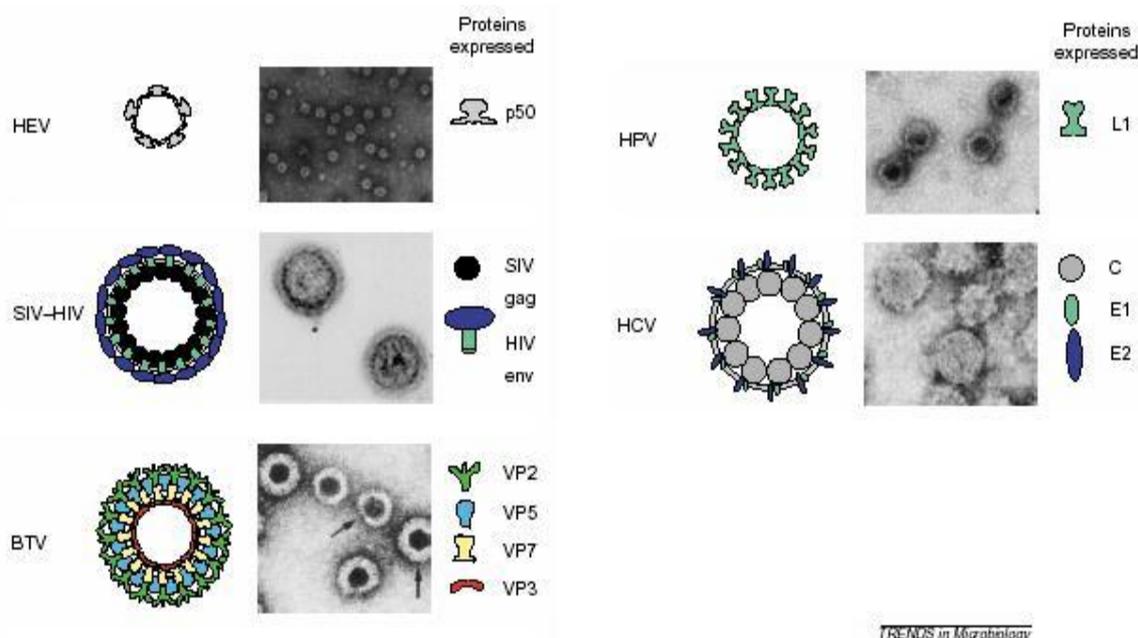


Figura 12. Estrutura de VLPs para uma variedade de vírus. A morfologia do capsídio e as proteínas expressadas para obtenção da VLP são ilustradas. Em cada caso a microscopia eletrônica da VLP produzida é mostrada. Adaptado de (Noad & Roy, 2003).

As *virus-like particles* (VLPs – partículas semelhantes ao vírus) são estruturas protéicas com morfologia similar aos vírions intactos, e são obtidas a partir da expressão de proteínas do capsídio viral, que espontaneamente levam a montagem de estruturas similares aos vírus autênticos (Zhou *et al.*, 1991; Kirnbauer *et al.*, 1992, 1993). As VLPs não são infecciosas ou oncogênicas, portanto, são candidatas atrativas para o desenvolvimento de vacinas profiláticas contra os papilomavírus (da Silva et al. 2001).

Vírus não envelopados que expressam uma ou duas proteínas principais em seus capsídeos representam os modelos cujas VLPs apresentam-se mais similares ao vírus intacto, devido à simplicidade de sua estrutura. Vacinas contra hepatite B foram um dos primeiros produtos contendo VLPs sintetizadas, produzidas a partir de proteínas recombinantes em sistemas de expressão controlados (McAleer *et al.*, 1984). Outras doenças que são alvo para imunização com VLPs são gastroenterites (Tacket *et al.*, 2003), hepatite C (Lechmann *et al.*, 2001) e malária (Oliveira-Ferreira *et al.*, 2000).

Diversos estudos baseados em modelos animais mostraram que a imunidade humoral é um fator chave na prevenção da infecção por papilomavírus (Breitburd *et al.*, 1995; Kirnbauer *et al.*, 1996). A transferência passiva de soro contendo anticorpos gerados contra VLPs para animais não imunizados confere proteção ao desafio com o vírus nativo, o que demonstra a proteção proporcionada por anticorpos neutralizantes (Breitburd *et al.*, 1995); uma vacinação com VLPs de papilomavírus por diferentes métodos pode induzir títulos de anticorpos neutralizantes tipo-específicos (IgG e IgA) e proteger eficientemente animais e humanos da infecção por papilomavírus (Xu *et al.*, 2006). As próprias VLPs são boas adjuvantes e podem induzir uma forte resposta de células T- *helper*. Vários estudos têm demonstrado que VLPs também podem ativar células dendríticas (DCs) (Bontkes *et al.*, 2005). As DCs são uma família de células apresentadoras de antígenos (APCs), com uma capacidade única de iniciar e modular uma resposta imune mediada por células.

Animais vacinados com VLPs de L1 dos papilomavírus homólogos (papilomavírus de coelho, canino e bovino) foram protegidos frente a desafio experimental, o que evidenciou que uma vacina contra o HPV baseada em VLPs seria um candidato atraente para a profilaxia das doenças associadas a este vírus (Breitburd *et al.* 1995; Campo, *et al.* 1994). Abrem-se, dessa forma, parâmetros de homologia para o estudo do emprego de VLPs contra o HPV, com base em resultados obtidos na construção de VLPs contra o BPV.

2.7. Leveduras *Pichia pastoris* como Sistema de Expressão Heterólogo

Os sistemas de expressão procariotos têm como maior vantagem de produção o baixo custo, entretanto, não realizam as modificações pós-traducionais necessárias e pode haver liberação de endotoxinas durante a purificação da proteína. Além disso, a proteína heteróloga pode ficar retida em “corpos de inclusão”, o que torna o processo de

recuperação/purificação mais trabalhoso (Montor & Sogayar, 2003; Billman-Jacobe, 1996; Makrides, 1996; Brown, 2003; Pelczar et al., 1996).

Os sistemas de expressão eucariotos não se resumem apenas às leveduras, há também células de mamíferos, plantas e insetos. Porém, quando baseados em células de mamíferos, apesar das proteínas serem processadas corretamente e indistinguíveis das versões não-recombinantes, apresentam crescimento lento, meios caros, baixo nível de expressão e processo de purificação complexo (Brown, 2003). O sistema que utiliza células de insetos é relativamente fácil de manter e com menor custo em comparação com as células de mamífero, mas ainda assim, a manipulação e manutenção são mais complexas se comparadas às células de levedura e bactéria, que também são sistemas de cultivo mais baratos (Montor & Sogayar, 2003; McCarroll & King, 1997).

Sistemas de expressão em leveduras oferecem vantagens consideráveis em relação a sistemas procarióticos ou a outros sistemas eucarióticos. Leveduras não exibem partículas pirogênicas, são capazes de secretar proteínas e de realizar processos pós-traducionais relacionados à secreção (Gellissen *et al.* 2005). Como um sistema microbiano eucariótico, combina a facilidade de manipulação genética e crescimento relativamente rápido a altas densidades celulares em meios relativamente simples (Gellissen *et al.* 2000). Leveduras possuem genoma de pequeno tamanho, o que simplifica análises moleculares e genéticas.

A levedura *Pichia pastoris* é um ascomiceto homotálico, que normalmente encontra-se haplóide no estado vegetativo e multiplica-se por brotamento multilateral. Pode ser manipulada por métodos genéticos clássicos e, diferentemente de linhagens homotálicas de *S. cerevisiae* (as quais são diplóides), permanece haplóide a não ser que seja forçada a cruzar, como em cultivos com limitação de nitrogênio (Cereghino & Cregg, 2000; Gellissen *et al.*, 2005). A Companhia Petrolífica Phillips foi a primeira a desenvolver meios e protocolos para o crescimento de *Pichia pastoris* em metanol, em cultura contínua, de altas densidades celulares (maior que 130 g de peso seco celular). Durante a década de 70, *P. pastoris* foi avaliada como uma fonte potencial de simples proteína celular devido a habilidade desta levedura de aproveitar metanol como sua única fonte de carbono. Infelizmente, a crise do óleo dos anos 70 aumentou dramaticamente o custo do metano (fonte de metanol). Simultaneamente, o preço da soja, principal fonte alternativa de ração animal, caiu. Por isso, a economia da produção de simples proteína celular a partir do metanol se tornou altamente desfavorável (Davidson, 1995).

Entretanto, na década seguinte, a Companhia Petrolífica Phillips, junto ao Instituto de Biotecnologia/ Associados Industriais Salk Inc. (SIBIA, La Jolla, CA, USA), estudaram *P. pastoris* como um sistema de expressão para proteínas heterólogas. O gene e o promotor para as enzimas álcool-oxidase foram isolados pela SIBIA, que também gerou vetores, cepas e protocolos correspondentes para a manipulação molecular de *P. pastoris*. O que, há mais de 20 anos atrás começou como um programa para converter o abundante metanol em uma fonte de proteína para ração animal se desenvolveu no que hoje constitui duas importantes ferramentas biológicas: um modelo eucariótico na pesquisa da biologia celular e um sistema de produção de proteínas recombinantes. A levedura *P. pastoris* ganhou atenção generalizada com sistema de expressão por causa de sua habilidade de expressar altos níveis de proteínas heterólogas. Como resultado, a construção de vetores recombinantes, métodos de transformação, criação de marcas de seleção e métodos de fermentação foram desenvolvidos para explorar o potencial produtivo deste sistema. (Rosenfeld et al, 1999)

A Corporação de Pesquisa Tecnológica (Tucson, AZ, USA) é a atual possuidora da patente para o sistema de expressão em *P. pastoris*, desde 1993, e o sistema de expressão em *P. pastoris* está disponível na forma de kit comercial da Corporação Invitrogen (Carlsbad, CA, USA). Várias linhagens de *P. pastoris* estão disponíveis para expressão de proteínas recombinantes, sendo que todas elas derivam da linhagem NRRL-Y 11430.

Como um eucarioto, *Pichia pastoris* tem muitas das vantagens de um sistema de expressão eucariótico, como o processamento da proteína e modificação pós-traducional, sem deixar de ser tão fácil de manipular como *E. coli* ou *Saccharomyces cerevisiae* (Wurm & Bernard, 1999; Schatzmayr, 2001; Morton & Potter, 2000).

Esse sistema é mais rápido, mais fácil e menos dispendioso de usar do que outros sistemas de expressão eucarióticos, geralmente apresentando maiores níveis de expressão. Como uma levedura, a *Pichia pastoris* partilha as vantagens de manipulações moleculares e genéticas com as *Saccharomyces*, e tem a vantagem adicional de demonstrar níveis de expressão 10- a 100- vezes maiores para proteínas heterólogas. Estas características tornam a levedura *P. pastoris* muito útil como sistema de expressão para proteínas (Sudbery, 1996).

A espécie *Pichia pastoris* demonstrou ser um hospedeiro eficiente para a expressão de genes heterólogos, resultando na produção em larga escala de uma variedade de proteínas recombinantes (Ver anexo I) (Cereghino & Gregg, 2000).

Dessa forma, tem sido muito utilizada nas últimas décadas. É uma espécie atrativa, também por causa de sua capacidade de usar o metanol como única fonte de carbono e energia, exigindo um único conjunto de enzimas metabolizadoras de metanol, cuja produção é estritamente regulada (Ellis et al., 1985; Cereghino & Cregg, 2000; Inan & Meagher, 2001; Hohenblum et al., 2004; Slibinskas et al., 2004; Aoki et al., 2003; McKinney et al., 2004; Torres & Moraes, 2002). Entre todas as cepas identificadas até o ano de 1995, apenas quatro gêneros apresentariam esta característica: *Hansenula*, *Pichia*, *Candida* e *Torulopsis* (Farber et al. 1995).

As reações iniciais estão localizadas em uma pequena organela especializada denominada peroxissomo, enquanto os passos subseqüentes da cadeia do metabolismo metilotrófico desenvolvem-se no citoplasma. O peroxissomo ancora três enzimas indispensáveis para esse metabolismo, a saber, a álcool oxidase, a catalase e a dihidroxiacetona sintase (Jahic, 2003).

Conforme descrito por Cregg & Cereghino (2000), o primeiro passo para o metabolismo do metanol é a oxidação deste em formaldeído utilizando oxigênio molecular pela enzima álcool oxidase. Além de formaldeído, esta reação gera peróxido de hidrogênio. Para evitar a toxicidade ocasionada pela água oxigenada, essa etapa inicial ocorre dentro do peroxissomo, que sequestra os subprodutos tóxicos, preservando a integridade celular. A enzima álcool oxidase tem uma fraca afinidade para o oxigênio molecular, de modo que *P. pastoris* compensa esse déficit gerando grandes quantidades dessa enzima (Gellissen et al., 2005).

Na presença de metanol no meio, as oxidases do álcool são prontamente sintetizadas; na presença de glicose, a produção das enzimas é reprimida. Para um controle tão eficaz, os genes relacionados à transcrição das oxidases devem ser ativados e desligados com precisão e devem estar subordinados a um forte promotor. De fato, os promotores AOX1 e, com menor influência, o promotor AOX2, são os responsáveis diretos pela ativação dos genes das enzimas álcool oxidases. (Cereghino et al. 2000). O promotor pode ser desligado quando fontes de carbono em quantidades não limitantes, como a glicose, causam sua repressão no nível transcricional, minimizando a possibilidade de seleção de mutantes que não expressem a proteína heteróloga (Cereghino et al. 2000).

As enzimas álcool oxidase possuem baixa afinidade pelo oxigênio e esta característica é compensada pela sua maior expressão pelo promotor AOX1 para produzir grandes quantidades da enzima, cuja abundância pode chegar a até 30% do

conteúdo de proteína celular total quando o metanol é utilizado como única fonte de carbono. Dessa forma, o forte promotor AOX1 pode ser utilizado para direcionar a expressão de proteínas recombinantes em altos níveis (McKinney et al., 2004).

A expressão heteróloga em *Pichia pastoris* pode ser tanto intracelular ou na forma de produto secretado. A secreção exige a presença de um peptídeo sinal indicando a proteína recombinante como alvo para a via secretora. Embora várias seqüências com sinais de secreção tenham sido utilizadas com sucesso, incluindo os sinais nativos de secreção presentes em algumas proteínas heterólogas, o êxito foi variável. O sinal de secreção gerado a partir da *Saccharomyces cerevisiae*, conhecido como peptídeo fator α tem sido o mais utilizado (Cregg et al., 1993; Scorer et al., 1993). A maior vantagem de expressar proteínas heterólogas como produtos de secreção é que a levedura *Pichia pastoris* secreta níveis muito baixos de proteínas nativas. Isso representa uma vantagem para a recuperação e a purificação de proteínas a partir do meio de crescimento da levedura, uma vez que a maior parte das proteínas presentes serão as heterólogas (Barr et al., 1992).

Em comparação com *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris* pode ter uma vantagem na glicosilação de proteínas secretadas porque estas não são hiperglicosiladas. As proteínas sintetizadas tanto por *Saccharomyces cerevisiae* e *P. pastoris* apresentam, em sua maioria, sítios de glicosilação N-ligados para manose; no entanto, o comprimento das cadeias de oligossacarídeos acrescentados por modificação pós-traducional de proteínas em *P. pastoris* (média de 8-14 resíduos de manose por cadeia lateral) é muito mais curto do que aqueles em *S. cerevisiae* (50-150 resíduos de manose) (Grinna & Tschopp, 1989; Tschopp et al., 1987b). Além disso, o núcleo de oligossacarídeos em *S. cerevisiae* possui terminais para ligações α 1, 3 glicano, o que não ocorre em *P. pastoris*. Acredita-se que as ligações α 1, 3 glicano em proteínas glicosiladas produzidas a partir de *S. cerevisiae* são os principais responsáveis para a natureza hiper-antigênica dessas proteínas tornando-as particularmente inadequadas para uso terapêutico (Daly & Hearn, 2005).

O sistema de expressão em *Pichia pastoris* tem sido amplamente utilizado para produção de uma grande variedade de diferentes proteínas heterólogas de diversos organismos, entre eles estão vírus, bactérias, fungos, protistas, plantas e animais incluindo o homem, os quais são listados em Cereghino & Cregg (2000) e Macauley-Patrick *et al.* (2005). Entre essas proteínas destacam-se as usadas como produtos farmacêuticos para humanos, tais como fator de crescimento ligado à insulina-1 (IGF-1) e albumina sérica

humana, HSA (Cereghino & Cregg, 2000). Destaca-se também, a produção de subunidades vacinais usadas contra viroses, tais como antígeno de superfície do vírus da hepatite B e glicoproteína D do herpes vírus bovino (Cereghino & Cregg, 2000).

2.8. Vetores de Expressão pPICZA e pPICZA α

Existem muitos vetores comerciais disponíveis para expressão em *P. pastoris*. Alguns vetores têm sido desenhados para serem usados tanto em *E. coli* como em *P. pastoris*. Estes contêm uma origem de replicação bacteriana e uma de levedura, para manutenção do plasmídeo, e marcas de seleção para um ou ambos os organismos. A maioria dos vetores de expressão tem um cassete de expressão composto por um fragmento de 0,9 kb referente à seqüência do promotor do gene *AOX1* e a seqüência de terminação da transcrição do *AOX1* (Cereghino & Cregg, 2000). O promotor *AOX1* é descrito como aquele de maior sucesso em expressão recombinante em *P. pastoris*. Entre o promotor e a seqüência terminadora existe um sítio ou múltiplos sítios de clonagem para inserção da seqüência codificante do gene heterólogo, caracterizando vetores da linha pPICZ. Alguns dos vetores dessa linha possuem ainda sinais de secreção, que permitem a secreção da proteína heteróloga. Tem sido utilizado com sucesso o sinal α -mating factor de *S. cerevisiae* (Invitrogen, 2007), que codifica o peptídeo pré-pro fator α , cuja função é ordenar a secreção da proteína sintetizada.

Além de uma variedade de opções de enzimas de restrição, os vetores pPICZA e pPICZA α contam ainda com duas seqüências que possibilitam duas estratégias interessantes de detecção e recuperação da proteína heteróloga produzida. Trata-se do epítopo c-myc (Glu-Gln-Lys-Leu-Ile-Ser-Glu-Glu-Asp-Leu), cuja fusão à proteína recombinante permite a sua imunodetecção pelo anticorpo anti-myc. A outra estratégia é demonstrada pela cauda c-terminal de poli-histidina (6XHis), cujo epítopo c-terminal pode ser detectado através do anticorpo anti-His, além de permitir a purificação da proteína recombinante fusionada por meio de cromatografia de afinidade. (Invitrogen, 2007)

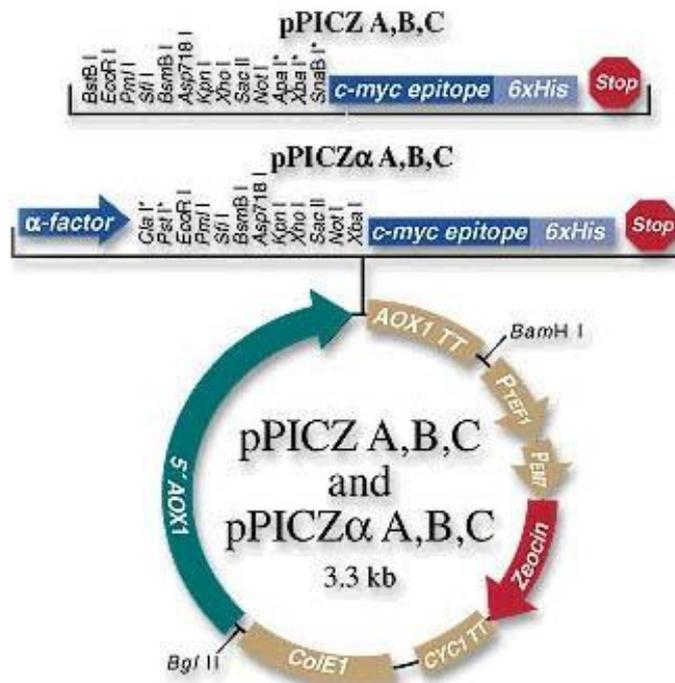


Figura 13. Mapas gênicos dos vetores de expressão pPICZA e pPICZA α (Invitrogen, 2005)

Os vetores de expressão pPICZA e pPICZA α , são plasmídeos integrativos para células da levedura *Pichia pastoris*, direcionados para uma seqüência homóloga do loci genômico da levedura, justamente, de transcrição controlada pelo promotor AOX. Portanto, esses vetores devem ser linearizados, para permitir a integração. Assim, vetores de expressão linearizados podem gerar transformantes estáveis via recombinação homóloga entre as seqüências compartilhadas pelo vetor e pelo genoma do hospedeiro (Orr-Weaver et al. 1981).

A transformação em *P. pastoris* ocorre pela integração do cassete de expressão em locus específico e origina transformantes geneticamente estáveis. Para que isso ocorra o cassete de expressão/vetor é digerido em um único sítio, que pode ser de uma marca gênica (ex., *HIS4*) ou do promotor *AOX1*. A integração no genoma ocorre via recombinação homóloga quando o cassete de expressão/vetor contém regiões homólogas ao genoma da *P. pastoris*, e a integração pode ser via inserção ou substituição gênica (Daly & Hearn, 2005).

A integração por inserção ocorre em altas freqüências (50-80%) por eventos de *crossover* (permuta) único nos loci *HIS4* ou *AOX1* (Cereghino & Cregg, 2000), e

também pode resultar em integrações múltiplas em *tandem* devido a eventos de recombinação repetidos numa taxa de 1-10% dos transformantes (Daly & Hearn, 2005).

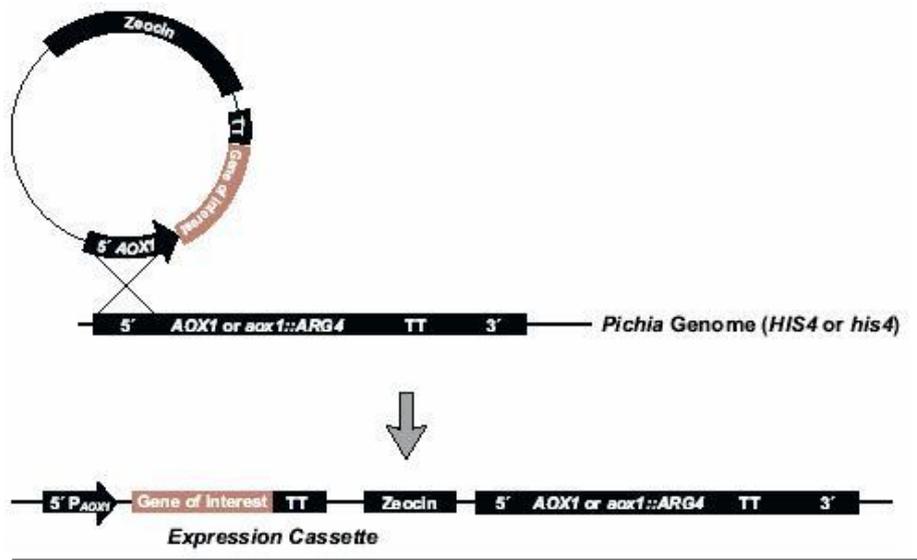


Figura 14. Cassete de expressão. Integração de um cassete de expressão por inserção nos *locus* *AOX1* ou *aox1::ARG4* (Invitrogen, 2007).

Eventos de integração por substituição gênica ocorrem por duplo *crossover* (permuta) no *locus* gênico alvo, dando origem a transformantes de cópia única que são geralmente mais estáveis. A substituição gênica em *P. pastoris* é obtida pela digestão do vetor de expressão nas regiões 5' e 3' terminais que correspondem às regiões 5' e 3' do locus *AOX1*. A transformação resulta na deleção sítio-específica do gene *AOX1*, numa frequência de 5-25% dos transformantes (Daly & Hearn, 2005).

Apesar de técnicas clássicas e de genética molecular serem bem desenvolvidas para *P. pastoris*, poucos genes para marcas de seleção são descritos para manipulação genética da levedura. As marcas existentes são limitadas aos genes da via biossintética *HIS4* de *P. pastoris* e *S. cerevisiae*, e *ARG4* de *S. cerevisiae*, e o gene *Sh ble* do *Streptoalloteichus hindustanus*, o qual confere resistência à droga Zeocina relacionada à bleomicina (Higgins *et al.*, 1998).

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo do projeto é a construção e avaliação dos vetores de expressão pPICZAL1B2 e pPICZ α L1B2 para a produção da proteína L1 de BPV-2 em células da levedura *Pichia pastoris*

3.2. OBJETIVOS TÉCNICOS

- A. Construção dos vetores pPICZL1B2 e pPICZ α L1B2
- B. Transformação de células da levedura *Pichia pastoris* com os respectivos vetores de expressão;
- C. Isolamento de clones recombinantes;
- D. Análise dos clones recombinantes quanto presença do gene heterólogo;
- E. Avaliação da expressão por análises em RT-PCR, SDS-PAGE e *dot-blotting*;

3.3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- A. Observar a produção da proteína L1 em leveduras *Pichia pastoris* transformadas com os vetores de expressão pPICZL1B2 e pPICZ α L1B2;
- B. Executar a recuperação da proteína L1, a partir das vias intra- e extracelular do sistema de expressão recombinante baseado em *P. pastoris*;
- C. Avaliação da produção intracelular e extracelular da proteína L1 de BPV2 no sistema de expressão baseado em células de *Pichia pastoris*

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. MATERIAIS E REAGENTES

4.1.1. Linhagens de microrganismos

A linhagem DH5 α de *Escherichia coli* (Invitrogen – Carlsbad, CA, EUA), genótipo [F' {*proAB*, *lacIq*, *lacZ Δ M15, *Tn10* (TetR)} *mcrA*, Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*), ϕ 80*lacZ* Δ M15, Δ *lacX74*, *deoR*, *recA1*, λ -*araD139*, Δ (*ara-leu*)7697, *galU*, *galK*, *rpsL*(StrR), *endA1*, *nupG*] possibilita a realização de manipulações genéticas, como propagação e amplificação de DNAs plasmidiais provenientes das ligações de produtos de PCR no vetor pGEM-T e pGEM-T Easy e de clonagens do gene heterólogo nos vetores de expressão pPICZA e pPICZA α L1B2. A linhagem X-33 de *Pichia pastoris*, também da Invitrogen, possuindo genótipo selvagem e fenótipo Mut⁺ e His⁺, foi utilizada para expressão da proteína L1 de BPV 2. Como controle positivo da indução intracelular, foi utilizada a linhagem GS115/pPICZ/*lacZ* de *Pichia pastoris* (Invitrogen), a qual produz a proteína β -galactosidase fusionada ao epitopo *myc* e à cauda de poli-histidina pela extremidade carboxila. A expressão do gene *lacZ* é dirigida pelo promotor AOX1 e induzida por metanol. Para controle positivo da indução extracelular, utilizou-se a linhagem GS115/pPICZ α /HSA de *Pichia pastoris* (Invitrogen), a qual produz a proteína albumina sérica humana fusionada ao epitopo *myc* e à cauda de poli-histidina pela extremidade carboxila.*

4.1.2. Plasmídios

O plasmídio pAT153, que contém o genoma completo de BPV 2 (pAT153B2), foi empregado para obtenção do gene L1. Os vetores pGEM-T e pGEM-T Easy (Promega, Madison, EUA), que contêm o gene *Amp^r* de resistência a Ampicilina (Invitrogen) e o gene *lacZ* para identificação de recombinantes, foi utilizado para clonagem e propagação de produtos de PCR. Os vetores de expressão pPICZA e pPICZA α (Invitrogen), contendo o promotor *AOX1*, a região de terminação de transcrição *AOX1TT* e o gene *Sh ble* de resistência a ZeocinaTM (Invitrogen), foram utilizados para expressão da proteína L1 em *P. pastoris*, sendo o vetor pPICZA α construído para a expressão extracelular por inserir o sinal de secreção α -*mating* à proteína recombinante.

4.1.3. Soluções e Tampões

Solução I: Glicose 50mM, Tris-HCl 25mM pH 8.0, EDTA (Ácido Tetracético Etilenodiamina) 10mM pH 8.0 (estéril); Solução II: NaOH 0,2M, SDS 1%; Solução III: Acetato de Potássio 5M; PBS (Tampão fosfato – salina): Fosfato de potássio 50mM, NaCl 150mM pH 7,2; Solução tampão TAE (tris-acetato-EDTA) 10X: Tris base 400mM, ácido acético 190mM, EDTA 10mM pH 7.6; Solução tampão TBS (Tris-salina) 10X: Tris-HCl 0.5M; NaCl 1.5M pH 7.6; para solução de lavagem com TBS-Tween, diluir 1:10 e acrescentar 500 mL de Tween para 1 L de TBS 1X); Solução tampão de lise celular: fosfato de sódio 50 mM (pH 7.4), PMSF 1 mM EDTA 1mM, glicerol 5% (v/v); Tampão de transferência: Tris-glicina 1X, SDS 1%, etanol 20%; *Coomassie Brilliant Blue*: azul de Coomassie R250 0.3%, metanol 45% e ácido acético 10%; Solução descorante: metanol 45%, ácido acético 10%; Tampão de corrida para SDS-PAGE 10X: Tris 0.25M, glicina 1.9M e SDS 1%.

4.1.4. Composição dos meios de cultura e condições de cultivo

Para a transformação de bactérias *E. coli* com os vetores de passagem pGEM-T e pGEM-T Easy, foi utilizado o meio Luria-Bertani (LB: triptona 1%, extrato de levedura 0.5% e NaCl 1%) contendo 100 µg/mL de Ampicilina. Para transformação de bactérias *E. coli* com os cassetes de expressão pPICZAL1B2 e pPICZAαL1B2, foi utilizado o meio Luria-Bertani *Low Salt* (LB *Low Salt*: triptona 1%, extrato de levedura 0.5%, NaCl 0.5%, pH 7.5) acrescido de 25 µg/ml de ZeocinaTM. Para meio sólido, foram acrescentados 15g/L de ágar. As células foram rotineiramente cultivadas a 37°C em agitador orbital (100 rpm).

Para transformação das leveduras, as células foram cultivadas em meio YPD (extrato de levedura 1%, peptona 2% e glicose 2%) antes de serem submetidas ao pulso elétrico. Para meio sólido, foram acrescentados 20g/L de ágar. Após eletroporação, as leveduras transformantes foram semeadas em placas YPDS (extrato de levedura 1%, peptona 2%, glicose 2% e sorbitol 1M; foram acrescentados 20 g/L de ágar) contendo 100 µg/mL de ZeocinaTM. As células foram rotineiramente cultivadas a 30°C e, quando necessário, sob agitação vigorosa (240 rpm).

A formação de biomassa foi realizada através do cultivo dos transformantes em meio BMGY – *Buffered Glycerol-complex Medium*: extrato de levedura 1%, peptona 2%, fosfato de potássio 100 mM, pH 6.0, YNB 1.34%, biotina 4x10⁻⁵%, glicerol 1%, por 48 horas ou até uma DO₆₀₀ igual a 20. As induções da expressão foram executadas

em meio BMMY – *Buffered Methanol-complex Medium*: extrato de levedura 1%, peptona 2%, fosfato de potássio 100 mM, pH 6.0, YNB 1.34%, biotina 4×10^{-5} %, metanol 0.5%, adicionando-se alíquotas de metanol a cada 24 horas para uma concentração final de 2%, por 5 dias (120 horas). As células foram rotineiramente cultivadas a 28°C sob agitação vigorosa (240 rpm).

4.1.5. Enzimas, kits e marcadores

Foram utilizados enzimas e kits da Promega Corporation: *XhoI*, *Sall*, *EcoRI*, e *SacI* (incluindo tampão de reação ideal para cada enzima), T4 DNA ligase, *kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System*, *kit Wizard Plus SV Minipreps DNA Purifications System*, *kit SV Total RNA Isolation System*, *kit Improm-IITM Reverse Transcription System*. Foram obtidos da Invitrogen Corporation: Xgal, IPTG, RNase, dNTPs, *Taq* DNA Polimerase (*Platinum® Taq DNA Polymerase High Fidelity*), Lyticase, ZeocinaTM, marcador λ /*Hind* III, Marcador 1 Kb *plus*. Foram utilizados da Qiagen Corporation (Duesseldorf, Alemanha): *kit QIAprep Spin Maxiprep*. O marcador *PageRulerTM Prestained Protein Ladder Color Burst* para eletroforese de proteínas foi obtido da Fermentas International Inc. (Burlington, Canada).

4.1.6. Géis de agarose e SDS-PAGE

Os géis de agarose utilizados foram preparados na concentração de 0.8% e 1% em TAE 1X. Para aplicação do material no gel, foi utilizado tampão de amostra (Glicerol 50%, Azul de Bromofenol 0.2% e solvente água miliQ). As corridas de eletroforese foram realizadas com fonte de tensão constante e ajustável (entre 0-500 V). Por fim, para visualização das bandas de DNA em transiluminador de luz ultravioleta, os géis foram corados com solução de Brometo de etídeo (0.5 µg/ml).

Os géis de poliacrilamida foram preparados na concentração de 12.5% e utilizando o detergente iônico dodecil sulfato de sódio (SDS). Para aplicação no gel, as amostras do extrato protéico total foram submetidas à condições desnaturantes, sendo aliqüotadas em tampão SDS 2X contendo o agente redutor β -mercaptoetanol (BME) e incubadas por 10 minutos a 100°C. As corridas de eletroforese foram realizadas com fonte de tensão constante e ajustável, seguindo os seguintes parâmetros: 150 V e 25mA por 90 minutos (para as amostras de expressão intracelular) e 75 a 50V e 20mA por 180 minutos (para as amostras de expressão extracelular). Foi empregado o tampão de

corrida para SDS-PAGE 1X. Para visualização das bandas de proteínas, os géis foram corados com *Comassie Brilliant Blue* e descorados com solução descorante.

4.1.7. Reagentes e demais materiais

Todos os reagentes utilizados para a preparação de soluções e meios são de origem da **VETEC QUÍMICA FINA LTDA** e **MERCK LTDA**.

Materiais plásticos e vidrarias estéreis próprios para técnicas em Microbiologia e Biologia Molecular;

4.1.8. Equipamentos

Estufa de cultura microbiana (Nova Ética®) regulada a 37°C. Termociclador (MJ96G, Biocycler®); Bancada de eletroforese para análise; Fonte de tensão constante e ajustável (entre 0-500 V); Fonte de luz UV; Máquina fotográfica digital especializada; Cubas horizontais de eletroforese OmniPhor® e cuba vertical para SDS-PAGE BioSystem®; Agitador de tubos AP56 Phoenix®; Imunoblotter Scie-Plas® acoplado à bomba de vácuo; Câmara de fluxo laminar equipada com Bico de Bunsen e lâmpada de luz ultravioleta; Banho-maria com temperatura regulável e agitação (Nova Ética®); Incubadora refrigerada Shaker de bancada CT712RN Cientec® equipamentos para laboratório; Frascos de cultivo com reentrâncias Lobov®; Micro-Centrífuga refrigerada (Vision®); Geladeira e Freezer Brastemp®; Freezer Ultra Low Temperature (-86°C) *New Brunswick Scientific*®; Eppendorf® *Multiporator*; Eppendorf® *Concentrator plus*; *DNA-workstation* UniEquip GmbH®; pHmetro PG1800 Gehaka®;

4.2. MÉTODOS

4.2.1. Clonagens

A. Desenho dos *primers* e Amplificação do gene L1 de BPV-2

O gene L1 foi inicialmente amplificado por PCR (*Polymerase Chain Reaction* – “Reação em Cadeia da Polimerase”) a partir do genoma completo do BPV 2 selvagem, clonado no vetor pAT153, cedido gentilmente pela Dra. Rita de Cássia Stocco, Lab. Genética – Instituto Butantan, com o uso de oligonucleotídeos específicos para amplificação, desenhados nos seguintes moldes:

OLIGONUCLEOTÍDEOS L1B2

Forward L1B2pP(*EcoRI*)

5' TTTTGAATTCAWAATGTCTTTGTGGCAACAAGGC 3'

Reverse L1B2pP(*XhoI*)

5' TTTTGTGACGCTTTGATTTTTTTTCTTTTTGCAGG 3'

OLIGONUCLEOTÍDEOS L1B2 α

Forward L1B2pP α (*EcoRI*)

5' AGAATTCGCGTTGTGGCAACAAG 3'

Reverse L1B2pP α (*SalI*)

5' TCCGTCGACAGCTTTGATTTTTTTTC 3'

*Em negrito, sítios de restrição das enzimas utilizadas na clonagem

Os oligonucleotídeos acima inserem os sítios para as enzimas de restrição no gene L1B2, que facilitam a clonagem nos vetores pGEM-T, pPICZA e pPICZA α , bem como todas as análises seguintes dos clones por restrição.

B. Amplificação do gene L1 (*Taq* DNA polimerase e *Taq High Fidelity*)

O gene L1 foi amplificado, inicialmente, utilizando-se a *Taq* DNA Polimerase para identificação da temperatura ótima de anelamento, definida como a 56°C. Essa mesma metodologia de PCR é aplicada em etapas posteriores para a detecção de insertos clonados. Posteriormente, foi realizada a amplificação com polimerase de alta fidelidade, *Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity* (Invitrogen).

Reagentes	Volume
DNA (70ng/μL)	1μL(1:10)
Primer forward (10μM)	1.5μL (0.6 μM)
Primer reverse (10μM)	1.5μL (0.6 μM)
Tampão 10x	2.5μL (1X)
MgCl ₂ (50mM)	0.5μL (1mM)
Taq comum (5U/μL)	0.5 μL (0.04U/μL)
dNTP (2mM)	0.5μL (40 μM)
Água	17μL
Total	25 μL

Quadro 1. Componentes da PCR para amplificação do gene L1 com enzima Taq comum;

Descrição das etapas do programa no termocilador: Desnaturação inicial a 94°C por 1'; 35 ciclos de 94°C por 20'', 56°C por 20'' e 68°C por 1'30''; extensão final a 68°C por 5'.

Reagentes	Volume
DNA (70ng/μL)	5μL(1:10)
Primer forward (10μM)	2μL (0.4 μM)
Primer reverse (10μM)	2μL (0.4 μM)
Tampão 10x	5μL (1X)
MgSO ₄ (50mM)	2μL (2mM)
Taq HiFi	0.2 μL (0.04U/μL)
dNTP (2mM)	5μL (0.2 μM)
Água	28.8μL
Total	50 μL

Quadro 2. Componentes da PCR para amplificação do gene L1 com enzima Taq *High Fidelity*;

Descrição da ciclagem térmica: Desnaturação inicial a 95°C por 3'; 35 ciclos de 94°C por 1', 58°C por 30'' e 72°C por 30''; extensão final a 72°C por 2'.

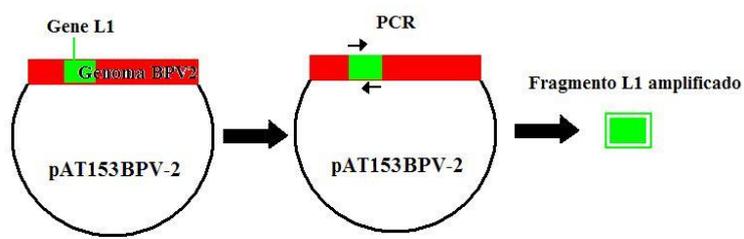


Figura 15. Ilustração da amplificação do fragmento L1 do genoma de BPV-2, presente no vetor pAT153

C. Purificação e ligação do gene L1 no vetor de clonagem pGEM-T

O material amplificado foi purificado através do *kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega) e usado em uma reação de ligação ao vetor pGEM-T (Promega), cujo tamanho é de 3Kb, conforme o cálculo abaixo:

Cálculo Vetor-inserto, relação molar de 5:1:

$$\frac{\text{ng do vetor} \times \text{tamanho em Kb do inserto} \times 5}{\text{tamanho em Kb do vetor}} = \text{ng do inserto necessária}$$

A reação está detalhada na Tabela 3:

Reagentes	Volume
Vetor pGEM T (50ng)	5µL
L1 amplificado (100ng)	1.25µL
Enzima T4 ligase 10u/µL	0.5µL
Tampão 10x	4µL
Água	9.25µL
Total	20 µL

Quadro 3. Componentes da reação de ligação para montagem vetor pGEM-T carregando o gene L1;

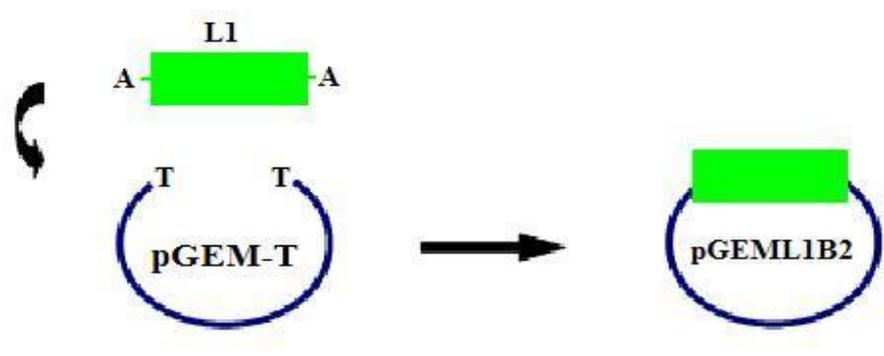


Figura 16. Ilustração da ligação do fragmento L1 de BPV-2 no vetor pGEM-T

Após incubação de 16 horas em temperatura de 14°C, o produto da ligação foi usado como agente transformante de células de *Escherichia coli* linhagem DH5α, previamente tratadas segundo o protocolo Sambrook de 1989 para preparo de células competentes descrito no próximo subtópico.

D. Transformação de *E. coli*

A linhagem a ser transformada foi inoculada em 50 mL de meio LB para crescimento por 16 horas a 37°C, com agitação. Após este período, realizou-se o pré-inóculo com 1 ml da cultura em novo erlenmeyer contendo 500ml de LB para crescimento a 37°C, com agitação até atingir uma DO A600 de 0,5. Uma alíquota de 250ml de cultura foi centrifugada a 5000rpm por 5 min, e 0°C. O pellet obtido foi ressuspendido em 30ml de solução gelada de CaCl₂ (100mM) e incubado no gelo por 30min. Nova centrifugação a 5500rpm por 7min foi realizada para ressusensão das células em 5ml de solução CaCl₂ 100mM, 15% de glicerol bem gelados. Alíquotas de 250µl de células competentes foram armazenadas em freezer -80°C.

Para a transformação, 0,5µg de DNA, 25µl de tampão de transformação e 50µl das células competentes foram incubados no gelo por 30min com posterior choque térmico a 42°C por 5min. Após 1min no gelo foi acrescentado 800 µl de LB para recuperação das células por 1 hora a 37°C. As células assim transformadas foram posteriormente semeadas em placas de meio de cultura Luria-Bertani (LB) (Extrato de levedura 0,5%; Peptona de caseína 1%; NaCl 1%; Água destilada); Agente antimicrobiano correspondente ao vetor utilizado (vetor pGEM-T, agente ampicilina em concentração 100 µg/ml), contendo X-gal (20 mg/ml), IPTG (40 µg/ml) e ampicilina (100 µg/ml), e deixadas a 37°C, por 16-24 horas para crescimento dos transformantes. As colônias que se mostraram resistentes ao antibiótico caracterizaram os possíveis clones.

E. Mini-extração plasmidial

Para extração plasmidial foi usado o protocolo de Sambrook, 1989. A cultura foi crescida a 37°C em 20 ml de meio LB + antibiótico por 16 horas. Após este período foi feita uma centrifugação da cultura em tubo de 1,5ml, por 1min, 4°C a 14000rpm. Depois de obtido o pellet bacteriano, o mesmo foi ressuspendido em 100µl da Solução I gelada (glicose 50mM, Tris-HCl 25nM pH 8, EDTA 10mM pH 8) para dispersão em vórtex e posteriormente, misturado por inversão com 200µl da Solução II (NaOH 0,2N e SDS 1%) para lise das células. A Solução III (acetato de potássio 5M, ácido acético glacial e água destilada) foi adicionada (150µl) para precipitação de proteínas e DNA genômico no tubo que foi mantido no gelo por 3-5min. Logo após, realizou-se uma centrifugação a 14000rpm por 5min e 4°C. para recuperação do sobrenadante em um

novo tubo. Foi acrescentado 2 volumes de etanol absoluto a temperatura ambiente e centrifugado a 14000rpm, 10min. Foi realizada remoção do sobrenadante e obtenção do pellet, que foi adicionado de 1 ml de etanol 70% gelado para lavagem através da centrifugação por 5-10min. Após remoção do sobrenadante e secagem do pellet na estufa (37°C), ele foi ressuspenso em 50µl de água MilliQ, contendo RNase (20µg/ml), incubado por 1 hora a 37°C. O estoque da extração foi a -20°C.

Os recombinantes foram analisados quanto à presença da construção pGEM-L1B2, através de miniprep, PCR e digestão com enzima *EcoRI* (Promega) que lineariza a construção.

F. Digestão dupla dos clones pGEM-TL1B2

Uma vez reconhecidos os clones portadores da construção pGEM-L1B2, por PCR para detecção do gene L1 e por digestões que linearizam o vetor mais o inserto, correspondendo à altura de 4.5 Kb no gel de agarose, realizou-se um novo inóculo dos clones, desta vez, para mini extração plasmidial para fins de subclonagem. Por digestão dupla, à 37°C de incubação, o inserto foi devidamente liberado do seu respectivo vetor e, em seguida, purificado pelo uso do kit *Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega).

Digestão dupla dos clones pGEM-TL1B2 para posterior clonagem em pPICZA

Reagentes	Volume
Fragmento L1 (100ng)	8µL
Enzima Eco RI 20u/µL	1µL
Enzima XhoI 20u/ µL	1µL
Tampão 10x	2µL
BSA	0.2 µL
Água	7.8µL
Total	20 µL

Quadro 4. Componentes da reação de digestão do fragmento L1 para subclonagem em pPICZA;

Digestão dupla dos clones pGEM-TL1B2 para posterior clonagem em pPICZA α L1B2

Reagentes	Volume
Fragmento L1 (100ng)	8μL
Enzima Eco RI 20u/μL	1μL
Enzima Sal I 20u/ μL	1μL
Tampão 10x	2μL
BSA	0.2 μL
Água	7.8μL
Total	20 μL

Quadro 5. Componentes da reação de digestão do fragmento L1 para subclonagem em pPICZA α

G. Subclonagem do gene L1B2 nos vetores de expressão pPICZA e pPICZA α

Paralelamente, os vetores pPICZA e pPICZA α foram também digeridos com as enzimas já citadas na expectativa de linearizar e disponibilizar os dois sítios para posterior ligação com o inserto L1.

Reagentes	Volume
Vetor pPICZA (50ng)	8μL
Enzima Eco RI 20u/μL	1μL
Enzima XhoII 20u/ μL	1μL
Tampão 10x	2μL
BSA	0.2 μL
Água	7.8μL
Total	20 μL

Reagentes	Volume
Vetor pPICZAα (50ng)	8μL
Enzima Eco RI 20u/μL	1μL
Enzima Sal I 20u/ μL	1μL
Tampão 10x	2μL
BSA	0.2 μL
Água	7.8μL
Total	20 μL

Quadros 6 e 7. Componentes das reações de digestão dos vetores pPICZA e pPICZA α para subclonagem do fragmento L1;

Ligação do L1BPV-2 com os vetores de expressão pPICZA e pPICZA α .

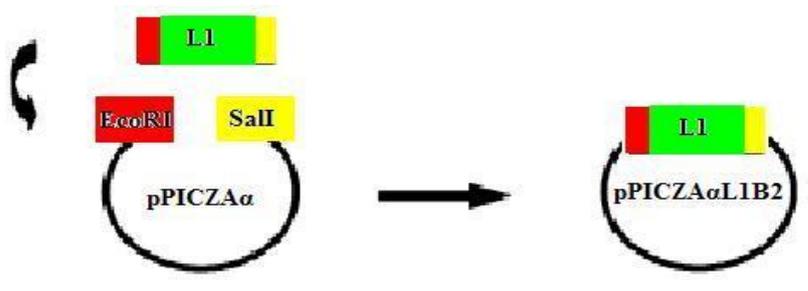


Figura 17. Ilustração da ligação do fragmento L1 de BPV-2 ao vetor pPICZA α . Em destaque, sítios complementares de *EcoRI* (em vermelho) e de *SalI* (em amarelo);

Reagentes	Volume
Vetor pPICZA (50ng)	5μL
Fragmento L1(100ng)	1.5μL
Enzima T4 ligase 10u/μL	1μL
Tampão 10x	4μL
Água	8.5μL
Total	20 μL

Reagentes	Volume
Vetor pPICZAα (50ng)	5μL
Fragmento L1(100ng)	1.5μL
Enzima T4 ligase 10u/μL	1μL
Tampão 10x	4μL
Água	8.5μL
Total	20 μL

Quadros 8 e 9. Componentes das reações de ligação dos vetores pPICZA e pPICZA α ao fragmento L1;

Após a incubação por 1 hora em temperatura ambiente (24°C) e 16 horas (*overnight*) a 12°C, o produto da ligação foi usado como agente transformante de células de *Escherichia coli* linhagem DH10 α , previamente tratadas segundo o protocolo de preparo de células competentes. Após o procedimento de transformação, já descrito em etapas anteriores, as células foram plaqueadas em meio sólido LB *low salt*; com antibiótico zeocina (marca de resistência do vetor pPICZ,) em concentração 25 μ g/ml.

Após incubação por 16 horas a 37°C, as colônias resistentes à zeocina foram estriadas em uma nova placa de LB *low salt*, e incubadas a 37°C por 16 horas.

H. Análise dos clones pPICZAL1B2 e pPICZAαL1B2 (PCR de colônia, digestão plasmidial e sequenciamento)

Para proceder a análise dos clones pPICZAL1B2 e pPICZAαL1B2, optou-se por realizar PCR de colônias, onde é possível detectar o inserto L1B2 diretamente de uma amostra, caso esteja presente em alguma colônia na cultura. Para isso, é necessário submeter uma suspensão da colônia isolada, a uma temperatura de 95°C por 5 minutos, com o objetivo de fragmentar a parede bacteriana pelo calor, liberando o material genético. Após essa etapa preliminar, o protocolo segue semelhante a PCR já citada (subtópico B.)

Reagente	Volume
Suspensão de colônia	5µL
Primer forward (10µM)	1.5µL (0.6 µM)
Primer reverse (10µM)	1.5µL (0.6 µM)
Tampão 10x	2.5µL (1X)
MgCl ₂ (50mM)	0.5µL (1mM)
Taq comum (5U/µL)	0.2 µL (0.04U/µL)
dNTP (2mM)	0.5µL (40 µM)
Água	12µL
Total	25 µL

Quadros 10. Componentes da PCR de colônias portadoras das construções pPICZAL1B2 ou pPICZAαL1B2;

Descrição da ciclagem térmica: Desnaturação inicial a 94°C por 1'; 35 ciclos de 94°C por 20'', 56°C por 20'' e 68°C por 1'30''; extensão final a 68°C por 5'.

Os clones assim detectados foram selecionados para crescimento, extração plasmidial e, em seguida, digestão com as enzimas previamente citadas para linearização da construção, através da qual se verifica no tamanho esperado para os vetores de expressão contendo o inserto, e digestão dupla para liberação completa do inserto presente na construção, no tamanho correspondente.

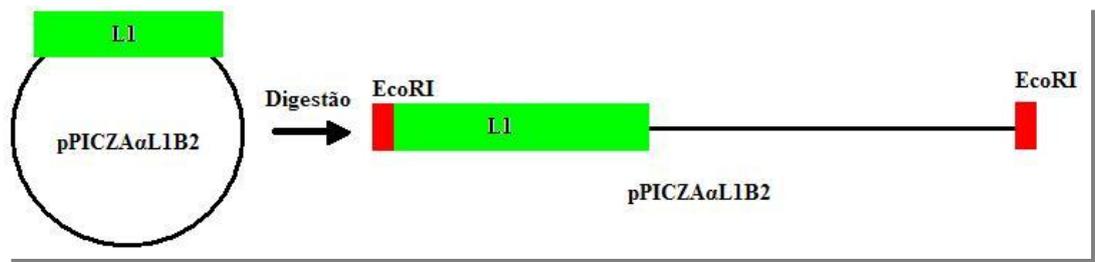


Figura 18. Ilustração de uma digestão com EcoRI a qual foi submetida a construção pPICZA α L1B2, na qual espera-se o tamanho de 5,1Kb, correspondentes a 1,5Kb do inserto L1 contido no vetor pPICZA α , de tamanho de 3,6Kb;

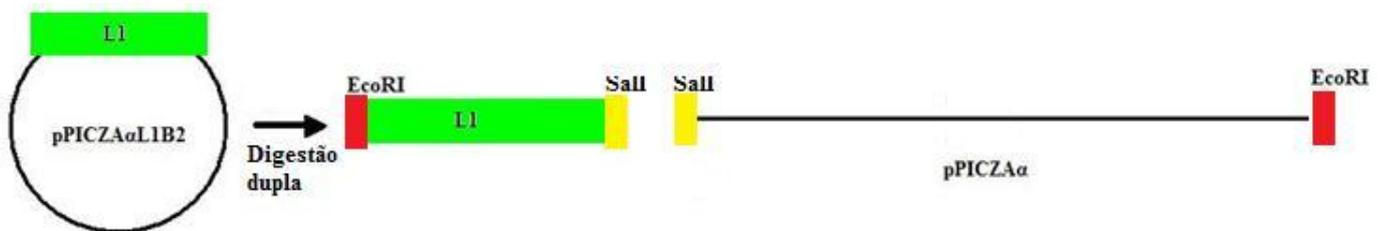


Figura 19. Ilustração de uma digestão dupla com EcoRI e Sall da construção pPICZA α L1B2, na qual espera-se a liberação do fragmento L1 de BPV-2, de tamanho aproximado de 1,5Kb, e o vetor pPICZA α , de tamanho de 3,6Kb;

As amostras foram sequenciadas no Núcleo Integrado de Tecnologia (NIT) do CPqAM, utilizando o sequenciador automático de DNA ABI Prism 3100 (Applied Biosystem®), confirmando sumariamente a clonagem, a manutenção da fase de leitura das seqüências e correta orientação do inserto em seus respectivos vetores.

4.2.2. Expressão em *Pichia pastoris*

A. Extração dos plasmídios de *E. coli* e transformação destes em leveduras *P. pastoris*

Inicialmente, células de *E. coli* recombinantes, contendo a construção pPICZAL1B2 ou a construção pPICZA α L1B2, foram cultivadas e submetidas à extração plasmidial com o kit *QIAprep Spin Maxiprep*, seguindo instruções do fabricante. Aproximadamente 10 μ g do cassete de expressão foram linearizados por digestão com a enzima *SacI*, segundo especificações do manual de *Pichia pastoris* (Invitrogen®) para a integração do cassete de expressão ao genoma da levedura. Paralelamente, 10 μ g dos dois vetores sem inserto também foram linearizados para transformação, uma vez que as leveduras recombinantes com este plasmídeo constituiriam o controle negativo da expressão.

Para preparação de células eletrocompetentes, foram realizados os seguintes procedimentos: uma colônia da levedura *P. pastoris* X-33 (tipo selvagem) foi pré-inoculada em 10 mL de YPD (250 rpm, a 30°C) *overnight* ou até uma DO₆₀₀ igual a 3; de 3-5 mL do pré-inóculo foi adicionado a 250 mL de meio YPD para crescimento por 6 horas ou até uma DO₆₀₀ igual 1.3; a cultura de leveduras foi centrifugada (3000 rpm por 5 min., a 4°C) para sedimentação das células; a lavagem do *pellet* foi gentilmente realizada por pipetagem, através de uma ressuspensão inicial das células em 100 mL de água deionizada (autoclavada) gelada, seguida de centrifugação e descarte do sobrenadante; a segunda ressuspensão do *pellet* foi realizada com 50 mL de água deionizada (autoclavada), seguindo-se de nova centrifugação e descarte do sobrenadante; a última lavagem do *pellet* foi realizada com 20 mL de sorbitol gelado 1M, seguindo-se da última centrifugação e descarte do sobrenadante; as células foram finalmente ressuspensas em 0.5 mL de sorbitol 1M e mantidas no gelo.

Para a eletroporação, 5-10 µg de DNA previamente linearizados (em um volume de 10 µL) foram homogeneizados a 80 µL de células eletrocompetentes mediante pipetagem. Essa mistura foi transferida para uma cubeta de 2 mm pré-resfriada e incubada no gelo por 5 min. A cubeta foi inserida no eletroporador (Multiporator Eppendorf) para transformação, seguindo os parâmetros determinados pelo fabricante: 2500V por 5 ms. Imediatamente após o pulso elétrico, 1 mL de sorbitol 1M gelado foi adicionado a cubeta. Em seguida, esse material foi transferido para um tubo estéril de 15 mL e incubado por 1 hora a 30°C, sem agitação. Para aumentar o rendimento da transformação, foi adicionado 1 mL de YPD ao tubo, o qual foi incubado por mais 2-3 horas a 30°C, sob agitação. A partir desse material, alíquotas de 10, 25 e 100 µL foram semeadas em placas de meio YPDS contendo 100 µg/mL de ZeocinaTM para incubação a 30°C por 2-3 dias.



Figura 20. Eppendorf® Multiporator e cubetas de 1, 2 e 4mm ; equipamento utilizado para transformação das células de *P. pastoris*;

B. Análise dos recombinantes de *P. pastoris*

Após o período de incubação referido, os recombinantes obtidos através da seleção por ZeocinaTM foram analisados quanto à integração do cassete de expressão no genoma das leveduras. A metodologia empregada foi a PCR de colônia (LINDER *et al.*, 1996). De forma resumida, cada colônia foi ressuspensa isoladamente em 10 µL de água MilliQ. Em seguida, foi adicionado 5 µL de uma solução de liticase (5 U/µL) à suspensão de células, a qual foi incubada por 10 min. a 30°C e no nitrogênio líquido por 1 min. Esta etapa preliminar é fundamental para a lise da parede celular das leveduras. Uma alíquota de 5 µL deste lisado foi coletada como DNA *template* para o *mix* da reação contendo os *primers* AOX1, tampão, MgCl₂, dNTPs e água estéril. Depois de uma etapa de pré-aquecimento a 95°C por 5 min., foi adicionado 0.8 unidades de *Taq* polimerase ao *mix*, o qual foi submetido a seguinte ciclagem térmica: 30 ciclos de desnaturação inicial a 95°C por 1 min., anelamento a 54°C por 1 min. e extensão a 72°C por 1 min.; uma etapa de extensão final a 72°C por 7 min. A colônia de *P. pastoris* X-33 transformada com o vetor pPICZAα sem inserto constituiu o controle da reação para a integração do cassete de expressão.

Seqüências dos *primers* para amplificação do gene AOX1.

OLIGONUCLEOTÍDEOS AOX1

Forward AOX1

5` GACTGGTTCCAATTGACAAGC 3`

Reverse AOX1

5` CAAATGGCATTCTGACATCC 3`

Alíquotas de 10 µL das amostras submetidas à amplificação foram aplicadas em gel de agarose para análise das bandas mediante corrida eletroforética. As colônias que se mostraram positivas à amplificação com *primers* AOX1 foram repicadas para novas placas YPDS contendo ZeocinaTM (100 µg/mL) e incubadas a 30°C para crescimento. Paralelamente, foram feitos preservados em glicerol dos referidos clones para estocagem a -80°C.

No intuito de usar ferramentas alternativas para se verificar a integração e, posteriormente, expressão do gene L1 íntegro ao cassete de expressão, novos *primers* foram desenhados, voltados para uma região interna ao gene.

Seqüências dos *primers* para amplificação da região interna do gene L1 de BPV 2

Forward Interno L1

5` AAGATGGAGACATGATGGAAATAG 3`

Reverse Interno L1

5` AAATTTGCCAGTATCATACTCTGAC3`

Esses oligonucleotídeos internos ao gene L1 podem fornecer indícios de manutenção da integridade do gene L1 no cassete de expressão integrado e são ferramentas importantes para verificar a transcrição do gene, através de RT-PCR. A reação e os ciclos de amplificação seguem os parâmetros previamente descritos.

C. Cultivo e indução dos recombinantes

Os clones de *Pichia pastoris* foram selecionados para testes de crescimento e indução da proteína heteróloga juntamente com a linhagem GS115 contendo o gene *lacZ* (controle positivo da expressão) e a linhagem X-33 transformada com o vetor pPICZA sem inserto (controle negativo da expressão). Colônias isoladas do meio seletivo foram inoculadas em 50 mL de meio BMGY em frasco erlenmeyer de 500 mL (volume de meio utilizado equivalente a 10% do volume total do frasco) e incubadas a 28°C por 48 horas sob agitação vigorosa (240 rpm), etapa fundamental para produção de biomassa. Quando a cultura atingiu uma DO₆₀₀ próxima a 20, o material foi submetido à centrifugação (3000 rpm por 5`, a temperatura ambiente) para sedimentação das células e descarte do meio contendo glicerol. Em seguida, as leveduras foram ressuspensas em 100 mL de meio BMMY (contendo metanol a 0.5%) em frasco erlenmeyer de 1 litro. A indução foi feita por 120 horas, com adição de metanol para uma concentração final de 2% a cada 24 horas. Imediatamente antes da adição do agente indutor, alíquotas de 1 mL foram coletadas nos tempos T₄₈, T₉₆ e T₁₂₀, centrifugadas (15000 rpm por 5 min.) e os *pellets* estocados a -80°C para análise da expressão.

Para os clones capazes de secretar a proteína recombinante, no intuito de identificar aqueles cujo poder de expressão poderia ser maior, foi realizado um crescimento em placa *deep-well* 96 poços, cada poço preenchido com 1 mL de cultura com meio BMGY, para enriquecimento durante 24 horas, e BMMY, para indução durante 72 horas. A cada 24 horas, 1% de metanol foi adicionado, durante a fase de indução. A troca dos meios foi realizada por meio de centrifugação a 5000rpm por 10

minutos, em centrífuga refrigerada Eppendorf®. Todo o crescimento e indução ocorreram a 250rpm e 30°C. Ao fim da indução, o sobrenadante de 48 clones (portadores da construção integrada pPICZA α L1B2) induzidos foi recuperado por centrifugação (5000rpm a 4°C por 15 minutos) e 100 μ L de cada foram aplicados diretamente ao dispositivo Immunoblotter Scie-Plas® acoplado à bomba de vácuo, sobre uma membrana de nitrocelulose. O desempenho de cada clone pode assim ser visualmente verificada, quanto a expressão da proteína L1 recombinante, através da reação imunológica do anticorpo anti-HIS conjugado à fosfatase alcalina.

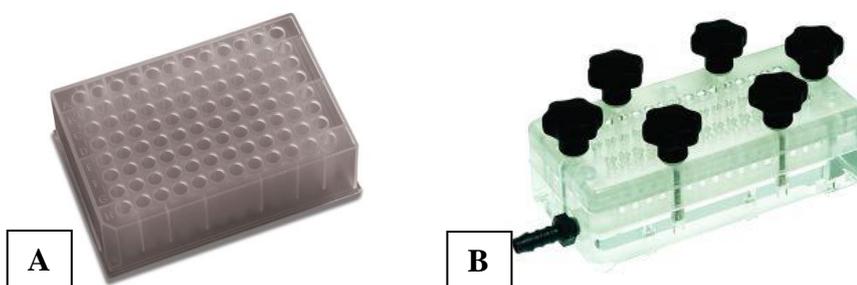


Figura 21. A – Placa *deep-well* de 96 poços; B – Dispositivo *imunoblotter*;

Uma vez escolhidos os clones cujos resultados no imunoensaio (dot-blot) foram mais intensos, um novo experimento de cultivo, com fase de crescimento em 50 mL de BMGY, durante 48 horas, e indução em 100mL de BMMY, durante 120 horas, foi realizado. Ambas as fases do cultivo ocorreram a 30°C e 250rpm. A cada 24 horas, 2% de metanol foram adicionados durante as 120 horas de indução.

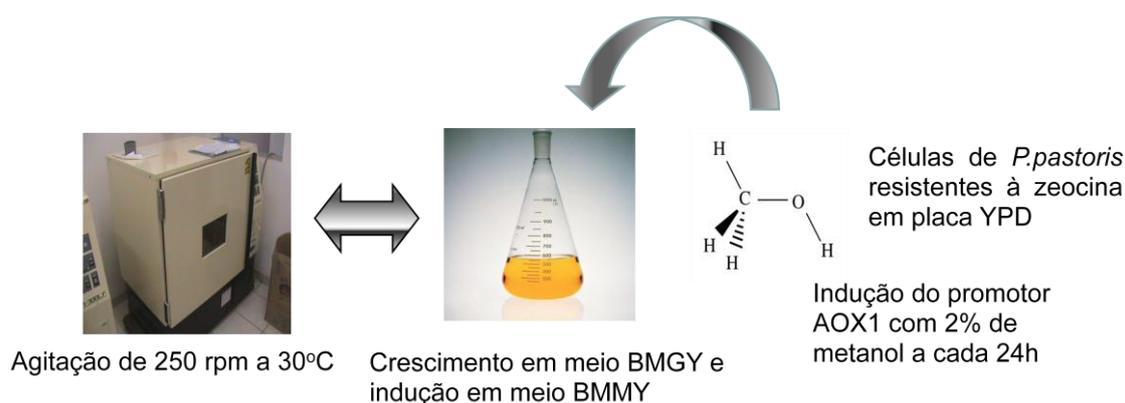


Figura 22. Esquema ilustrativo do ensaio de cultivo, com fase de crescimento e de indução, aos quais foram submetidos os clones portadores das construções pPICZAL1B2 ou pPICZA α L1B2;

D. Análise de transcrição do gene

Após 120 horas de indução, alíquotas de 1 mL das culturas foram coletadas, centrifugadas e os *pellets* estocados a -80°C para análise da transcrição do gene L1. O RNA total dos transformantes foi extraído com o *kit SV Total RNA Isolation System*, seguindo as recomendações do fabricante, e estocado a -80°C. O RNAm do gene L1 foi detectado mediante RT-PCR (Reação em Cadeia da Polimerase - Transcriptase Reversa), utilizando o *kit ImProm-IITM Reverse Transcription System* e *primers* específicos para a amplificação de uma região interna ao gene L1.

E. Processamento das amostras protéicas

No final das 96 horas de indução, 100mL da cultura foram centrifugados (3000 rpm por 30` a 4°C) em tubo estéril de 50 mL. Para os clones pPICZAL1B2 o meio de cultura foi descartado e o *pellet* celular foi recuperado para extração das proteínas intracelulares. Para lise das células, foi adicionado 3mL do tampão de lise ao *pellet* e um volume igual de *glass beads* (0.5 mm). Em seguida, foram realizados 8 ciclos de 30 seg. no vórtex e 30 seg. no gelo. Subseqüentemente, nova centrifugação foi realizada (3000 rpm por 30 min., a 4°C) para recuperação do sobrenadante e posterior análise da proteína L1. Para determinação da concentração protéica, foi empregada uma versão modificada (com relação ao volume utilizado) do método de Bradford (1976).

Para os clones pPICZA α L1B2, após a centrifugação, o sobrenadante foi recuperado para posteriores análises imunológicas de detecção direta da proteína recombinante presente no meio extracelular. Para a recuperação do conteúdo protéico presente no meio extracelular, a primeira metodologia testada foi a liofilização do meio isento de células, na qual aproximadamente 50mL de meio foram congelados a -80°C e, mantida a temperatura das amostras, submetidos a cerca de 48 horas no vácuo para sublimação de todo o conteúdo aquoso. Em seguida, o material seco foi ressuscitado com 3mL de tampão fosfato, atingindo volume final de 6 a 7 mL. A segunda metodologia foi a precipitação protéica por adição de acetona gelada da seguinte forma: 1 mL do meio de cultura foi misturado a 8 mL de acetona 100% gelada e a suspensão foi acondicionada a -20°C por cerca de 16 horas. Procedeu-se a centrifugação por 20 minutos a 5000 rpm e secagem do precipitado a 37°C por 15 minutos. A amostra pôde ser então ressuscitada em tampão de fosfato para uma concentração final de 10X ou ressuscitada diretamente no tampão de amostra com β -mercaptoetanol para corrida SDS-PAGE.

O extrato protéico solúvel foi empregado em corrida eletroforética com gel SDS-PAGE 12.5% para análise da presença e integridade da proteína recombinante. Ensaios de *Imunoblotting* para detecção de L1 com anticorpo (anti-His) contra a cauda de poli-histidina C-terminal da proteína heteróloga foram executados mediante *dot blotting* (concentração de anticorpo anti-His 1:10000). O protocolo empregado para o ensaio imunoenzimático consiste em: sensibilização da membrana de nitrocelulose pela ligação das proteínas intracelulares por 1 hora; lavagem com TBS 1X por 5 min.; bloqueio com leite desnatado 2.5% por 1 hora; lavagem com TBS 1X por 5 min.; adição de anticorpo (anti-His conjugado à fosfatase alcalina na concentração de 1 µg/mL e na diluição de 1:5.000 em leite desnatado 5%) para 40 min. De incubação a 37°C; três etapas de lavagem por 10 min. Com TBS-Tween (TBST); revelação com NBT/BCIP (*Nitro blue tetrazolium chloride / 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate, toluidine salt*). Foram utilizados extratos protéicos com concentrações padronizadas, aplicando-se 0.3 µg, 0.6 µg e 1.2 µg de proteína total intracelular e extracelular para sensibilização da membrana de nitrocelulose. A reação foi observada após 15-20 min. com pouca iluminação e interrompida por lavagem da membrana com água destilada.

5. RESULTADOS

5.1. Amplificação do gene L1 de BPV-2 a partir do genoma viral selvagem

O gene L1 de BPV-2 foi amplificado, sendo a banda de 1500pb visualizada em gel de agarose (Figura 23.).

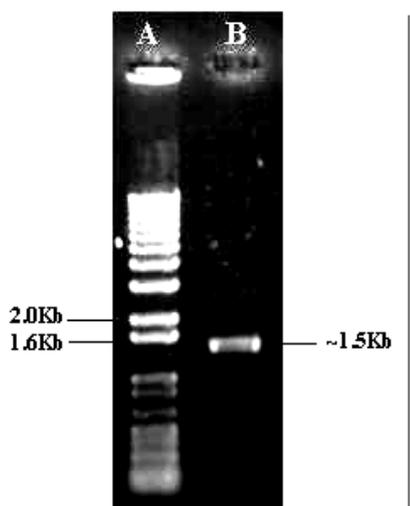


Figura 23. Eletroforese em gel de agarose 0.8% em TAE; Voltagem aplicada de 100V ($10V/cm^2$) por 30 minutos; Produto da amplificação do gene L1 de BPV 2: (A) - marcador molecular de 1 Kb (Invitrogen), (B) - fragmento de PCR de 1,5 kb (L1 de BPV2);

5.2. Amplificação do gene L1 a partir da construção pGEM-TL1B2

Com os mesmos oligonucleotídeos iniciadores utilizados anteriormente, realizou-se PCR sobre as extrações plasmidiais pGEM-T para verificação da clonagem do gene L1 (Figura 24.).

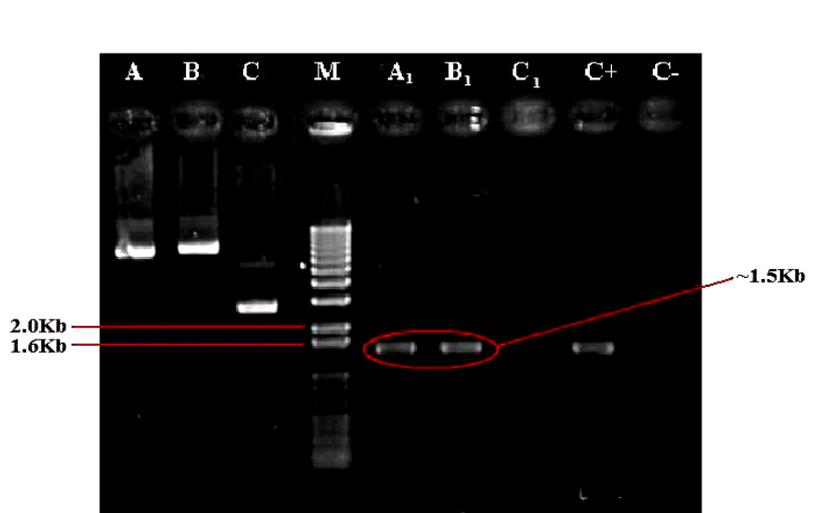


Figura 24. Eletroforese em gel de agarose 0.8% em TAE; Voltagem aplicada de 100V ($10V/cm^2$) por 30 minutos; PCR de três possíveis clones pGEMTL1B2; M- marcador molecular de 1Kb (Invitrogen); A, B, C – extração plasmidial de três culturas; A₁, B₁, C₁ – resultados da PCR respectivos a cada extração; C+ (Controle positivo); C- (Controle negativo); Clones A e B positivos quanto a presença de L1; Clone C, negativo;

5.3. Digestão dupla da construção pGEM-TL1B2

A digestão dupla, por meio das duas enzimas, cujos sítios foram previamente inseridos ao gene L1, liberou o fragmento L1 do vetor pGEM-T (Figuras 25 e 26.), permitindo sua posterior clonagem nos vetores de expressão pPICZA e pPICZA α .

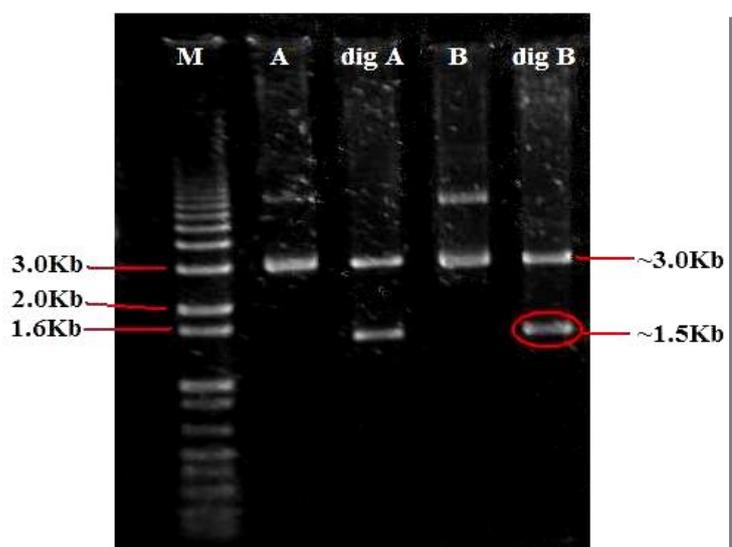


Figura 25. Eletroforese em gel de agarose 0.8% em TAE; Voltagem aplicada de 100V(10V/cm²) por 30 minutos; Digestão dupla da construção pGEMTL1B2 com *EcoRI/Sall*, liberando o fragmento de 1,5 kb (L1 de BPV2); M- marcador molecular de 1Kb (Invitrogen), A e B – extração plasmidial de cada clone, Dig A e Dig B – digestões dos respectivos clones;

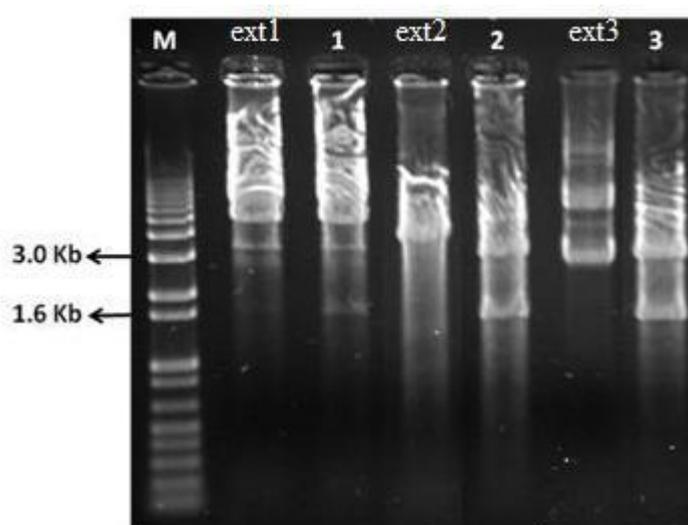


Figura 26. Eletroforese em gel de agarose 0.8% em TAE; Voltagem aplicada de 100V(10V/cm²) por 30 minutos; Digestão com as enzimas *EcoRI* e *XhoI* de DNA plasmidial; ext1, ext2 e ext3 – extrações plasmidiais de três colônias selecionadas; 1, 2 e 3 – digestões dos respectivos plasmídios pGEMTL1B2, onde é possível visualizar duas bandas referentes aos fragmentos do vetor pGEM-T Easy (3 Kb) e do inserto L1 (1.5 Kb); M – Marcador molecular de 1 Kb plus.

5.4. Subclonagem do gene L1B2 nos vetores de expressão pPICZA e pPICZA α

Procedeu-se a digestão dos vetores pPICZA e pPICZA α com as respectivas enzimas, disponibilizando os sítios de clonagem próprios à inserção do gene L1 de BPV-2. Após reação de ligação, a construção foi usada como agente transformante, gerando clones em *E. coli* sujeitos à análise.

5.4.1. Análise dos clones pPICZAL1B2 e pPICZA α L1B2 (PCR de colônia)

As colônias de *E. coli* transformadas com as construções pPICZAL1B2 e pPICZA α L1B2 foram apontadas por meio de PCR de colônia (Figura 27.) que forneceram indícios de sucesso na clonagem.

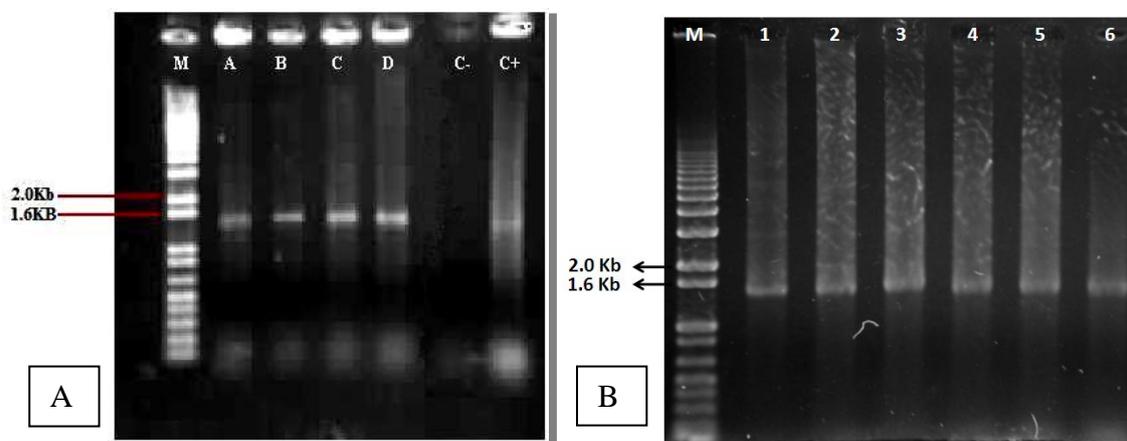


Figura 27. Eletroforese em gel de agarose 0.8% em TAE; Voltagem aplicada de 100V(10V/cm²) por 30 minutos; (A) PCR de colônias de quatro possíveis clones contendo a construção pPICZA α L1B2; M- marcador molecular de 1Kb (Invitrogen); A, B, C, D – quatro clones que indicam a presença do gene L1B2 (~1.5Kb); C- (Controle negativo); C+ (Controle positivo); (B) Confirmação da presença do inserto L1 na construção pPICZAL1B2: **1 a 6** – amostras submetidas a PCR com *primers* específicos para L1, nas quais é possível visualizar bandas referentes ao inserto L1 (1.5 Kb) amplificado a partir de alíquotas da extração plasmidial; **M** – Marcador molecular de 1 Kb *plus*.

5.4.2. Análise dos clones pPICZAL1B2 e pPICZA α L1B2 (Digestão das extrações plasmidiais).

As digestões com enzimas previamente utilizadas nas clonagens linearizaram e liberaram o fragmento correspondente ao gene L1, confirmando a construção dos vetores pPICZAL1B2 e pPICZA α L1B2 (Figuras 28, 29 e 30.).

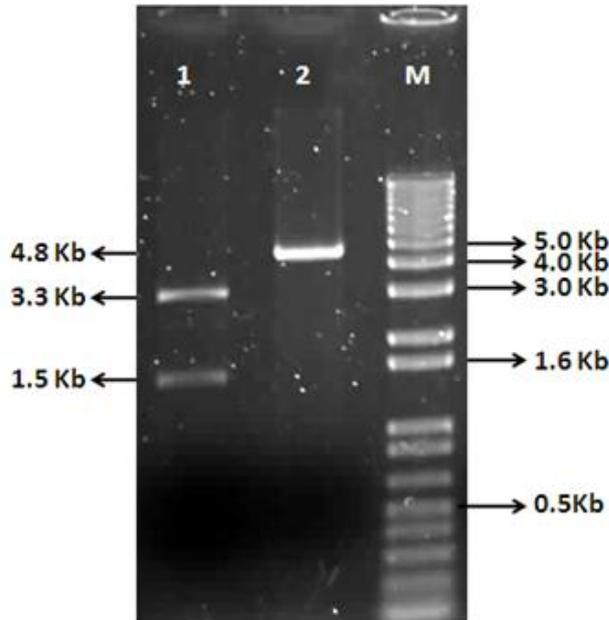


Figura 28. Confirmação da obtenção de bactérias recombinantes portadoras da construção pPICZAL1B2 por digestão enzimática: **1** – Fragmentos de 3.3 Kb e 1.5 Kb referentes ao vetor pPICZA e ao gene L1, respectivamente, obtidos a partir de digestão enzimática com *EcoRI* e *XhoI* da amostra de extração plasmidial (colônia número 1); **2** – Fragmento de 4.8 Kb referente à construção pPICZAL1B2 linearizada por digestão com a enzima *EcoRI*

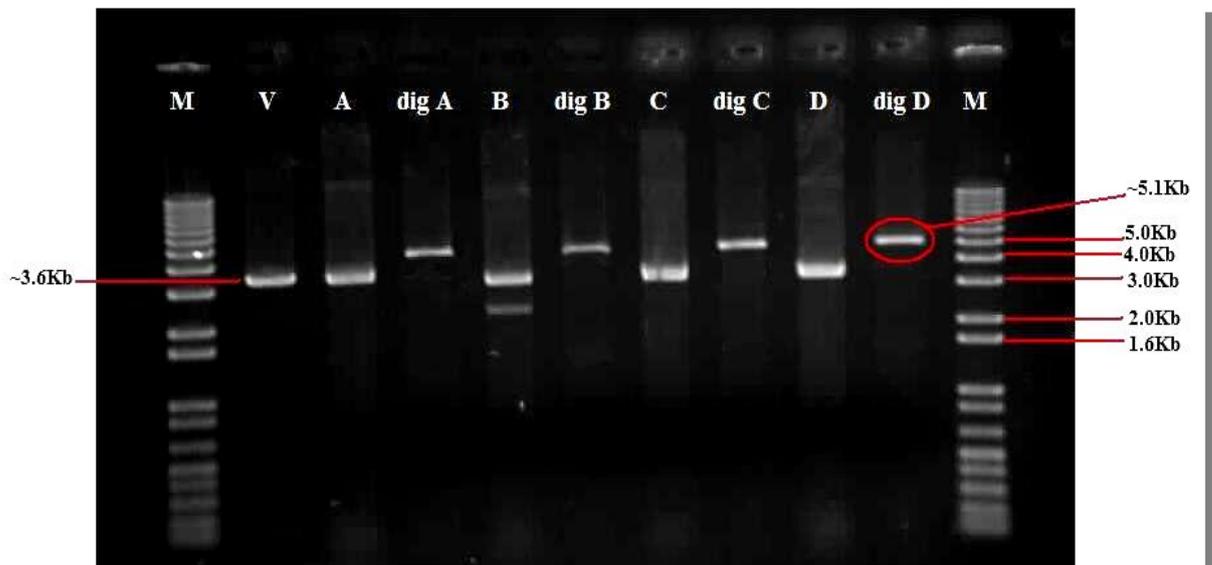


Figura 29. Eletroforese em gel de agarose 0.8% em TAE; Voltagem aplicada de 100V(10V/cm²) por 30 minutos; Construção pPICZA α L1B2 linearizada por digestão com *EcoRI*; M- marcador molecular de 1Kb (Invitrogen); V – vetor pPICZA α linearizado (~3.6Kb); A, B, C, D – extração plasmidial de quatro possíveis clones; dig A, dig B, dig C, dig D – digestão com *EcoRI* dos quatro clones pPICZA α L1B2

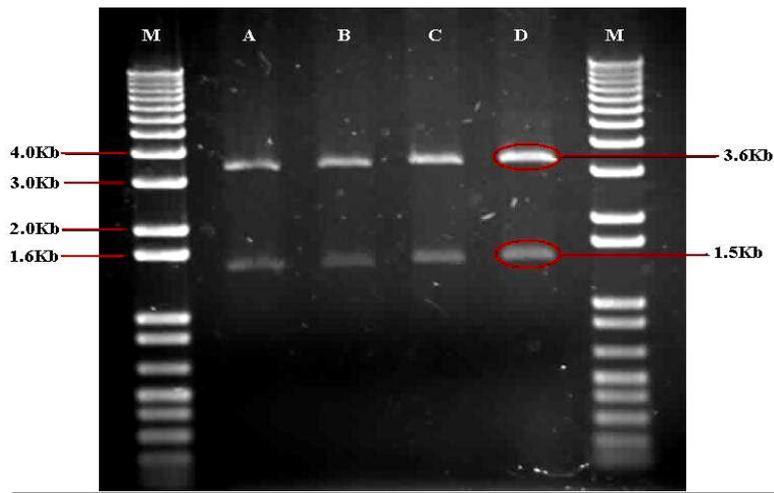


Figura 30. Eletroforese em gel de agarose 0.8% em TAE; Voltagem aplicada de 100V(10V/cm²) por 30 minutos; Digestão dupla *EcoRI/ SalI* (Promega) dos clones pPICZAαL1B2; M- marcador molecular de 1Kb (Invitrogen); A, B, C, D – digestão dupla dos plasmídeos de cada clone, liberando o respectivo fragmento L1B2 (~1.5Kb);

5.5. Obtenção dos clones recombinantes pPICZAL1B2 e pPICZAαL1B2 em *Pichia pastoris*

5.5.1. Transformação de *P. pastoris*: Recombinantes pPICZAL1B2 e recombinantes pPICZAαL1B2

A partir da extração plasmidial de células de *E. coli* recombinantes, foram obtidas as construções pPICZAL1B2 e pPICZAαL1B2, as quais, devidamente dosadas, corresponderam a aproximadamente 10 µg de DNA necessário à transformação das leveduras, segundo protocolo de eletroporação descrito no subtópico 4.2.2. da Metodologia. Os cassetes de expressão pPICZAL1B2 e pPICZAαL1B2 foram linearizados por digestão com a enzima *SacI*. Paralelamente, 10 µg dos dois vetores sem inserto também foram linearizados para transformação, uma vez que as leveduras recombinantes com este plasmídeo constituiriam o controle negativo da expressão.



Figura 31. Repiques das colônias de leveduras eletroporadas com a construção pPICZAL1B2 e pPICZA α L1B2 em placa YPDS com 100 μ g/mL de ZeocinaTM

5.5.2. PCR de colônias de leveduras para confirmação da integração do cassete de expressão

No intuito de verificar a integração do cassete de expressão ao genoma da *P. pastoris*, foi realizado PCR de colônias com os oligonucleotídeos iniciadores AOX1 (Figura 32.), caracterizando colônias detentoras das construções pPICZ, bem como PCR de colônia usando oligonucleotídeos iniciadores para a região interna do gene L1 (forward) e para o gene AOX1(reverse) , demonstrando indícios de não haver perda do gene por ocasião da transformação (Figura 33.).

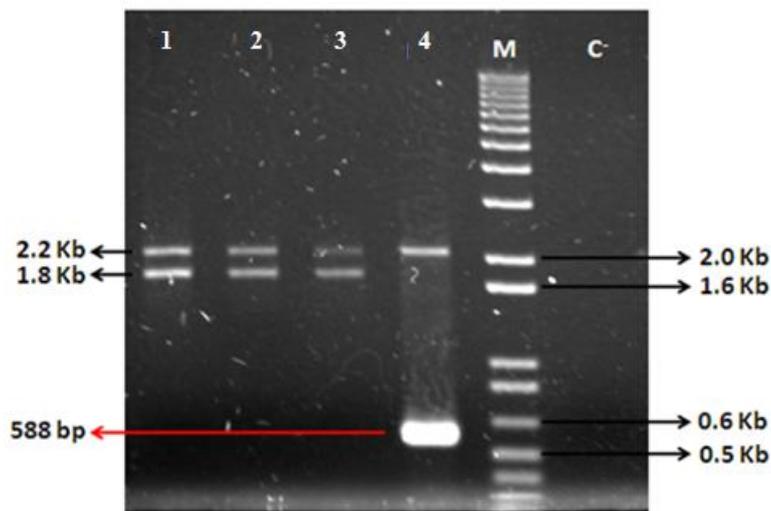


Figura 32. PCR de colônia para confirmação da integração do cassete de expressão no genoma das leveduras recombinantes, utilizando *primers* para o gene *AOX1*: **1, 2 e 3** – Fragmentos de 2.2 Kb e 1.8 Kb referentes à amplificação do gene selvagem *AOX1* da levedura e do gene L1 (1.5 Kb) adicionado de uma pequena região resultante do anelamento de *primers* (325 bp) no promotor *AOX1* presente no vetor pPICZA; **4** – Fragmentos de 2.2 Kb e 588 pb referentes à amplificação do gene selvagem *AOX1* da levedura e da pequena região interna ao promotor *AOX1* presente no vetor pPICZA α , utilizado como controle positivo da reação de PCR; **C** - reação controle sem DNA; **M** - Marcador molecular de 1 Kb *plus*.

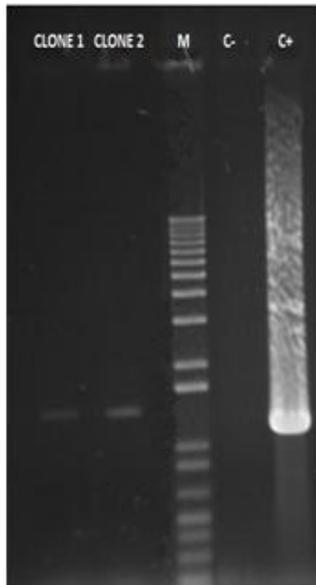


Figura 33. Clones 1 e 2 (clones pPICZ α L1B2), fragmentos amplificados com primer *forward* interno ao gene L1B2 e primer *reverse* AOX1 a partir do *template* integrado ao genoma de *P. pastoris*; M – marcador 1Kb, C- e C+(Maxprep pPICZL1B2)

5.5.3. Análise de expressão do gene L1 de BPV-2 em *P. pastoris*

Após 120 horas de indução, alíquotas de 1mL das culturas foram coletadas, centrifugadas e os *pellets* estocados a -80°C para análise da transcrição do gene L1, através da RT-PCR, a partir da qual a região interna do gene L1 foi amplificada (Figura 34.), demonstrando a transcrição ativa do gene na célula hospedeira.

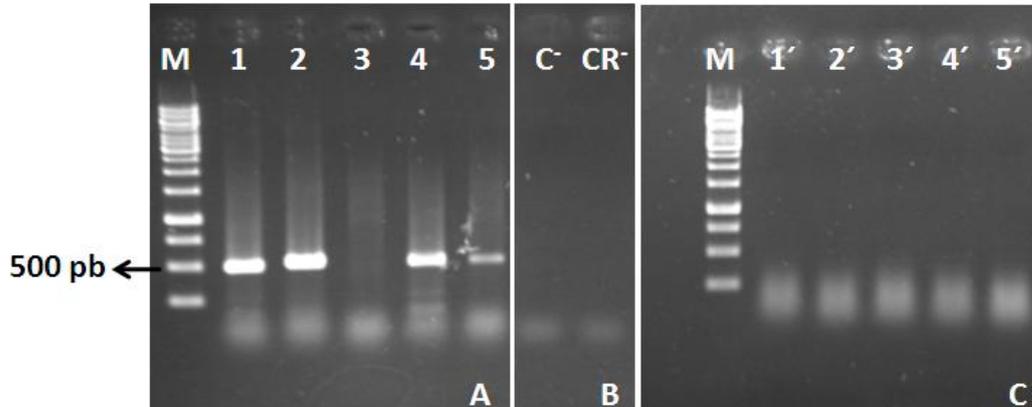


Figura 34. Eletroforese em gel de agarose: análise da atividade transcricional do gene L1 por RT-PCR a partir de material proveniente dos recombinantes de *P. pastoris* X-33/pPICZAL1B2, X-33/pPICZ α L1B2 e X-33/pPICZA após 120 horas de indução com metanol a 2%. **(A)** Amostras do crescimento submetidas à extração de RNA total, produção de cDNA e posterior amplificação com *primers* específicos para uma região interna ao gene L1 de 500 pb: **1 e 2** (pPICZAL1B2), **4 e 5** (pPICZ α L1B2) - Fragmento 500 pb referente à região interna do gene L1 amplificada a partir de RT-PCR de 4 clones induzidos; **3** – produto da RT-PCR realizada da colônia de *P. pastoris* X-33 transformada com o vetor pPICZA sem o gene L1; **M** – Marcador molecular de 100 pb; **(B)** Amostras utilizadas como controle para a reação de RT-PCR: **C-** - amostra sem RNA *template*; **CR-** - amostra sem cDNA *template* utilizada para a PCR. **(C)** Amostras do crescimento submetidas à extração de RNA total, à transcrição reversa sem a transcriptase reversa e posterior PCR: **1' a 5'** – Nenhum fragmento de DNA foi amplificado; **M** – Marcador molecular de 100 pb.

Para identificar a produção heteróloga da proteína L1, foi realizada a extração protéica total das leveduras submetidas à indução com metanol. Os clones que receberam o vetor dirigido para a expressão intracelular (pPICZAL1B2) foram submetidos à lise celular para obtenção do extrato protéico e análise em gel de SDS-PAGE sob condições desnaturantes. Paralelamente foram utilizadas culturas-controles (pPICZA e pPICZ*AlacZ* /GS115) (Figura 35). Os clones de expressão extracelular tiveram seus sobrenadantes analisados, também em SDS-PAGE desnaturante (dados não mostrados). Para estes, o controle utilizado foi a GS115/ pPICZ α HSA, a qual secreta a albumina sérica humana (Figura 36).

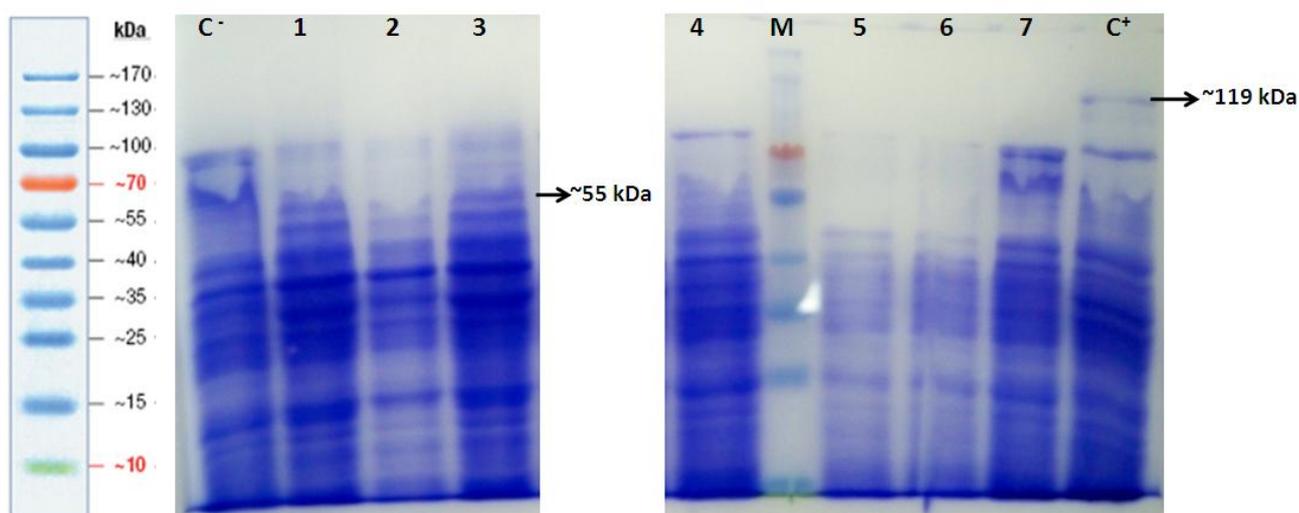


Figura 35. Eletroforese em gel SDS-PAGE 12.5%: material proveniente do extrato protéico solúvel dos recombinantes de *P. pastoris* após 120 horas de indução com metanol a 2%: **1 a 7** - alíquotas do extrato protéico correspondentes aos transformantes induzidos, onde é possível visualizar bandas de aproximadamente 55 kDa referentes à proteína L1 fusionada a cauda de poli-histidina nos poços 1, 2 e 3; **C⁻** - linhagem de *P. pastoris* X-33 transformada com o vetor pPICZA sem o inserto L1 (controle negativo), na qual não evidencia-se a banda de 55 kDa; **C⁺** - linhagem GS115 transformada com a construção pPICZ*AlacZ* (controle positivo), onde observa-se uma banda de aproximadamente 119 kDa referente à proteína β -galactosidase; **M** – Marcador PageRulerTM (Fermentas).

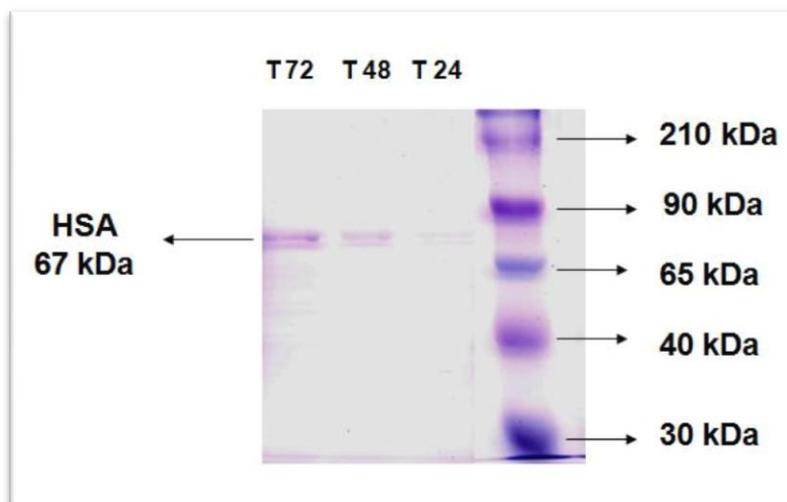


Figura 36. Eletroforese em gel SDS-PAGE 12.5%: material proveniente do sobrenadante bruto de recombinante de *P. pastoris* após 24, 48 e 72 horas de indução com metanol a 2%: É possível visualizar a banda da proteína presente no meio extracelular, de aproximadamente 67 kDa referentes à proteína HSA fusionada a cauda de poli-histidina. A amostra caracteriza o controle positivo de expressão extracelular no ensaio de SDS-PAGE. A linhagem GS115 da levedura foi transformada com a construção pPICZαHSA, Marcador ColorBurst™ (Invitrogen).

B. Screening da expressão extracelular de clones pPICZαL1B2

Devido a obtenção de muitos clones pPICZαL1B2, realizou-se um ensaio em pequena escala, por meio de indução em *deep-well*, para verificar e selecionar aqueles de expressão extracelular mais pronunciada (Figura 37).

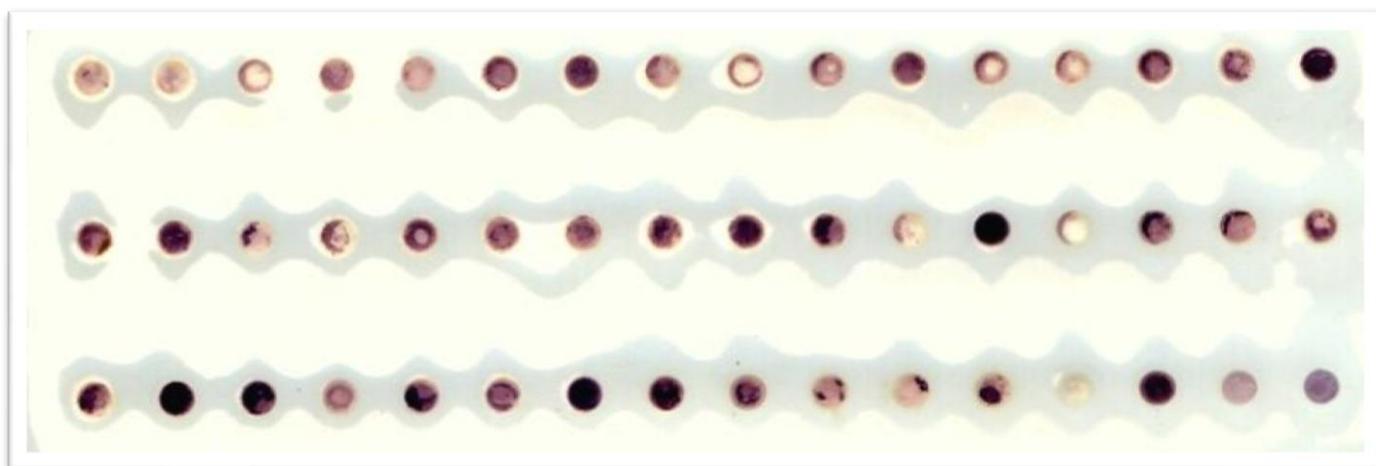


Figura 37. Dot blot usando anti-HIS (1:10000) conjugado à fosfatase alcalina, com 100µL do sobrenadante de 48 clones pPICZαL1B2 induzidos durante 72 horas com metanol 1%; Destaque para sinais mais intensos, indicando clones com maior poder de expressão recombinante;

C. Ensaio imunológico *dot blotting* com anti-HIS (1:10000) conjugado à fosfatase alcalina a partir de amostras coletadas após 120 horas

Selecionado o clone de expressão extracelular, foi feita uma indução em maior escala em frascos com 100ml de cultura. Paralelamente, foi realizada a indução com os clones de expressão intracelular, nas mesmas condições. Sendo assim, a partir do experimento de indução, obteve-se amostras de proteína das vias intracelular (extrato proteico de lise celular) e extracelular (sobrenadante liofilizado). Uma vez dosadas, as amostras foram submetidas ao ensaio imunológico com anticorpo específico para a cauda de histidina, marca presente apenas na proteína L1 recombinante (Figura 38).

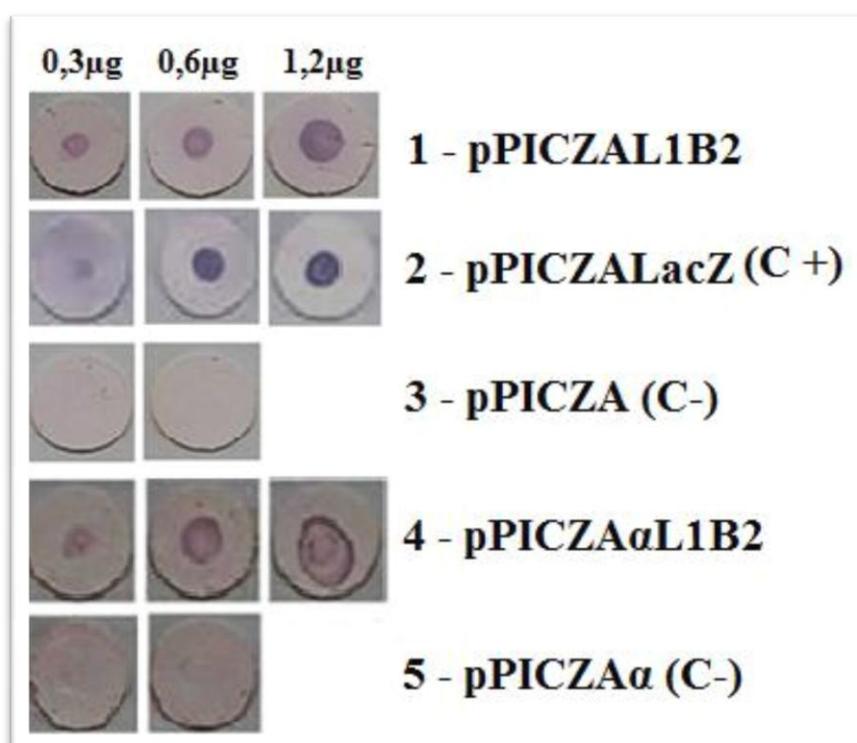


Figura 38. *Dot blot* com anticorpo anti-His conjugado à fosfatase alcalina (1:10000), com (1) - amostra de extrato protéico recuperado da lise celular de um clone de *P. pastoris* transformado com o vetor de expressão pPICZAL1B2, com dosagem protéica média (Bradford) de 5µg/µL; (2) - extrato protéico de clone portador da construção pPICZALacZ, com dosagem de 4,5µg/µL (controle negativo da expressão intracelular); (3) - clone transformado com vetor pPICZALacZ, com dosagem de cerca de 7µg/µL (controle positivo de expressão intracelular); (4) - amostra proveniente de meio de cultura concentrado por liofilização (de 50 ml para 5mL) de um clone de *P. pastoris* transformado com o vetor de expressão pPICZAαL1B2 (dosagem protéica média de 7µg/µL); (5) - sobrenadante liofilizado de um clone pPICZA (dosagem protéica média de 5,5µg/µL) (controle negativo de expressão extracelular); Todos os clones foram induzidos a 30°C, com metanol a 2%, durante 120 horas;

E. Aperfeiçoamento da indução e recuperação de proteínas extracelulares do sobrenadante

Em busca de uma otimização das condições de crescimento e indução, por haver suspeita de perdas protéicas por meio de proteólise no momento da secreção, um novo ensaio de fermentação em frascos de cultura foi realizado, com a única diferença, em relação aos cultivos anteriores, na temperatura de indução, ocorrendo a 22 - 23°C. A partir dessas amostras, foi possível uma dosagem protéica, pelo método de Bradford, estimada em 1,5µg/µL, em média. O ensaio dot blotting apresentou reações específicas quanto à presença da proteína L1 recombinante (Figura 39.), de acordo com os resultados anteriores.



Figura 39. Dot blot usando anti-HIS (1;10000) conjugado à fosfatase alcalina, com 100µL do sobrenadante bruto coletado por centrifugação após indução por 72 horas, com metanol a 1% e temperatura constante de 23°C. Poço 1 – pPICZAα (controle negativo); Poços 2 ao 6 - pPICZAαL1B2;

Alternativamente ao processo de liofilização, realizou-se, nas amostras obtidas de culturas direcionadas à expressão extracelular, o método de concentração protéica por meio de precipitação com acetona gelada, a partir do sobrenadante. O dot blotting apresentou, mais uma vez, reações específicas, evidenciado a expressão da proteína L1 recombinante (Figura 40.).

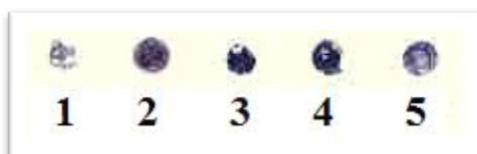


Figura 40. Dot blot usando anti-HIS (1;10000) conjugado à fosfatase alcalina, com 50µL do concentrado protéico, (3mL do sobrenadante precipitado com acetona gelada e ressuspendido em 400µL de tampão fosfato) aplicados sobre membrana de nitrocelulose; Poço 1 – pPICZAα (controle negativo); Poços 2 ao 5 - pPICZAαL1B2 induzidos durante 72 horas, a 23°C, com metanol 1%;

6. DISCUSSÃO

O papilomavírus bovino (BPV), por sua vez, representa um grave problema econômico do ponto de vista pecuário. Segundo a Associação de Criadores de Pernambuco, cerca de 30% do plantel em algumas propriedades apresenta algum tipo de papilomatose evidente. Nos bovinos, são mais comuns papilomatoses cutânea e nas mucosas genital e orofaríngea, não havendo diferença na prevalência da patologia entre os sexos ou entre raças, sendo mais freqüente em animais com menos de dois anos de idade (Corrêa & Corrêa, 1992).

Em vista disso, uma das opções mais promissoras é a vacinação, aproveitando a proteína L1, que forma o capsídeo viral, no objetivo de produzir *virus-like particles* (partículas semelhantes a vírus ou VLPs), que se formam espontaneamente após a expressão de L1 em sistema heterólogo.

Categorizada nos últimos anos como um sistema heterólogo eficiente e de baixo custo, a levedura metilotrófica *Pichia pastoris* tem assumido um papel de destaque na Biotecnologia no que se refere à produção de altos níveis de proteínas. O sistema de expressão baseado nesta levedura contorna várias das dificuldades encontradas em outros sistemas, a depender da relação custo/eficiência envolvido na produção da proteína recombinante (Wurm & Bernard, 1999; Schatzmayr, 2001; Morton & Potter, 2000).

Vetores de clonagem e expressão na levedura *Pichia pastoris* estão bem estabelecidos e disponíveis comercialmente. Estes vetores têm sido utilizados com sucesso para produção de diferentes tipos de proteínas heterólogas (Sudbery, 1996), no entanto, ainda são muito escassas as informações sobre a expressão de genes de BPV em *P. pastoris*, principalmente, quanto às diferentes modalidades de expressão e em como alguns parâmetros podem influenciar a praticidade e o rendimento neste sistema para as proteínas dos papilomavírus. Neste trabalho, foi usado como base o sistema de expressão em células da levedura *P. pastoris* para expressar a proteína L1 de BPV-2 através de vetores da linha pPICZ (Invitrogen); sendo testados anteriormente com o gene L1 do BPV-4 (Souza, 2007 dados não publicados) e por Coimbra et al, 2007 com o gene L1 do HPV-16. Estes vetores utilizam o promotor AOX1 para a expressão recombinante. O presente trabalho optou por montar dois vetores de expressão pPICZA

e pPICZA α com o gene L1 do BPV 2, criando, desta forma, construções estáveis, mas diferentes quanto as vias de expressão empregadas na produção da proteína L1.

A escolha do promotor AOX1 como “chave” para a expressão heteróloga do gene L1 de BPV-2 condiz com uma vasta literatura científica que cita esse promotor como o de maior sucesso para expressão heteróloga em *P. pastoris* (Cereghino 2001a). As vantagens e desvantagens do uso do promotor AOX1 estão sumarizadas no **Quadro 11**. Apesar da possibilidade de uso de um promotor constitutivo (GAP), já foram relatados indícios de que a expressão constitutiva de genes heterólogos em *P. pastoris* tem estado acompanhada de efeitos citotóxicos mais evidentes (Menendez et al. 2004).

Vantagens	Desvantagens
A transcrição de proteínas heterólogas é fortemente controlada por um mecanismo de repressão/ desrepressão	O monitoramento dos níveis de metanol durante a indução é um problema freqüente, devido a imprecisão de sondas
Altos níveis de proteína heteróloga podem ser obtidos, ainda que a mesma seja tóxica à célula	Metanol é um produto inflamável, de modo que, para a indústria, não é uma característica desejável à produção
A repressão da transcrição do gene heterólogo por uma fonte inicial de carbono assegura a obtenção de um bom crescimento celular antes da sobrecarga de expressão do gene	Metanol é principalmente derivado de uma fonte petroquímica, cujo envolvimento em produção de alimentos ou insumos médicos é evitado quando possível
A indução da transcrição é prontamente alcançada pela adição de metanol ao meio de cultura	Duas fontes de carbono são necessárias, uma vez que o processo é dividido em duas etapas (crescimento/ indução), havendo necessidade de troca dos meios de cultura em um ponto específico

Quadro 11. Vantagens e desvantagens do uso do promotor AOX1 para expressão heteróloga; Adaptado de Macauley-Patrick, 2005;

Por eletroporação de leveduras *P. pastoris*, obteve-se clones estáveis para as construções pPICZAL1B2 ou pPICZA α L1B2, ambos identificados por sua resistência ao antibiótico zeocina (marca de seleção) e integração do cassete de expressão (PCR de colônia).

A literatura descreve três fenótipos possíveis, ao se transformar a levedura *P. pastoris*, no que se refere à utilização de metanol como indutor ao sistema de expressão

recombinante. O fenótipo Mut⁺ (*methanol utilization plus*) apresenta o promotor AOX1 funcional, já citado como um promotor forte, permitindo taxas de crescimento em metanol similares às observadas em linhagens selvagens da levedura (Cregg & Cereghino, 2000). No fenótipo Mut^S, há uma ruptura do promotor AOX1, por ocasião da integração do cassete de expressão durante a transformação, tornando as leveduras desta linhagem dependentes do promotor AOX2, notadamente menos eficiente na expressão das álcool oxidases, do que o promotor AOX1 (Yo et al., 2002). Como consequência, a taxa de crescimento dessas leveduras por aproveitamento do metanol é lenta. O terceiro fenótipo é descrito como Mut⁻, o que significa que, para esses fenótipos, ambos os promotores AOX1 e AOX2 não são funcionais, o que torna essas leveduras inaptas a crescerem em meios cuja única fonte de carbono seja o metanol.

Segundo Macauley-Patrick e colaboradores (2005), a transformação de linhagens X-33 de *P. pastoris* (genótipo selvagem e fenótipo Mut⁺) com vetores linearizados no promotor *AOX1* gera transformantes Mut⁺. Baseado nisso e de acordo com o padrão de bandas resultantes da amplificação por PCR de colônia dos recombinantes, utilizando *primers* (oligonucleotídeos iniciadores) para o gene *AOX1* (Figura 32.), foi indicada a integração do cassete de expressão pPICZAL1B2 ou pPICZAαL1B2 ao genoma das leveduras, evento este que ocorreu por inserção em um único evento de *crossover* na região homóloga do locus *AOX1*. Esse evento, a depender da construção utilizada, gerou dois fenótipos distintos: um capaz de produzir a proteína recombinante L1-BPV-2 e mantê-la no meio intracelular, e outro, capaz de produzir a mesma proteína recombinante fusionada ao fator prepro alfa, sinalizando sua secreção. Ambos os clones obtidos possuem fenótipo Mut⁺, o que indica plena capacidade de alcançar altas taxas de crescimento em meio contendo metanol.

O fenótipo Mut⁺ é desejável para a expressão de algumas proteínas recombinantes, uma vez que possibilita a obtenção de biomassa considerável, incrementando a produção heteróloga (Hohenblum et al., 2004, Slibinskas, et al., 2004). Entretanto, alguns pesquisadores têm reportado a possibilidade de que o fenótipo Mut⁺ apresente uma desvantagem no que se refere a longos períodos de indução, pois, um rápido acréscimo de biomassa é acompanhado por uma taxa de morte celular elevada por produção excessiva de subprodutos do metabolismo tóxicos à levedura. Esse evento, refletindo estresse celular, seria prejudicial à expressão heteróloga, o que justificaria a preferência ao fenótipo Mut^S, de crescimento mais lento e com produção de

subprodutos tóxicos menos evidente, para algumas proteínas recombinantes (Aoki et al., 2003, McKinney et al., 2004, Paramsivam et al., 2002).

Além dos fenótipos, outro aspecto a se considerar por ocasião da transformação e em como isso pode ter influenciado os níveis protéicos obtidos neste trabalho é o evento de integração dos cassetes pPICZAL1B2 ou pPICZA α L1B2 ao genoma da levedura. A integração de múltiplas cópias do gene heterólogo pode ser utilizada para otimização da expressão. Esse efeito, denominado dosagem gênica, entretanto, é um tanto controverso à respeito dos níveis de expressão relatados para diferentes proteínas heterólogas.

De modo geral, acredita-se que um aumento significativo no número de cópias do gene heterólogo integrado ao genoma do hospedeiro resultará num aumento apreciável nos níveis de produção da respectiva proteína (Clare et al., 1991; Romanos, 1995; Vassileva et al., 2001). É sugerido que, para *Pichia pastoris*, os fatores limitantes para o rendimento de um sistema com múltiplas cópias integradas seriam eventos pós-traducionais, como o dobramento protéico no retículo endoplasmático e processamento de sinal (Hohemblum et al., 2004). Entretanto, vários trabalhos relatam níveis elevados de produção a partir da utilização de cópias únicas do cassete de expressão, enquanto o aumento deliberado do número de cópias não apresentou efeito significativo.

Hohemblum (2004), trabalhando com o gene do tripsinogênio humano, sob controle do promotor GAP, não observou aumento na expressão deste gene quando a dosagem deste aumentava de 1 para 3 cópias, mas, ao usar o promotor AOX, os níveis de expressão aumentaram consideravelmente com o aumento de 1 para 2 cópias do gene. Os níveis de expressão, no entanto, caíram ao se elevar ainda mais o número de cópias. Kotzé (2007) relatou que o aumento no número de cópias do gene L1 de HPV 16 para 4 não proporcionou melhor rendimento da expressão heteróloga em *P. pastoris* quando comparado com cópia única. Já Clare *et al* (1991) analisou o efeito da dosagem gênica e do fenótipo de utilização do metanol, e afirmou que o rendimento da produção somente apresentou diferenças significativas quando utilizou-se 9 cópias do gene heterólogo em clones Mut^s. Outras publicações sugerem que o aumento no número de cópias resultou em níveis de produção que excediam os limites do processamento das proteínas, induzindo uma resposta apoptótica e conseqüente morte celular (Hu *et al.*, 2006).

Uma vez estabelecidos clones pPICZAL1B2 e clones pPICZA α L1B2, foi montado e executado um primeiro experimento de fermentação com objetivo de

produzir a proteína L1 recombinante conforme a via de expressão da levedura transformada.

Uma vez obtidos transformantes estáveis contendo os cassetes de expressão pPICZAL1B2 ou pPICZA α L1B2 integrados, foi realizado um cultivo para experimentação da indução, com níveis de metanol a 1% por períodos não superiores a 120 horas. Apesar de, num primeiro momento, ambos os transformantes serem submetidos às mesmas condições de cultivo, ao longo dos experimentos de indução, percebeu-se que algumas particularidades poderiam influenciar na expressão, a depender da via escolhida, intracelular ou extracelular.

As análises por RT-PCR confirmaram a transcrição ativa, do gene recombinante, pela maquinaria celular da levedura (Figura 34.). Entretanto, a produção confirmada de RNAm referente ao gene L1 pode não ser o indicativo determinante de sua correta expressão, uma vez que poderiam ocorrer alguns eventos que inviabilizariam a tradução plena e contínua do transcrito, como o término precoce da transcrição. Essa possibilidade contribuiria com os baixos níveis de expressão observados para a proteína L1 neste experimento de fermentação em frascos, se comparados com níveis relatados na literatura para outras proteínas recombinantes produzidas sob condições similares em *P. pastoris* (Boettner et al. 2002, Slibinskas et al, 2004, Li et al. 2009). A transcrição de genes em levedura pode ser finalizada se o DNA apresentar alta proporção de regiões A-T, pois essas regiões sinalizam como sítios de poliadenilação, que promovem a terminação precoce da transcrição no hospedeiro, gerando RNAm truncado (Scorer et al. 1993, Romanos *et al* 1995). Alguns autores sugerem que a síntese de genes otimizados, através da qual as regiões ricas em A-T são substituídas nos genes heterólogos, proporcionam um aumento nos níveis de expressão em *P. pastoris* (Sinclair & Choy, 2002; Li *et al.*, 2003; Gurkan & Ellar, 2005; Boettner *et al.*, 2007). Os *primers* (oligonucleotídeos iniciadores) utilizados no ensaio de RT-PCR são complementares a regiões internas ao gene L1, amplificando uma região de apenas 500 pb, de modo que, apenas com esse resultado, não seria possível descartar a possibilidade de término precoce da transcrição ou outro evento sobre o transcrito que prejudicasse a produção.

Os dados obtidos a partir das análises *in silico* da composição nucleotídica demonstram que a sequência L1 de BPV 2 possui um conteúdo G-C relativamente baixo (42,64%) em vista de seu conteúdo A-T (57,36%). Muito embora os resultados obtidos nos ensaios de *dot blotting* indiquem a produção de L1 na sua integridade, a elevada proporção de bases A-T no gene L1 pode estar comprometendo a transcrição do gene

heterólogo pelo hospedeiro. Essa hipótese está de acordo com o que é proposto no trabalho de Kotzé (2007), no qual se empregou um gene L1 sintético de HPV 16, com conteúdo G-C igual a 62%, e obteve níveis de produção da proteína heteróloga significativamente maiores em *P. pastoris* quando comparados a outros genes não otimizados. Resultados semelhantes também foram alcançados por Li *et al* (2003). Sreekrishna *et al* (1997) afirmam que o emprego de genes nos quais o conteúdo A-T está em uma faixa entre 30-55% da composição gênica representa uma estratégia capaz de potencializar os níveis de expressão em *P. pastoris*.

A eletroforese em gel SDS-PAGE de amostras da extração protéica total das células (via intracelular) após a indução evidenciou a presença sugestiva da proteína L1 (55-58 kDa) em pelo menos 3 das 7 culturas recombinantes avaliadas (Figura 35.). O controle negativo indicou que, mesmo para a linhagem transformada apenas com o vetor pPICZA sem o inserto L1 e induzida sob as mesmas condições, não foi possível a visualização da banda em questão. Já o controle positivo, cujo extrato protéico provém de leveduras *P. pastoris*, linhagem GS115 e transformadas com o vetor de expressão pPICZ, contendo o gene *lacZ*, evidencia a capacidade do sistema de expressar níveis detectáveis de proteína recombinante.

O SDS-PAGE com as amostras de sobrenadante bruto proveniente da expressão extracelular de L1 de BPV-2, contudo, não apresentaram concentração protéica suficiente para visualização por método *Comassie-Blue* (resultado omitido), apesar do controle positivo realizado com *P. pastoris*, linhagem GS115, transformada com pPICZA α HSA ter evidenciado bandas correspondentes à albumina sérica humana recombinante demonstrando a funcionalidade do sistema de expressão (Figura 36.). Uma confirmação mais precisa acerca da expressão, somente foi possível após os resultados posteriores por *dot blotting* (Figuras 38., 39. e 40.), no qual foi utilizado anticorpos anti-His, cujo antígeno é a cauda de poli-histidina fusionada à extremidade C-terminal da proteína recombinante. Portanto, os ensaios imunológicos verificaram a expressão da proteína em sua integridade, seja para o fenótipo de expressão intracelular, seja para o fenótipo de expressão extracelular.

De acordo com os resultados descritos neste trabalho, a linhagem X-33 de *P. pastoris*, transformada com o cassete de expressão pPICZAL1B2, bem como aquela transformada com o cassete pPICZA α L1B2, demonstrou-se capaz de produzir a proteína L1 de BPV 2 após indução com metanol. Isto representa uma etapa fundamental para a implantação de uma estratégia vacinal contra infecções por

papilomavírus. Nas condições de cultivo previamente citadas, foi possível obter uma produção média de proteína total de 5µg/µL (para a via intracelular, extrato total de lise celular de 50mL de cultura) e 7µg/µL (para a via extracelular, de 50 mL de sobrenadante liofilizado), reagentes ao anticorpo anti-HIS (6XHIS), conforme avaliado em ensaio *dot blotting*.

Para alguns tipos de proteínas, a expressão heteróloga intracelular é recomendável, considerando-se a manutenção da estrutura e/ou atividade do produto (Maresova *et al.* 2010). Outra situação em que é preferível a expressão intracelular é a pesquisa de moléculas cuja atividade relaciona-se a eventos citoplasmáticos, como no estudo realizado por Doyle e colegas em 2009, onde puderam verificar a redução da citotoxicidade do 15-acetildioxinivalenol em leveduras por ocasião da expressão heteróloga de anticorpos intracelulares. Diferentemente, as leveduras transformadas com a construção pPICZAαL1B2 tornaram-se aptas exportar a proteína L1, simplificando as etapas de purificação e recuperação. Torna-se ainda mais desejável esta via, devido ao fato de poucas proteínas nativas da levedura serem secretadas, o que facilita o reconhecimento da proteína heteróloga. Principalmente para produtos de uso vacinal, a expressão pela via extracelular pode ser preferível por minimizar consideravelmente a presença de contaminantes por ocasião da purificação (Ebrahimi *et al.* 2010).

Para novas análises da expressão da proteína L1, tanto a obtida pela via intracelular como pela via extracelular, as amostras positivas nos ensaios de *dot blotting* foram submetidas a ensaio de *western blotting*, utilizando os mesmos anticorpos. Entretanto, não foi possível a identificação da proteína por essa metodologia. Essa ausência de sinal apropriado no *western blotting* pode ser atribuída a perdas protéicas por manipulação das amostras ou mesmo aos baixos níveis de expressão do sistema, ainda carente de otimizações para a produção desta proteína.

As proteínas de papilomavírus derivadas de sistemas de expressão heterólogos merecem ainda atenção especial para sua recuperação após a indução. Alguns autores relataram a formação de agregados dos pentâmeros de L1 de HPV, sob a forma de VLPs, quando em contato com superfícies de membranas ou submetidas a procedimentos de diálise, além de afinidade a superfícies de prolipropileno e vidro (Shi *et al.*, 2005). Seria possível ainda que uma parte substancial da produção total da proteína L1 de BPV-2 esteja sendo perdida em meio aos restos celulares, retida em membranas, devido ao seu caráter hidrofóbico, como relatado em trabalhos anteriores

de Kotzé e colaboradores em 2007, que a proteína L1 de HPV-16 apresenta afinidade por sistemas de membranas lipídicas citoplasmáticas, prejudicando sua recuperação. A utilização de surfactantes não iônicos nas soluções aquosas de VLPs, tanto quanto a aplicação de protocolos para desmontagem e remontagem dessas partículas (Mach *et al.*, 2006) evitam a agregação e conseqüente perda de material. Até mesmo o processamento para extração do conteúdo protéico das células por meio de lise mecânica com pérolas de vidro pode promover a degradação protéica e representa um ponto plausível de perda de material.

Em relação à seqüência do gene L1 de BPV 2 é possível que ela contenha regiões inibitórias (ou códons raros) capazes de reduzir a expressão do gene heterólogo em *P. pastoris*. A substituição de códons raros no gene heterólogo para a tradução nesta levedura pode aumentar significativamente seus níveis de expressão. Teng *et al* (2007) e Outchkourov *et al* (2002) demonstraram resultados surpreendentes ao relatarem um aumento de 10 e 20 vezes, respectivamente, em comparação com a expressão de gene selvagem em *P. pastoris*, através da otimização dos códons. De acordo com as análises *in silico* feitas a partir da seqüência L1 de BPV 2 depositada no *GenBank*, existe uma diferença em torno de 12% entre o *codon usage* do gene L1 e da levedura *P. pastoris* (Anexo III). Em outras palavras, aproximadamente 12% dos códons presentes no gene heterólogo são raramente utilizados pelo hospedeiro em questão. É coerente, então, destacar que os baixos níveis de expressão, tanto para a via intracelular como para a via extracelular, podem ser conseqüência, também, dessa diferença na utilização de códons.

Além dos aspectos genéticos, as condições de cultivo parecem ser particularmente mais críticas para a via extracelular de expressão em *P. pastoris*, onde a proteína recombinante é sujeita às variantes no meio de cultura diferentes daquelas às quais estaria submetida no meio intracelular. Para ambas as vias utilizadas, vários parâmetros podem ser otimizados, como temperatura, pH, aeração entre outros. Alguns parâmetros são comumente danosos a ambas as vias como, a concentração de metanol disponível no meio de indução, o qual pode afetar negativamente as taxas de transcrição do gene heterólogo (Cereghino, 2002). Alguns dos produtos da degradação intracelular do metanol são tóxicos à célula e, quando em excesso, pode conduzi-la à morte. Paralelamente, como o metabolismo do metanol requer altos níveis de oxigênio, a expressão de genes regulados pelo promotor *AOX1* é prejudicada pela limitação de oxigênio (Gelissen *et al.* 2005). A utilização de frascos aletados, capazes de

potencializar a circunvolução do cultivo foi uma das melhorias implementadas neste trabalho para corrigir de forma pontual a questão da aeração.

É de grande importância uma atenção a mais ao se lidar com expressão extracelular, principalmente no que diz respeito à utilização de meios de cultura. Os meios de cultura para crescimento de altas densidades celulares e indução de expressão recombinante para linhagens *P. pastoris* são, praticamente, inalterados desde aqueles descritos pela Companhia Philips de Petróleo em 1970, para o ganho de massa celular para obtenção de proteína. Apesar de sua aplicação ter alcançado resultados razoáveis para a maioria das proteínas recombinantes, a turbidez e precipitação ocasionada pela concentração salina costumam prejudicar a mensuração de densidade (Cereghino, 2002).

Brady e colegas (2001) relataram que substâncias semelhantes a lipídios eram formadas no sobrenadante obtido após experimentos de fermentação, nos quais se utilizou a concentração salina recomendada no preparo convencional do meio de cultura. Esse lipídeo foi apontado como a causa principal de problemas durante o processamento do sobrenadante, além de induzir a agregação de proteínas recombinantes secretadas. O estudo de Brady demonstrou que reduzir a concentração de sais no meio de cultura (para pelo menos ¼ do recomendado pelo protocolo de crescimento de *P. pastoris*, além de diminuir a interferência em análises de densidade celular da cultura, reduz ou mesmo elimina a formação dessas substâncias, que dificultam a purificação de proteínas secretadas. Em nossos experimentos de crescimento e indução, a concentração de sais no meio de cultura foi representada principalmente pelo sulfato de amônio (1%) presente na solução de YNB (*Yeast Nitrogen Base*) e pelo tampão fosfato de potássio (solução K_2HPO_4/KH_2PO_4 100mM). Foi observado que o sobrenadante recuperado por centrifugação dos cultivos de expressão extracelular, realmente apresentaram alguma substância lipídica decantada irregular, apontada como provável responsável por perdas de proteína recombinante e resultados anômalos e indeterminados nos ensaios de eletroforese SDS-PAGE para essas amostras.

Outra explicação para o baixo rendimento da proteína L1 secretada, em *P. pastoris*, vinculada às condições do meio de cultura, poderia ser a retenção intracelular do produto da expressão heteróloga. Em seus estudos com expressão extracelular de tripsinogênio em *P. pastoris*, Hohenblum e colegas (2004), utilizando o promotor GAP (constitutivo), realizaram experimentos de cultura em glicose e em metanol, como

fontes de carbono, e verificaram que em ambas, após lise das células transformadas, foram detectadas frações substanciais da proteína recombinante em forma insolúvel retida no meio intracelular. Entretanto, somente, nas culturas submetidas ao crescimento alimentado por glicose, foi possível a obtenção de tripsinogênio recombinante solúvel no sobrenadante. Seus achados indicam que, apesar da presença do fator α de secreção, a fonte de carbono utilizada é um determinante para a correta expressão extracelular da proteína heteróloga.

Por fim, outra questão pertinente a expressão heteróloga em *P. pastoris*, principalmente para a expressão extracelular, é o controle de proteólise do produto heterólogo. De maneira geral, proteínas recombinantes secretadas apresentam o potencial de serem proteoliticamente degradadas em meio de cultura por proteases extracelulares, proteases ligadas a células (Kang et al. 2000) e/ou por proteases intracelulares de células lisadas durante o crescimento e indução. Entretanto, para *P. pastoris*, não há registro documentado de proteases extracelulares, além de, como já foi relatado, apenas baixos níveis de proteínas endógenas são secretadas por esta levedura (Cregg & Cereghino, 2000; Jahic, 2003).

Algumas estratégias de cultivo visam o controle de proteólise e algumas delas puderam ser aplicadas em nossos ensaios de expressão extracelular da proteína L1 em *P. pastoris*. A estabilidade de um produto heterólogo pode ser aumentada pela adição de suplementos ricos em aminoácidos (casamina, peptona) ao meio de cultura, por agirem como substratos alternativos e competitivos às proteases (Werten et al. 1999). Nos ensaios de cultivo apresentados neste trabalho, só foram obtidos crescimento celular e níveis de expressão viáveis com uso de meios de cultura complexos, acrescidos de extrato de levedura e peptona. Reduzir a temperatura na qual se desenvolve a indução é outra estratégia recomendada para aumentar o rendimento de proteínas recombinantes secretadas. Li e colaboradores (2001) demonstraram, ao diminuir a temperatura de cultivo (de 30°C para 23°C), um aumento no rendimento de proteínas anticongelantes do arenque, bem como em sua viabilidade. Seguindo os relatos de outros autores (Hong et al., 2002; Jahic, 2003) que verificaram um aumento considerável em seus níveis de expressão extracelular, novos experimentos de crescimento e indução foram realizados com as colônias transformadas com a construção pPICZA α L1B2, submetidas então à indução a uma temperatura controlada de 23°C, a partir das quais o sobrenadante forneceu resultados positivos em *dot blotting*, conforme visto nas Figuras 39 e 40.

Muito embora a expressão de proteínas heterólogas em *P. pastoris* possa ser realizada com sucesso em frascos, é inquestionável que os níveis de produção são maiores com a utilização de fermentadores, nos quais é possível o controle fino de parâmetros acima discutidos (Cereghino, 2002).

7. CONCLUSÃO

A construção e avaliação dos vetores de expressão pPICZAL1B2 e pPICZA α L1B2 forneceram resultados que indicaram sucesso na produção da proteína L1 de BPV-2 em células da levedura *Pichia pastoris*. Conforme todos os achados aqui descritos, desde as etapas de clonagem até a expressão induzida dos clones da levedura, de acordo com suas vias intra- ou extracelular, a produção da proteína L1 pôde ser detectada. As observações de expressão da proteína L1, seja pela via intracelular, seja pela via extracelular, fornecem subsídios técnicos da utilização da levedura *P. pastoris* como uma sistema de expressão heteróloga interessante para a produção de proteínas dos mais diversos tipos de papilomavírus, conforme a necessidade vacinal desejada.

No que diz respeito à comparação entre as vias de expressão, muito ainda precisa ser estudado e é de grande importância se considerar de que maneira a escolha da via afeta o produto recombinante. Ambos os fenótipos obtidos para a levedura demonstraram-se como meios alternativos de um sistema viável e potencialmente promissor para futuras aplicações na biotecnologia de produção de proteínas recombinantes de papilomavírus. É inegável que a praticidade metodológica de recuperação/purificação da proteína L1 a partir da via extracelular do sistema, se apresenta não apenas como uma possibilidade, mas como uma alternativa desejável para um produto cuja produção está destinada a insumos vacinais. Entretanto, um conjunto de parâmetros, dos quais se aponta as condições de cultivo, a sequência do gene heterólogo e os métodos de recuperação, ainda carecem de otimizações que devem contribuir para melhores rendimentos de expressão.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANTONSSON A., FORSLUND O., EKBERG H., STERNER G. & HANSSON B.G. 2000. The ubiquity and impressive genomic diversity of human nature of these viruses. *J. Virol.* 74 (24):11636-11641.

ANTONSSON A & HANSSON B.G. 2002. Healthy skin of many species harbors papillomaviruses which are closely related to their human counterparts. *J. Virol.* 76 (24):12537-12542.

AOKI, H., AHSAN, M. N., WATABE, S. “Heterologous expression in *Pichia pastoris* and single-step purification of a cysteine proteinase from northern shrimp”. *Prot Exp Pur* 31 (2), 213 – 221. 2003.

BAKER, T.S.; NEWCOMB, W.W.; OLSON, N.H., COWSERT, L.M.; OLSON, C.; BROWN, J.C.; Structures of bovine and human papillomaviruses. Analysis by cryoelectron microscopy and three-dimensional image reconstruction. *Biophys. J.* 60: 1445-1456. 1991.

BEDELL, M.A.; HUDSON, J.B.; GOLUB, T.R.; TURYK, M.E.; HOSKEN, M.; WILBANKS, G.B.; LAIMINS, L.A. Amplification of human papillomaviruses genomes in vitro is dependent on epithelial differentiation. *Journal of Virology.* V. 65, n. 5, p. 2254 – 2260. 1991.

BELNAP, D. M., OLSON, N. H., CLADEL, N. M., NEWCOMB, W. W., BROWN, J. C., KREIDER, J. W., CHRISTENSEN, N. D. & BAKER, T. S. (1996). Conserved features in papillomavirus and polyomavirus capsids. *Journal of Molecular Biology* **259**, 249±263.

BILLMAN-JACOB, H. “Expression in bacteria other than *Escherichia coli*”. *Curr Opin Biotechnol* 7, 500 – 504. 1996.

BOETTNER, M. et al. (2002). “High-throughput screening for expression of heterologous proteins in the yeast *Pichia pastoris*”. *Journal of Biotechnology* 99, 51 – 62. 2002.

BONTKES H. et al. Immune responses against human papillomavirus (HPV) type 16 virus-like particles in a cohort study of women with cervical intraepithelial neoplasia. II. Systemic but not local IgA responses correlate with clearance of HPV-16. *Journal of General Virology*, Vol 80, 409-417. 2005

BOSCH F. X.; LORINCZ A.; MUÑOZ N.; MEIJER C. J. L. M.; SHAH K.V. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *Journal of Clinical Pathology* v. 55, p. 244-265, 2002.

BORZACCHIELLO G., AMBROSIO V., GALATI P., PAGGIALI F., VENUTI A. & ROBERTO F. The pagetoid variant of urothelial carcinoma *in situ* of urinary bladder in a cow. *Vet. Pathol.* 38(1):113-116. 2001.

BLOCH, N.; BREEN, M.; SPRADBROW, P.B. Genomic sequences of bovine papillomaviruses in formalin-fixed sarcoids from Australian horses revealed by polymerase chain reaction. *Vet. Microbiol.*, Amsterdam, v.41, n.1-2, p.163-172, Jul. 1994.

BLOCH, N. et al. Identification of papillomavirus in scrapings from bovine warts by use of the polymerase chain reaction. *Vet. Res. Commum.*, Dordrecht, v.21, n.1, p.63-68, Jan. 1997.

BOUVARD, V.; MATLASHEWSKI, G.; GU, Z.M.; STOREY, A.; BANKS, L. The human papillomavirus type 16 E5 gene cooperates with the E7 gene to stimulate proliferation of primary cells and increases viral gene expression. *Virology*. v. 203, p. 73 – 80. 1994.

BRADFORD MM. (1976). Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72: 248-254.

BRADY CP, SHIMP RL, MILES AP, WHITMORE M, STOWERS AW: High-level production and purification of P30P2MSP119, an important vaccine antigen for malaria, expressed in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Protein Expr Purif* 2001, 23:468-475.

BRAVO, I.G.; CRUSIUS, K.; ALONSO, A. The E5 protein of human papillomavirus type 16 modulates composition and dynamics of membrane lipids in keratinocytes. *Archives of Virology*. v. 150, n. 2, p. 231 – 246. 2005

BREITBURD F, KIRNBAUER R, HUBBERT NL, NONNENMACHER B,. Immunization with virus like particles from cottontail rabbit papillomavirus (CRPV) can protect against experimental CRPV infection. *Journal of General Virology*. 1995 Jun; 69(6):3959–3963.

BROWN, T. A. “Clonagem Gênica e análise de DNA: uma Introdução”. Artmed 4 ed, 240p. 2003.

CAMPO, M. S. Vaccination against papillomavirus. *Can. Cells*, New York, v.3, n.11, p.421-426, Nov. 1991.

CAMPO, M.S. Infection by bovine papillomavirus and prospects for vaccination. *Trends Microbiol.*, Limerick, v.3, n.3, p.92-7, mar. 1995.

CAMPO, M.S. Review bovine papillomavirus and cancer. *Vet. J.*, London, v.154, n.3, p.175-188, Nov. 1997.

CAMPO, M.S.; JARRETT, W.F. Papillomavirus infection in cattle: viral and chemical cofactors in naturally occurring and experimentally induced tumours. *Ciba Found Symp.*, Chichester, n.120, p.117-135, 1986.

CAMPO, M.S.; JARRETT, W.F. Vaccination against cutaneous and mucosal papillomavirus in cattle. *Ciba Found Symp.*, Chichester, v.187, p.61-73, 1994.

CAMPO, M.S. et al. Association of bovine papillomavirus type 2 and bracken fern with bladder cancer in cattle. *Can. Res.*, Philadelphia, n.52, n.24, p.6898-6904, Dec. 1992.

CAMPO, M.S. et al. Experimental reproduction of the papilloma-carcinoma complex of the alimentary canal in cattle. *Carcinogenesis*, Oxford, v.15, n.8, p.1597-1601, Aug. 1994.

CAMPO, M.S. Animal models of papillomavirus pathogenesis. *Virus Res* 89:249-261, 2002

CARVALHO C., FREITAS A.C., BRUNNER O., GÓES L.G.B., CAVALCANTE A.Y., BEÇAK W. & SANTOS R.C.S. 2003. Bovine papillomavirus type 2 in reproductive tract and gametes of slaughtered bovine females. *Braz. J. Microbiol.* 34(1):82-84.

CEREGHINO, J.L.; CREGG, J.M. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiology* 24: 45-66. 2000

CEREGHINO GPL, CEREGHINO JL, SUNGA AJ, et al. 2001a. New selectable marker/auxotrophic host strain combinations for molecular genetic manipulation of *Pichia pastoris*. *Gene* 263(1-2): 159-169.

CHEN, X., GARCEA, R., GOLDBERG, I., CASINI, G. & HARRISON, S. C. (2000). Structure of small virus-like particles assembled from the L1 protein of human papillomavirus 16. *Mol. Cell*, 5, 557-567.

CHOO, K.B.; PAN, C.C.; HAN, S.H. Integration of human papillomavirus type 16 into cellular DNA of cervical carcinoma: preferential deletion of E2 gene and

invariable retention of long control region and the E6/E7 open reading frames. *Virology*. V. 161, p. 259 – 261, 1997.

CLARE JJ, RAYMENT FB, BALLANTYNE SP, SREERKRISHNA K, ROMANOS MA. 1991. High-level expression of tetanus toxin fragment C in *Pichia pastoris* strains containing multiple tandem integrations of the gene. *BioTechnology* **9**: 455–460

COIMBRA E.C., SOUZA H.M., LEITÃO M.C.G., SANTOS J.F., BEÇAK W., STOCCO dos SANTOS R.C., A. C. FREITAS A.C. Virus-Like Particles as a vaccinal strategy against tumors induced by papillomavirus infection. Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology A Méndez-Vilas 1ª Ed. 689-696

CORRÊA WM e CORRÊA CNM (1992) Enfermidades infecciosas dos mamíferos domésticos: Papilomatoses. Rio de Janeiro, Medsi, 843p. 2.ed.

DA SILVA, D.M.; EIBEN, G.L.; FAUSCH, S.C.; WAKABAYASHI, M.T.; RUDOLF, M.P.; VELDERS, M.P.; KAST, W.M. Cervical cancer vaccines: emerging concepts and developments. *J Cell Physiol*, 186, 169-182, 2001.

DALY, R.; HEARN, M.T.W. Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production. *J. Mol. Recognit.*18: 119–138, 2005.

DAVID M.K., PETER M.H., DIANE E.G., ROBERT A.L., MALCOLM A.M., BERNARD R. & STEPHEN E.S. 2001. Fields Virology. 4th ed. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia.

DAVIDSON JF. 1995. The origin of insights in chemical engineering: planned and unplanned research. *Chem Eng Sci* **50**(23):3661–3684.

DE VILLIERS E-M., FAUQUET C., BROKER T.R., BERNARD H.-U. & ZUR HAUSEN H. 2004. Classification of papillomaviruses. *Viol.* 324:17-27.

DOORBAR, J. *The papillomavirus life cycle. Journal of Clinical Virology*. V. 32, p. 7 – 15, 2005.

DOYLE PJ., SAEED H., HERMANS A., GLEDDIE SC., HUSSACK G., ARBABI-GHAHROUDI M., SEGUIN C., SAVARD ME., MACKENZIE CR., and HALL JC. Intracellular expression of a single domain antibody reduces cytotoxicity of 15-acetyldeoxynivalenol in yeast. *The Journal of Biological Chemistry* vol. 284, no. 50, pp. 35029–35039, 2009

DURÃO, J.F.C. et al. Aspectos anatomopatológicos e clínicos da hematúria enzoótica dos bovinos. *Rev. Port. Cienc. Vet.*, Lisboa, v.90, n.515, p.132-137, Jul./Set. 1995.

EBRAHIMI SM., TEBIANIAN M., TOGHYANI H., MEMARNEJADIAN A., ATTARAN HR. Cloning, expression and purification of the influenza A (H9N2) virus M2e antigen and truncated Mycobacterium tuberculosis HSP70 as a fusion protein in *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification* 70 (2010) 7–12

ELLIS, S. B. et al. “Isolation of alcohol oxidase and two other methanol regulatable genes from the yeast *Pichia pastoris*”. *Mol Cell Biol* 5, 1111 – 1121. 1985

FABER KN, HARDER W, AB G, VEENHUIS M. 1995. Review: methylotrophic yeasts as factories for the production of foreign proteins. *Yeast* 11: 1331–1344

FLIGGE C., SCHÄFER F., SELINKA H., SAPP C., and SAPP M. DNA-Induced Structural Changes in the Papillomavirus Capsid. *Journal of Virology*, August 2001, p. 7727-7731, Vol. 75, No. 16 0022-538X/01/\$04.00+0

GISSMANN L, OSEN W, MULLER M, JOCHMUS I. Therapeutic vaccines for human papillomaviruses. *Intervirology*.44:167-75. 2002

GELLISSEN, G. Heterologous protein production in methylotrophic yeasts. *Applied Microbiology and Biotechnology*. V. 54, p. 741-750, 2000

GELLISSEN, G. New yeast expression platforms based on methylotrophic *Hansenula polymorpha* and *Pichia pastoris* and on dimorphic *Arxula adenivorans* and *Yarrowia lipolytica* – A comparison. *FEMS Yeast Research* 5: 1079–1096 (2005)

GURCAN C, ELLAR D. Recombinant production of bacterial toxins and their derivatives in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Microbial Cell Factories* 2005; 4: 1–8

HARRO, C.D.; PANG, Y.S.; RODEN, R.D.S.; HILDESHEIM, A.; WANG, Z.; REYNOLDS, M.J.; MAST, T.C.; ROBINSON, R.; MURPHY, B.R.; KARRON, R.A.; DILLNER, J.; SCHILLER, J.T.; LOWY, D.R. Safety and immunogenicity trial in adult volunteers of human papillomavirus 16 L1 virus-like particle vaccine. *Journal of National Cancer Institute*. V. 93, n. 4, 2001.

HATAMA, S.; NOBUMOTO, K.; KANNO, T. Genomic and phylogenetic analysis of two novel bovine papillomaviruses, BPV-9 and BPV-10. *Journal of General Virology*, 89, 158–163. 2008.

HEDGE, R.S. The papillomavirus E2 proteins: structure, function and biology. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*. V. 31, p. 343 – 360, 2002.

HOHENBLUM, H. et al. “Effects of gene dosage, promoters, and substrates on unfolded protein stress of recombinant *Pichia pastoris*”. *Biotechnol Bioeng* 85(4), 367 – 375. 2004.

HONG F, MEINANDER NQ, JONSSON LJ. 2002. Fermentation strategies for improved heterologous expression of laccase in *Pichia pastoris*. *Biotechnol Bioeng* 79(4): 438–449.

HOPKINS, A. Bracken (*Pteridium aquilinum*): its distribution and animal health implications. *Br. Vet. J. Bailliere Tindall*, v.146, n.4, p.316-326, Jul./Aug. 1990.

HOPKINS, N.C.G. Aetiology of enzootic haematuria. *Vet. Rec.*, London., v.118, n.26, p.715-717, Jun. 1986.

HOWLEY, P. M.; LOWY, D. R. (2001). Papillomaviruses and their replication. In: Howley, P.M.; Knipe, D.M. (eds). *Fields virology*, 4 ed., vol. 2. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, p. 2197–2229.

INAN, M. & MEAGHER, M. M. (2001). “The effect of ethanol and acetate on protein expression”. *J Biosci Bioeng* 92, 337 – 341. 2001.

JAHIC M. 2003. Process Techniques for Production of Recombinant Proteins with *Pichia pastoris*. PhD Thesis, Department of Biotechnology, Royal Institute of Technology, S-10 691 Stockholm, Sweden; ISBN 91-7283-522-2.

JARRET, W.F. et al. Studies on vaccination against papillomaviruses: the immunity after infection and vaccination with bovine papillomaviruses of different types. *Vet. Rec.*, London, v.126, n.19, p.473-475, May 1990.

JARRETT, W.F. et al. Studies on vaccination against papillomaviruses: prophylactic and therapeutic vaccination with recombinant structural proteins. *Virol.*, New York, v.184, n.1, p.33-42, Sep. 1991.

KANG HA, CHOI ES, HONG WK, et al. 2000. Proteolytic stability of recombinant human serum albumin secreted in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol* 53: 575–582.

KIRNBAUER, R.; Booy, F.; Cheng, N.; Lowy, D.R.; Schiller, J.T. (1992). Papillomavirus L1major capsid protein selfassembles into virus-like particles that are highly immunogenic. *Proc Natl Acad Sci USA*, 89, 12180–12184.

KIRNBAUER, R.; Chandrachud, L.M.; O'Neil, B.W.; Wagner, E.R.; Grindlay, G.J.; Armstrong, A.; McGarvie, G.M.; Schiller, J.T.; Lowy, D.R.; Campo, M.S. (1996).

Virus-like particles of bovine papillomavirus type 4 in prophylactic and therapeutic immunization. *Virology*, 219, 37- 44.

KOTZÉ, L.. Development of *Pichia pastoris* as a production system for HPV16 L1 virus-like particles as component to a subunit vaccine. 2007. 87p. Dissertação (mestrado) – University of Stellenbosch. Stellenbosch, South Africa.

KOUTSKY L. A.; AULT, K. A.; WHEELER, C.M.; BROWN, D.R.; BAAR, E.; ALVAREZ, F.B.; CHIACCHIERINI, L.M.; JANSEN, K.U. A controlled trial of a human papillomavirus type 16 vaccine. *New England Journal of Medicine*, v. 347, n. 21, p. 1645 – 1651, 2002.

KOUTSKY, L.A.; GALLOWAY, D.A.; HOLMES, K.K. Epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Epidemiologic reviews* v. 10, p.122 – 163, 1988.

LANCASTER W.D. & OLSON C. 1982. Animal papillomaviruses. *Microbiol. Res.* 46 (2):191-207.

LECHMANN, M.; MURATA, K; SATOI, J.; VERGALLA J. 2001. Hepatitis C virus-like particles induce virus-specific humoral and cellular immune responses in mice. *Hepathology* Volume 34, Issue 2 , Pages 417 – 423

LI H., WANG D., XU A., LI S., JIN S., WU D. High level expression and purification of active recombinant human interleukin-8 in *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification* 68 (2009) 60–64

LI Z, XIONG F, LIN Q, *et al.* 2001. Low temperature increases the yield of biologically active herring antifreeze protein in *Pichia pastoris*. *Prot Exp Pur* 21(3): 438–445.

LOWY, D.R.; KIRNBAUER, R.; SCHILLER, J.T.; Genital human papillomavirus infection. *Proceedings of the National Academy of Science of United States of America*. V. 91, p. 2436 – 2440, 1994.

LUEKING A., HOLTZ C., GOTTHOLD C.,LEHRACH H., and CAHILL D. A System for Dual Protein Expression in *Pichia pastoris* and *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification* 20, 372–378 (2000) doi:10.1006/pep.2000.1317

MACAULEY-PATRICK, S.; FAZENDA, M.L.; MCNEIL, B.; HARVEY, L.M. Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. *Yeast* 22: 249–270, 2005.

MAKRIDES, S. C. “Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*”. *Microbiol Rev* 60, 512 – 538. 1996.

MARESOVA H., MARKOVA Z., VALESOVA R., SKLENAR J., KYSLIK P. Heterologous expression of leader-less pga gene in *Pichia pastoris*: intracellular production of prokaryotic enzyme. *BMC Biotechnology* 2010, **10**:7 doi:10.1186/1472-6750-10-7

MCCARROLL, L.; KING, L.A. “Stable insect cell cultures for recombinant protein production”. *Curr Opin Biotechnol* 8, 590 – 594, 1994.

MCKINNEY, J. et al. “Expression and purification of human tryptophan hydroxylase from *Escherichia coli* and *Pichia pastoris*”. *Protein Expr Purif* 33, 185 – 194. 2004.

MENENDEZ J, HERNANDEZ L, BANGUELA A, PAIS J. 2004. Functional production and secretion of the *Gluconoacetobacter diazotrophicus* fructose-releasing exo-levanase (LsdB) in *Pichia pastoris*. *Enz Microb Technol* **34**(5): 446–452

MIMS, C.A.; Virus immunity and pathogenesis. *Br. Med. Bull.* ed. 41:1-102, 1985

MODIS, Y.; TRUS, B.L.; HARRISON, S.C. Atomic model of the papillomavirus capsid. *The EMBO Journal* 21 (18): 4754-4762. 2002.

MONTESINO R., NIMTZ M., QUINTERO O., GARCIA R., FALCÓN V., CREMATA J., Characterization of the oligosaccharides assembled on *Pichia pastoris*–expressed recombinant aspartic protease. *Glycobiology* vol. 9, n. 10, p. 1037-1043, 1999.

MONTOR, W.R., SOGAYAR, M.C. “Insetos como biofábricas de proteínas humanas”. *Ciência Hoje* 33(196), 16 – 23, 2003.

MORTON, C. L. & POTTER, P. M. “Comparison of *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*, *Spodoptera frugiperda*, and COS7 cells for recombinant gene expression”. Application to a rabbit liver carboxylesterase, *Mol biotechnol* 16, 193 – 202. 2000.

MOURA, J.W. et al. Chromosome aberrations in cattle raised on bracken fern pasture. *Experientia*, Basel, v.44, n.9, p.785-788, Sep. 1988.

MULLER, et al. The Organization of the Core Proteins of the Yeast Spindle Pole Body. *Science Signaling*: 3341-3352 DOI: 10.1091/mbc.E05-03-0214. 2005

NADAL, S. R.; MANZIONE, C. R.; Vacinas contra o Papilomavirus humano / Vaccines against human Papillomavirus. *Rev. bras. colo-proctol*;26(3):337-340, jul.-set. 2006.

NARDELLI-HAEFLIGER, D.; WIRTHNER, D., SCHILLER, J.T.; LOWY, D.R.; HILDESHEIM, A.; PONCI, F.; DE GRANDI, P. *Journal of National Cancer Institute*, 95(15), 1128 (2003).

NICHOLLS, P.K.; STANLEY, M.A. The immunology of animal papillomaviruses. *Vet. Immun. Immunopathol.*, Amsterdam, v.73, n.2, p.101-127, 2000.

O'BRIEN, P.M.; CAMPO, M.S. (2002). Evasion of host immunity directed by papillomavirus-encoded proteins. *Virus Res*, 88, 103-118.

OUTCHKOUROV, N.S. et al. Optimization of the expression of equistatin in *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification*, v. 24, p. 18-24, 2002.

OGAWA, T., TOMITA, Y., OKADA, M., SHINOZAKI, K., KUBONOYA, H., KAIHO, I. & SHIRASAWA, H.. Broad-spectrum detection of papillomaviruses in bovine teat papillomas and healthy teat skin. *J Gen Virol* 85, 2191–2197. 2004.

OGAWA, T., TOMITA, Y., OKADA, M., SHIRASAWA, H.. Complete genome and phylogenetic position of bovine papillomavirus type 7. *J Gen Virol* 88, 1934–1938. 2007.

OLIVEIRA-FERREIRA J.; MYAHIRAY.; LAYTON G.; SAVAGE N.; ESTEBAN M.; RODRIGUEZ D.; RODRIGUEZ J. Immunogenicity of Ty-VLP bearing a CD8⁺ T cell epitope of the CS protein of *P. yoelii*: enhanced memory response by boosting with recombinant vaccinia virus. *Vaccine*, Volume 18, Issue 25, 15 June 2000, Page 2923

OLSON, C. et al. Urinary bladder tumor induced by a bovine cutaneous papilloma agent. *Can. Res.*, Toronto, n.19, p.779-783, Aug. 1959.

ORR-WEAVER T. L.; SZOSTAK J.W.; ROTHSTEIN R.J. Yeast transformation: a model system for the study of recombination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America* v. 78, p. 6384-6358, 1981.

PARAMSIVAM M, SARAVANAN K, UMA K, et al. 2002. Expression, purification and characterization of equine lactoferrin in *Pichia pastoris*. *Prot Exp Pur* 26: 28–34

PACHAURI, S.P.; SHARMA, U.K.; JOSHI, H.C. Note on pathological studies on the urinary bladder tumours of cattle with chronic haematuria. *Int. J. Anim. Sci.*, Sonapat, v.51, n.9, p.898 – 900, Sep. 1981.

PELCZAR, J. M., CHAN, E. C. S., KRIEG, N. R. “Microbiologia: conceitos e aplicações”. São Paulo, *Makron Books*, 2.ed, 517p. 1996.

PEÑA, L.M.; LAIMINS, L.A. Regulation of human papillomavirus gene expression en vegetative cell cycle. In: MCCANCE, D.J. ed. *Perspectives in Medical Virology – Human Papillomaviruses*, Elsevier, cap. 4, p. 31 – 35. 2002

POKOJ, S., LAUER I., FÖTISCH K., HIMLY M., MARI A., ENRIQUE E., MIGUEL-MONCIN M. M. S., LIDHOLM J., VIETHS S., SCHEURER S. *Pichia pastoris* is superior to *E. coli* for the production of recombinant allergenic non-specific lipid-transfer proteins. *Protein Expression and Purification* 69 (2010) 68–75

POLACK, E.W. *Toxicidade da Pteridium aquilinum (L.) Kuhn no Estado do Paraná*. 1990. 102 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1990.

RAJENDRAN, M.P. et al. Experimental production of enzootic bovine haematuria with braken fern. *Indian Vet. J.*, Bangalore, n.60, p.173-178, Mar. 1983.

REDDY, A.L.; FIALKOW, P.J. Papillomas induced by initiation-promotion differ from those induced by carcinogen alone. *Nature*, London, v.304, n.7, p.69-71, Jul. 1983

ROMANOS M. 1995. Advances in the use of *Pichia pastoris* for high-level gene expression. *Curr Opin Biotechnol* 6: 527–533

ROSENFELD SA, NADEAU D, TIRADO J, et al. 1999. Production and purification of recombinant hirudin expressed in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Methods Enzymol* 306: 154–169.

SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F., MANIATIS, T. “Molecular Cloning: A Laboratory Handbook”. *Second Edition, Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press*. 1989.

SANTOS, R.C.S. et al. Bovine papilomavírus transmission and chromosomal aberrations: on experimental model. *J. Gen. Virol.*, Reading, v.79, n.9, p.2127- 2135, Sep. 1998.

SAPP M., VOLPERS C., MÜLLER A. and STREECK R. E. Organization of the major and minor capsid proteins in human papillomavirus type 33 virus-like particles. *J Gen Virol* 76 (1995), 2407-2412;

SCHATZMAYR, H. G. “Emerging and reemerging viral diseases”. *Cad Saude Publica* 17, 209 – 213. 2001.

SCHUCH, L.F.D. Papilomatose bovina. In: RIETCORREA, F.; SCHILD, A.L.; MÉNDEZ, M.D.C. *Doenças de ruminantes e eqüinos*. Pelotas: Ed. Universitária/UFPel, 1998. p.115-118.

SINCLAIR, G.; CHOY, F.Y.. Synonymous codon usage bias and the expression of human glucocerebrosidase in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification*, v. 26, p. 96-105, 2002.

SHI, L.; SANYAL, G.; NI, A.; LUO, Z. et al. Stabilization of human papillomavirus virus-like particles by non-ionic surfactants. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 94, p. 1538-1551, 2005.

SHULER, M. L. & KARGI, F. "Utilizing Genetically Engineered Organisms" In: *Bioprocess Engineering: Basic Concepts*, 2nd Edition by Prentice Hall. 2001.

SLIBINSKAS, R. et al. "Synthesis of the measles virus nucleoprotein in yeast *Pichia pastoris* and *Saccharomyces cerevisiae*". *J Biotechnol* 107, 115 – 124. 2004.

STRINGFELLOW, D. A. et al. *Virology*. Michigan: Upjohn, 1988. 139p.

SUDBERY, P. E. "The expression of recombinant proteins in yeasts". *Curr Opin Biotechnol* 7, 517 – 524. 1996.

TACKET C; SZTEIN MB; LOSONSKY GA; WASSERMAN SS; ESTES MK. Humoral, mucosal and cellular immune responses to oral Norwalk virus-like particles (VLP) in volunteers. *Clinical Immunology*, 2003,108, 241-247

TENG, D.; FAN, Y.; YANG, Y.; TIAN, Z. et al. Codon optimization of *Bacillus licheniformis* β -1, 3-1, 4-glucanase gene and its expression in *Pichia pastoris*. *Applied Microbiology Biotechnology*, v. 74, p. 1074-1083, 2007.

TORRES, F. A. G. & MORAES, L. M. P. (2002). "Proteínas recombinantes produzidas em leveduras". *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, 20-23. 2002.

TSCHOPP JF, BRUST PF, CREGG JM, STILLMAN CA, et al. (1987). Expression of the lacZ gene from two methanol-regulated promoters in *Pichia pastoris*. *Nucleic Acids Res.* 15: 3859-3876.

VAN REGENMORTEL, M.H.V. et al. *Virus taxonomy: the classification and nomenclature of viruses*. The Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses . San Diego: Academic Press, 2000.

VASSILEVA A, CHUGH DA, SWAMINATHAN S, KHANNA N. 2001. Expression of hepatitis B surface antigen in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* using the GAP promoter. *J Biotechnol* 88: 21–35.

XU L. et al. Regulation of Smad activities. *Biochim Biophys Acta* 1759:503–513. 2006.

WERTEN MWT, van den BOSCH TJ, WIND RD, MOOIBROEK H, de WOLF FA. 1999. High-yield secretion of recombinant gelatins by *Pichia pastoris*. *Yeast* 15(11): 1087–1096.

WHITE CE, KEMPI NM, KOMIVES EA. 1994. Expression of highly disulfide-bonded proteins in *Pichia pastoris*. *Structure* 2(11):1003–1005.

WILSON, V.G.; WEST, M.; WOYTEK, K.; RANGASAMY, D. Papillomavirus E1 proteins: form, function and features. *Virus Genes* v. 24, n. 3, p. 275 – 290, 2002

WOSIACKI S.R., BARREIROS M.A.B., ALFIERI A.F. & ALFIERI A.A. 2005. Semi-Nested- PCR for detection and typing of bovine papillomavirus type 2 in urinary bladder and whole blood from cattle with enzootic haematuria. *Journal of General Virol.* Methods 126(1-2):215-219.

WOSIACKI S.R., CLAUS M.C., ALFIERI A.F. & ALFIERI A.A. 2006. Bovine papillomavirus type 2 detection in the urinary bladder of cattle with chronic enzootic haematuria. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 101(6):635-638.

WURM, F. & BERNARD, A. “Large-scale transient expression in mammalian cells for recombinant protein production”. *Curr Opin biotechnol* 10, 156 – 159. 1999.

YU J, LI D-Y, ZHANG Y-J, *et al.* 2002. High expression of *Trigonopsis variabilis* D-amino acid oxidase in *Pichia pastoris*. *J Mol Cat B Enz* 18(4–6): 291–297

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

ANEXO I – Proteínas recombinantes expressas em *P. pastoris*, adaptado de Macauley-Patrick, 2005

Proteína expressa	Função	Nível de expressão
Bactéria		
Cadeia pesada do fragment C de <i>Clostridium botulinum</i> sorotipo F [BoNTF(Hc)]	Antígeno	205 mg/kg de célula
<i>Escherichia coli</i> AppA	Usado na indústria de alimentação animal como fonte de fosfato inorgânico	117 ± 1 U/mL
<i>Escherichia coli</i> phytase	Usado na indústria de alimentação animal para aumentar a utilização de fósforo	6.4 g/L
<i>Gluconoacetobacter diazotrophicus</i> exo-levanase	Potencial fonte de frutose para produção de xarope de alta frutose	0.46 g/L
Aqualisina I <i>Thermus aquaticus</i> YT-1	Protease de serina subtipo lisina termoestável	1 g/L
Fungos		
Tanase de <i>Aspergillus oryzae</i>	Hidrolisa as ligações do tipo éster e depsídeos de galotaninas e ésteres de ácido gálico	72 mg/L
Proteína fusionada de <i>Candida antarctica</i> CBM-CALB	Lipase	1.3 g/L
Lipase/ aciltransferase de <i>Candida parapsilosis</i>	Catalisa a alcoólise de ésteres	5.8 g/L
Lipase de <i>Rhizopus oryzae</i>	Catalisa a quebra de triglicérides	19 U/mL
Cellobiose dehidrogenase (CDH) de <i>Trametes versicolor</i>	Oxidação de grupos terminais redutores de Cellobiose	225 U/mL
Lacase (Icc1) de <i>Trametes versicolor</i>	Fenoloxidase	23.9 U/mL
D-amino ácido oxidase (DAAO) de <i>Trigonopsis variabilis</i>	Flavoproteína, oxidoreductase	1.46 U/MG
Invertebrados		
Antígeno BM95 de <i>Boophilus microplus</i>	Proteção de gado contra infestação de <i>B. microplus</i>	550.0 mg/L
Catepsina L de <i>Pandalus borealis</i> (camarão)	Proteínase de cisteína	60.0 mg/L
Vertebrados (não humanos)		
Veneno batroxobina de <i>Bothrops atrox</i> moojeni	Quebra a cadeia alfa do fibrinogênio	7 mg/L
Cadeia leve da enteroquinase bovina (EKL)	Proteínase duodenal de serina	350.0 mg/L
Lactoferrina eqüina (ELF)	Proteína ligante do ferro, família das transferrinas	40.0 mg/L
Lisozima H5 do ovo de galinha	Efeitos bactericidas	2.1 mg/L
Ovotransferrina do ovo de galinha branco	Proteína ligante do ferro, família das transferrinas	57.0 mg/L
Endostatina de camundongo	Supressor de crescimento tumoral	133.33 mg/L
Interferon-τ (r-oIFN-τ) ovino	Atividade antiviral e antiproliferativa	391.7 mg/L
Lactoferrina Porcina (PLF)	Glicoproteína ligante do ferro, família das transferrinas	12.0 mg/L
Humanos		
Receptor μ-Opióide (HuMOR)	Receptor acoplado à proteína G (GPCR)	4.0 pmol/mg
Receptor opióide fusionado à proteína verde-fluorescente	Receptor acoplado à proteína G (GPCR),	1250 pmol/l
Angiostatina	Usado em terapias de longo prazo para supressão de metástases	108.0 mg/L
Fragmento Fab Anti-HBs	Prevenção e tratamento do vírus da hepatite B	50.0 mg/L
DNA topoisomerase I (hTopo I)	Atua na replicação, transcrição, recombinação do DNA e agrupamento do cromossomo	11–58 mg/L
receptor D2S de dopamina	Proteína G	3–13 pmol/MG
Fator estimulador de colônia do macrófago-granulócito (hGM-CSF)	Regulação da atividade de maturação de granulócitos diferenciados e macrófagos	180.0 mg/L
Inibidor a protease de serina SERpin C1-INibitor (C1-Inh)	Glicoproteína plasmática, inibidor de reação inflamatória	180.0 mg/L
Albumina sérica	Ligante e transportador, coloide osmótico	13.4 mg/g
Amilóide P sérico (SAP)	Proteína G, inibidor da formação de auto-anticorpos contra DNA	12.0 mg/L
Domínio extracelular do receptor tipo II do Fator-β de crescimento transformante (SolRII)	β -TGF antagonista, regula a proliferação celular e diferenciação	20.0 mg/L
Plantas		
Aglutinina da campânula-branca Amaryllidaceae	Ligante de grupos α -D-mannose	80.0 mg/L
α1,3-fucosiltransferase de <i>Arabidopsis thaliana</i>	Biosíntese de oligossacarídeos <i>O-linked</i> e <i>N-linked</i>	1.0 U/L
Gsp (Panax ginseng C, peptídeo medicinal)	Uso potencial como droga contra diabetes	800.0 mg/L
Proteínase de cisteína de milho (Mir1)	Germinação, senescência	Insolúvel/inativo
α-amylase (Amy 1A/3D) de arroz	Hidrólise do amido	340.0 mg/L
β-D-fructofuranosidase (Osβfruct3) de arroz	Hidrólise da sucrose	0.35 U/L
<i>Solanum tuberosum</i> (apyrase de batata)	Fosfohidrolase, inibição da agregação plaquetária	1.0 mg/L
Taumatina II <i>Thaumatococcus daniellii</i>	Proteína “sweet-tasting”	25 mg/L
Vírus		
Nucleoproteína do vírus do sarampo (MeN)	Responsável pelo empacotamento do genoma viral	29% de proteína total

ANEXO II – Sequência do gene L1 de BPV-2

Extraído do GenBank: M20219.1

Gene L1/BPV-2

ATGGCGTTGTGGCAACAAGGCCAAAAGCTGTATCTCCCTCCAACCCCTGTAAGCAA
GGTGCTATGCAGTGAAACCTATGTGCAAAGAAAAAGCATATTCTATCATGCAGAAACGGAA
CGCCTGTAACTGTAGGACATCCATACTACCAAGTCACTGTGGGGGACAAAACCTGTTCCCAA
AGTGTCTGCTAATCAATTTAGAGTTTTTAAAATACAGCTCCCCGATCCCAATCAGTTTGCATT
GCCTGATAGGACTGTGCACAATCCAAGCAAGGAGCGCCTGGTTTTGGGCTGTAATAGGGGTTT
AAGTATCTCGTGGCCAACCACTAGGAGGCACAGTACTGGGCACCCCACTTTTAATGCTCTG
CTTGATGCAGAAAATGTTAATAGAAAAGTTACTGCACAAACAACAGATGACAGGAAGCAAA
CAGGATTAGATGCTAAGCAACAACAGATTCTGTTGCTGGGCTGTACCCCTGCAGAAGGGGA
ATACTGGACCACAGCCCGTCCATGTGTTACTGATAGACTAGAAAATGGTGCCTGTCCTCCTT
TAGAATTAAGAACAACACATAGAAGATGGAGACATGATGGAAATAGGGTTTTGGTGCTGC
TGACTTTAAACACTAAATGCCAGTAAATCAGATCTACCTCTTGACATTCAAAATGAAATAT
GCCTGTATCCAGACTACCTCAAATGGCTGAAGATGCTGCTGGAAACAGTATGTTCTTCTTT
GCAAGAAAAGAACAAGTGTATGTAAGGCATATATGGACTCGGGGGGGCTCTGAAAAAGAA
GCACCCAGTAAAGACTTCTACCTCAAAAATGGTAGAGGTGAAGAACTCTAAAAATACCTA
GTGTGCACTTTGGCAGTCCCAGTGGATCCTTGGTGTCCACTGATAATCAAATATTTAACAGG
CCTTATTGGCTATTCAGGGCTCAGGGCATGAACAATGGGATTGCATGGAATAATTTATTATT
TTTAACTGTAGGGGATAACACACGGGGAACCTTAGTATTAGTGTAGCTGCAGATGGAA
ACGCATTGTCAGAGTATGATACTGGCAAATTTAACCTATACCATAGGCATATGGAAGAATAT
AAGCTAGCATTATATTGGAGCTGTGCTCTGTTGAGATTACTGCACAAACACTGTCACATCT
GCAAGGACTGATGCCCTCTGTGCTACAAAACCTGGGAAATCGGGGTGCAACCTCCTGCTTCTT
CTATTTTAGAAGATACTTATAGGTACATAGAGTCTCCTGCAACTAAATGTGCAAGTAATGTT
ATACCACCAAAGAAGACCCTTATGCAGGGCTTAAGTTTTGGAGCATAGACTTAAAAGAAA
AGCTGTCTTTGGACTTAGACCAATTTCCCTTGGGAAGAAGATTCTTAGCTCAGCAAGGGGCA
GGATGTTCAACTGTGAGAAAGAGAGCTGTTGCAACCAGAAATTCAGTAAGCCTGCAAAAA
GAAAAAAAATCAAAGCTTAA

ANEXO III – Análise do uso de códons BPV-2/*P. pastoris*

L1 BPV2 (red):
sequence derived from Bovine Papillomavirus

Codontable (black):
Pichia pastoris

Mean difference: 26.03 %

Ordinate (y-axis): relative adaptiveness

