

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

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E
BIOLOGIA MOLECULAR
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**EXPRESSÃO DO GENE L1 DE PAPILOMAVÍRUS HUMANO
TIPOS 18 E 33 EM LEVEDURA *Pichia pastoris***

JÚLIA FURTADO CAMPOS

VIRTUS IMPAVIDA

**RECIFE
2009**

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

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**EXPRESSÃO DO GENE L1 DE PAPILOMAVÍRUS HUMANO TIPOS
18 E 33 EM LEVEDURA *Pichia pastoris***

JÚLIA FURTADO CAMPOS

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-graduação em
Genética e Biologia Molecular
da Universidade Federal de
Pernambuco como requisito para
obtenção do título de Mestre em
Genética pela UFPE

Orientador: Prof. Dr. Antonio Carlos de Freitas

**RECIFE
2009**

Campos, Júlia Furtado

Expressão do gene L1 de papilomavírus humano tipos 18 e 33 em levedura *Pichia pastoris* / Júlia Furtado Campos. – Recife: O Autor, 2009.

75 folhas : il., fig., tab.

Orientador: Antonio Carlos de Freitas.

**Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco.
Centro de Ciências Biológicas. Genética e Biologia Molecular, 2009.**

Inclui bibliografia.

**1. Papilomavírus- genética 2. Câncer cervical- vacina profilática 3.
Pichia pastoris I. Título.**

579.135 CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2010-88

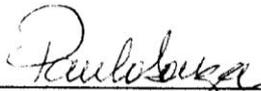
**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR**

**Parecer da comissão examinadora da dissertação de:
Júlia Furtado Campos**

**intitulada:
Expressão do gene L1 de Papilomavírus Humano tipos 18 e 33 em levedura *Pichia
pastoris***

**A comissão examinadora considera o presente trabalho
APROVADO**

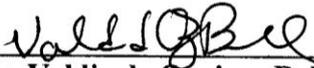
**Portanto, cumpridas todas as exigências regimentais, Júlia Furtado Campos faz jus ao
título de Mestre em Genética e Biologia Molecular pela UFPE. Recife, 09/03/2009**



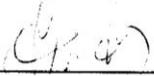
**1º Examinador: Prof. Dr. Paulo Roberto Eleutério de Souza
Universidade Federal Rural de Pernambuco**



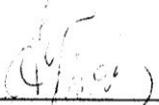
**2º Examinador: Prof. Dr. Tercílio Calsa Junior
Universidade Federal de Pernambuco**



**3º Examinador: Prof. Dr. Valdir de Queiroz Balbino
Universidade Federal de Pernambuco**



**Orientador: Prof. Dr. Antonio Carlos de Freitas
Universidade Federal de Pernambuco**



Coordenador: Prof. Dr. Antonio Carlos de Freitas

Agradecimentos

Aos meus pais, Daniel e Raquel, e ao meu irmão, Leonel, pelo carinho, estímulo e confiança. À minha tia Lília, por estar sempre por perto.

À Katita, que me recebe alegremente todos os dias em que volto para casa.

Ao meu parceiro musical, Tomaz.

Ao meu orientador, Antonio Carlos de Freitas, pelos conhecimentos transmitidos, pela tranquilidade, apoio e amizade, além do crescimento pessoal que me proporcionou.

Aos colegas e amigos:

Mirela, que foi minha dupla de trabalho por alguns meses, com quem convivi no laboratório e fora dele, e por quem guardo grande admiração.

Eliane, pela amizade, por tantos momentos de companhia e apoio, e pela participação fundamental neste trabalho. O carinho e admiração que sinto são indescritíveis :)

Conceição, pelo estímulo e dedicação. Por ser uma pessoa tão boa e disposta a ajudar sempre.

Filipe, pela amizade e generosidade, além de tantos momentos de diversão. Obrigada por andar comigo até em casa (nem sempre tarde), pelas conversas e caronas, e pelo carinho que é tão fácil de se perceber. Já não vejo a hora de conhecer o “meninozinho”.

Elainy, por ceder-nos seu espaço na bioquímica nos velhos tempos, mas principalmente pela amizade e conversas sinceras que tivemos (façamos o esforço necessário, Lalinha).

Helder, sempre admirável exemplo de esforço, pelos ensinamentos e descontração.

Maria Fernanda, pela grande amizade que conquistamos em tão pouco tempo, pelo apoio e carinho.

Marcelo (tchetché) e André, pela ajuda, companhia, amizade e disponibilidade.

Guilherme, que consegue ser mais desajeitado do que eu, obrigada por tornar nossa rotina mais divertida, pelos fins de semana na praia, e por ser tão carinhoso e dedicado às amigas (pena que não dá para estar em vários lugares ao mesmo tempo).

Fernanda, pela amizade e pela família que me apresentou, tão acolhedora e cheia de carinho.

Carla, pela diversão que proporcionava e ainda proporciona (muitas vezes inconscientemente) a todos nós.

Janaíne, Rafaele, Élyda, Felipe, Bárbara, Angélica, Cybelle, Carol e todos do grupo GEMAP.

Monique, Elaine, Nataly, Maíra, Nathália, Nati Nemo, Juliana, Maíra, Milena e Rafael, pelo auxílio, carinho e companhia no período em que estive no LIKA diariamente.

Catarina e Camila, pelo companheirismo que foi tão importante para mim.

Rodrigo, Marília, Thati e Bethânia, por quem tenho um carinho imenso, pelos momentos compartilhados desde o início desse processo.

Rute, Esteban, Will, Rochane, Billy, Brígida, Luciana, Carol, Theresa, Rodrigo e Felipe pela ajuda e convívio tranquilo.

Michelline, Áurea, Paula, Priscila e Serginho, pela descontração e sinceridade.

Aos funcionários do Departamento de Genética, Dona Zizi e Romildo, pela disponibilidade diária.

Aos professores do Programa de Pós Graduação em Genética, pelo acolhimento e conhecimentos compartilhados.

Ao Dr. Willy Beçak e à Dra. Rita Stocco, pelo apoio e pela concessão do plasmídeo pBR322H18 e da amostra clínica de HPV 33, imprescindíveis para a realização deste trabalho .

Ao CNPq, pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

Item	Página
Lista de Abreviaturas	i
Lista de Figuras	ii
Lista de Tabelas	iii
Resumo	iv
Abstract	v
Introdução	vi
1. Revisão da Literatura	7
1.1. Papilomavírus Humano	7
1.1.1. Classificação e prevalência dos tipos virais	7
1.1.2. Biologia Molecular e estrutura do HPV	10
1.1.3. Proteína L1 e estrutura do capsídeo	14
1.1.4. Resposta imune ao HPV e mecanismos de evasão viral	16
1.1.5. Ciclo infeccioso e câncer cervical	20
1.1.6. Vacinação profilática – <i>Virus-like particles</i>	22
1.2. Sistemas de expressão heteróloga	25
1.2.1. <i>Pichia pastoris</i>	27
2. Objetivos	29
2.1. Objetivo geral	29
2.2. Objetivos específicos	29
3. Material e Métodos	30
3.1. Material	30
3.1.1. Obtenção do gene L1	30
3.1.2. Linhagens de microrganismos	30
3.1.3. Soluções	30
3.1.4. Composição dos meios de cultura	30
3.1.5. Enzimas, <i>kits</i> e marcadores	31
3.1.6. Géis de agarose	31
3.2. Métodos	31
3.2.1. Construção dos vetores de clonagem e expressão	31
3.2.1.1. Desenho de <i>primers</i>	31

3.2.1.2. Extração de plasmídeo bacteriano pBR322HPV18	32
3.2.1.3. Confirmação da presença do genoma de HPV 18 no plasmídeo pBR322HPV18	33
3.2.1.4. Amplificação do gene L1 de HPV 18 e 33	33
3.2.1.5. Clonagem em vetor pGEM	34
3.2.1.6. Clonagem em vetor pPICZA	34
3.2.1.7. Sequenciamento	35
3.2.2. Transformação de <i>Pichia pastoris</i>	35
3.2.3. PCR de colônia	36
3.2.4. Expressão do gene L1	36
3.2.5. Análise da transcrição do gene L1	37
3.2.6. Análise da expressão da proteína L1	37
3.2.7. Purificação e diálise das proteínas	38
4. Resultados	39
4.1. Construção dos vetores	39
4.1.1. Obtenção do genoma de HPV18	39
4.1.2. Amplificação do gene L1 de HPV 18	39
4.1.3. Amplificação do gene L1 de HPV 33	40
4.1.4. Ligação e transformação bacteriana com as construções pGEML1H18 e pGEML1H33	40
4.1.5. Análise das construções pPICZAL1H18 e pGEML1H33	41
4.2. Transformação da levedura <i>Pichia pastoris</i> e análise dos recombinantes	42
4.2.1. Extração plasmidial	42
4.2.2. Eletroporação	43
4.3. Indução da expressão do gene L1	44
4.3.1. Análise de transcrição do gene L1 nos transformantes	44
4.4. Análise da produção da proteína L1	44
4.4.1. Avaliação da expressão da proteína L1 através de gel SDS-PAGE	44
4.4.2. Purificação e diálise das proteínas	45
4.4.3. Avaliação da expressão da proteína L1 através de Dot Blot	45
5. Discussão	47
6. Conclusões	50
7. Referências Bibliográficas	51
8. Apêndice: Manuscrito de artigo científico	61

Lista de Abreviaturas

<i>AOX1</i> e <i>AOX2</i>	genes que codificam para álcool oxidase isoformas 1 ou 2
APC	célula apresentadora de antígeno
CIN e NIC	carcinoma intraepitelial cervical
CL	célula de Langerhan
CRPV	papilomavírus de coelho
CSF	fator estimulador de colônia
DNA	ácido desoxirribonucléico
DO ₆₀₀	densidade ótica a 600 nm
<i>E</i>	gene que codifica proteína Early ou imediata
E2F	fator de transcrição E2
EGFR	receptor do fator de crescimento epidermal
HPV	papilomavírus humano
HSIL	lesão intraepitelial escamosa de alto grau
hTERT	transcriptase reversa da telomerase humana
<i>L</i>	gene que codifica proteína Late ou tardia
LSIL	lesão intraepitelial escamosa de baixo grau
MHC	complexo de histocompatibilidade principal
Mut +	metabolismo rápido de metanol
Mut s	metabolismo lento de metanol
<i>NOTCH-1</i>	gene que codifica para proteína transmembrana da família Notch
p21	proteína 21, supressora de tumor
p53	proteína 53, supressora de tumor
p107, p130	proteínas da família Rb
p300	histona acetiltransferase, molécula co-ativadora de transcrição
PBS	Tampão fosfato-salina
pRb	proteína do retinoblastoma
RNA _m	ácido ribonucléico mensageiro
S	síntese (replicação)
SIL	lesão intraepitelial escamosa
TCD4 ⁺	célula T auxiliar
TCD8 ⁺	célula T citotóxica
URR	região regulatória
VLP	partícula semelhante ao vírus

Lista de Figuras

	Página
Figura 1. Árvore filogenética dos tipos de papilomavírus.	8
Figura 2. Classificação dos papilomavírus humanos.	9
Figura 3. Esquema do genoma do HPV: disposição dos genes precoces (E), dos genes tardios capsidiais (L1 e L2) e da região de regulação (URR).	11
Figura 4. Estimulação da progressão do ciclo celular por HPVs de alto risco.	13
Figura 5. Reativação transcricional da subunidade hTERT da telomerase pela oncoproteína viral E6.	14
Figura 6. Estrutura do pentâmero de L1.	15
Figura 7. A) Modelo do capsídeo do papilomavírus; B) Estrutura das proteínas capsidiais.	16
Figura 8. Esquema simplificado da resposta imunológica à infecção por HPV.	17
Figura 9. Modelo da relação entre as respostas imunológicas ao HPV e o desenvolvimento de câncer cervical.	18
Figura 10. Localização no epitélio escamoso dos principais estágios do ciclo de vida do papilomavírus.	21
Figura 11. Evolução da lesão cervical pré-maligna ao câncer invasivo.	22
Figura 12. A) Partículas virais; B) <i>Virus-like particles</i> (VLPs).	23
Figura 13. Representação esquemática da produção de, e vacinação com <i>virus-like particles</i> (VLPs) de papilomavírus humano.	24
Figura 14. Extração e digestão de plasmídeo pBR322H18.	39
Figura 15. PCR do gene L1 de HPV 18 com polimerase de alta fidelidade.	39
Figura 16. PCR do gene L1 de HPV 33 com polimerase de alta fidelidade.	40
Figura 17. Extração plasmidial das colônias clonadas com os plasmídeos pGEML1.	40
Figura 18. Purificação de pPICZA e L1 HPV 18 e 33 digeridos com <i>BstBI</i> / <i>XhoI</i> .	41
Figura 19. Extração das colônias clonadas com pPICZAL1H18 e pPICZAL1H33.	41
Figura 20. Confirmação da clonagem no vetor de expressão pPICZA por PCR.	42
Figura 21. Linearização do DNA para transformação em <i>Pichia pastoris</i> .	42
Figura 22. Placas com <i>Pichia pastoris</i> transformadas por eletroporação com as construções pPICZAL1H18 e pPICZAL1H33.	43
Figura 23. PCR de colônia utilizando-se <i>primers</i> AOX1.	43

Figura 24. RT-PCR dos recombinantes <i>P. pastoris</i> .	44
Figura 25. Análise por eletroforese de proteínas em gel SDS-PAGE do lisado total dos clones <i>P. pastoris</i> .	45
Figura 26. Dot blots com os anticorpos anti-L1 (CAMVIR-1) e anti-His.	46

Lista de Tabelas

	Página
Tabela 1. Classificação epidemiológica dos tipos de HPV.	9
Tabela 2. Parâmetros para a escolha de um sistema de expressão.	26
Tabela 3. Seqüências dos <i>primers</i> utilizados para amplificação do gene L1 de HPV 18 e 33.	32

Resumo

A prevalência dos tipos de papilomavírus (HPV) relacionados ao câncer cervical apresenta variações geográficas. Em todo o mundo, o HPV 16 é mais freqüente nos casos de câncer cervical, seguido do tipo 18. No Brasil, apesar de o HPV 16 ser o tipo predominante, existem variações regionais importantes com relação a outros tipos. O HPV 18 é o segundo tipo mais freqüente nas regiões Norte, Sudeste e Sul, entretanto, no Nordeste e Centro-Oeste, há uma maior prevalência dos HPVs 31 e 33, depois do HPV 16. Uma atenção especial é necessária aos tipos de HPV mais relevantes em determinadas regiões, permitindo a inclusão dessas vacinas em um amplo e efetivo programa de vacinação. Devido ao custo proibitivo em países em desenvolvimento das vacinas disponíveis até então, assim como à variação na distribuição dos tipos de HPV, este trabalho teve como objetivo a expressão do gene L1 de papilomavírus humano tipos 18 e 33 em levedura *Pichia pastoris*. Os genes L1 foram amplificados através de PCR com enzima de alta fidelidade e clonados no vetor de expressão pPICZA. *Pichia pastoris* foi transformada com as construções pPICZL1H18 e pPICZL1H33 e os clones recombinantes selecionados por resistência à Zeocina. A integração dos genes foi confirmada por PCR de colônia com os *primers* AOX1 e os clones transcrevendo RNAm de L1 foram analisados quanto à produção da proteína. Os lisados celulares foram usados em ensaios de dot blot com os anticorpos anti-L1 e anti-His. Todas as amostras testadas apresentaram resultado positivo, indicando expressão da proteína L1. Entretanto, nas condições utilizadas, o rendimento da produção da proteína L1 de HPV foi abaixo do esperado. A otimização em diversas etapas do processo (o uso de genes sintéticos otimizados, por exemplo) deverá mostrar-se uma solução para a utilização do sistema de células de *P. pastoris* para a expressão heteróloga da proteína L1.

Palavras-chave: Papilomavírus humano, câncer cervical, vacina profilática.

Abstract

The prevalence of HPV types found in cervical cancer shows geographical variations. Worldwide, the HPV type 16 is more frequent in cervical cancer cases, followed by type 18. In Brazil, although HPV 16 is the predominant type in published studies, there are important regional variations with regard to other types. HPV 18 is the second type in Northern, Southeastern and Southern regions, however, in Northeastern and Central-Western regions, there is a higher prevalence of HPVs 31 and 33, instead of type 18. A special attention is needed to more relevant HPV types in certain populations, allowing the inclusion of these vaccines in a broad effective vaccination program. Due to the prohibitive cost of vaccines developed until the moment in developing countries, and because of the variation in HPV type distribution, this work aimed to express L1 gene of human papillomavirus types 18 and 33 in the yeast *Pichia pastoris*. L1 genes were amplified through high fidelity PCR and successfully cloned into pPICZA expression vector. *Pichia pastoris* was transformed with pPICZL1H16, pPICZL1H18 and pPICZL1H33 constructions and the recombinant clones were selected by Zeocin resistance. Colony PCR using AOX1 primers confirmed integration. Clones that were transcribing L1 mRNA were analyzed for protein production. Protein extracts were used in dot blot assays with anti-L1 antibody and anti-His antibody. All samples tested had positive results, indicating L1 protein expression. Nevertheless, with the conditions utilized, HPV L1 protein yield was below expected. The optimization in various steps (e.g. use of optimized synthetic gene) must overcome difficulties and successfully express L1 protein in *P. pastoris*.

Key words: Human papillomavirus, cervical cancer, prophylactic vaccine.

Introdução

O papilomavírus humano (HPV) está relacionado com a etiologia de alguns tipos de câncer, principalmente os anogenitais, dentre os quais o câncer cervical é o mais frequente e responsável por uma alta taxa de mortalidade. A infecção por HPV é hoje caracterizada como uma das principais doenças sexualmente transmissíveis que afligem a população. Estima-se que 25 a 50% da população feminina mundial esteja infectada, e que 75% das mulheres contraíam a infecção durante algum período de suas vidas.

Cerca de 40 tipos de HPV infectam o trato genital. A partir de estudos sobre a associação entre câncer cervical e a infecção pelo HPV, 15 tipos foram classificados como sendo de alto risco. O câncer de colo de útero é o segundo tipo mais comum de câncer entre mulheres no mundo, com uma estimativa de aproximadamente 493.000 novos casos diagnosticados a cada ano e uma taxa de mortalidade de 50%. Cerca de 83% dos casos ocorrem em países em desenvolvimento, onde corresponde a 15% dos cânceres em mulheres.

O desenvolvimento de vacinas para prevenir infecções pelo HPV tem se tornado uma questão fundamental. A produção de uma vacina eficaz contra HPVs oncogênicos reduziria drasticamente as taxas de incidência e mortalidade do câncer cervical. No Brasil, apesar de estratégias adotadas para ampliar o rastreamento precoce de novos casos de câncer cervical, os resultados não tem sido satisfatórios, pois as taxas de incidência e de mortalidade permaneceram em patamares ainda muito elevados.

Devido às variações geográficas observadas com relação à distribuição dos tipos virais, é necessária uma atenção direcionada às necessidades de cada região. Apesar de o HPV 16 ser o mais prevalente no Brasil, nas regiões Nordeste e Centro-Oeste os tipos 31 e 33, juntamente com o 18, têm uma importante frequência. Assim, o desenvolvimento de estratégias de vacinação deve levar em conta o tipo viral envolvido na patogênese.

Até o momento, os resultados mais promissores no desenvolvimento de vacinas profiláticas empregam partículas protéicas desprovidas do genoma viral, as VLPs (*virus-like particles*). As vacinas disponíveis conferem proteção contra os HPVs oncogênicos 16 e 18, entretanto o custo dessa imunização (são necessárias três doses) ainda é bastante elevado, além da ausência de tipos importantes nas regiões Nordeste e Centro-Oeste do Brasil.

Nos últimos anos, a levedura *Pichia pastoris* emergiu como um sistema eficiente e de baixo custo para a produção de proteínas heterólogas. Este microrganismo combina vantagens da expressão de células de mamíferos com as de células procariotas, tais como a capacidade de realizar modificações pós-traducionais e a obtenção de níveis elevados de expressão da

proteína recombinante, respectivamente. Os meios para *P. pastoris* são econômicos e bem definidos, tornando este sistema adequado para produção de proteínas heterólogas em larga escala. Além disso, é um sistema passível de ser patenteado para a produção de VLPs de HPV 18 e 33.

Este trabalho teve como objetivo a produção da proteína L1 de HPV 18 e 33 em células da levedura *Pichia pastoris*, base para a produção de vacinas profiláticas contra infecções por HPV, agente etiológico do câncer cervical.

1. Revisão da Literatura

1.1. Papilomavírus Humano

1.1.1. Classificação e prevalência dos tipos virais

Recentemente, o Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (CITV) considerou que os papilomavírus pertencem a uma família taxonômica distinta, Papilomaviridae, e não estão relacionados aos poliomavírus e ao SV40. As comparações de sequência utilizando-se o gene L1 de 96 tipos de HPV e 22 papilomavírus animais levaram ao estabelecimento das seguintes classificações: (1) para grandes agrupamentos de tipos de papilomavírus humano (HPV), foi introduzido o termo “gênero”. Diferentes gêneros compartilham menos de 60% de identidade da sequência de L1; (2) para agrupamentos menores, foi introduzido o termo “espécie”. Essas espécies compartilham entre 60% e 70% de identidade de nucleotídeos. O termo espécie é reservado para associações filogenéticas de múltiplos tipos de papilomavírus dentro de um gênero que mostra 60-70% de identidade da sequência de L1 e similaridade biológica considerável; (3) os tipos de papilomavírus dentro de uma espécie possuem entre 71% e 89% de identidade da sequência de L1. A classificação taxonômica dos tipos (diferença de pelo menos 10%), subtipos (diferença de 2 a 10%) e variantes (diferença de no máximo 2%), é baseada na sequência do gene L1 (de Villiers et al, 2004; Figura 1).

Os dois principais gêneros de HPV são os gêneros Alfa e Beta, com aproximadamente 90% dos HPVs atualmente caracterizados pertencendo a um desses dois gêneros. Os HPVs genitais pertencem ao gênero Alfa. Mais de 100 tipos de HPV foram caracterizados molecularmente e aproximadamente 40 tipos são capazes de infectar o trato genital (Muñoz et al, 2006). Os papilomavírus Beta estão tipicamente associados a infecções cutâneas não aparentes em humanos, porém em indivíduos imunocomprometidos e em pacientes com epidermodisplasia verruciforme hereditária, os vírus podem estar associados ao desenvolvimento de câncer de pele (Harwood & Proby, 2002; Pfister, 2003). Os HPVs restantes pertencem a três gêneros (Gama, Mu e Nu) e geralmente causam papilomas cutâneos que não progridem para câncer (de Villiers et al, 2004).

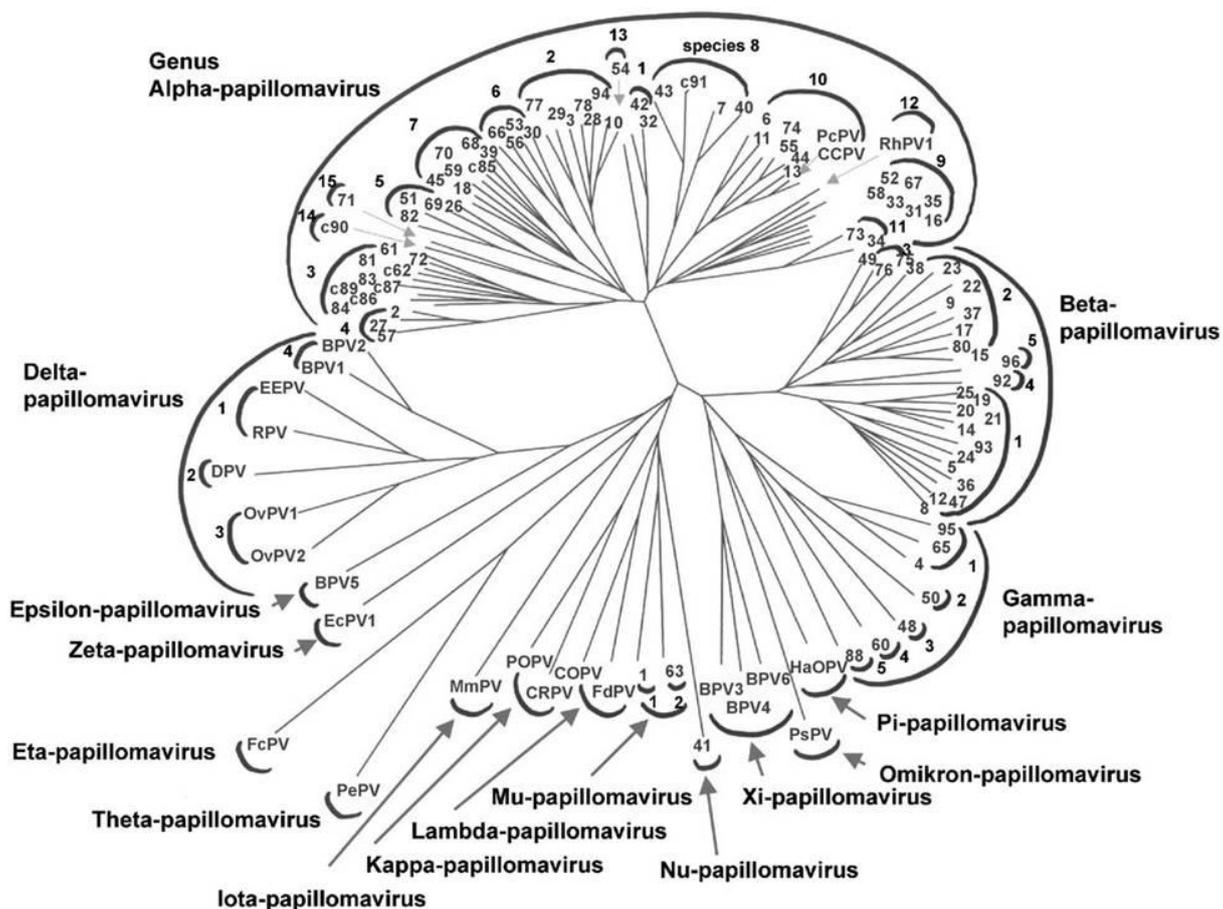


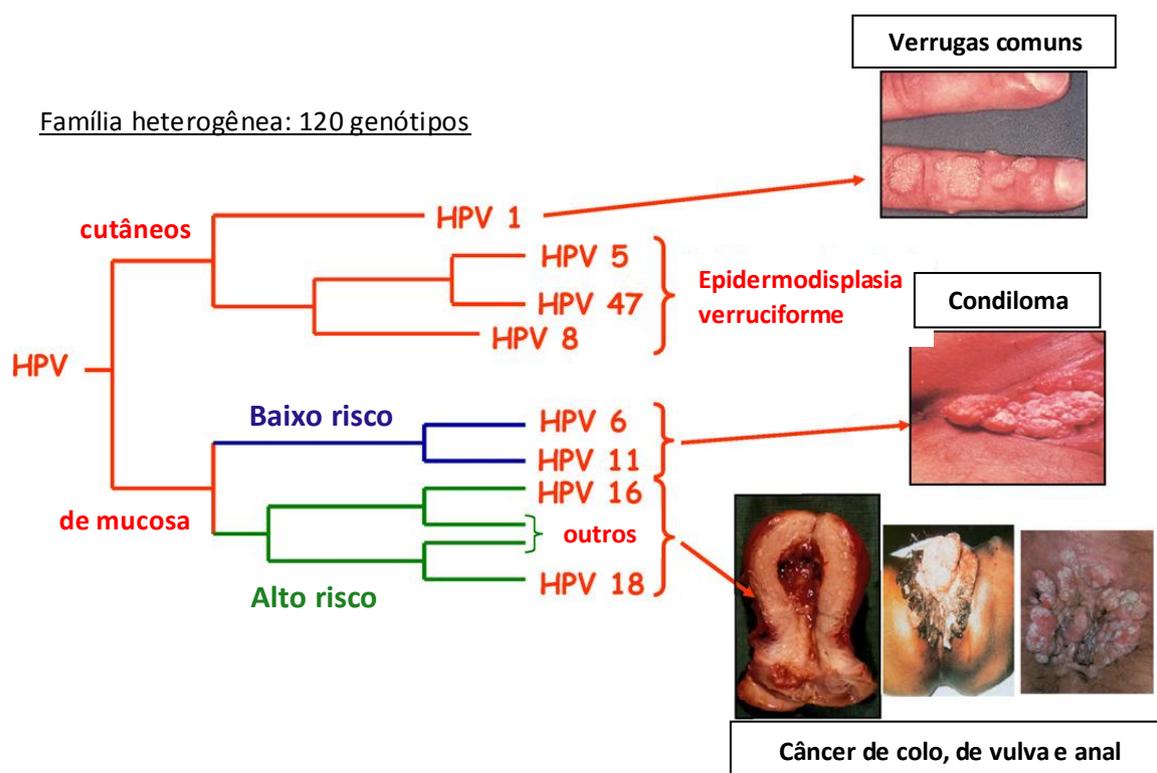
Figura 1. Árvore filogenética dos tipos de papilomavírus. Os semicírculos externos identificam gêneros de papilomavírus (por exemplo, alfa). Os números nos semicírculos internos são referentes às espécies (de Villiers et al, 2004).

A associação do HPV com alguns tipos de neoplasias foi detectada, primeiramente, em cânceres do trato anogenital, incluindo cérvix, vulva, vagina, pênis e ânus. Além destes, estão também associados ao HPV, alguns tipos de cânceres de cabeça, pescoço (Syrjanen, 2005) e pele (Sterling, 2005).

Os tipos de HPV podem ser classificados como de alto ou baixo risco (Tabela 1), de acordo com o grau de lesões que induzem (Stanley, 2001). Dados obtidos a partir de estudos de caso-controle, realizados em diferentes países, sobre a associação entre câncer cervical e a infecção pelo HPV classificou 15 tipos de HPV como sendo de alto risco. Além disso, alguns tipos foram considerados provavelmente carcinogênicos, devido ao número pequeno de pacientes estudados (Muñoz et al, 2003; Baseman & Koutsky, 2005). Essa correlação entre tipos de HPV de alto risco e a formação de lesões precursoras e malignas ficou mais evidente após os estudos nos quais se identificou a presença do DNA viral em 84 a 99,7% dos cânceres cervicais (Bosch et al, 1995; Walboomers et al, 1999; Figura 2).

Tabela 1. Classificação epidemiológica dos tipos de HPV.

Epidemiologia	Tipos
Alto risco estabelecido	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73, 82
Alto risco provável	26, 53, 66
Baixo risco estabelecido	6, 11, 13, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 62, 70, 72, 74, 81

**Figura 2.** Classificação dos papilomavírus humanos (adaptado de Denis et al, 2008).

Em todo o mundo, o HPV tipo 16 é o mais freqüente em casos de câncer cervical, com exceção da Indonésia, onde prevalece o tipo 18 (Bosch et al, 1995; de Boer et al, 2006). No Brasil, o HPV tipo 16 é também o mais freqüente, seguido pelos tipos 18, 31 e 33. No que se refere ao segundo tipo mais freqüente, existem variações de acordo com a região brasileira. No Nordeste e Centro-Oeste, os HPVs tipo 31 e 33 são os que apresentam maior incidência depois do HPV 16, enquanto que nas regiões Norte, Sudeste e Sul, o HPV 18 é o segundo mais freqüente entre os casos de câncer cervical (Cavalcanti et al, 1994; Eluf-Neto et al, 1994;

Bosch et al, 1995; Gonçalves et al, 1999; Noronha et al, 1999; Lorenzato et al, 2000; Guimarães et al, 2008).

Apesar da estratificação por risco dos tipos de HPV continuar evoluindo, está claro que a maioria das infecções é auto-limitante e nem todas as infecções por HPVs de alto risco são destinadas a progredir (Ho et al, 1998). O que determina se uma infecção única vai progredir ou não permanece sendo o foco de vários estudos.

1.1.2. Biologia molecular e estrutura do HPV

O HPV é constituído por uma molécula circular de DNA dupla fita com cerca de 8 Kb e pelo menos oito ORFs (*open reading frame* ou quadro aberto de leitura), divididas em precoces e tardias (Figura 3), expressas de RNAs mensageiros policistrônicos transcritos a partir de uma única fita de DNA (Stanley, 2001). Estes vírus codificam múltiplas proteínas em um genoma muito compacto, e tiram vantagem do *splicing* alternativo para expressar diferencialmente essas proteínas de maneira temporal e de acordo com a diferenciação celular (Zheng & Baker, 2006).

Os genes de expressão precoce E (*Early*) codificam proteínas envolvidas na replicação e transcrição do DNA viral e no processo de transformação da célula hospedeira. Os genes de expressão tardia L (*Late*) codificam as proteínas L1 e L2 que formam o capsídeo viral. Além desses dois grupos de genes, existe uma região de controle viral URR (Região Regulatória *Upstream*), com aproximadamente 850 pb (10% do genoma viral), a qual não tem função em codificar proteína, mas é composta pela origem de replicação, assim como sítios de ligação de múltiplos fatores de transcrição importantes na regulação de promotores virais tanto precoces quanto tardios (Stanley, 2001; Bernard, 2002).

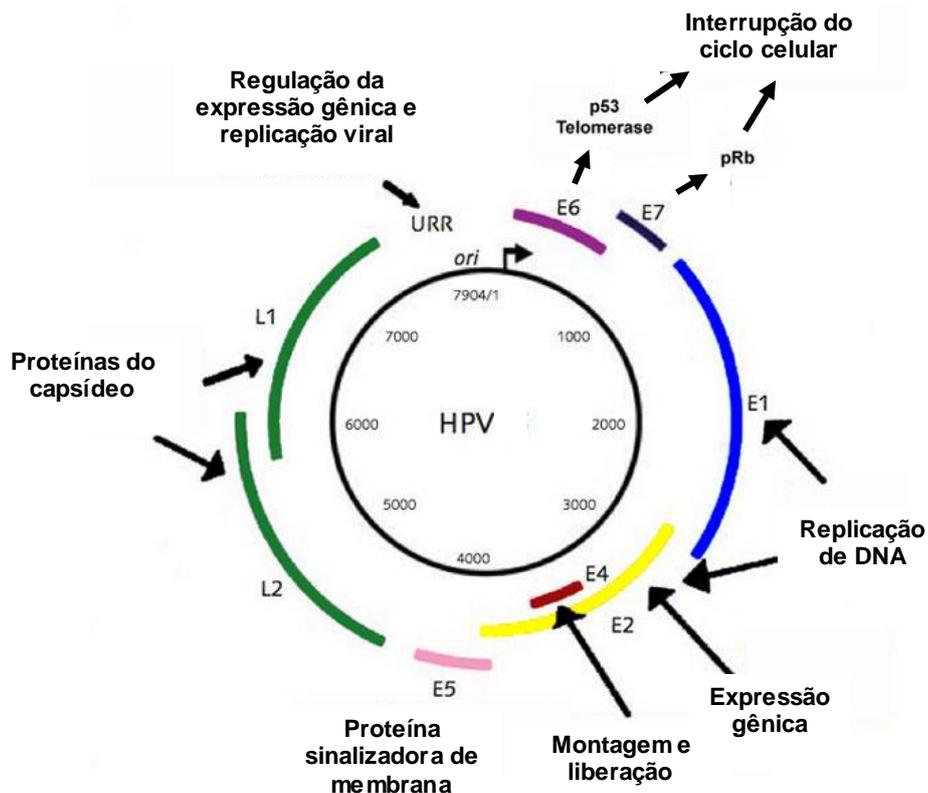


Figura 3. Esquema do genoma do HPV: disposição dos genes precoces (E), dos genes tardios capsidiais (L1 e L2) e da região de regulação (URR) [<http://www.microbiologybytes.com/virology/Papillomaviruses.html>].

Os genes E1 e E2 possuem importante função de replicação viral; suas respectivas proteínas formam um complexo que se liga a seqüências na origem de replicação e agem no recrutamento de polimerases celulares e proteínas acessórias para mediar a replicação. A proteína E1 também possui atividade helicase, e E2 funciona ainda como regulador do mecanismo de transcrição (Mohr, 1990; Frattini and Laimins, 1994; Conger, 1999).

O gene E4 expressa uma proteína de fusão com E1, sendo responsável pelo rompimento do citoesqueleto, auxiliando na liberação do vírus da célula hospedeira (Motoyama et al, 2004). A proteína E5 possui atividade de transformação por estimular a proliferação celular, interagindo com proteínas transmembrana, tais como o receptor do fator de crescimento epidermal (EGFR) e o fator estimulante de colônia (CSF) [Genther et al, 2005].

No epitélio não-infectado, a expressão de proteínas necessárias para a progressão do ciclo celular é controlada pela proteína supressora de tumor, pRb. Em células que não estão em divisão, pRb (proteína do retinoblastoma) é hipofosforilada no início do G1 e se associa

com membros da família do fator de transcrição E2F, formando complexos que funcionam como repressores de transcrição (Doorbar, 2006; Figura 4).

Na presença de fatores de crescimento, a ciclina D/Cdk4/6 é ativada, o que leva à fosforilação de Rb e à liberação do fator de transcrição E2F, o qual dirige a expressão de proteínas envolvidas na progressão da fase S. p16 regula os níveis de ciclina D/Cdk ativa na célula, provendo um mecanismo de *feedback* que regula os níveis de MCM (*minichromosome maintenance protein*), PCNA (antígeno nuclear de proliferação celular) e ciclina E. p14^{Arf}, cuja expressão é diretamente ligada à de p16, regula a atividade da ubiquitina-ligase MDM (*murine double minute*), que mantém p53 em um nível abaixo daquele requerido para parada do ciclo celular e/ou apoptose (Doorbar, 2006; Figura 4).

No epitélio cervical infectado por tipos de HPV de alto risco, a progressão através do ciclo celular não é dependente de fatores de crescimento externos, mas é estimulada pela proteína E7, que se liga e degrada pRb e facilita a expressão, mediada por E2F, de proteínas celulares necessárias à entrada na fase S, permitindo a replicação dos genes virais (Fehrmann and Laimins, 2003; McCance, 2005, Doorbar, 2006). Embora os níveis de p16 aumentem, o *feedback* normal é ignorado, já que a proliferação celular mediada por HPV não é dependente de ciclina D/Cdk4/6. O aumento nos níveis de p14^{Arf}, que ocorre na ausência de *feedback* mediado por p16, leva à inibição da função de MDM e a um aumento nos níveis de p53. Isto é contabilizado pela proteína viral E6, que se associa à ubiquitina-ligase E6AP (proteína associada a E6) para estimular a degradação da proteína p53 e evitar a parada do crescimento e/ou apoptose (Stubenrauch & Laimins, 1999, Doorbar, 2006). Assim, E6 age como repressora da apoptose e media a sobrevivência de células com danos severos (zur Hausen, 2000).

A meia-vida de p53, de muitas horas, é reduzida para menos de vinte minutos nos queratinócitos (Hubbert et al, 1992; Huijbregtse et al, 1993). Sem a proteína p53 a célula perde a capacidade de reparar possíveis danos no seu material genético e há um aumento na frequência de rearranjos, mutações e aneuploidias, que acumulados propiciam o desenvolvimento de uma neoplasia ou câncer (Vousden, 1993).

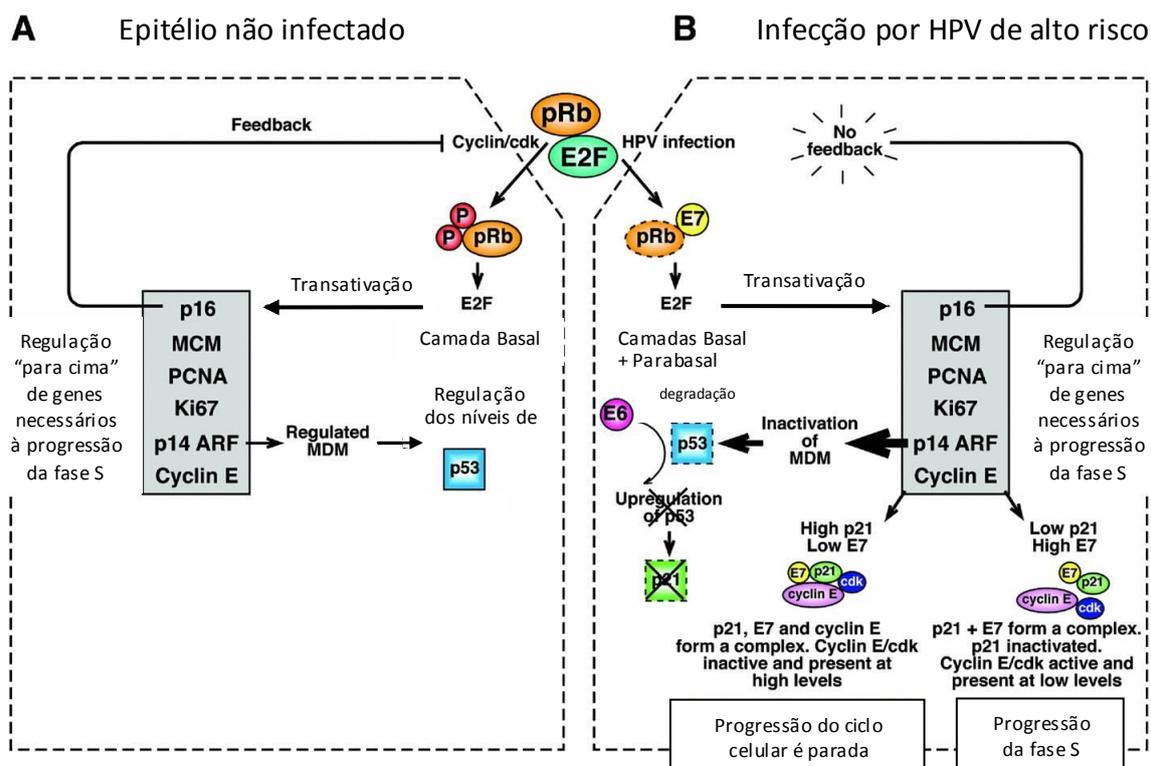


Figura 4. Estimulação da progressão do ciclo celular por HPVs de alto risco. A infecção por HPV leva à desregulação do ciclo celular. A regulação da expressão protéica no epitélio não infectado é mostrada em (A). Na presença de HPV de alto risco (B), a regulação de proteínas necessárias para a proliferação celular é alterada, permitindo ao HPV estimular a entrada na fase S nas camadas superiores do epitélio (adaptado de Doorbar, 2006).

Na doença cervical de baixo grau, em que os níveis de E7 são cuidadosamente regulados, considera-se que a proliferação celular mediada por E7 pode algumas vezes ser inibida como um resultado da associação com p21 e ciclina E/Cdk. Os altos níveis de E7 encontrados em células de câncer cervical devem superar esse bloqueio pela ligação e inativação de p21, inibidor de Cdk (Doorbar, 2006).

Estes mecanismos que envolvem as proteínas E6 e E7 são apenas a base geral para a investigação e a compreensão de outros eventos implicados com estas proteínas para o desenvolvimento carcinogênico. A proteína E7 associa-se a outros supressores de tumor da família Rb (p107, p130), a ciclinas (envolvidas na progressão do ciclo celular) e a histonas desacetilases que reprimem a transcrição de genes, como o *NOTCH-1*, relacionado com a diferenciação de células e ativamente expresso no carcinoma cervical (Southern et al, 2000; Tewari et al, 2000). Já a proteína E6 altera a transcrição de genes através da interação com a proteína p300 (regula transcrição via acetilação das histonas) e aumenta o tempo de vida celular, por estimular a atividade de telomerase (Slebos et al, 1995; Figura 5).

A ativação transcricional de hTERT (transcriptase reversa da telomerase humana) leva à ligação da subunidade catalítica no complexo enzimático telomerase que alonga então os telômeros das células epiteliais. Isto resulta na inibição da senescência dos queratinócitos. Esse mecanismo é amplificado pela ação inibitória indireta de E7 sobre a expressão da proteína p16, geralmente superexpressa nos estágios terminais de senescência (Slebos et al, 1995).

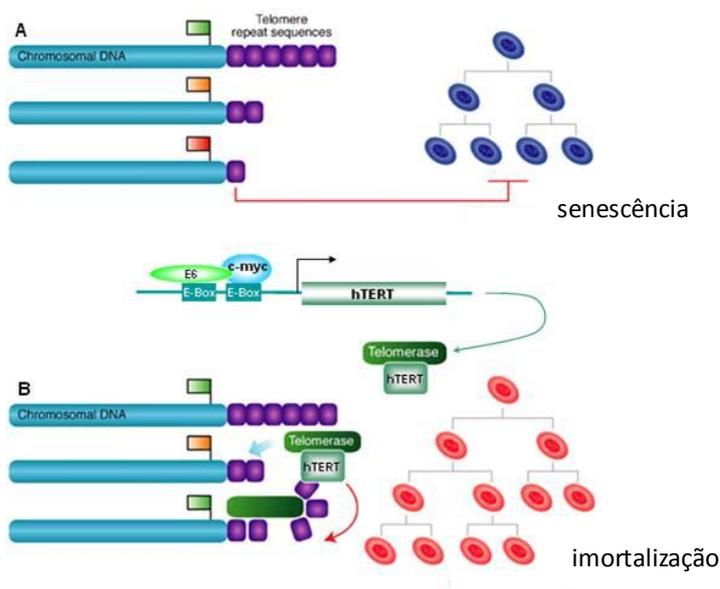


Figura 5. Reativação transcricional da subunidade hTERT da telomerase pela oncoproteína viral E6. A) Na ausência de E6, as repetições teloméricas sofrem uma diminuição progressiva, levando à senescência replicativa de células somáticas. B) Na presença da oncoproteína viral E6, esta se associa ao fator celular c-Myc no nível dos *E-box* do promotor de hTERT (http://dicos.ens-lyon.fr/vie/viro/XML/db/bio/viro/metadata/LOM_V05_3D1_Papilloma_Oncogenese.b.xml).

1.1.3. Proteína L1 e estrutura do capsídeo

Os monômeros de L1 contêm 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 à porção C-terminal de L1 são responsáveis pelas interações interpentaméricas requeridas para montagem do capsídeo. Caracterizações bioquímicas e estruturais de L1 mostram que as α -hélices na região C-terminal tem papel importante no dobramento e montagem do capsídeo. 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 capsídeo viral, devido seu papel na interação entre os pentâmeros adjacentes (Bishop et al, 2007a).

Recentemente, a estrutura cristalográfica da proteína L1 de quatro tipos de HPV (11, 16, 18, e 35) foi estudada (Bishop et al, 2007b). Em resumo, cinco monômeros são reunidos de maneira simétrica para formar o pentâmero com um canal oco no centro, em torno de um eixo central. Os eixos centrais da cadeia polipeptídica da subunidade adjacente interagem diretamente, e os *loops* da superfície apresentam elaborado entrelaçamento entre os monômeros individuais. Os cinco *loops* expostos na superfície do pentâmero – BC, DE, EF, FG e HI; Figura 6 – constituem a parte da superfície viral que pode ser reconhecida como epítomos conformacionais do HPV.

Em geral, os arranjos desses *loops* são bastante similares nos quatro tipos. Porém, uma diferença estrutural mínima no *loop* de um epítopo, com um desvio espacial de aproximadamente 2 Å, é suficiente para romper a ligação anticorpo-epítopo. Apesar da grande homologia na seqüência das proteínas L1 entre diferentes tipos de HPV e a conservação geral dos pentâmeros, as estruturas detalhadas do *loop* na superfície do pentâmero são amplamente diferentes por causa de mudanças na composição de aminoácidos, assim como inserções e deleções, as quais não apenas mudam a composição da superfície do epítopo, mas também afetam a antigenicidade da superfície viral, demonstrando a base molecular para a especificidade dos anticorpos neutralizantes (Bishop et al, 2007b).

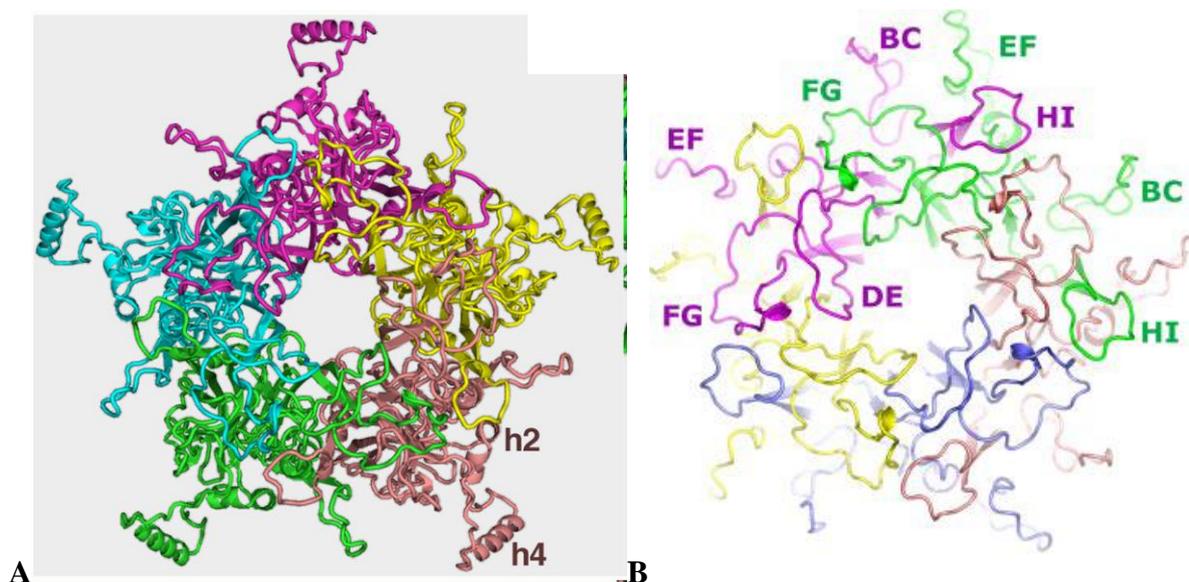


Figura 6. Estrutura do pentâmero de L1. A) Elementos estruturais de L1 importantes para a montagem do pentâmero. Visão superior de um pentâmero de L1, mostrando as projeções laterais de cada um dos cinco monômeros (cada um em uma cor diferente) [adaptado de Bishop et al, 2007a]. B) Estrutura cristalográfica do pentâmero de L1 de HPV 16, na qual cada monômero é apresentado em uma cor diferente para mostrar o entrelaçamento dos *loops* da superfície (adaptado de Bishop et al, 2007b).

O capsídeo viral é icosaédrico, com aproximadamente 55 nm de diâmetro. É composto por 72 pentâmeros (capsômeros) da proteína L1 (~55kDa), em associação com 12 ou mais cópias da proteína L2 (Baker et al, 1991; Modis et al, 2002; Figura 7). 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).

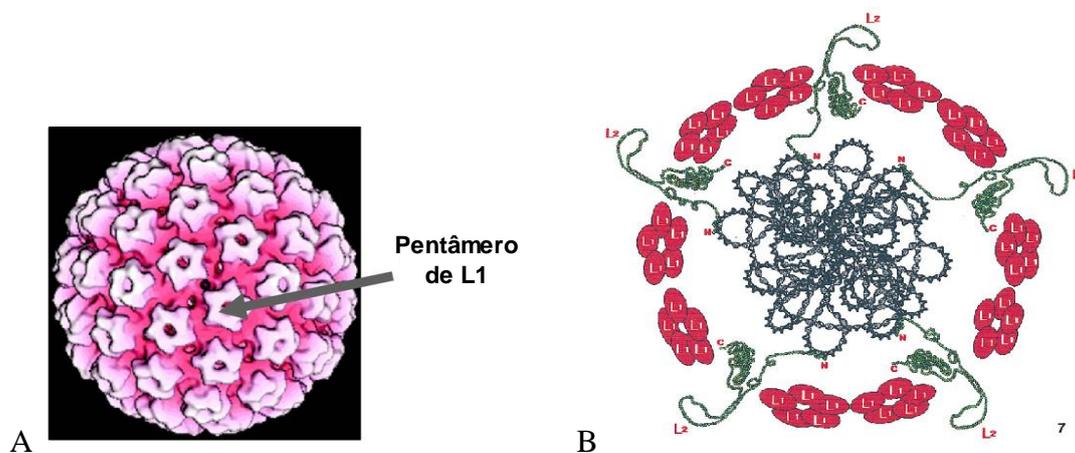


Figura 7. A) Modelo do capsídeo do papilomavírus; B) Estrutura das proteínas capsidiais. Os pentâmeros de L1 (vermelho) se associam à proteína L2 (verde) que se liga ao DNA viral (cinza) [adaptado de Liu et al, 1997].

1.1.4. Resposta imune ao HPV e mecanismos de evasão viral

Diferentemente de patógenos do sangue, como o vírus da hepatite B, uma resposta imune contra o HPV precisa ser gerada no sítio de infecção. Normalmente, imunidade protetora contra HPV envolve tanto resposta imune inata quanto adquirida. As respostas inatas são imediatas e não específicas, ao passo que células de resposta imune adaptativa reconhecem antígenos virais específicos.

Não há viremia na infecção por HPV, e, além disso, partículas virais são liberadas da superfície do epitélio escamoso com pouco acesso a canais vasculares e linfáticos, e a linfonodos onde as respostas imunológicas são iniciadas (Stanley, 2008).

Inicialmente, células infectadas por vírus são lisadas pelo sistema imune inato, e citocinas produzidas por essas células são capazes de amplificar as respostas inata e adaptativa. A imunidade adquirida é mediada pela atividade de linfócitos B e T. Os linfócitos T se tornam ativados ao reconhecerem proteínas virais, e produzem citocinas adicionais que induzem o crescimento e a maturação de linfócitos B. Ambas as respostas de linfócitos T e B

são necessárias para uma proteção efetiva contra o HPV (Figura 8). Um modelo para a relação entre as respostas imune inata e adquirida ao HPV e o desenvolvimento de câncer cervical foi proposto por Einstein (2008; Figura 9).

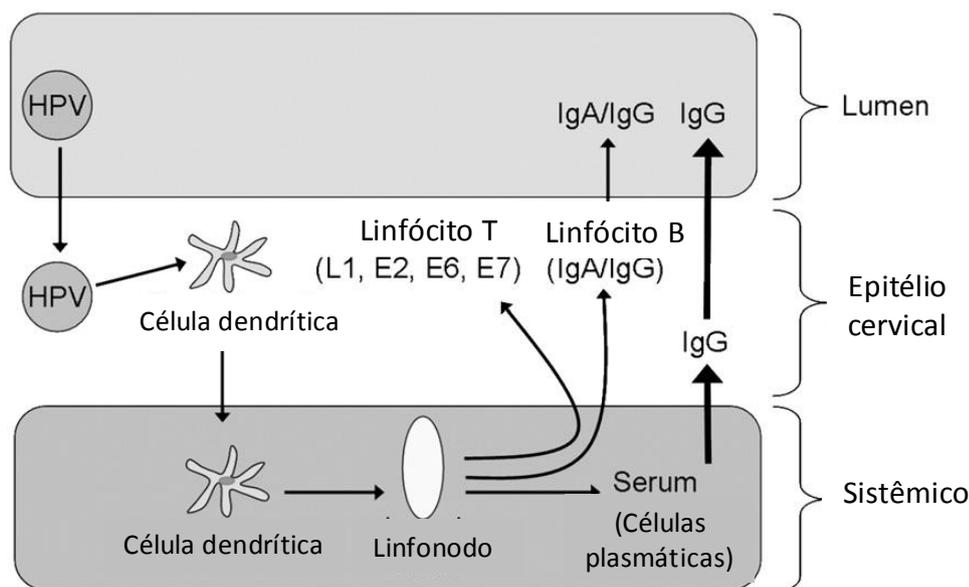


Figura 8. Esquema simplificado da resposta imunológica à infecção por HPV (adaptado de Stanley, 2008).

Uma resposta imune adequada a infecções por HPV genitais é estabelecida na maioria dos casos, a qual parece ser caracterizada por imunidade mediada por células, forte e local, associada à regressão da lesão e à geração de anticorpos séricos neutralizantes. Esses anticorpos são gerados na maioria, mas não em todos os indivíduos infectados (Kirnbauer et al, 1994; Wikstrom et al, 1995; Carter et al, 1995), e são direcionados contra epítomos conformacionais da proteína L1, expostos na superfície externa da partícula viral intacta. Os níveis de anticorpos neutralizantes após infecções naturais por HPV são baixos, mesmo nos momentos de pico (Villa et al, 2005), o que provavelmente reflete a ausência de viremia e a produção de partículas virais nas células epiteliais superficiais (Stanley, 2006).

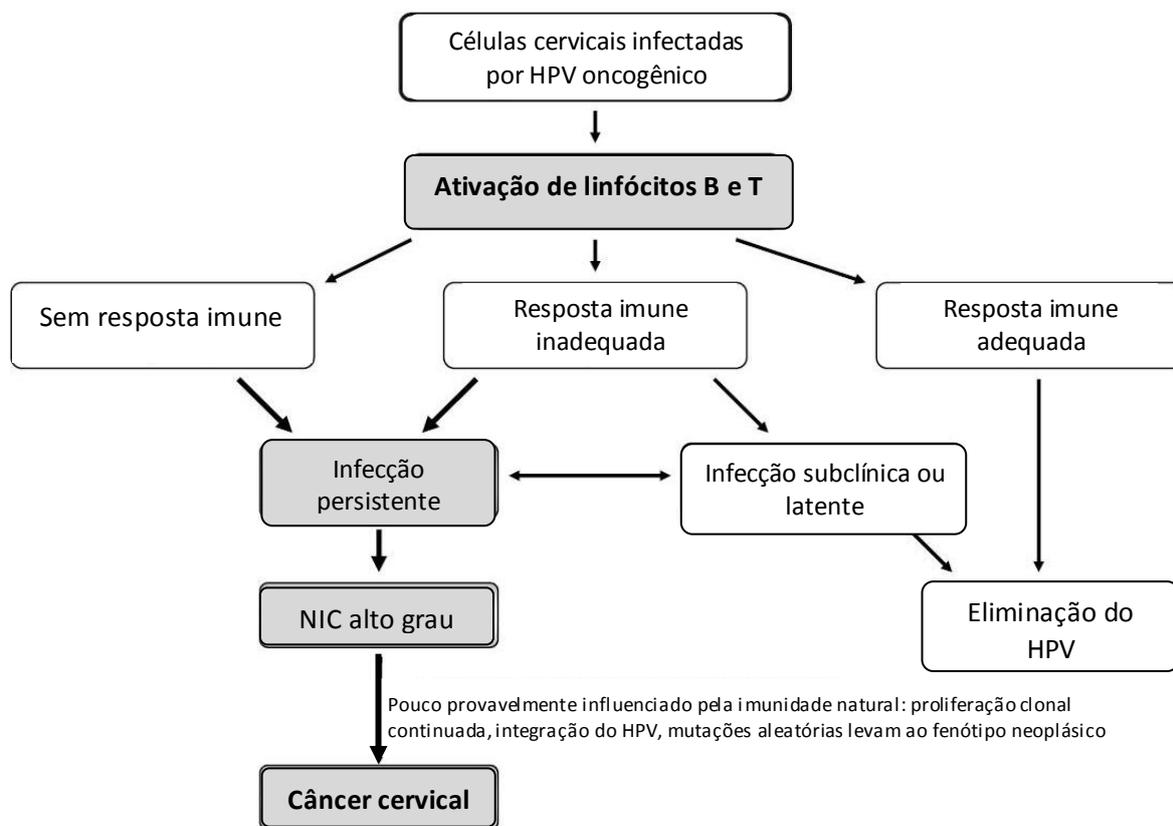


Figura 9. Modelo da relação entre as respostas imunológicas ao HPV e o desenvolvimento de câncer cervical. A infecção por HPV induz uma resposta imune adquirida natural após o reconhecimento de proteínas específicas do HPV e ativação de linfócitos B e T em mulheres que efetivamente eliminaram o HPV. Uma resposta imune adequada promove eliminação do vírus, porém uma resposta inadequada, ou falha em gerar resposta, promove a persistência do vírus, o que pode levar ao câncer cervical (adaptado de Einstein, 2008).

Ainda que com o tempo ocorra reversão natural de 80% a 90% das infecções genitais por HPV, cerca de 10% a 20% dos indivíduos desenvolvem infecção persistente. Este grupo tem alto risco de progressão à doença intraepitelial cervical de alto grau e neoplasia intraepitelial cervical (NIC) 2/3, condição caracterizada (em termos biológicos) pela expressão das proteínas E6 e E7 de HPV em células em divisão, instabilidade cromossômica, e habilidade progressiva em resistir às defesas antivirais do sistema imune, tanto inatas quanto adaptativas (Stanley, 2008).

Teoricamente, a infecção pelo HPV deveria ser detectada pelas células apresentadoras de antígeno do epitélio escamoso, as células de Langerhans, as quais são células dendríticas intraepiteliais. A entrada do capsídeo viral é geralmente um sinal de ativação para células dendríticas, mas existem evidências de que as células de Langerhans não são ativadas pela entrada dos capsídeos (Fausch et al, 2002).

Os papilomavírus humanos adotaram vários mecanismos que impedem uma resposta eficiente do sistema imunológico e o primeiro destes é o seu próprio tipo de ciclo que não provoca lise celular, ou seja, a liberação do vírus ocorre com a morte programada dos queratinócitos (descamação). Deste modo, os sinais essenciais para a resposta imune no epitélio, como a produção de citocinas pró-inflamatórias que ativam a migração das células apresentadoras de antígenos (APCs), são ausentes (Kupper & Fuhlbrigge, 2004; Stanley et al, 2006).

A natureza não-lítica da infecção por HPV limita a produção de antígenos que são processados e apresentados ao sistema imune adaptativo. Além disso, o vírus codifica apenas proteínas não secretadas (proteínas E), a maioria delas sendo expressas em baixos níveis e primariamente no núcleo das células infectadas (Crum et al, 1986; Greenfield et al, 1991; Stoler et al, 1992). A produção das proteínas do capsídeo, imunogênicas, é limitada à camada externa diferenciada, a qual é liberada pelo epitélio (Cason et al, 1989; Rudolf et al, 1999).

Os HPVs de alto risco interferem na regulação da expressão do gene indutível por interferon α (Chang & Laimins, 2000; Nees et al, 2001), e as oncoproteínas E6 e E7 de HPV 16 interagem diretamente com componentes das vias de sinalização de interferon, anulando estas vias (Barnard & McMillan, 1999; Ronco et al, 1998).

A proteína E7 de HPVs de alto risco regula a transcrição de genes associados com a apresentação de antígenos e inibe sua função, o que reduz os peptídeos virais apresentados na superfície de células infectadas, e ajuda o vírus a escapar da detecção por linfócitos T citotóxicos (Georgopoulos et al, 2000; Kanodia et al, 2007).

Mesmo com alguns mecanismos de escape do sistema imune, a infecção pelo HPV pode ser combatida por indivíduos imunocompetentes. O tempo necessário para o desaparecimento dos tipos de HPV de alto risco, particularmente o HPV 16, é de 8-14 meses em média, consideravelmente maior do que os 5-6 meses necessários para os tipos de HPV de baixo risco (Franco et al, 1999; Giuliano et al, 2002; Brown et al, 2005).

O tempo desde a infecção até a liberação dos vírions é de aproximadamente três semanas, tempo requerido para o queratinócito basal passar pela diferenciação completa e descamação. O período entre a infecção e o aparecimento de lesões é altamente variável, podendo ser de semanas a meses (Oriel, 1971), sugerindo que o vírus pode efetivamente esquivar-se do sistema imune.

1.1.5. Ciclo infeccioso e câncer cervical

Os HPVs são vírus não-líticos que replicam seu genoma no núcleo das células hospedeiras utilizando a maquinaria celular do hospedeiro. A infecção por papilomavírus é única por requerer a disponibilidade de células epiteliais epidermais ou de mucosas, as quais têm capacidade de proliferação e seu ciclo de vida produtivo é acoplado ao ciclo de diferenciação das células infectadas do hospedeiro (Kanodia et al, 2007; Figura 10).

A infecção inicial ocorre nas células basais, uma camada única de células indiferenciadas, em proliferação, que normalmente estão protegidas por células diferenciadas, que não se dividem. O acesso às células basais ocorre através de microabrasões causadas por várias formas de trauma físico (Stanley, 2001). O receptor para a entrada do vírus na célula ainda é desconhecido, entretanto o heparan sulfato media a ligação inicial dos vírions às células (Joyce et al, 1999).

Nas células-tronco epiteliais e em sua progênie, os vírus replicam seu DNA episossomalmente, usando as proteínas virais não-estruturais E1 e E2, e a maquinaria de replicação celular. As células em divisão povoam a camada basal do epitélio. Enquanto as células infectadas se dividem, os genomas virais são separados nas células filhas. Uma célula filha migra para as camadas suprabasais e passa por diferenciação, enquanto a outra continua a se dividir e funciona como reservatório para a replicação viral contínua (Kanodia et al, 2007).

A expressão de E6 e E7 atrasa a parada do ciclo celular e diferenciação, normalmente observados quando as células epiteliais se movem da membrana basal para se tornarem queratinócitos maduros. Esse atraso na parada do ciclo celular permite uma maior replicação de episossomos virais nas células epiteliais suprabasais, e produz o espessamento da pele (ou verruga) característico de algumas infecções por papilomavírus (Frazer, 2004).

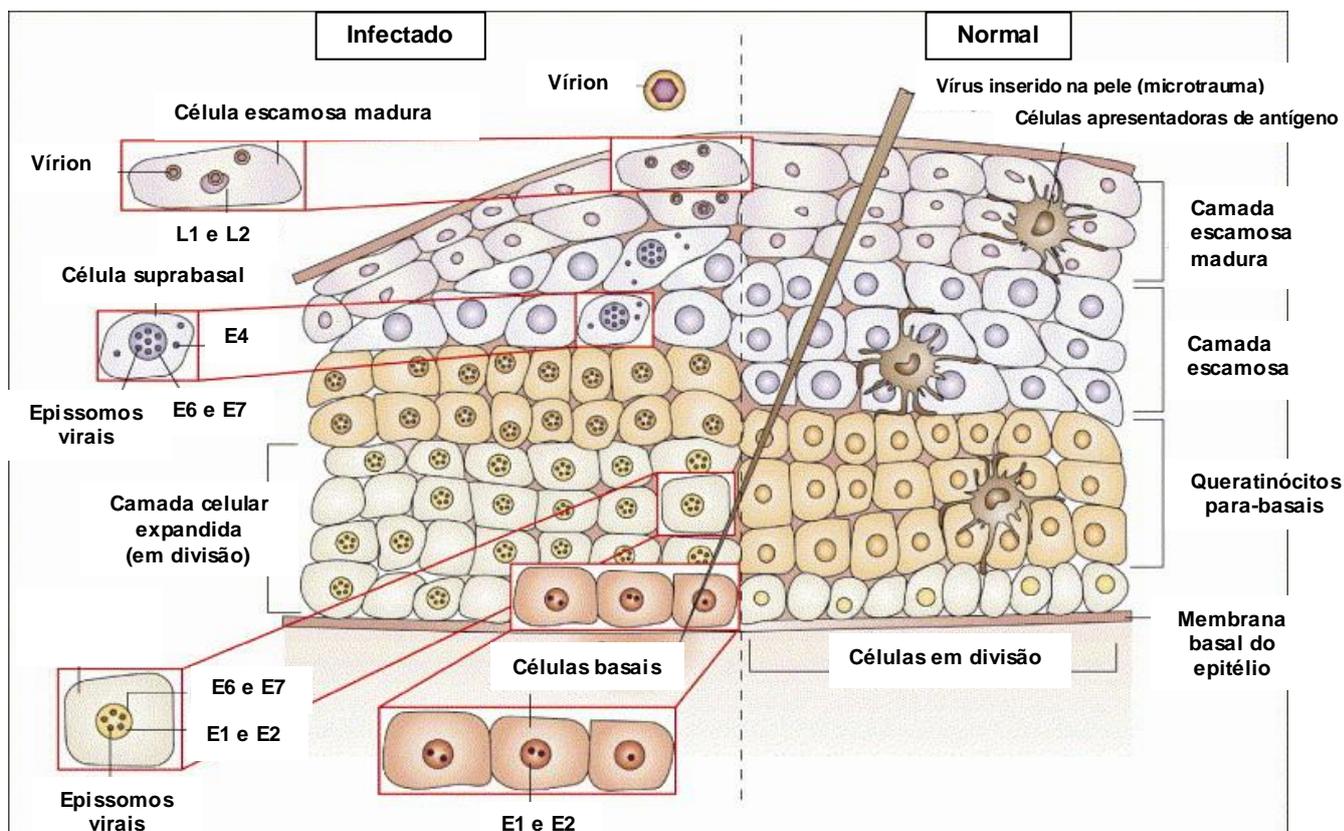


Figura 10. Localização no epitélio escamoso dos principais estágios do ciclo de vida do papilomavírus. Células filhas das células-tronco epiteliais se dividem ao longo da membrana basal e então amadurecem verticalmente através do epitélio sem mais divisões (lado direito). Após a introdução do HPV na camada basal do epitélio, ocorre a expressão de proteínas virais não-estruturais. Sob a regulação dessas proteínas, a população de células em divisão se expande verticalmente e a diferenciação celular epitelial é atrasada e menos completa. As proteínas virais são expressas seqüencialmente com a diferenciação, e vírions maduros são produzidos apenas nas camadas mais superficiais do epitélio. As células apresentadoras de antígeno (APCs) estão esgotadas no epitélio infectado por HPV (adaptado de Frazer, 2004).

Durante a fase inicial da infecção, o HPV está presente como epissomo, porém na maioria dos cânceres o HPV se integra ao genoma do hospedeiro (Wentzensen et al, 2004). A integração resulta na inativação do gene E2 e perda de sua função em reprimir a transcrição de E6 e E7, permitindo um acúmulo de mudanças genéticas (Stubenrauch & Laimins, 1999).

As lesões causadas pelos papilomavírus podem ser classificadas em neoplasias intraepiteliais cervicais (NIC) do tipo 1, 2 e 3 (Figura 11A). A NIC-1 (neoplasia intraepitelial cervical do tipo 1 ou de baixo grau) é a manifestação mais comum da infecção aguda por papilomavírus humano. A maioria das infecções por HPV, com a neoplasia mais branda (NIC-1), tende a desaparecer naturalmente no organismo. Uma pequena proporção de infecções resulta em displasia de médio e alto grau (NIC-2 e 3, respectivamente). Estas lesões

raramente regridem, e se não forem tratadas, freqüentemente progridem para câncer cervical (Figura 11B) [Moscicki et al, 2006; Bryan, 2007].

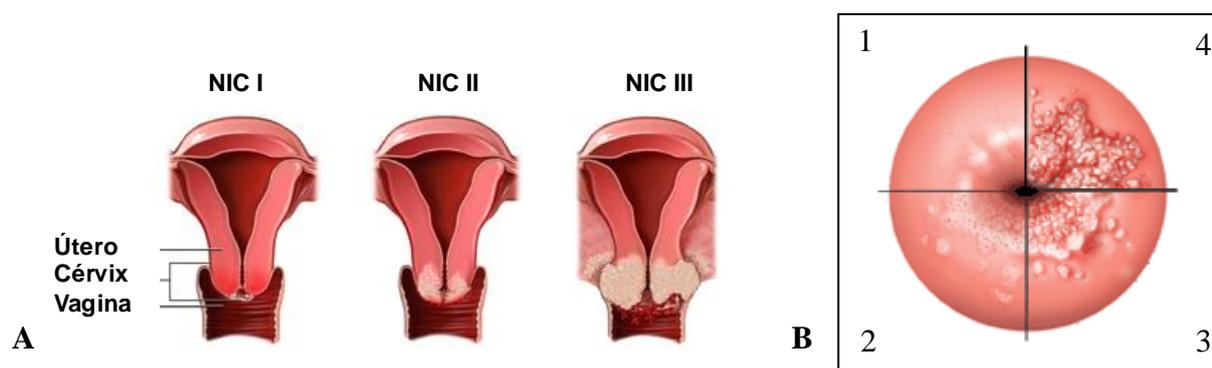


Figura 11. Evolução da lesão cervical pré-maligna ao câncer invasivo. A) Esquema do colo uterino com neoplasia intraepitelial cervical (adaptado de NMA, 2007). B) Esquema do colo uterino normal (1), com lesões de baixo grau (2), alto grau (3) e câncer cervical (4) [http://www.hopkinsmedicine.org/cervicaldysplasia/treatment_1.htm].

1.1.6. Vacinação profilática – *Virus-like particles*

Os vírus desenvolveram diversas formas e estratégias de replicação para sobreviver e replicar-se em um ambiente hostil. Porém nem todos os veículos montados por componentes virais contêm ácidos nucleicos, obrigatórios para o estabelecimento de infecção produtiva. Essas partículas semelhantes a vírus (*virus-like particles*, VLPs), representando conchas vazias são, contudo, ainda capazes de penetrar em células alvo e considera-se que são liberadas das células infectadas para induzir resposta imunológica do hospedeiro. Este fenômeno foi descrito exhaustivamente para células infectadas com o vírus da hepatite B, que produz partículas vazias de 22 nm compostas apenas pelo antígeno de superfície (HBsAg). Desde que essas partículas foram isoladas e caracterizadas pela primeira vez (Bayer et al, 1968), o conhecimento rápido e crescente das funções e estrutura de VLPs combinado com as habilidades da engenharia genética mostrou múltiplas oportunidades para a exploração de VLPs em vários campos de biologia molecular (Ludwig and Wagner, 2007).

VLPs têm sido produzidas para mais de 30 vírus diferentes que infectam humanos e outros animais (Noad & Roy, 2003). 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).

A proteína L1 têm a propriedade intrínseca de automontagem, contendo toda a informação necessária para a montagem de capsídeos vazios (Kirnbauer et al, 1992; Bishop et al, 2007a; Figura 12). As interações diméricas e triméricas entre os monômeros da proteína L1 dos capsômeros adjacentes são importantes para a montagem e estabilidade das VLPs (Chen et al, 2000; Stehle et al, 1996; Modis et al, 2002). A montagem das VLPs derivadas de L1 de HPV é reversível, pois as mesmas podem ser desmontadas e remontadas através de variações no pH, força iônica e potencial redox (i.e., concentração de agentes redutores, como ditioneitol) [McCarthy et al., 1998]. Considera-se que a montagem é iniciada pela dimerização dos capsômeros, seguida da adição sequencial e gradativa de capsômeros pré-formados até que a VLP seja completamente formada (Stehle et al., 1996).

VLPs de L1 são similares aos vírions do papiloma, tanto em estrutura quanto em imunogenicidade, e são fortes indutores de resposta de anticorpos neutralizantes (Christensen et al, 1994; Rose et al, 1994; Giannini et al, 2006).

Em junho de 2006, a vacina quadrivalente contra os HPVs 6, 11, 16 e 18 (GardasilTM) desenvolvida pela Merck Pharmaceuticals (Villa et al, 2005) foi aprovada pelo FDA (*Food and Drug Administration*). Outra vacina, bivalente (CervarixTM, contra HPVs 16 e 18), foi produzida pela GlaxoSmithKline Biologicals, e está sob análise pelo FDA. Essas vacinas são compostas de VLPs do antígeno capsidial L1, sem DNA (Christensen et al, 1994; Rose et al, 1994; Giannini et al, 2006).

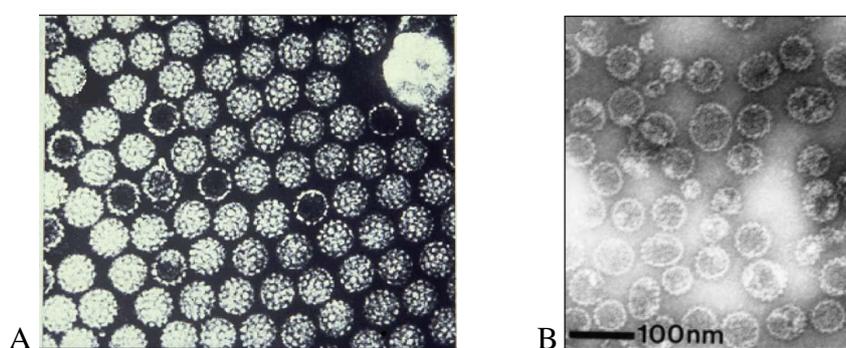


Figura 12. A) Partículas virais; B) *Virus-like particles* (VLPs) [adaptado de Stanley et al, 2006].

As vacinas de VLPs são administradas intramuscularmente, resultando em rápido acesso aos linfonodos locais, desta forma evitando as estratégias de fuga do sistema imune

que ocorrem durante o ciclo infeccioso intraepitelial. Além disso, as VLPs são bastante imunogênicas, e ativam respostas imunes tanto inatas quanto adaptativas (Harro et al, 2001).

Em alguns casos, VLPs parecem não requerer o uso de adjuvantes para alcançar forte estimulação imune. Os efeitos auto-adjuvantes dessas VLPs são inerentes por sua tendência em ter um tamanho adequado para fagocitose pelas células dendríticas, para processamento e apresentação pelo MHC (Complexo Maior de Histocompatibilidade) de classe II, assim como promover diretamente a maturação e migração de células dendríticas, essenciais para a estimulação da resposta imune inata (Fifis et al, 2004; Gamvrellis et al, 2004). Um esquema da produção de, e vacinação com VLPs de HPV é mostrado na Figura 13.

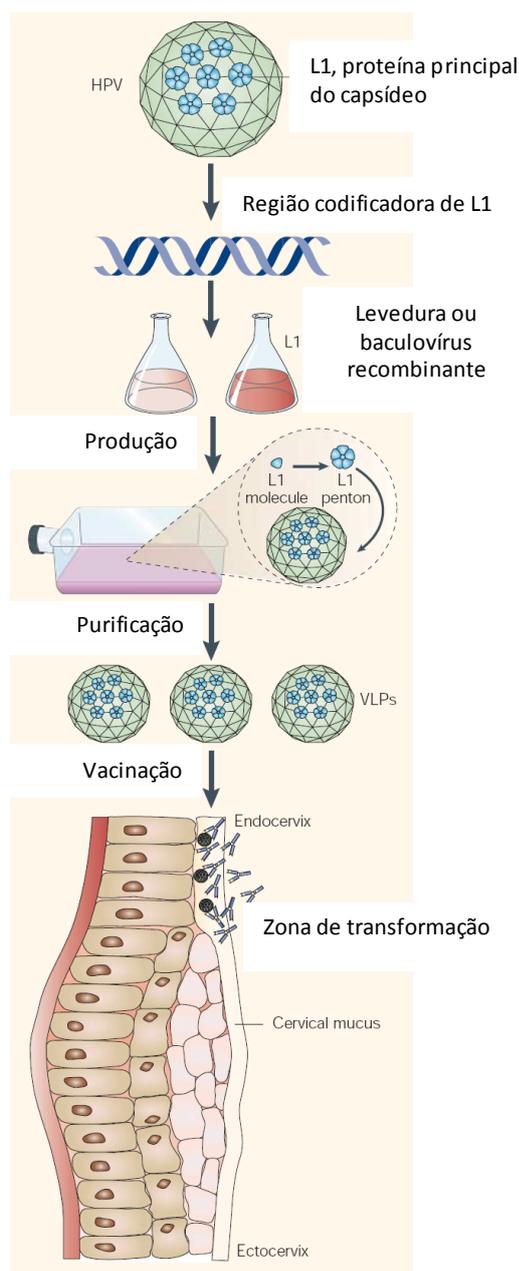


Figura 13. Representação esquemática da produção de, e vacinação com VLPs de papilomavírus humano (adaptado de Schiller and Davies, 2004).

1.2. Sistemas de expressão heteróloga

A demanda global de proteínas recombinantes tem acelerado constantemente nos últimos vinte anos. Essas proteínas recombinantes têm uma ampla abrangência de importantes aplicações, incluindo vacinas e medicamentos para animais e seres humanos, enzimas industriais, novos materiais e componentes de nanopartículas para diversas aplicações (Lico et al, 2008). Devido ao grande valor comercial de várias proteínas, encontrar meios para produzi-las eficientemente e em uma forma funcional tem sido o foco de muitos estudos (Macauley-Patrick et al, 2005).

A bactéria *Escherichia coli* tem sido exaustivamente utilizada como hospedeiro recombinante por várias razões, incluindo: (1) facilidade de rápida e precisa modificação do genoma, (2) crescimento rápido até altas densidades celulares, (3) facilidade de cultivo em meios de baixo custo, (4) facilidade de redução de atividade protease. *E. coli* pode acumular proteínas heterólogas em até 50% de seu peso celular seco (Swartz, 1996). Entretanto, há muitas desvantagens, tais como a inabilidade para modificações pós-traducionais, presença de pirógenos tóxicos na parede celular e formação de corpos de inclusão contendo a proteína heteróloga insolúvel e agregada (Demain & Adrio, 2008).

Células de mamífero são capazes de modificar compostos heterólogos fielmente de acordo com um padrão de mamíferos, entretanto, o procedimento de fermentação tem alto custo e o rendimento é muito mais baixo do que aqueles relatados para diversos sistemas microbianos. Além disso, células de mamífero são alvos potenciais para agentes virais infecciosos, o que força um controle rígido de todas as etapas de fermentação e purificação (Gellissen et al, 2005).

Células de inseto têm sido bastante utilizadas para a produção de proteínas recombinantes. Elas são mais fáceis de manipular do que células de mamífero, pois frequentemente não requerem soro no meio de cultura ou incubação em CO₂. Uma das vantagens desse sistema é de que a modificação pós-traducional de proteínas produzidas em células de inseto é similar àquela de mamíferos. Os sistemas de expressão baseados em células de insetos mais usados são os que utilizam baculovírus como vetor e os que utilizam linhagens de células transfectadas estáveis. O primeiro sistema apresenta altos níveis de expressão, no qual as células de inseto são infectadas por um baculovírus que carrega o gene de interesse, porém após um pico de expressão as células morrem e são lisadas, o que pode ser prejudicial às proteínas recombinantes produzidas devido à ação de proteases. No segundo sistema, a expressão é contínua e apresenta níveis de expressão variados. Essas linhagens são

obtidas pela transfecção das células com plasmídeos que carregam o gene de interesse, marca de resistência e promotores reconhecidos pelas células de insetos (McCarroll & King, 1997).

Culturas de tecido vegetal podem ser utilizadas para a produção de proteínas. Alguns de seus benefícios são a possibilidade de isolá-las continuamente do meio de cultura, e a facilidade do uso de condições esteréis. No entanto, outros avanços na produção e otimização no processamento *downstream* são necessários para que este sistema se torne comercialmente praticável (Gellissen et al, 2005).

A produção de proteínas heterólogas em leveduras permite um processamento mais similar ao encontrado em células animais, pois o ambiente intracelular da levedura é mais adequado para a ocorrência de várias reações que normalmente acontecem em células de mamíferos. Porém, algumas modificações pós-traducionais realizadas em células animais não ocorrem nesses organismos, o que pode alterar a estrutura funcional da proteína. A expressão heteróloga em leveduras é bem caracterizada e há várias técnicas de manipulação gênica disponíveis, além de possuir a melhor relação custo/benefício em eucariotos. É um sistema ideal para produção em larga escala de proteínas. *Saccharomyces cerevisiae* e *Pichia pastoris* são amplamente utilizadas como sistema de expressão heteróloga (Torres & Moraes, 2002; Brown, 2003). A Tabela 2 mostra alguns parâmetros para a escolha de um sistema de expressão.

Tabela 2. Parâmetros para a escolha de um sistema de expressão (adaptado de Gellissen et al, 2005).

<i>Sistema de expressão</i>	<i>Classificação</i>	<i>Pontes dissulfeto</i>	<i>Glicosilação</i>	<i>Secreção</i>	<i>Custos de fermentação</i>	<i>Uso de antibióticos</i>	<i>Custo de segurança</i>	<i>Processos desenvolvidos</i>	<i>Produtos no mercado</i>
Células de mamífero	eucarioto superior	sim	sim; tipicamente semelhante a humanos	possível	alto	não necessário	alto custo	escala industrial	sim
Células de plantas	eucarioto superior	sim	sim; fucose terminal	possível; restrições de tamanho	moderado	não necessário	baixo custo	escala piloto	sim
<i>Pichia pastoris</i>	levedura metilotrófica	sim	sim; sem α 1,3 manose terminal	possível	baixo	não necessário	baixo custo	escala industrial	sim
<i>Escherichia coli</i>	bactéria gram-negativa	(sim); no periplasma	não	secreção periplásmica	dependente de promotor-baixo a moderado	normalmente necessário	baixo custo	escala industrial	sim

1.2.1. *Pichia pastoris*

Pichia pastoris é um ascomiceto homotálico, que normalmente encontra-se haplóide no estado vegetativo e multiplica-se por brotamento multilateral (Cereghino & Cregg, 2000; Gellissen et al, 2005). É uma espécie de levedura metilotrófica, pois é capaz de utilizar metanol como única fonte de carbono (Kurtzman & Robnett, 1998). O primeiro passo no metabolismo metanólico é a oxidação do metanol a formaldeído, pela enzima álcool oxidase (AOX - codificada pelos genes *AOX1* e *AOX2*, sendo o primeiro, responsável pela maior quantidade da enzima na célula), processo em que é gerado peróxido de hidrogênio. Para evitar sua toxicidade, este início do metabolismo ocorre no peroxissomo (Veenhuis et al, 1983).

Na década de 70, a *P. pastoris* foi utilizada com o intuito de servir como fonte de alimentação animal, já que o metanol era uma fonte de custo relativamente baixo (Wegner, 1990). No entanto, a crise do petróleo inviabilizou a produção de *Single cell protein* – SCP devido ao aumento nos custos de produção do metanol. A partir de então, *P. pastoris* passou a ser utilizada como um hospedeiro para expressão de proteínas heterólogas. Em 1993, a patente deste sistema foi passada para a RCT (*Research Corporation Technology*- Tucson, AZ), e a *Invitrogen Corporation* (Carlsbad, CA, USA) foi licenciada para vender o sistema de expressão na forma de kit (Macauley-Patrick et al, 2005; Cereghino & Cregg, 2000).

A produção de proteínas em *P. pastoris* é baseada na utilização do promotor do gene *AOX1*. A expressão do gene *AOX1* é controlada no nível da transcrição, e é fortemente induzida por metanol (Ogata et al, 1969; Tschopp et al, 1987; Cregg et al, 1989). A maioria dos vetores possuem um cassete de expressão composto pela seqüência promotora do gene *AOX1* (*AOX1 5'*), um ou mais sítios de clonagem para inserção do gene heterólogo, uma seqüência de término da transcrição do gene *AOX1* e seqüências para integração no genoma, para seleção e secreção (Daly & Hearn, 2005).

O vetor comercial pPICZ é um dos mais utilizados para expressão em *P. pastoris*. Este vetor apresenta duas seqüências que possibilitam estratégias diferentes de detecção e recuperação da proteína heteróloga produzida. A primeira delas refere-se ao epítipo C-myc, cuja fusão à proteína recombinante permite a sua imunodetecção por anticorpo anti-myc. A outra seqüência está relacionada à cauda de poli-histidina, cujo epítipo C-terminal possibilita tanto a detecção através do anticorpo anti-His quanto a purificação da proteína recombinante através de cromatografia por afinidade (Torres & Moraes 2002; Invitrogen, 2007).

Os recombinantes podem apresentar diferentes fenótipos de acordo com o tipo de integração do vetor. Existem três fenótipos quanto à utilização de metanol: Mut⁺, Mut^s e Mut⁻. O Mut⁺ (*Methanol utilization plus*) cresce na mesma velocidade do fenótipo selvagem e

suporta altas taxas de metanol para cultivo em larga escala. O Mut^s (*Methanol utilization slow*) possui o gene *AOX1* interrompido, dessa forma as células contam apenas com o *AOX2* para o metabolismo do metanol, o que resulta em uma linhagem de crescimento lento já que *AOX2* é normalmente menos expresso que *AOX1*. O Mut⁻ (*Methanol utilization minus*) é inviável para crescimento em metanol, pois as linhagens têm ambos os genes *AOX* deletados (Macauley-Patrick et al, 2005).

O sistema de expressão baseado nas células de *P. pastoris* apresenta características peculiares que exercem algumas vantagens sobre os outros. As suas células podem produzir grandes quantidades de proteínas, no espaço intracelular ou extracelular; atingem altas densidades em meios mínimos e de baixo custo e realizam modificações pós-traducionais semelhantes aos mamíferos (Macauley-Patrick et al, 2005). As técnicas requeridas para manipulação genética de *P. pastoris* são similares às descritas para *S. cerevisiae*. *P. pastoris* pode, por exemplo, ser transformada por eletroporação, métodos de geração de esferoplastos ou métodos de célula intacta, tais como os que envolvem cloreto de lítio e PEG (polietilenoglicol) [Cregg & Russell, 1998].

O cultivo de *P. pastoris* pode ser feito em larga escala e os parâmetros que influenciam a produção e atividade da proteína, como pH, aeração e quantidade de carbono, podem ser bem controlados (Higgins and Cregg, 1998). Além disso, esta levedura não é uma forte fermentadora, como *Saccharomyces cerevisiae* e conseqüentemente não atinge com rapidez níveis tóxicos de etanol e ácido acético para as células (Cereghino et al, 2002). Outra vantagem é a possibilidade de reprimir a expressão da proteína heteróloga (se for tóxica à célula, em altos níveis) já que o promotor *AOX1* é fortemente reprimido nas células que crescem com glicose e outras fontes de carbono, sendo induzido cerca de mil vezes quando as células são submetidas a um meio onde o metanol é a única fonte de carbono (Cereghino et al, 2002).

O sistema de expressão em *Pichia pastoris* tem sido amplamente utilizado para produção de uma grande variedade de 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 e albumina sérica humana. 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. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Este projeto teve como objetivo a expressão do gene L1 de HPV 18 e HPV 33 em células da levedura *Pichia pastoris* para a produção de *virus-like particles* (VLPs).

2.2. Objetivos específicos

- Clonagem do gene L1 de HPV 18 e HPV 33 em vetor de expressão pPICZA (Invitrogen);
- Transformação da levedura *Pichia pastoris* com as construções obtidas;
- Avaliação da produção da proteína L1 de HPV 18 e HPV 33.

3. Material e Métodos

3.1. Material

3.1.1. Obtenção do gene L1

O gene L1 de HPV 18 foi obtido através de PCR, a partir do plasmídeo pBR322 contendo o genoma completo do vírus (clonado a partir de amostra européia); o gene L1 de HPV 33 foi amplificado a partir de amostra clínica (proveniente do Departamento de Tocoginecologia da UNIFESP-SP).

3.1.2. Linhagens de microrganismos

Escherichia coli TOP 10 genótipo [F' {*proAB*, *lacIq*, *lacZ*ΔM15, *Tn10* (TetR)} *mcrA*, Δ(*mrr-hsdRMS-mcrBC*), φ80*lacZ*ΔM15, Δ*lacX74*, *deoR*, *recA1*, λ-*araD139*, Δ(*ara-leu*)7697, *galU*, *galK*, *rpsL*(StrR), *endA1*, *nupG*] e *Pichia pastoris* X33 (tipo selvagem) foram obtidas da Invitrogen Corporation (Califórnia, EUA). Como controle positivo, foi utilizada a *Pichia pastoris* GS115 (His⁻) recombinante contendo o gene L1 de HPV 16 (Coimbra et al, 2007) foi utilizada.

3.1.3. Soluções

Solução I: Glicose 50mM, Tris-HCl 25mM, EDTA (Ácido Tetracético Etilenodiamina) 10mM (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 de lise celular: PBS 1X, EDTA 1mM, glicerol 5% (v/v); Solução tampão de transferência: Tris-glicina 1X, SDS 1%, etanol 20%.

3.1.4. Composição dos meios de cultura

Luria-Bertani (LB) *Low Salt*: Triptona 1%, extrato de levedura 0,5%, NaCl 0,5%, pH 7,5 (para meio sólido, foram acrescentados 15 g/L de ágar); YPD: extrato de levedura 1%, peptona 2%, glicose 2% (para meio sólido, foram acrescentados 20 g/L de ágar); YPDS:

extrato de levedura 1%, peptona 2%, glicose 2%, sorbitol 1M (para meio sólido, foram acrescentados 20 g/L de ágar); BMGY – *Buffered Glycerol-complex Medium* (extrato de levedura 1%, peptona 2%, fosfato de potássio 100mM, pH 6.0, YNB 1,34%, biotina $4 \times 10^{-5}\%$, glicerol 1%); BMMY – *Buffered Methanol-complex Medium* (extrato de levedura 1%, peptona 2%, fosfato de potássio 100mM, pH 6.0, YNB 1,34%, biotina $4 \times 10^{-5}\%$, metanol 1%).

3.1.5. Enzimas, kits e marcadores

Foram utilizados enzimas e kits da Promega Corporation (Madison, EUA): *Xho* I, T4 DNA ligase, vetor pGEM-T *Easy*, kit *Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System*, kit *Wizard Plus SV Minipreps DNA Purifications System*. Foram obtidos da Invitrogen Corporation (Califórnia, EUA): vetor de expressão em células de *Pichia pastoris* pPICZA, Xgal, IPTG, RNase, dNTPs, *Taq* DNA Polimerase, marcador Lambda *Hind* III e Marcador 1 Kb *plus*, kit *Purification and Quantification PureLink*, antibiótico ZeocinaTM. A enzima de restrição *Bst* BI foi adquirida da New England BioLabs Inc. (EUA) e a enzima *Triple Master* DNA polimerase foi adquirida da Eppendorf (EUA). O marcador Color Burst para eletroforese de proteínas foi obtido da Sigma (Missouri, EUA).

3.1.6. Géis de agarose

Os géis de agarose utilizados foram preparados na concentração de 0,8% em TAE 1X. As corridas foram realizadas a 5 V/cm, por 30 minutos. Posteriormente, os géis foram corados em Brometo de Etídeo e visualizados em transiluminador de luz ultravioleta.

3.2. Métodos

3.2.1. Construção dos vetores de clonagem e expressão

3.2.1.1. Desenho de primers

Os primers foram construídos com base nas seqüências dos genes L1 de HPV 18 e 33, depositadas em bancos de dados (GenBank acessos gi:194272988 e gi:333049, respectivamente). Os primers *forward* foram desenhados de modo a conterem a seqüência consenso de leveduras (seqüência de Kozak) e um sítio de restrição para *Bst*BI no terminal 5'.

Os *primers* reversos continham um sítio de restrição terminal para *Xho*I, e o códon de parada do gene L1 foi removido para que futuramente houvesse ligação a uma cauda de poli-histidina (6-His). Os sítios de restrição foram incluídos com a finalidade de direcionar a posterior clonagem com o vetor de expressão em *Pichia pastoris*, pPICZA (Tabela 3).

Tabela 3. Seqüências dos *primers* utilizados para amplificação do gene L1 de HPV 18 e 33.

	Seqüência 5' - 3'
L1 HPV 18	<i>F_w</i> GATTCGAAAAAATGTGCCACGGGTCC <i>Rev</i> GTCCCTCGAGTTCCTGGCACGTACACG
L1 HPV 33	<i>F_w</i> GATTCGAAAAAATGTCCGTGTGGCGGCCTAG <i>Rev</i> TCCCTCGAGTTTTTAACCTTTTTGCG

Bases extras para eficiência de clivagem; Sítios de restrição; Seqüência Consenso.

3.2.1.2. Extração de plasmídeo bacteriano pBR322HPV18

O genoma completo do HPV 18 clonado em pBR322 foi transformado em *E. coli* DH5 α para ser amplificado e posteriormente purificado.

As células bacterianas foram cultivadas em 20 mL de meio LB líquido, contendo ampicilina (100 μ g/mL) e incubadas a 37°C por 16 horas com agitação (160 rpm). Após o crescimento bacteriano, 1,5 mL da cultura foi transferido para microtubo de 1,5 mL e centrifugado a 13.000 rpm por 1 min a temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado; este procedimento foi repetido quatro vezes.

O sedimento bacteriano foi ressuspensionado em 100 μ L de solução I gelada (Glicose 50mM, Tris-HCl 25mM, e EDTA 10mM) estéril por meio de agitação em vórtex. A solução I garante a ressuspensão das células sem a ocorrência de lise. Em seguida, foram adicionados 200 μ L de solução II recém preparada (NaOH 0,2M, SDS 1%) e misturado gentilmente por inversão de 4 a 5 vezes. A solução II promove a lise alcalina das células bacterianas, uma vez que contém detergente e hidróxido de sódio, solubilizantes dos lipídeos das membranas das células. O material permaneceu no gelo por 5 min, e em seguida foi adicionada a solução III gelada (Acetato de Potássio 5M), homogeneizando-se completamente por inversão, para incubação por 5 min no gelo. A solução III é utilizada para a neutralização do pH do lisado e formação de duas fases (um precipitado contendo proteínas e DNA cromossômico e uma fase aquosa correspondente ao DNA plasmidial de interesse).

O microtubo foi centrifugado (13.000 rpm, 5 min, temperatura ambiente) para que houvesse precipitação do lisado celular e assim ser possível a remoção da fase aquosa. Este sobrenadante foi transferido para um novo tubo e foram adicionados 2 volumes de etanol absoluto. Neste ponto a reação foi mantida por 2 minutos a temperatura ambiente e então centrifugada a 13.000 rpm por 5 min para precipitação do DNA. Ao precipitado foi adicionado 1 mL de etanol 70% gelado. Repetindo-se a centrifugação por mais 5 minutos (13.000 rpm, temperatura ambiente), o sedimento foi posto para secar por 30 minutos na estufa a 37°C.

O DNA foi ressuspendido em 30 µL de H₂O MilliQ contendo RNase (20 µg/mL) e incubado por 30 min a 37°C. O produto da reação foi submetido à análise em gel de agarose, sendo posteriormente guardado em freezer a -20°C.

3.2.1.3. Confirmação da presença do genoma de HPV 18 no plasmídeo pBR322HPV18

Dois sítios de restrição da enzima *EcoRI* flanqueiam a região onde foi clonado o genoma de HPV 18. Para confirmar a presença do inserto, o plasmídeo pBR322HPV18 foi digerido com a enzima *EcoRI* (37°C, 16 h), e as bandas correspondentes ao vetor e ao genoma viral (~7,9 Kb) foram visualizadas por eletroforese em gel de agarose 0,8% (5 V/cm, 30 min).

3.2.1.4. Amplificação do gene L1 de HPV 18 e 33

O plasmídeo pBR322H18 e a amostra clínica contendo DNA de HPV 33 foram submetidos a reações de PCR com a enzima *Taq* DNA polimerase comum, para identificação da temperatura ótima de anelamento.

Posteriormente, uma reação de PCR com enzima *Taq* polimerase de alta fidelidade *Triple Master* (Eppendorf) foi realizada, com temperatura de anelamento de 56°C para o gene L1 de HPV 18 e 57°C para L1 de HPV 33. O produto de PCR foi analisado através de corrida eletroforética (gel de agarose 0,8% em tampão TAE a 100 V por 30 minutos).

As etapas de purificação dos produtos de PCR ocorreram de acordo com as instruções do protocolo do *kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega).

3.2.1.5. Clonagem em vetor pGEM

Os genes L1 de HPV 18 e 33 purificados e o vetor pGEM-T *Easy* (Promega) foram usados em uma reação de ligação na proporção de 3:1 (vetor:inserto, respectivamente) na presença da enzima T4 DNA ligase (3U/ μ L, Promega), tampão 1X da enzima (5 μ L, 2X), vetor (1 μ L, 50 ng), inserto (0,6 μ L, 85 ng) e H₂O (2,4 μ L); para um volume final de 10 μ L. A reação foi processada a 23°C por 3 horas.

Para transformação bacteriana com as construções pGEML1H18 e pGEML1H33, uma reação padrão foi preparada previamente contendo 25 μ L de tampão de transformação (CaCl₂ 50mM) e 50 μ L de células competentes *E. coli* TOP10. O próximo passo foi a adição do produto da ligação (10 μ L) anteriormente citado. Após incubação no gelo por 30 minutos, as células foram submetidas a um choque térmico a 42°C por 3 minutos e rapidamente transferidas para o gelo, onde permaneceram por 1 minuto. As células foram submetidas a um processo de recuperação onde foi acrescentado 900 μ L de meio LB líquido sem antibiótico por 45 minutos a 37°C. Os tubos foram centrifugados (5000 rpm, 5 min, temperatura ambiente) para precipitação das células. Parte do sobrenadante foi descartada através de pipetagens, e as células foram plaqueadas em meio sólido (LB + ágar bacteriológico 1,4%) contendo Xgal (20 mg/mL), IPTG (40 μ g/mL) e ampicilina (100 μ g/mL). As placas foram incubadas a 37°C por 16 horas e posteriormente guardadas no refrigerador até serem analisadas.

As colônias brancas foram analisadas por mini extração plasmidial (*kit Wizard Plus SV Minipreps DNA Purifications System* - Promega), e os plasmídeos foram submetidos a digestões, tanto para confirmação da presença do inserto clonado quanto para a preparação para ligação com o vetor de expressão pPICZA. As enzimas utilizadas foram *Xho* I (10 U/ μ L, 37°C, Promega) e *Bst* BI (20 U/ μ L, 65°C, New England BioLabs). Após as digestões, os produtos foram purificados com o *Kit Wizard SV Gel and PCR clean-up System* diretamente do gel de agarose, por meio de excisão da banda correspondente ao gene L1.

3.2.1.6. Clonagem em vetor pPICZA

O produto da ligação entre L1H18 e pPICZA, assim como L1H33 e pPICZA (todos digeridos com as enzimas *Bst* BI e *Xho* I) foram utilizados em reações de transformação química em *E. coli* TOP 10. As células transformadas foram plaqueadas em meio sólido

contendo ZeocinaTM (25 µg/mL). As colônias obtidas foram analisadas por mini extração plasmidial (*kit Wizard Plus SV Minipreps DNA Purifications System* – Promega). Reações de PCR com *primers* específicos para L1 de HPV 18 e L1 de HPV 33 foram realizadas a fim de se confirmar a presença do inserto.

3.2.1.7. Sequenciamento

O sequenciamento foi realizado com o método dideoxi de terminação de cadeia, utilizando-se o sequenciador automático ABI 3100 (Applied Biosystem, USA). Os vetores de passagem e de expressão contendo o inserto foram submetidos a uma reação de sequenciamento utilizando-se *primers* AOX1: (*forward* 5' GACTGGTTCCAATTGACAAGC 3', *reverse* 5' GCAAATGGCATTCTGACATCC 3') e *primers* internos (*forward* H18 5' ATGGTAGATACTGGATATGGTGC 3' e *reverse* H18 5' CTGCTATACTGCTTAAATTTGGTAG 3'; *forward* H33 5' GGAACATTGGGGTAAAGGTGTTGC e *reverse* H33 5' CCACAGTAACAAATACC TGATTGCC 3'). Os *primers* AOX1 anelaram fora da região do gene de interesse flanqueando-o, e os *primers* internos anelaram dentro da seqüência do gene trabalhado, para permitir a verificação da matriz de leitura do inserto com a cauda de histidina.

3.2.2. Transformação de *Pichia pastoris*

Os plasmídeos recombinantes pPICZAL1 foram linearizados por digestão com *SalI* (New England Biolabs) por 4 h a 37°C. Os plasmídeos pPICZL1H18, pPICZL1H33 e pPICZ (vetor vazio) foram usados para transformação da linhagem X33 de *P. pastoris* por eletroporação.

Para a preparação de células eletrocompetentes, foram realizados os seguintes procedimentos: a levedura *P. pastoris* (linhagem X33, tipo selvagem) foi cultivada em 10 mL de meio YPD *overnight* (pré-inóculo), para posterior crescimento em 500 mL de meio YPD. Após 24 h (DO₆₀₀ = 1,1), as células foram coletadas por centrifugação (1500g por 5 min a 4°C) e lavadas duas vezes com água destilada estéril e uma vez com sorbitol 1M. A ressuspensão foi feita em 1 mL de sorbitol 1M e as células foram mantidas no gelo.

Para a eletroporação, 5-10 µg de DNA foram homogeneizados com 80 µL de células eletrocompetentes através de ressuspensões. Este material foi transferido para uma cubeta pré-

resfriada e incubado no gelo por 5 min. A cubeta foi inserida no eletroporador (Multiporator, Eppendorf) para transformação (1500V, 5 ms). Imediatamente após o procedimento, 1 mL de sorbitol gelado foi adicionado à cubeta. A amostra foi transferida para um tubo de 15 mL estéril e incubada por 2 h a 30 °C. Alíquotas de 10, 25, 50, 100 e 200 µL foram espalhadas em placas YPDS contendo 100 µg/mL de Zeocina para incubação a 30°C por 2–3 dias.

3.2.3. PCR de colônia

Uma PCR foi realizada diretamente das colônias de *P. pastoris* em placa. Uma colônia única foi homogeneizada com 24 µL de água MilliQ para incubação a 65°C, por 2 min. Uma alíquota de 1 µL foi usada para a reação de amplificação com os *primers* AOX1 (10 pmol/µL). Depois de uma incubação a 95°C por 5 min, a *Taq* polimerase (0.8 U) foi adicionada. A reação consistiu de 30 ciclos (1 min a 95°C, 1 min a 54°C e 1 min a 72°C, com uma extensão final de 7 minutos a 72°C). Os *primers* para amplificação da região AOX foram *Fwd* 5'GACTGGTTCCAATTGACAAGC 3' and *Rev* 5'CAAATGGCATTCTGACATCC 3'.

3.2.4. Expressão do gene L1

Os clones *Pichia pastoris* foram selecionados para testes de crescimento e indução da proteína heteróloga, e a linhagem X-33 transformada com vetor sem inserto foi usada como controle negativo. As colônias foram inoculadas em meio BMGY (*Buffered Glycerol-complex Medium*) para crescimento por 16-24 h a 28-30°C para produção de biomassa. O volume de meio utilizado foi equivalente a 10% do volume total do frasco. Para a indução, a cultura deveria estar em uma DO600 de 20-30. Nesse momento, o material foi submetido à centrifugação (3000g, 5 min, temperatura ambiente) para que o meio com glicerol pudesse ser removido, e as células foram ressuspensas em meio BMMY (*Buffered Methanol-complex Medium*). A indução durou 96 h, com adição de metanol (concentração final de 2%) a cada 24 h. Antes da adição de metanol, um volume de 1mL era centrifugado e os *pellets* estocados a -80°C, para análises subsequentes.

3.2.5. Análise da transcrição do gene L1

Os *pellets* dos clones induzidos, estocados a -80°C , foram usados para extração de RNA total pelo método fenol ácido, de acordo com Schmitt et al, 1990. A síntese de cDNA foi realizada com 1pg-1µg de RNA, 0,1µg de oligoDT (Promega) e H_2O MilliQ, em um volume final de 5µL para incubação a 70°C por 5 min, e posteriormente incubação no gelo por 5 min. Em seguida, foram adicionados tampão de reação (1x), MgCl_2 (3mM), RNAsin (20 U), DNTP (0,5mM) e Transcriptase Reversa (5U) para incubação a 42°C , por 1 hora, e 70°C , por 15 min. A amplificação por RT-PCR (Reação em Cadeia da Polimerase / Transcriptase Reversa), usando-se 2 µL de cDNA, tampão de reação (1x), dNTP (0,08mM), MgCl_2 (1 mM), *Taq* DNA polimerase (2,5U), *primers* internos (15 pmol cada) e H_2O MilliQ, para um volume final de 25 µL. Os *primers* usados foram desenhados com base na sequência interna do gene L1, resultando em um produto de amplificação de 500 pb.

3.2.6. Análise da expressão da proteína L1

Os clones positivos para transcrição do gene L1 foram inoculados para uma nova análise de indução do gene e produção da proteína recombinante por eletroforese de proteínas e dot blot. O crescimento e a indução ocorreram sob as mesmas condições descritas no item 3.2.4. Uma versão modificada (com relação ao volume utilizado) do método de Bradford (1976) foi utilizada para a determinação da concentração protéica. As proteínas (40 µg por poço) foram submetidas a uma eletroforese em gel SDS-PAGE (12,5%), e coradas com Coomassie blue. O protocolo do dot blot foi realizado da seguinte maneira: ligação das proteínas intracelulares totais da levedura (0,9 µg) na membrana de nitrocelulose por 1h; lavagem com PBS por 5 min; bloqueio com leite desnatado 2,5% por 40 min; lavagem com PBS por 5 min; adição de anticorpo (Anti-His conjugado à fosfatase alcalina 1 µg/mL diluído 1:20.000 em leite 5%; Sigma; e Anti-L1 CAMVIR-1, 1 µg/mL; Chemicon International), para 1h de incubação a 37°C ; três lavagens com PBS-Tween (10 min cada); adição de anticorpo secundário conjugado à peroxidase (apenas para ensaio com Ac Anti-L1) e revelação com NBT/BCIP (*Nitro blue tetrazolium chloride/5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate, toluidine salt*) para reação com anticorpo Anti-His. O dot blot com Anti-L1 foi revelado após adição do cromógeno TMB (tetra metil di-hidrocloro de benzidina, Sigma, USA) dissolvido em metanol e adicionado de tampão citrato pH 4,0 e H_2O_2 , após incubação por 1 hora a 65°C . A

reação foi observada após 15-20 min, no escuro e interrompida por lavagem da membrana com água destilada.

3.2.7. Purificação e diálise das proteínas

O extrato protéico foi purificado através de coluna de níquel com o *Ni-NTA Spin Kit* (Qiagen), para facilitar a detecção da proteína L1. As amostras foram eluídas em tampão com alta concentração (8M) de uréia, o que interfere nas análises imunológicas. O material purificado foi submetido a uma diálise e liofilização para realização de novos testes.

4. Resultados

4.1. Construção dos vetores

4.1.1. Obtenção do genoma de HPV18

A extração foi efetuada e a construção plasmidial de 12,2 Kb correspondente ao vetor pBR322 (4,2 Kb) mais o inserto (genoma viral – 8 Kb) foi obtida com sucesso (Figura 14). Para obtenção do genoma do vírus, a banda de 8 Kb foi excisada e purificada a partir do gel de agarose.

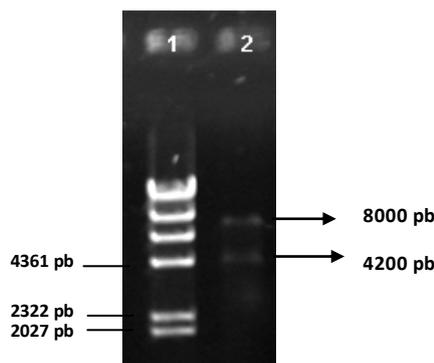


Figura 14. Extração e digestão de plasmídeo pBR322H18. Poço 1: marcador lambda *Hind* III, poço 2: genoma HPV 18 (8000 pb) e pBR322 (4200 pb).

4.1.2. Amplificação do gene L1 de HPV 18

Após a digestão e confirmação da presença do genoma viral de HPV 18 nos clones, o material foi submetido a uma amplificação com *primers* específicos. O resultado da amplificação foi uma banda de 1,7 Kb correspondente ao gene L1 (Figura 15).

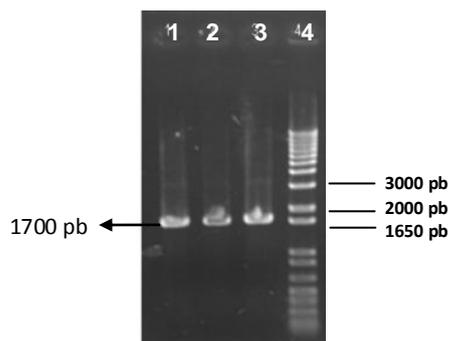


Figura 15. PCR do gene L1 de HPV 18 com polimerase de alta fidelidade. Poços 1-3: gene L1 de HPV 18; poço 4: Marcador molecular 1 Kb *plus*.

4.1.3. Amplificação do gene L1 de HPV 33

O gene L1 de HPV 33 foi amplificado a partir do DNA viral presente em amostra clínica positiva para HPV 33. O resultado da amplificação foi uma banda de 1,5 Kb correspondente ao gene L1 (Figura 16).

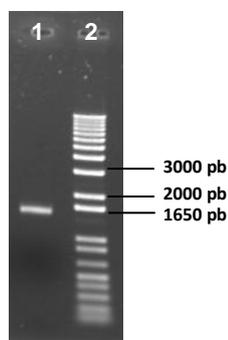


Figura 16. PCR do gene L1 de HPV 33 com polimerase de alta fidelidade. Poço 1: gene L1 de HPV 33; poço 2: Marcador molecular 1 Kb *plus*.

4.1.4. Lição e transformação bacteriana com as construções pGEML1H18 e pGEML1H33

Três clones pGEML1H18 (colônias 2, 4 e 5; Figura 17A) e seis clones pGEML1H33 foram obtidos, dos quais três são mostrados na Figura 17B.

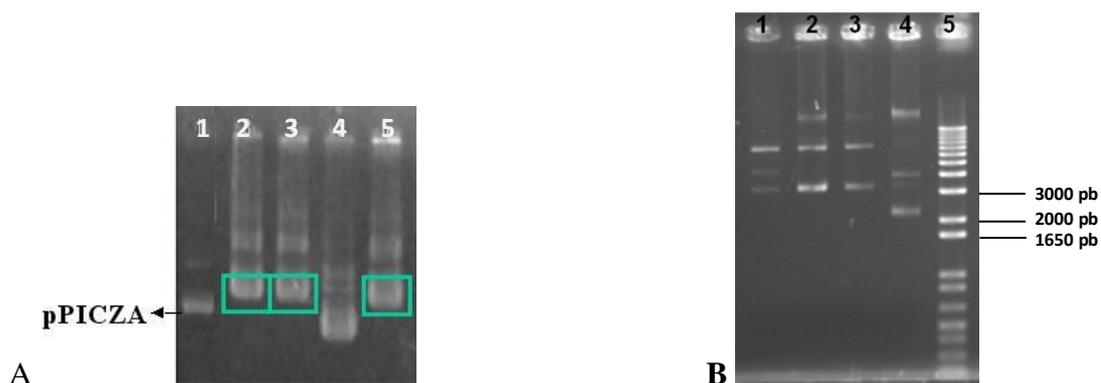


Figura 17. Extração plasmidial das colônias clonadas com os plasmídeos pGEML1. A) pGEML1H18. Poço 1: pPICZA (3,3 Kb) foi utilizado como controle; poços 2, 3 e 5: pGEM com inserto L1H18; poço 4: controle negativo (vetor sem inserto). B) pGEML1H33. Poços 1-3: pGEM com inserto L1H33, poço 4: controle negativo (vetor sem inserto); poço 5: Marcador molecular 1 Kb *plus*.

O procedimento de subclonagem de L1 no vetor de expressão pPICZA foi realizado subsequentemente à análise dos clones pGEML1H18 e pGEML1H33 por meio de seqüenciamento com os *primers* L1 *Forward* e L1 *Reverse*.

4.1.5. Análise das construções pPICZAL1H18 e pGEML1H33

O gene L1 extraído foi amplificado, purificado e digerido com as enzimas *Bst*BI e *Xho*I. Paralelamente, o vetor pPICZA também foi digerido com as mesmas enzimas após extração e purificação (Figura 18).

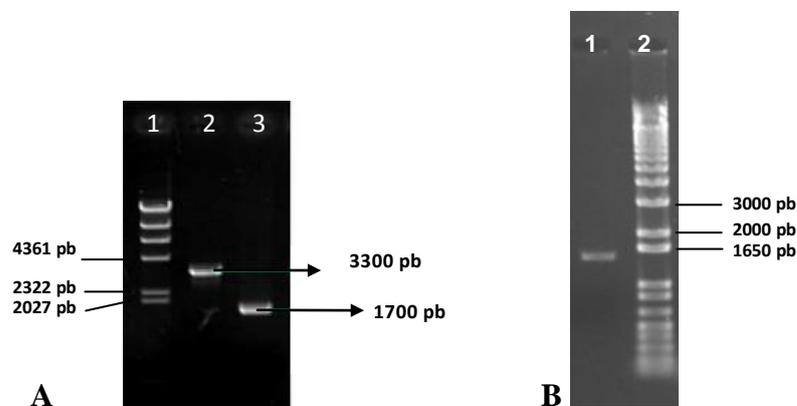


Figura 18. A) Purificação de pPICZA e L1 HPV 18 digeridos com *Bst*BI / *Xho*I. Poço 1: marcador lambda *Hind* III; poço 2: pPICZA digerido; poço 3: L1 HPV 18 digerido. B) Purificação de L1 HPV 33 digerido com *Bst* BI / *Xho* I. Poço 1: L1 HPV 33 digerido; poço 2: Marcador molecular 1 Kb plus.

Foram obtidos aproximadamente 20 possíveis clones com a construção pPICZAL1H18 (Figura 19A) e 11 possíveis clones pPICZAL1H33, dos quais dois são mostrados na Figura 19B.

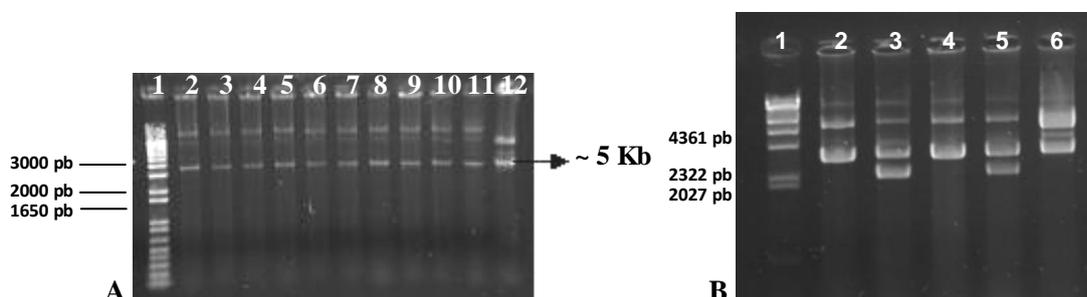


Figura 19. A) Extração das colônias clonadas com pPICZAL1H18. Poço 1: Marcador 1kb *Plus* (Invitrogen); poços 2-11: construção pPICZAL1H18; poço 12: controle positivo (clone BPV1). B) Extração das colônias clonadas com pPICZAL1H33. Poço 1: Marcador Lambda *Hind* III; poços 2 e 4: construção pPICZAL1H33; poços 3 e 5: pPICZA sem inserto; poço 6: controle positivo (clone BPV1).

As colônias obtidas foram analisadas também por meio de digestão enzimática, PCR (*primers* L1 *Forward* e L1 *Reverse*; Figura 20); e sequenciamento (*primers* *AOX1* 5' e *AOX1* 3').

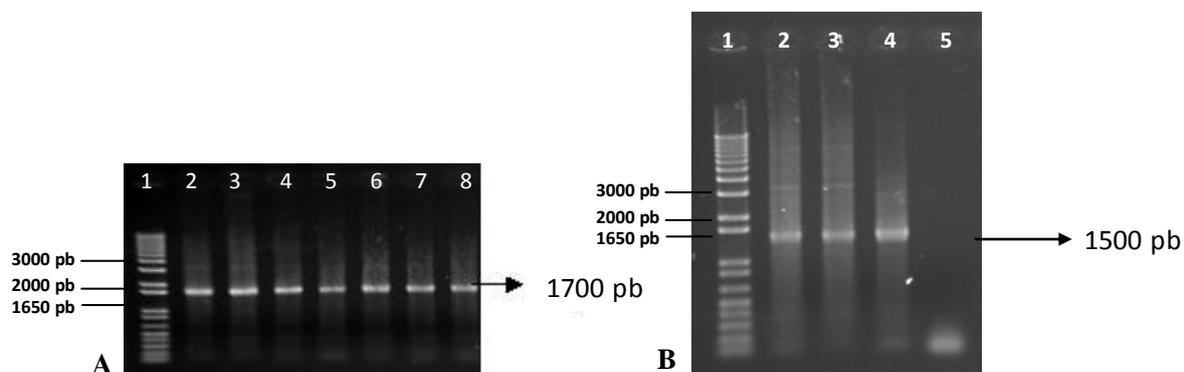


Figura 20. Confirmação da clonagem no vetor de expressão pPICZA por PCR. A) PCR da construção pPICZA com o gene L1 de HPV 18. Poço 1: Marcador 1kb *Plus* (Invitrogen); poços 2-8: gene L1 HPV 18. B) PCR da construção pPICZA com o gene L1 de HPV 33. Poço 1: Marcador 1kb *Plus*; poços 2-3: gene L1 HPV 33; poço 4: Controle positivo; poço 5: controle da reação.

4.2. Transformação da levedura *Pichia pastoris* e análise dos recombinantes

4.2.1. Extração plasmidial

Aproximadamente 5-10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de DNA dos clones com as construções pPICL1H18 e pPICL1H33 foram linearizados com a enzima *SacI* (Figura 21A). O material linearizado foi purificado e concentrado (Figura 21B).

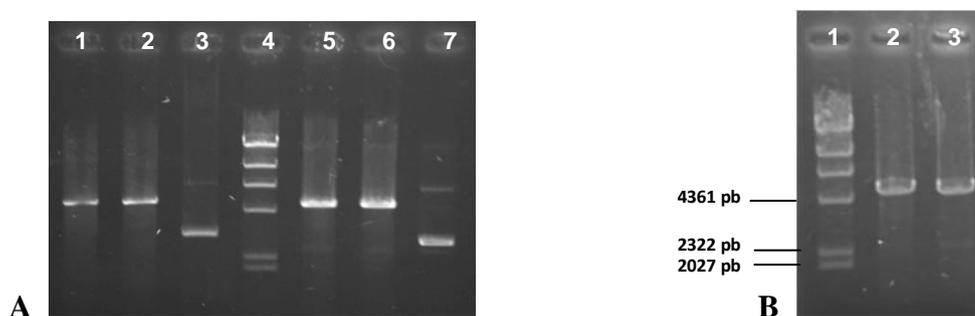


Figura 21. Linearização do DNA para transformação em *Pichia pastoris*. A) Poços 1 e 2: pPICZAL1H18 digerido com *SacI*; poço 3: pPICZAL1H18 não digerido; poço 4: Marcador Lambda *Hind III*; poços 5 e 6: pPICZAL1H33 digerido com *SacI*; poço 7: pPICZAL1H33 não digerido. B) Poço 1: Marcador Lambda *Hind III*; poço 2: pPICZAL1H18 digerido com *SacI* após purificação e concentração a vácuo; poço 3: pPICZAL1H33 digerido com *SacI* após purificação e concentração a vácuo.

4.2.2. Eletroporação

A análise dos clones foi feita por crescimento em placas YPDS com 100 $\mu\text{g/mL}$ de zeocina (Figura 22), e PCR de colônia (Figura 23; Linder et al, 1996).

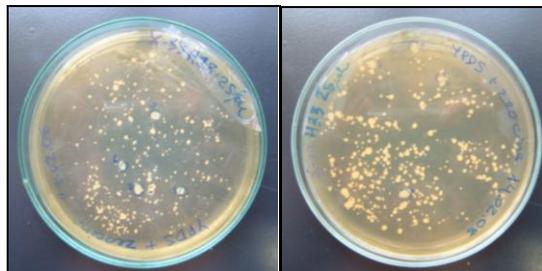


Figura 22. Placas com *Pichia pastoris* transformadas por eletroporação com as construções pPICZAL1H18 e pPICZAL1H33, respectivamente.

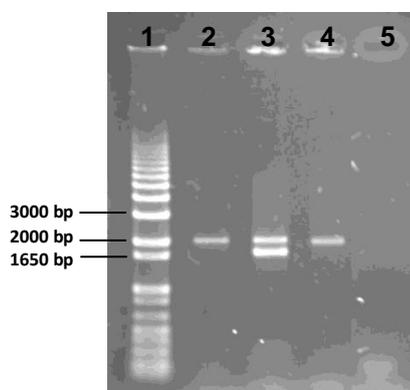


Figura 23. PCR de colônia utilizando-se *primers* AOX1, que amplificam o gene de interesse mais um fragmento de aproximadamente 300pb. Poço 1: Marcador 1kb *Plus* (Invitrogen); poço 2: recombinante X33/pPICZL1H18, com o tamanho esperado do gene de interesse clonado no pPICZA (1700pb + 300pb = 2000pb); poço 3: recombinante X33/pPICZL1H33, mostrando o produto de 1800bp (1500bp + 300bp) e o gene selvagem AOX1 (2200pb); poço 4: controle positivo, recombinante GS115/pPICZL1H16 (1500pb + 300pb = 1800pb); poço 5: controle de reação (sem DNA).

Analisando-se os recombinantes, pode-se concluir que nos poços 2-4 o inserto está presente, e que os recombinantes dos poços 2 e 4 são MutS, já que o gene AOX1 selvagem não está presente.

4.3. Indução da expressão do gene L1

4.3.1. Análise de transcrição do gene L1 nos transformantes

Com o intuito de avaliar a presença de RNA mensageiro e consequentemente confirmar a ocorrência de transcrição do gene L1 (integrado no genoma) de HPV 18 e 33, o RNA total foi extraído (ponto 120h de indução do gene L1) para realização de uma RT-PCR. Três transformantes HPV 18 e três transformantes HPV 33 foram analisados, e dois de cada apresentaram um fragmento de aproximadamente 500 pb referente ao gene L1, amplificado do cDNA obtido com a transcrição reversa. O transformante controle (pPICZA/X-33) foi negativo para amplificação do produto de 500 pb (Figura 24).

Para descartar a possibilidade de contaminação das amostras de RNA total com DNA genômico da levedura, uma reação de transcrição reversa sem a transcriptase reversa foi realizada para todas as amostras. A PCR realizada com este material foi negativa para a detecção do produto referente ao gene L1 em todas as amostras.

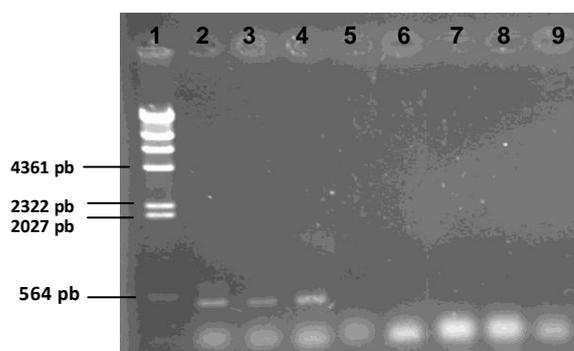


Figura 24. RT-PCR dos recombinantes *P. pastoris*. Poço 1. Marcador Lambda *Hind*III (New England Biolabs); poços 2-3: clones X33/pPICZL1H18; poço 4: clone X33/pPICZL1H33; poço 5: X-33/pPICZA (controle negativo, vetor sem inserto); poço 6: controle de reação (sem DNA); poços 7-9: controles sem transcriptase reversa. O tamanho dos produtos da RT-PCR para o gene L1 é de 500pb.

4.4. Análise da produção da proteína L1

4.4.1. Avaliação da expressão da proteína L1 através de gel SDS-PAGE

O lisado total dos clones *P. pastoris* foi submetido a uma eletroforese em gel SDS-PAGE, para verificação da integridade das proteínas, assim como a presença de L1, proteína

de interesse. A figura 25 mostra que não ocorreu degradação das proteínas, entretanto a banda correspondente à proteína L1 (~55 kDa) não pôde ser visualizada.

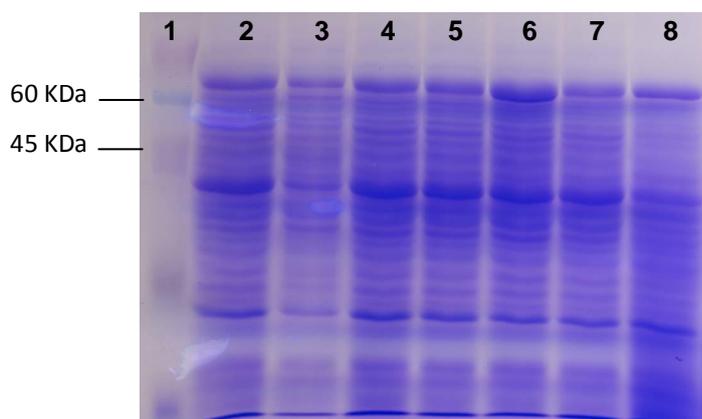


Figura 25. Análise por eletroforese de proteínas em gel SDS-PAGE do lisado total dos clones *P. pastoris* (40 µg/poço). Poço 1: Marcador *Color Burst Electrophoresis* (Sigma). Poços 2-8: lisados celulares de: clones X33/pPICZL1H18 (2-3); clones X33/pPICZL1H33 (4-5); clone GS115/pPICZL1H16 (6); vetor sem inserto X33/pPICZ, controle negativo (7); GS115 tipo selvagem, controle negativo (8). A lise celular foi realizada após indução com metanol. A figura mostra que não ocorreu degradação das proteínas, entretanto a banda da proteína L1 (~55 kDa) não pôde ser visualizada. Gel SDS-PAGE (12.5%), corado com Comassie blue.

4.4.2. Purificação e diálise das proteínas

Após a purificação e diálise das proteínas, muito pouco material pôde ser recuperado, e parte deste foi utilizada para quantificação pelo método de Bradford. O dot blot foi realizado com apenas uma das amostras, o qual funcionou, porém a reação foi bastante fraca.

4.4.3. Avaliação da expressão da proteína L1 através de Dot Blot

Dois clones positivos quanto à transcrição de L1 de cada tipo de HPV (18 e 33) foram analisados quanto à expressão da proteína recombinante. Os extratos protéicos foram usados em ensaios de dot blot com anticorpo anti-L1 (CAMVIR-1) e anticorpo anti-His (figura 26). Todas as amostras testadas tiveram resultado positivo, indicando expressão da proteína L1.

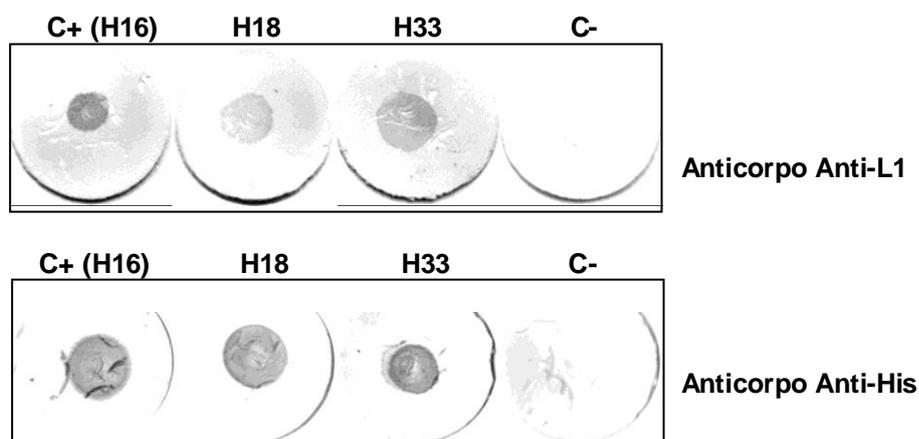


Figura 26. Dot blots utilizando-se os anticorpos anti-L1 (CAMVIR-1) e anti-His foram realizados para verificar a expressão da proteína L1 de HPV 18 e 33, a qual tem uma cauda de poli-histidina C-terminal. As proteínas totais foram extraídas dos clones *P. pastoris* e dos controles negativo (*P. pastoris* X33 transformada com o vetor sem inserto) e positivo (HPV 16) após indução com metanol. As amostras foram diluídas e 0,9 μ g de proteína foram aplicados na membrana. O dot blot com o anticorpo anti-L1 foi revelado por reação de peroxidase, enquanto o dot blot com anticorpo anti-His foi revelado por NBT/BCIP.

5. Discussão

O HPV é a principal causa de câncer cervical no mundo. A infecção pelo papilomavírus, sua disseminação e progressão para câncer cervical são estreitamente relacionados a fatores sócio-econômicos. Das 274000 mortes causadas por câncer cervical a cada ano, mais de 80% ocorrem em países em desenvolvimento, e a estimativa é de que essa proporção aumente para 90% em 2020 (Parkin et al, 2006).

Atualmente, as vacinas aprovadas para uso em humanos são baseadas em VLPs de HPV 16, 18, 6 e 11, deixando de fora pelo menos 13 tipos oncogênicos de HPV, responsáveis por quase 30% dos casos de câncer cervical (Gasparic et al, 2007). Além disso, o custo dessas vacinas ainda é proibitivo para a maioria da população nos países em desenvolvimento. Variações geográficas na distribuição dos tipos de HPV devem ser consideradas para a tomada de decisões corretas referentes à saúde pública. No Brasil, os HPVs tipos 31 e 33 têm uma frequência relevante nas regiões Nordeste e Centro-Oeste (Cavalcanti et al, 1994; Eluf-Neto et al, 1994; Gonçalves et al, 1999; Noronha et al, 1999; Lorenzato et al, 2000; Guimarães et al, 2008), assim, o desenvolvimento de vacinas mais adequadas a essas regiões é necessário para o controle do câncer cervical.

Muitos sistemas de expressão têm sido utilizados para a produção da proteína L1 de HPV, como leveduras (Sasagawa et al, 2005; Woo et al, 2008), células de mamíferos (Plesa et al, 2003), plantas transgênicas (Liu et al, 2005) e células de inseto (Kirnbauer et al, 1993; Volpers et al, 1994; Liao et al, 2008).

A levedura *Pichia pastoris* tem ganhado ampla aceitação como um hospedeiro para a produção de proteínas heterólogas, o que pode ser exemplificado pelo fato de um grande número de proteínas sintetizadas neste microrganismo estarem sendo testadas para uso como fármacos. *P. pastoris* não adiciona manoses terminais com ligações $\alpha 1,3$, as quais acredita-se serem responsáveis pela natureza hiperantigênica de proteínas recombinantes, tornando-as inadequadas para uso terapêutico (Daly & Hearn, 2005; Torres & Moraes, 2002). Neste trabalho, células de *Pichia pastoris* foram usadas para a produção heteróloga da proteína L1 de HPV 18 e 33.

A transcrição pode ser terminada se o DNA tem uma alta proporção de bases AT (Romanos, 1995; Sreekrishna et al, 1997). Em um estudo relatado por Scorer et al (1993) com relação à produção da proteína do envelope de HIV-1, o RNAm era truncado quando expresso em *P. pastoris*, e o sítio de término era semelhante à sequência consenso de levedura 5'TTTTATA. Em vários estudos onde regiões ricas em AT dos genes heterólogos foram retiradas, observou-se um aumento nos níveis de expressão em *P. pastoris* (Outchkourov et al,

2002; Gurkan and Ellar, 2005; Boettner et al, 2007; Su et al, 2007). Neste trabalho, a transcrição do gene L1 pelos clones recombinantes foi confirmada por RT-PCR, a qual confirmou que todos os clones testados foram positivos quanto à transcrição de RNAm de L1. Como nesse teste os *primers* utilizados amplificam uma região de 500 pb, há ainda a possibilidade de ter havido um término precoce da transcrição. Aumentar a proporção de bases GC no DNA é uma estratégia que pode ser utilizada para melhorar os níveis de expressão.

Para detectar a presença da proteína L1 no extrato intracelular total da levedura, géis SDS-PAGE foram corridos com diversas concentrações de proteína, entretanto, a banda esperada (55-58-KDa) não pôde ser visualizada. Uma questão importante é que a integridade das proteínas foi verificada. O grande número de proteínas nativas na levedura, associado a um possível baixo nível de expressão, pode ter impedido a visualização da banda no gel.

Para verificar se houve alguma produção da proteína L1, mesmo não sendo possível a confirmação por eletroforese de proteínas, análises por dot blot foram realizadas utilizando-se um anticorpo anti-his para detecção da cauda de poli-histidina (6-his) ligada à proteína, e o anticorpo anti-L1 de HPV16 (CAMVIR-1), com resultados positivos em todas as amostras testadas. O anticorpo CAMVIR-1 identifica um epítipo linear em L1 de HPV 16, reagindo fortemente também com HPV 33. A região reconhecida pelo anticorpo é bastante conservada entre diferentes tipos de HPV (McLean et al, 1990). Nos clones de HPV 18, também foram observadas reações positivas, entretanto menos intensas, provavelmente resultado de reação cruzada devido a essa conservação na sequência de aminoácidos.

Western blots com os mesmos anticorpos citados acima foram realizados com as amostras positivas nos ensaios de dot blot. Nenhum deles mostrou resultados satisfatórios mesmo após alterações no procedimento, incluindo a transferência das proteínas para a membrana de nitrocelulose e as concentrações de proteínas testadas. Levando-se em conta os anticorpos específicos que deram resultados positivos nos dot blots, é possível que a falha em detectar a proteína no *western blot* esteja ligada a alguma degradação protéica quando submetida à lise com pérolas de vidro, ou a um baixo nível de expressão do gene heterólogo, limitando a sensibilidade da técnica.

A levedura metilotrófica *Pichia pastoris* se tornou um sistema de expressão bastante utilizado para a produção de diversas proteínas heterólogas (Cregg et al, 2000). Entretanto, muitas proteínas têm sido produzidas com graus de sucesso variáveis. Alguns experimentos falharam por causa de vários fatores (Cregg et al, 2000; Porro et al, 2005), incluindo o gene alvo não tendo sido expresso no sistema selecionado e os níveis de expressão sendo muito baixos para serem evidenciados por SDS-PAGE. As razões pelas quais algumas proteínas têm níveis de expressão baixos ou intermediários permanecem não evidentes.

Quanto às condições de cultivo, diversos parâmetros podem ser otimizados, como temperatura, concentração de metanol, pH, entre outros. A utilização de frascos aletados permite maior aeração do meio, sendo uma medida simples que pode ser adotada para uma melhora dos resultados. Embora a expressão de proteínas heterólogas em *P. pastoris* possa ser realizada com sucesso em culturas em frascos, os níveis de expressão são tipicamente mais baixos com relação àqueles obtidos quando fermentadores são utilizados, nos quais se pode controlar precisamente a demanda oxigênio, além de outros parâmetros.

VLPs de HPV em contato com superfícies de membranas ou submetidas a procedimentos de diálise apresentam uma tendência à agregação, além de uma afinidade a superfícies como polipropileno e vidro. Durante a manipulação do material, esse problema pode ter ocorrido, acarretando em perda de proteína. Segundo Shi et al (2005), a introdução de surfactantes não iônicos nas soluções aquosas de VLPs de HPV evita a agregação, proporcionando uma estabilização das VLPs.

Diversas publicações (Byrne et al, 2000; Valencik & McDonald, 2001; Massaer et al, 2001) têm mostrado que a otimização de códons pode melhorar os níveis de expressão através da substituição de códons raros, para tradução eficiente em *P. pastoris*. A otimização de genes resulta em altos níveis de expressão, de acordo com vários autores, como Teng et al (2007), que aumentaram em 10 vezes a expressão do gene β -1, 3-1, 4 – glucanase de *Bacillus licheniformis* e Outchkourov et al (2002), que aumentaram em 20 vezes a expressão de equistatina, um inibidor de proteinase da anêmona-do-mar *Actinia equine*, ambos comparando-se à expressão do gene selvagem em células de *Pichia pastoris*.

Fatores inibitórios foram identificados entre os primeiros 514 nucleotídeos no gene L1 de HPV 16, os quais evitam a produção da proteína L1 por causa de sua ação no RNAm. Esses elementos são capazes de reduzir a expressão do gene L1 a níveis indetectáveis em células de mamíferos (Collier et al, 2002; Schwartz, 2000). A inativação dessas seqüências resulta em altos níveis de produção da proteína L1 quando comparado à expressão do gene selvagem (Collier et al, 2002). É possível que ocorra uma situação semelhante quando da expressão em *P. pastoris*, problema que poderia ser contornado com a otimização de códons para eliminação de elementos inibitórios.

Diversos fatores influenciam a produção de biomassa e a expressão de proteínas heterólogas, os quais devem ser avaliados para que uma otimização do sistema seja realizada, de modo a aumentar a expressão da proteína L1 de HPV 18 e 33 em células de *P. pastoris*.

6. Conclusões

Os dados apresentados neste trabalho mostram que nas condições utilizadas, o rendimento da produção da proteína L1 de HPV foi abaixo do esperado, sendo que a otimização em diversas etapas do processo (o uso de genes sintéticos otimizados, por exemplo) deverá mostrar-se uma solução para a utilização do sistema de células de *P. pastoris* para a expressão heteróloga da proteína L1.

7. Referências Bibliográficas

- Baker TS, Newcomb WW, Olson NH, Cowser LM, et al. (1991). Structures of bovine and human papillomaviruses. Analysis by cryoelectron microscopy and three-dimensional image reconstruction. *Biophys J*. 60:1445-56.
- Barnard P and McMillan NA. (1999). The human papillomavirus E7 oncoprotein abrogates signaling mediated by interferon- α . *Virology*. 259:305–13.
- Baseman JG and Koutsky LA. (2005). The epidemiology of human papillomavirus infections. *J Clin Virol*. 1:S16-24.
- Bayer ME, Blumberg BS and Werner B. (1968). Particles associated with Australia antigen in the sera of patients with leukaemia, Down's Syndrome and hepatitis. *Nature*. 218:1057-1059.
- Belnap DM, Olson NH, Cladel NM, Newcomb WW, et al. (1996). Conserved features in papillomavirus and polyomavirus capsids. *J Mol Biol*. 259:249-63.
- Bernard HU. (2002). Gene expression of genital human papillomaviruses and considerations on potential antiviral approaches. *Antivir Ther* 7:219–237.
- Boettner M, Steffens C, von Mering C, Bork P, et al. (2007). Sequence-based factors influencing the expression of heterologous genes in the yeast *Pichia pastoris* - A comparative view on 79 human genes. *Journal of Biotechnology*. 130:1–10.
- Bosch FX, Manos MM, Muñoz N, Sherman M, et al. (1995). Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. *J Natl Cancer Inst*. 87:796-802.
- Bishop B, Dasgupta J and Chen XS. (2007). Structure-based engineering of papillomavirus major capsid L1: controlling particle assembly. *Virol J*. 4:3.
- Bishop B, Dasgupta J, Klein M, Garcea RL, et al. (2007). Crystal structures of four types of human papillomavirus L1 capsid proteins: understanding the specificity of neutralizing monoclonal antibodies. *J Biol Chem*. 282:31803-11.
- 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.
- Brown TA. (2003). *Clonagem Gênica e análise de DNA: uma Introdução*. Porto Alegre, Artmed 240p. 4ed.
- Brown DR, Shew ML, Qadadri B, Neptune N, et al. (2005). A longitudinal study of genital human papillomavirus infection in a cohort of closely followed adolescent women. *J Infect Dis*. 191:182–92.
- Bryan JT. (2007). Developing an HPV vaccine to prevent cervical cancer and genital warts. *Vaccine*. 25:3001–3006.
- Byrne MP, Titball RW, Holley J and Smith LA (2000). Fermentation, purification, and efficacy of a recombinant vaccine candidate against botulinum neurotoxin type F from *Pichia pastoris*. *Protein Expr Purif*. 18:327-337.

- Carter JJ, Wipf GC, Hagensee ME, McKnight B, et al. (1995). Use of human papillomavirus type 6 capsids to detect antibodies in people with genital warts. *J Infect Dis.* 172:11–8.
- Cason J, Patel D, Naylor J, Lunney D, et al. (1989). Identification of immunogenic regions of the major coat protein of human papillomavirus type 16 that contain type-restricted epitopes. *J Gen Virol.* 70:2973-2987.
- Cavalcanti SM, Frugulhetti IC, Passos MR, Fonseca MF, et al. (1994). Prevalence of human papillomavirus DNA in female cervical lesions from Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 89:575-580.
- Cereghino JL and Cregg JM. (2000). Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiol Rev.* 24:45-66.
- Cereghino GPL, Cereghino JL, Ilgen C and Cregg JM. (2002). Production of recombinant proteins in fermenter cultures of the yeast *Pichia pastoris*. *Curr Opin Biotech.* 13:329-332.
- Chang YE and Laimins LA. (2000). Microarray analysis identifies interferon-inducible genes and Stat-1 as major transcriptional targets of human papillomavirus type 31. *J Virol.* 74:4174-82.
- Chen XS, Garcea RL, Goldberg I, Casini G, et al. (2000). Structure of small virus-like particles assembled from the L1 protein of human papillomavirus 16. *Mol Cell.* 5:557-67.
- Christensen ND, HopXR, DiAngelo SL, Cladel NM, et al. (1994). Assembled baculovirus-expressed human papillomavirus type 11 L1 capsid protein virus-like particles are recognized by neutralizing monoclonal antibodies and induce high titres of neutralizing antibodies. *J Gen Virol.* 75:2271-2276.
- Coimbra EC, Souza HM, Leitão MCG, Santos JF, et al. (2007). 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 (Ed.). 2: 689-696.
- Collier B, Oberg D, Zhao X and Schwartz S. (2002). Specific inactivation of inhibitory sequences in the 5' end of the human papillomavirus type 16 open reading frame results in production of high levels of L1 protein in human epithelial cells. *J Virol.* 76: 2739-2752.
- Conger KL, Liu JS, Kuo SR, Chow LT, et al. (1999). Human papillomavirus DNA replication. Interactions between the viral E1 protein and two subunits of human dna polymerase alpha/primase. *J Biol Chem.* 274:2696–2705.
- Cregg JM, Madden KR, Barringer KJ, Thill GP, et al. (1989). Functional characterization of the two alcohol oxidase genes from the yeast *Pichia pastoris*. *Mol Cell Biol.* 9:1316-1323.
- Cregg JM and Russell KA. (1998). Transformation. *Methods Mol Biol.* 103: 27-39.
- Cregg JM, Cereghino JL, Shi J and Higgins DR. (2000). Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. *Mol Biotechnol.* 16:23-52.
- Crum CP, Nagai N, Levine RU and Silverstein S. (1986). *In situ* hybridization analysis of HPV 16 DNA sequences in early cervical neoplasia. *Am J Pathol.* 123:174-182.

- Daly R and Hearn TW. (2005). Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production. *J Mol Recogn*. 18:119-138.
- de Boer MA, Vet JN, Aziz MF, Cornain S, et al. (2006). Human papillomavirus type 18 and other risk factors for cervical cancer in Jakarta, Indonesia. *Int J Gynecol Cancer*. 16:1809-14.
- de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, et al. (2004). Classification of papillomaviruses. *Virology*. 324:17-27.
- Demain AL and Adrio JL. (2008). Contributions of Microorganisms to Industrial Biology. *Mol Biotechnol*. 38:41-55.
- Denis F, Hanz S and Alain S. (2008). Clearance, persistence and recurrence of HPV infection. *Gynecol Obstet Fertil*. 36:430-40.
- Doorbar J. (2006). Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clin Sci (Lond)*. 110:525-41.
- Einstein MH. (2008). Acquired immune response to oncogenic human papillomavirus associated with prophylactic cervical cancer vaccines. *Cancer Immunol Immunother* 57:443-451.
- Ellis SB, Brust PF, Koutz PJ, Waters AF. et al. (1985). Isolation of alcohol oxidase and two other methanol regulatable genes from the yeast *Pichia pastoris*. *Mol Cell Biol*. 5:1111-1121.
- Eluf-Neto J, Booth M, Munõz N, Bosch FX, et al. (1994). Human papillomavirus and invasive cervical cancer in Brazil. *Br J Cancer*. 69:114-119.
- Fausch SC, Da Silva DM, Rudolf MP, Kast WM. (2002). Human papillomavirus virus-like particles do not activate Langerhans cells: a possible immune escape mechanism used by human papillomaviruses. *J Immunol*. 169:3242-3249.
- Fehrmann F and Laimins LA. (2003). Human papillomaviruses: Targeting differentiating epithelial cells for malignant transformation. *Oncogene*. 22:5201-5207.
- Fifis T, Gamvrellis A, Crimeen-Irwin B, Pietersz GA, et al. (2004). Size-dependent immunogenicity: Therapeutic and protective properties of nano-vaccines against tumors. *J Immunol*. 173:3148-3154.
- Franco EL, Villa LL, Sobrinho JP, Prado JM, et al. (1999). Epidemiology of acquisition and clearance of cervical human papillomavirus infection in women from a high-risk area for cervical cancer. *J Infect Dis*. 180:1415-23.
- Frazer IH. (2004). Prevention of cervical cancer through papillomavirus vaccination. *Nat Rev Immunol*. 4:46-54.
- Frattini MG and Laimins LA. (1994). Binding of the human papillomavirus E1 origin-recognition protein is regulated through complex formation with the E2 enhancer-binding protein. *Proc Natl Acad Sci USA*. 91:12398-12402.
- Gamvrellis A, Leong D, Hanley JC, Xiang SD, et al. (2004). Vaccines that facilitate antigen entry into dendritic cells. *Immunol Cell Biol*. 82:506-516.

- Gasparic M, Rubio I, Thönes N, Gissmann L, et al. (2007). Prophylactic DNA immunization against multiple papillomavirus types. *Vaccine*. 25:4540-4553.
- Gellissen G, Strasser AWM. and Suckow M. (2005). Key and Criteria to the Selection of an Expression Platform. In: Production of recombinant proteins - Novel microbial and eukaryotic expression systems. Gellissen G, ed. 1-5.
- Genther WSM, Disbrow GL, Shlegel R, Lee D, et al. (2005). Requirement of epidermal growth factor receptor for hyperplasia induced by E5, a high-risk human papillomavirus oncogene. *Cancer Res*. 65:6534-42.
- Georgopoulos NT, Proffitt JL and Blair GE. (2000). Transcriptional regulation of the major histocompatibility complex (MHC) class I heavy chain, TAP1 and LMP2 genes by the human papillomavirus (HPV) type 6b, 16 and 18 E7 oncoproteins. *Oncogene*. 19:4930-4935.
- Giannini SL, Hanon E, Moris P, Van Mechelen M, et al. (2006). Enhanced humoral and memory B cellular immunity using HPV16/18 L1 VLP vaccine formulated with the MPL/aluminium salt combination (AS04) compared to aluminium salt only. *Vaccine*. 24:5937:5949.
- Giuliano AR, Harris R, Sedjo RL, Baldwin S, et al. (2002). Incidence, prevalence, and clearance of type-specific human papillomavirus infections: the Young Women's Health Study. *J Infect Dis*. 186:462-469.
- Gonçalves MA, Massad E, Burattini MN and Villa LL. (1999). Relationship between human papillomavirus (HPV) genotyping and genital neoplasia in HIV-positive patients of Santos City, São Paulo, Brazil. *Int J STD AIDS*. 10:803-807.
- Greenfield I, Nickerson J, Penman S and Stanley M. (1991). Human papillomavirus 16 E7 protein is associated with the nuclear matrix. *Proc Natl Acad Sci USA*. 88:11217-11221.
- Guimarães V, Guimarães R, Brandão L, Silva MFPTB, et al. (2008). Association between *MBL2* gene functional polymorphisms and high-risk human papillomavirus infection in Brazilian women. *Hum Immunol*. 69:273-278.
- Gurkan C, Ellar DJ. (2005). Recombinant production of bacterial toxins and their derivatives in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Microbial Cell Factories*. 4:33.
- Harro CD, Pang YY, Roden RB, Hildesheim A, et al. (2001). Safety and immunogenicity trial in adult volunteers of a human papillomavirus 16 L1 virus-like particle vaccine. *J Natl Cancer Inst*. 93:284-492.
- Hartner FS and Glieder A. (2006). Regulation of methanol utilisation pathway genes in yeasts. *Microb Cell Fact*. 14;5:39.
- Harwood CA and Proby CM. (2002). Human papillomaviruses and non-melanoma skin cancer. *Curr Opin Infect Dis*. 15:101-114.
- Herrero R, Castellsague X, Pawlita M, Lissowska J, et al. (2003). Human papillomavirus and oral cancer: the International Agency for Research on Cancer multicenter study. *J Natl Cancer Inst*. 95:1772-1783.

- Higgins DR and Cregg JM. (1998). *Pichia* Protocols. Humana Press. Totowa, NJ.
- Ho GYF, Bierman R, Beardsley L, Chang CJ, et al. (1998) Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. *N Engl J Med.* 338:423–8.
- Hubbert NL, Sedman SA and Schiller JT. (1992). Human papillomavirus type 16 E6 increases the degradation rate of p53 in human keratinocytes. *J Virol.* 66:6237–6241.
- Huibregtse JM, Scheffner M and Howley PM. (1993). Cloning and expression of the cDNA for E6-AP, a protein that mediates the interaction of the human papillomavirus E6 oncoprotein with p53. *Mol Cell Biol.* 13:775–784.
- Invitrogen (2007). EasySelect *Pichia* Expression Kit. A manual of methods for expression of recombinant proteins using pPICZ and pPICZ α in *Pichia pastoris*. Catalog no. K1740-01.
- Joyce JG, Tung JS, Przysiecki CT, Cook JC, et al. (1999). The L1 major capsid protein of human papillomavirus type 11 recombinant virus-like particles interacts with heparin and cell-surface glycosaminoglycans on human keratinocytes. *J Biol Chem.* 274:5810–5822.
- Kanodia S, Fahey LM and Kast WM. (2007). Mechanisms used by human papillomaviruses to escape the host immune response. *Curr Cancer Drug Targets.* 7:79–89.
- Kirnbauer R, Booy F, Cheng N, Lowy DR, et al. (1992). Papillomavirus L1 major capsid protein self-assembles into virus-like particles that are highly immunogenic. *Proc Natl Acad Sci USA.* 89:12180-12184.
- Kirnbauer R, Taub J, Greenstone H and Roden R. (1993). Efficient self-assembly of human papillomavirus type 16 L1 and L1-L2 into virus-like particles. *J Virol.* 67:6929-6936.
- Kirnbauer R, Hubbert NL, Wheeler CM, Becker TM, et al. (1994). A virus-like particle enzyme-linked immunosorbent assay detects serum antibodies in a majority of women infected with human papillomavirus type 16. *J Natl Cancer Inst.* 86:494–9.
- Koutz P, Davis GR, Stillman C, Barringer K, et al. (1989). Structural comparison of the *Pichia pastoris* alcohol oxidase genes. *Yeast.* 5:167-177.
- Kupper TS and Fuhlbrigge RC (2004). Immune surveillance in the skin: mechanisms and clinical consequences. *Nat Rev Immunol.* 4:211–222.
- Kurtzman CP and Robnett CJ. (1998). Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie van Leeuwenhoek.* 73:331-371.
- Lechmann M, Murata K, Satoi J, Vergalla J, et al. (2001). Hepatitis C virus-like particles induce virus-specific humoral and cellular immune responses in mice. *Hepatology.* 34: 417–423.
- Liao S, Wang S, Xu L and Deng D. (2008). Production and verification of human papillomavirus type 18 vaccine *in vitro*. *Oncol Rep.* 20: 211-217.
- Lico C, Chen Q. and Santi L. (2008). Viral vectors for production of recombinant proteins in plants. *J Cell Physiol.* 216: 366-77.

- Liu HL, Li WS, Lei T, Zheng J, et al. (2005). Expression of human papillomavirus type 16 L1 protein in transgenic tobacco plants. *Acta Biochim Biophys Sin.* 37:153-158.
- Liu D, Zhang Y, Yu X, Jiang C et al. (2007). Assembly and Immunogenicity of Human Papillomavirus Type 16 Major Capsid Protein (HPV16 L1) in *Pichia pastoris*. *Chem. Res. Chinese U.* 23: 200-203.
- Lorenzato F, Ho L, Terry G, Singer A, et al. (2000). The use of human papillomavirus typing in detection of cervical neoplasia in Recife (Brazil) *Int J Gynecol Cancer.* 10:143-150.
- Ludwig C and Wagner R. (2007). Virus-like particles - universal molecular toolboxes. *Current Opinion in Biotechnology.* 18:537–545.
- Macauley-Patrick S, Fazenda ML, McNeil B and Harvey LM. (2005). Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. *Yeast.* 22:249–270.
- Massaer M, Mazzu P, Haumont M, Magi M, et al. (2001). High-level expression in mammalian cells of recombinant house dust mite allergen ProDer p 1 with optimized codon usage. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 125:32-43.
- McAleer WJ, Buynak EB, Maigetter RZ, Wampler DE, et al. (1984). Human hepatitis B vaccine from recombinant yeast. *Nature.* 307: 178–180.
- McCance DJ. (2005). Human Papillomaviruses and Cell Signaling. *Sci STKE.* 2005(288):29.
- McCarroll L and King LA. (1997) .Stable insect cell cultures for recombinant protein production. *Curr Opin Biotechnol.* 8:590-594.
- McCarthy MP, White WI, Palmer-Hill F, Koenig S, Suzich JA. (1998). Quantitative disassembly and reassembly of human papillomavirus type 11 virus like particles *in vitro*. *J Virol.* 72, 32-41.
- McLean CS, Churcher MJ, Meinke J, Smith GL, et al. (1990). Production and characterisation of a monoclonal antibody to human papillomavirus type 16 using recombinant vaccinia virus. *J Clin Pathol.* 43:488-492.
- Modis Y, Trus BL and Harrison SC. (2002). Atomic model of the papillomavirus capsid. *EMBO J.* 21:4754-62.
- Mohr IJ, Clark R, Sun S, Androphy EJ, et al. (1990). Targeting the E1 replication protein to the papillomavirus origin of replication by complex formation with the E2 transactivator. *Science* 250:1694–1699.
- Moscicki AB, Schiffman M, Kjaer S and Villa LL. (2006). Chapter 5: Updating the natural history of HPV and anogenital cancer. *Vaccine.* 24::S42-51.
- Motoyama S, Ladines-Llave CA, Villanueva SL and Maruo T. (2004). The role of human papilloma virus in the molecular biology of cervical carcinogenesis. *Kobe J Med Sci.*, 50: 9-19.

- Muñoz N. (2000). Human papillomavirus and cancer: The epidemiological evidence. *J Clin Virol.* 19:1-5.
- Muñoz N, Bosch FX, de Sanjose S, Herrero R, et al. (2003). Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med.* 348:518-527.
- Muñoz N, Castellsagué X, González AB and Gissmann L (2006). Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. *Vaccine.* 24S3:1-10.
- Nees M, Geoghegan JM, Hyman T, Frank S, et al. (2001) Papillomavirus type 16 oncogenes downregulate expression of interferon-responsive genes and upregulate proliferation associated and NF- κ B-responsive genes in cervical keratinocytes. *J Virol.* 75:4283-96.
- Noad R and Roy P. (2003). Virus-like particles as immunogens. *Trends Microbiol.* 11:438-44.
- Noronha V, Mello W, Villa L, Brito A, et al. (1999). Human papillomavirus associated with uterine cervix lesions. *Rev Soc Bras Med Trop.* 32:235-40.
- Ogata K, Nishikawa H and Ohsugi M. (1969). A yeast capable of utilizing methanol. *Agric Biol Chem.* 33:1519-1520.
- Ohi H, Miura M, Hiramatsu R and Ohmura T. (1994). The positive and negative cis-acting elements for methanol regulation in the *Pichia pastoris AOX2* gene. *Mol Gen Genet,* 243:489-499.
- Oliveira-Ferreira J, Myahira Y, Layton GT, Savage N, et al. (2000). 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.* 18: 1863–1869.
- Oriel JD. (1971). Natural history of genital warts. *Br J Vener Dis.* 47:1–13.
- Outchkourov NS, Stiekema WJ and Jongma MA. (2002). Optimization of the Expression of Equistatin in *Pichia pastoris*. *Protein Expr Purif.* 24:18-24.
- Parkin D M. (2006). The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002. *Int. J. Cancer.* 118: 3030-3044.
- Pfister H. (2003). Chapter 8: Human papillomavirus and skin cancer. *J Natl Cancer Inst Monogr.* 31:52-56.
- Plesa A, Anton G, Diaconu C, Stoian M et al. (2003). Cloning and expression of the L1 major capsid protein of the human papillomavirus 18 in murine cells. *Int J Mol Med.* 12:1021-1026.
- Porro D, Sauer M, Branduardi P and Mattanovich D. (2005). Recombinant protein production in yeasts. *Mol Biotechnol.* 31:245-259.
- Romanos MA. (1995). Advances in the use of *Pichia pastoris* for high-level gene expression. *Curr Opin Biotechnol.* 6: 527–533.
- Ronco LV, Karpova AY, Vidal M and Howley PM. (1998). Human papillomavirus 16 E6 oncoprotein binds to interferon regulatory factor-3 and inhibits its transcriptional activity. *Genes Dev.* 12:2061–72.

- Rose RC, Reichman RC, Bonnez W (1994). Human papillomavirus (HPV) type 11 recombinant virus-like particles induce the formation of neutralizing antibodies and detect HPV-specific antibodies in human sera. *J Gen Virol.* 75:2075.
- Rudolf M, P, Nieland JD, DaSilva DM, Velders MP, et al. (1999). Induction of HPV16 capsid protein-specific human T cell responses by virus-like particles. *Biol Chem.* 380:335-340.
- Sambrook J, Fritsch EF and Maniatis T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. *NY Cold Spring Harbor Laboratory Press.* 2.ed.
- Sasagawa T, Tani M, Basha W, Rose RC, et al. (2005). A human papillomavirus type 16 vaccine by oral delivery of L1 protein. *Virus Res.* 110:81-90.
- Schiller JT and Davies P. (2004). Delivering on the promise: HPV vaccines and cervical cancer. *Nat Rev Microbiol.* 2:343-7.
- Schwartz S. (2000). Regulation of human papillomavirus late gene expression. *Upsala J. Med. Sci.* 105: 171-192.
- Scorer CA, Buckholz RG, Clare JJ and Romanos MA. (1993). The intracellular production and secretion of HIV-1 envelope protein in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Gene* 136: 111–119.
- Shi L, Sanyal G, Ni A, Luo Z, et al. (2005). Stabilization of human papillomavirus virus-like particles by non-ionic surfactants. *J Pharm Sci.* 94:1538-51.
- Shope RE. (1937). Immunization of rabbits to infectious papillomatosis. *J Exp Med.* 65:607-624.
- Slebos RJ, Kesses TD, Chen AW, Han SM, et al. (1995). Functional consequences of directed mutations in human papillomavirus E6 proteins: abrogation of p53-mediated cell cycle arrest correlates with p53 binding and degradation in vitro. *Virology.* 208:111-20.
- Southern SA and Herrington CS. (2000). Disruption of cell cycle control by human papillomavirus with special reference to cervical carcinoma. *Int J Gynecol Cancer.* 10:263-274.
- Sreekrishna K, Brankamp RG, Kropp KE, Blankenship DT, et al. (1997). Strategies for optimal synthesis and secretion of heterologous protein in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Gene.* 190:55-62.
- Stanley M. (2001). Human papillomavirus and cervical carcinogenesis. *Best Practice & Res. Clin. Obstet. and Gynaecol.* 15:663-76.
- Stanley MA (2006). Immune responses to human papillomavirus. *Vaccine.* 24:16-22.
- Stanley M, Lowy DR and Frazer I (2006). Chapter 12: Prophylactic HPV vaccines: Underlying mechanisms. *Vaccine.* 24:S106-S113.
- Stanley M. (2008). Immunobiology of HPV and HPV vaccines. *Gynecol Oncol.* 109:S15–S21.

- Stehle T, Gamblin SJ, Yan Y, Harrison SC. (1996). The structure of simian virus 40 refined at 3.1 Å resolution. *Structure*. 4, 165-182.
- Sterling JC. (2005). Human papillomaviruses and skin cancer. *J Clin Virol*. 32:67-71.
- Stoler MH, Rhodes CR, Whitbeck A, Wolinsky SM, et al. (1992). Human papillomavirus type 16 and 18 gene expression in cervical neoplasias. *Hum Pathol*. 23:117-128.
- Stubenrauch F and Laimins LA. (1999). Human papillomavirus life cycle: active and latent phases. *Semin. Cancer Biol*. 9:379-386.
- Su Z, Wu X, Feng Y, Ding C et al. (2007). High level expression of human endostatin in *Pichia pastoris* using a synthetic gene construct. *Appl Microbiol Biotechnol*. 73:1355–1362.
- Swartz JR. (1996). *Escherichia coli* recombinant DNA technology. In F. C. Neidhardt (ed.), *Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology*, 2nd ed., (pp. 1693–1771). Washington DC: American Society of Microbiology Press.
- Syrjanen S. (2005). Human papillomavirus (HPV) in head and neck cancer. *J Clin Virol*. 32:59-66.
- Tacket CO, Sztein MB, Losonsky GA, Wasserman SS, et al. (2003). Humoral, mucosal, and cellular immune responses to oral Norwalk virus-like particles in volunteers. *Clin Immunol*. 108: 241–247.
- Teng D, Fan Y, Yang Y, Tian Z, et al. (2007). Codon optimization of *Bacillus licheniformis* β -1,3-1, 4-glucanase gene and its expression in *Pichia pastoris*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 74:1074-1083.
- Tewari KS, Taylor JA, Liao SY, DiSaia PJ, et al. (2000). Development and assessment of a general theory of cervical carcinogenesis utilizing a severe combined immunodeficiency murine-human xenograft model. *Gyn Onco*. 77:137-148.
- Torres FAG and Moraes LMP. (2002). Proteínas recombinantes produzidas em leveduras *Biotechnolog Cienc Desenvolv*. 29:20-22.
- Trottier H and Franco EL. (2006). The epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Vaccine*. 24: 1-15.
- 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.
- Valencik ML and McDonald JA. (2001). Codon optimization markedly improves doxycycline regulated gene expression in the mouse heart. *Transgenic Res*. 10:269–275.
- Veenhuis M, van Dijken JP and Harder W. (1983). The significance of peroxisomes in the metabolism of one-carbon compounds in yeasts. *Adv Microb Physiol*. 24:1-82.
- Villa LL, Costa RLR, Petta CA, Andrade RP, et al. (2005) Prophylactic quadrivalent human papillomavirus (types 6, 11 16 and 18) L1 virus-like particle vaccine in young women: a randomised double-blind placebo-controlled multicentre phase II efficacy trial. *Lancet Oncol*. 6:271–8.

Volpers C, Schirmacher P, Streeck RE and Sapp M. (1994). Assembly of the major and the minor capsid protein of human papillomavirus type 33 into virus-like particles and tubular structures in insect cells. *Virology*. 200:504-512.

Vousden K. (1993). Interactions of human papillomavirus transforming proteins with the products of tumor suppressor genes. *The Faseb Journal*. 7:872-879.

Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, et al. (1999). Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol*. 189:12-9.

Wegner G. (1990). Emerging applications of the methylotrophic yeasts. *FEMS Microbiol Rev*. 7:279-283.

Wentzensen N, Vinokurova S and von Knebel Doeberitz M. (2004). Systematic review of genomic integration sites of human papillomavirus genomes in epithelial dysplasia and invasive cancer of the female lower genital tract. *Cancer Res*. 64:3878-3884.

Wikstrom A, van Doornum GJJ, Quint WGV, Schiller JT, et al. (1995). Identification of human papillomavirus seroconversions. *J Gen Virol*. 76:529-39.

Woo MK, An JM, Kim JD, Park SN, et al. (2008). Expression and purification of human papillomavirus 18 L1 virus-like particle from *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch Pharm Res*. 31:205-9.

Zheng ZM and Baker CC. (2006). Papillomavirus genome structure, expression, and post-transcriptional regulation. *Front Biosci*. 11: 2286-2302.

zur Hausen H. (2000). Papillomaviruses causing cancer: Evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst*. 92: 690-698.

8. Apêndice

Manuscrito de artigo científico (a ser submetido à revista *Genetics and Molecular Research*)

Human papillomavirus L1 protein production into *Pichia pastoris* yeast cells

Campos JF^{1,2}, Coimbra EC^{1,2}, D'arc M^{1,2}, Gomes MCL², Mariz FC^{1,2}, Jesus ALS^{1,2}, Brunaska D², Stocco RC^{1,3}, Beçak W^{1,3}, Freitas AC^{1,2,3}

¹ Departamento de Genética, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil

² Setor de Biologia Molecular, Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), Universidade Federal de Pernambuco, Recife Pernambuco, Brasil

³ Laboratório de Genética, Instituto Butantan, São Paulo, São Paulo, Brasil

Antonio Carlos de Freitas

Departamento de Genética, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco

Av. Prof. Moraes Rego, 1235, 50670-901, Recife, Pernambuco, Brasil

55 81 21268520

antonio.freitas@pq.cnpq.br

Abstract

The prevalence of HPV types found in cervical cancer shows geographical variations. Worldwide, the HPV type 16 is more frequent in cervical cancer cases, followed by type 18. In Brazil, although HPV 16 is the predominant type in published studies, there are important regional variations with regard to other types. HPV 18 is the second type in North, Southeast and South regions, however, in Northeast and Center-West regions, there is a higher prevalence of HPVs 31 and 33, instead of type 18. Due to the prohibitive cost of vaccines developed until the moment in developing countries, and because of the variation in HPV type distribution, this work aimed to express L1 gene of human papillomavirus types 16, 18 and 33 in the yeast *Pichia pastoris*. L1 genes were amplified through high fidelity PCR and successfully cloned into pPICZA expression vector. *Pichia pastoris* was transformed with pPICZL1H16, pPICZL1H18 and pPICZL1H33 constructions and the recombinant clones were selected by Zeocin resistance. Colony PCR using AOX1 primers confirmed integration. Clones that were transcribing L1 mRNA were analyzed for protein production. Protein extracts were used in dot blot assays with anti-L1 antibody and anti-His antibody. All samples tested had positive results, indicating L1 protein expression. The data presented in this work confirm the viability of the *P. pastoris* cells system to heterologous production of L1 HPV protein, a natural candidate for a vaccinal strategy against infection. A special attention is needed to more relevant HPV types in certain populations, allowing the inclusion of these vaccines in a broad effective vaccination program.

Key words: Human papillomavirus, cervical cancer, *Pichia pastoris* expression system, prophylactic vaccine.

Introduction

Human papillomaviruses (HPVs) are a large group of small, nonenveloped, double-stranded DNA viruses (Pfister, 2003). Over 100 HPV types have been characterized molecularly and about 40 types are able to infect the genital tract (Muñoz et al, 2006). The high-risk types are associated with the development of anogenital cancers including those of the cervix, while infections by the low-risk HPVs induce only benign genital warts. The high-risk types include HPV 16, 18, 31, 33, and 45, while the low-risk types are HPV 6 and 11 (Singer et al, 1995). Because of the overwhelming burden of cervical cancer in developing countries, it is the second most common cause of cancer among women worldwide (Munoz, 2003), with approximately 450,000 newly diagnosed cases each year and a 50% mortality rate (Parkin, 2006; Lowndes, 2006).

The prevalence of HPV types found in cervical cancer shows worldwide geographical variations (Bosch et al. 1995). Worldwide, the HPV type 16 is more frequent in cervical cancer cases, followed by type 18. In Brazil, although HPV 16 is the predominant type in published studies, there are important regional variations with regard to other types. HPV 18 is the second type in North, Southeast and South regions, however, in Northeast and Center-West regions, there is a higher prevalence of HPVs 31 and 33, instead of type 18 (Cavalcanti et al, 1994; Eluf-Neto et al, 1994; Bosch et al, 1995; Gonçalves et al, 1999; Noronha et al, 1999; Lorenzato et al, 2000; Guimarães et al, 2008).

Purified native L1 protein assembles into virus-like particles (VLPs), which induce neutralizing B cell responses (Breitburd et al, 1995; Kirnbauer et al, 1996; Balmelli et al, 1998; Rose et al, 1998). VLPs offer a promising approach to the production of vaccines against many diseases, because their repetitive, high density display of epitopes is often effective in eliciting strong immune responses (Fifis et al, 2004). Both linear and conformational epitopes have been identified on the surface of HPV L1 VLPs (Christensen et al, 1990), and it is now well established that conformational epitopes are responsible for the activity of neutralizing antibody (Christensen et al, 1994; White et al, 1998; White et al, 1999). L1 VLP-based vaccines are highly protective against infection corresponding to the papillomavirus type used to derive the immunogen, but are ineffective against all but the most closely related HPV types (Harper et al, 2006; Paavonen et al, 2007). One of the complexities associated with the manufacture of the currently available licensed HPV vaccines is the need to include L1 VLPs from multiple HPV genotypes to protect against the 15 known oncogenic HPV types (Roden et al, 2006).

Pichia pastoris, a methylotrophic yeast, is an efficient host for recombinant protein production. The increasing popularity of this particular expression system can be attributed to several factors (Sreekrishna et al, 1997; Hasslacher et al, 1997; Hollenberg and Gellissent, 1997), such as the simplicity of techniques needed for the molecular genetic manipulation of *P.pastoris*, the ability of *P.pastoris* to produce foreign proteins at high levels, many eukaryotic posttranslational modifications, and the commercially available expression system (Liu et al, 2004). The success of the *Pichia* system is linked to the strong tightly regulated alcohol oxidase (AOX1) promoter by methanol (Tschopp et al., 1987). Compared with other eukaryotic systems, *P. pastoris* yeast can be grown on minimal nutrients and can be used to express large quantities of proteins that are not easily obtained from *E. coli*, and adapted for high cell density fermentation (Cregg et al., 1993; Chauhan et al., 1999; Files et al., 2001), which makes this system attractive for the production of heterologous proteins (Ning et al, 2005).

Due to the prohibitive cost of vaccines developed by Merck e Co. Inc. and GlaxoSmithKline Biologicals in developing countries, this work aimed to express L1 gene of human papillomavirus types 16, 18 and 33 in the yeast *Pichia pastoris* and evaluated the L1 protein production.

Material and Methods

Enzymes, Plasmids and Strains

Restriction endonucleases, T4 DNA ligase and *Taq* DNA polymerases were obtained from New England Biolabs. The pBR322H16 and pBR322H18 plasmids containing the whole genome of HPV-16 and 18, respectively, were used to obtain L1 HPV-16 through PCR. HPV 33 L1 gene was amplified through clinical sample (plasmids and clinical sample were gently given by Dr. Stocco). The pGEM-T *easy* (Promega, Madison) was used as cloning vector for PCR products. Expression vector pPICZA, purchased from Invitrogen, contains the 5' AOX1 promoter region induced by methanol and the 3' AOX1 transcription terminators, as well as the *Sh ble* gene to Zeocin (Invitrogen) resistance. *Escherichia coli* TOP 10 and *Pichia pastoris* GS115 (His⁻) and X33 (wild-type) were purchased from Invitrogen (Carlsbad, CA).

Media composition

Media for *E. coli* and *P. pastoris* are described in the *Pichia* Expression Kit Manual (Invitrogen): Low Salt LB medium (1% Tryptone, 0.5% Yeast Extract, 0.5% NaCl, pH 7.0); YPD (1% yeast extract, 2% peptone, 2% glucose); YPDS (1% yeast extract, 2% peptone, 2% glucose, 1M sorbitol); BMGY - Buffered Glycerol-complex Medium (1% yeast extract, 2% peptone, 100 mM potassium phosphate, pH 6.0, 1.34% YNB, 4 x 10⁻⁵ biotin and 1% glycerol); BMMY - Buffered Methanol-complex Medium (1% yeast extract, 2% peptone, 100mM potassium phosphate/pH 6.0, 1.34% YNB, 4 x 10⁻⁵ biotin, 0.5% methanol).

Construction of integrative vectors

The primers were constructed based on sequences deposited in GenBank. The forward primers (H16 Fw: 5' GGTACCTCACAATAATGTCTCTTTGGCTGC 3'; H18 Fw: 5' GATTCGAAAAAATGTGCCACGGGTCC 3'; H33 Fw: 5' GATTCGAAAAAATGTCCGTGTGGCGGCCTAG 3') were designed to contain the yeast consensus Kozak sequence and a restriction site for *KpnI* (HPV 16) and *BstBI* (HPVs 18 and 33) in the 5' terminal. The reverse primers (H16 Rev: 5' GTCGACGAGCTTACGTTTTTTGC 3'; H18 Rev: 5' GTCCCTCGAGTTCCTGGCACGTACACG 3'; Rev H33 5' TCCCTCGAGTTTTTAACCTTTTTGCG) contain a terminal *SalI* (HPV 16) and *XhoI* (HPVs 18 and 33) restriction site and the downstream stop codon was removed in order to have an attached 6 His-tag. L1 genes were amplified with a high fidelity *Taq* DNA polymerase (Triple Master, Eppendorf, USA), purified (*kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System* – Promega, Madison, USA) and cloned into pGEM-T *Easy* vector, through transformation with CaCl₂ (Sambrook et al, 1989). The clones were growth in LB media and selected by ampicillin resistance. Clonings were confirmed through PCR, enzyme digestion and sequencing. pGEML1 constructs and pPICZA were digested with enzymes described above. After purification, vector and insert were submitted to a T4 DNA ligase reaction, followed by chemical transformation in *E. coli* TOP 10. Clonings were confirmed through L1 PCR, digestion with restriction enzymes and sequencing with AOX1 primers.

Transformation of *P. pastoris*

The pPICZAL1 recombinant plasmids were linearized by digestion with *SalI* (New England Biolabs) for 4 h at 37°C. pPICZL1H16 was used to transform the GS115 *P. pastoris* strain by lithium chloride method (Gietz and Schiestl, 1996; modified version). pPICZL1H18, pPICZL1H33 and pPICZ (empty vector) were used to transform the X33 *P. pastoris* strain by electroporation (according to Eppendorf's protocol). Aliquots of 10, 25, 50, 100 and 200 µL were spread on YPDS plates containing 100 µg/mL Zeocin for incubation at 30°C for 2–3 days.

Colony PCR and analysis of the Mut⁺ and Mut^S phenotypes of *P. pastoris* recombinants

PCR was made directly from plate colonies. A single colony was mixed to 24 µL of MilliQ water for incubation at 65°C, 2 min. A 1 µL aliquot was used to amplification reaction with AOX1 primers (10 pmol/µL). After 5 min incubation at 95°C, *Taq* polymerase (0.8 U) was added and 30 cycles were run as follows: 1 min at 95°C, 1 min at 54°C and 1 min at 72°C, with a 7 min final extension at 72°C. Primers used for AOX region amplification were Fwd 5'GACTGGTTCCAATTGACAAGC 3' and Rev 5'CAAATGGCATTCTGACATCC 3' (*Pichia* Expression Kit Manual, Invitrogen). The amplification products were analyzed by 0.8% agarose gel electrophoresis.

L1 gene expression

Pichia pastoris clones were selected for fermentation tests, and the GS115 and X-33 strains without insert were used as negative controls. The colonies were inoculated in the BMGY – Buffered Glycerol-complex Medium to grow for 16-24 hours at 28-30°C for biomass production. The volume of medium used was equivalent to 10% of the total flask volume. For induction, the culture should be at a DO₆₀₀: 20-30. At this stage, the medium with glycerol was removed by centrifugation (3000xg, 5 min, room temperature) and cells were resuspended in BMMY - Buffered Methanol-complex Medium. The induction was continued for 96h with methanol addition every 24h to a final concentration of 2%. Everyday a volume of 1mL was centrifuged and pellets stored at -80°C, for later analysis.

Analysis of L1 transcription from *P. pastoris* recombinants

The pellets of induced clones, stocked at -80°C, were used for total RNA extraction by phenol acid method, according to Schmitt et al, 1990. cDNA synthesis was carried out with 1pg-1µg RNA, 0.1µg oligoDT 15 (Promega) and MilliQ H₂O, to a final volume of 5µL, for incubation at 70°C 5 min, and on ice, for 5 min. Then, it was added the reaction buffer (1x), MgCl₂ (3mM), RNAsin (20 U), DNTP (0.5mM) and Reverse Transcriptase (5U) for incubation at 42°, for 1 hour, and 70°C, 15 min. The amplification was made by RT-PCR (Reverse Transcriptase / Polymerase Chain Reaction), using cDNA (2 µL), reaction buffer (1x), dNTP (0.08mM), MgCl₂ (1mM), *Taq* DNA polymerase (2.5U), internal primers (15 pmol each) and MilliQ H₂O, to a final reaction volume of 25 µL. The primers (H16 Fw: 5' GGTCATTAGGTGTGGG 3'; H16 Rev: 5' AGCTGTGCCATATGGTTCTG 3'; H18 Fw: 5' ATGGTAGATACTGGATATGGTGC 3'; H18 Rev: 5' CTGCTATACTGCTTAAATTTGGTAG 3'; H33 Fw: 5' GGAACATTGGGGTAAAGGTGTTGC 3'; H33 Rev: 5' CCACAGTAACAAATACCTGATTGCC 3') used were constructed based on an internal sequence of the L1 gene, resulting in a 500 bp amplification product.

Analysis of protein expression

The positive clones for L1 gene transcription were inoculated for a new analysis of induction and expression of recombinant protein by protein electrophoresis and dot blot. Growth and induction were conducted under the same conditions described in previous item. A modified version of the Bradford method was used to determine protein concentration (Bradford, 1976). Proteins (40 µg per well) were run on SDS-PAGE (12.5%) gel electrophoresis and stained with Coomassie blue for checking the protein profile and quality of protein extraction of wild *P. pastoris* yeast cells and its recombinants. Dot blot protocol consisted of these steps: ligation of protein (0.9 µg) in nitrocellulose membrane for 1h; wash with PBS (50mM potassium phosphate, 150mM NaCl; pH 7.2) for 5 min; blocking with 2.5% milk for 40 min; wash with PBS for 5 min; addition of antibody Anti-His alkaline phosphatase-conjugated (Sigma-Aldrich), diluted in 5% milk or Anti-L1 CAMVIR-1 (Chemicon International), diluted in PBS 1X for incubation at 37°C, 1 h; three times wash with PBS-Tween (10 min each), addition of a secondary antibody, peroxidase-conjugated (only for Anti-L1 assay) and revelation with NTB/BCIP (Nitro blue tetrazolium chloride / 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate, toluidine salt) for Anti-His antibody reaction. Anti-L1 antibody dot blot assay was revealed with tetramethylbenzidine dihydrochloride (TMB) substrate (Sigma-Aldrich) for 15 to 20 minutes in the dark. Color development was stopped by rinsing the membrane with distilled water. Results were recorded photographically while the membranes were wet.

Results

P. pastoris expression vectors

HPV 16, 18 and 33 L1 genes were amplified through high fidelity PCR from plasmid pBR322 (HPV 16 and 18) and clinical sample (HPV 33). The PCR products were cloned into pGEM-T easy vector. L1 genes were excised from pGEM constructs through *KpnI* / *SalI* (HPV 16) and *BstBI* / *XhoI* (HPVs 18/33) digestion to insertion into pPICZA, digested with the same restriction enzymes. Clonings were confirmed through PCR, enzyme digestion and sequencing. HPVs 16, 18 and 33 L1 genes were successfully cloned into pPICZA expression vector and the final constructions were called pPICZL1H33, pPICZL1H18 and pPICZL1H33.

Screening of *Pichia pastoris* recombinants and analysis of the Mut⁺ and Mut^S phenotypes

Pichia pastoris was transformed with pPICZL1H16, pPICZL1H18 and pPICZL1H33 constructions and the recombinant clones were selected by Zeocin resistance. Colony PCR using AOX1 primers confirmed gene integration, and also indicated Mut⁺ (X33/pPICZL1H33) and Mut^S (X33/pPICZL1H18, GS115/pPICZL1H16) *P. pastoris* phenotypes (figure 1).

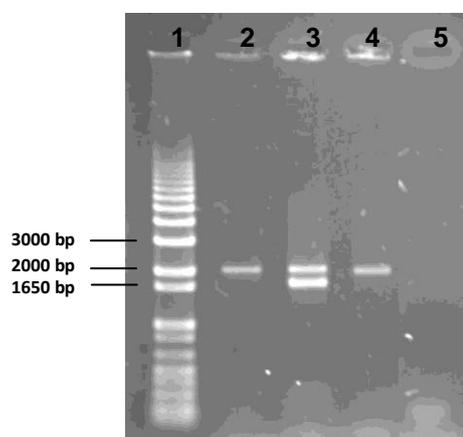


Figure 1. Colony PCR using AOX1 primers, which amplifies the gene of interest plus a fragment of approximately 300bp. Lane 1: 1 Kb plus molecular marker (Invitrogen). Lane 2: X33/pPICZL1H18 recombinant, with the expected size of our gene of interest cloned into pPICZA (1700bp + 300bp = 2000bp). Lane 3: X33/pPICZL1H33 recombinant, showing the 1800bp (1500bp + 300bp) product and the wild-type AOX1 gene (2200bp). Lane 4: GS115/pPICZL1H16 recombinant (1500bp + 300bp = 1800bp). Lane 5: reaction control (without DNA). Analyzing the *P. pastoris* recombinants, it can be seen that lanes 2-4 contain insert, and that the recombinants in lanes 2 and 4 may be Mut^S as there is no wild-type AOX1.

Analysis of HPV L1 transcription

After methanol induction, total RNA from recombinant *P. pastoris* cells was extracted for analysis by RT-PCR. A 500 bp cDNA fragment from L1 gene was observed (figure 2), indicative of active L1 gene transcription in all clones tested.

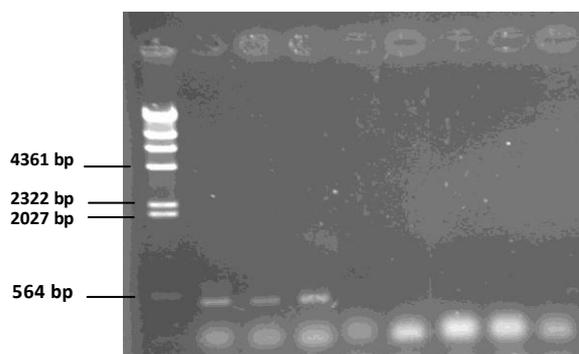


Figure 2. RT-PCR of *P. pastoris* recombinants. Lane 1: Lambda *Hind*III Molecular Marker (New England Biolabs). Lanes 2-3: X33/pPICZL1H18 clones. Lane 4: X33/pPICZL1H33 clone. Lane 5: X33/pPICZ (empty vector, negative control). Lane 6: Reaction control (without DNA). Lane 7: 100bp Molecular Marker (Promega). Lanes 8-10: Controls without reverse transcriptase. The length of the RT-PCR product for L1 gene is 500bp.

Analysis of protein expression

Clones that were transcribing L1 mRNA were analyzed for protein production by SDS-PAGE, Dot Blot and Western blot.

SDS-PAGE

SDS-PAGE using total protein extract from *P. pastoris* was conducted to evaluate the quality of extraction of proteins, and the samples protein profile. Although the protein profile shows no sign of degradation the L1 protein band (~55 kDa) could not be evidenced by SDS-PAGE gel electrophoresis (figure 3).

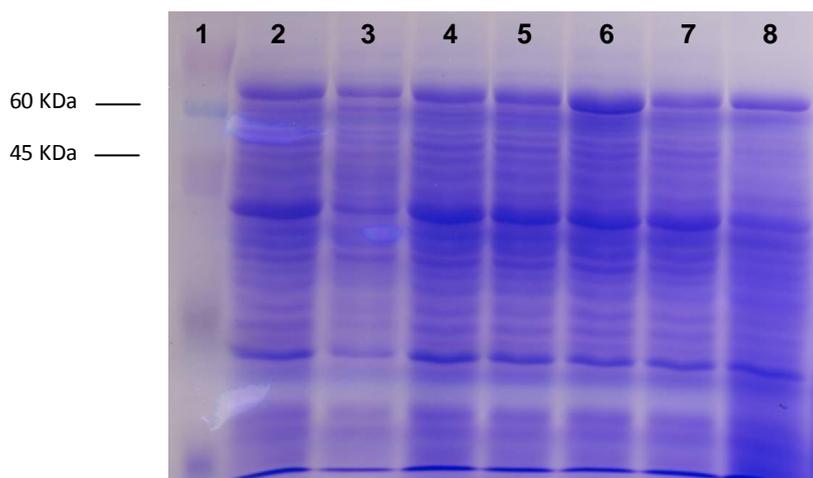


Figure 3. SDS-PAGE analysis of the *P. pastoris* clones total cell lysate (40 µg/lane). Lane 1: Color Burst Electrophoresis Marker (Sigma). Lanes 2-8: cell lysates from: X33/pPICZL1H18 clones (2-3); X33/pPICZL1H33 clones (4-5); GS115/pPICZL1H16 clone (6); X33/pPICZ empty vector, negative control (7); GS115 wild type, negative control (8). Cell lysis were performed after methanol induction. The figure shows that protein degradation did not occur, but the L1 protein band (~55 kDa) could not be visualized. SDS-PAGE gel (12.5%) was stained with Comassie blue.

Dot-Blot

Protein extracts were used in dot blot assays with anti-L1 antibody (CAMVIR-1) and anti-His antibody (figure 4). All samples tested had positive results, indicating L1 protein expression.

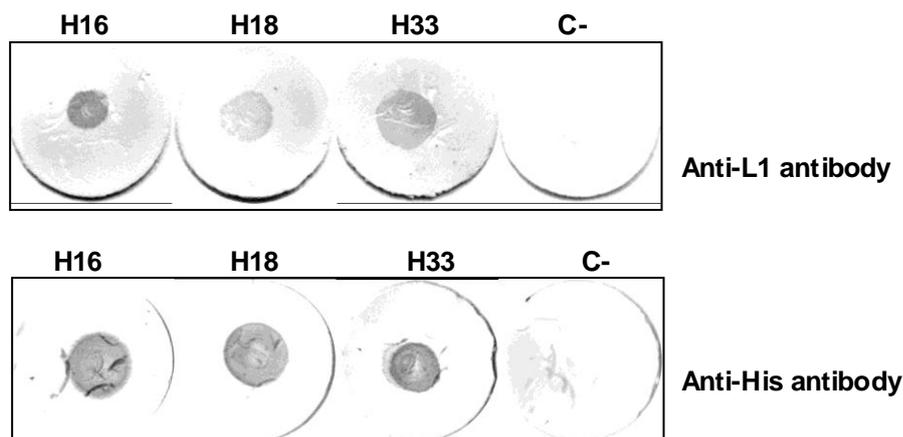


Figure 4. Dot blots using anti-L1 antibody (CAMVIR-1) and anti-His antibody were performed to verify the expression of HPV 16, 18 and 33 L1 proteins, which have a C-terminal 6-histidine tag. The total proteins were extracted from the *P. pastoris* clones and negative control (*P. pastoris* X33 transformed with the empty vector) after methanol induction. Samples were diluted and 0.9 μ g were applied on the membrane. Dot blot with anti-L1 antibody was revealed with TMB, and dot blot with anti-His antibody was revealed with NBT/BCIP.

Western Blot

Western blots were made with the positive samples in dot blot, with anti-His and CAMVIR-1 antibody. None of these showed satisfactory results even after optimizing the procedure, including the transfer of proteins to the nitrocellulose membrane and protein concentrations used (data not shown).

Discussion

HPV is the main cause of cervical cancer worldwide. The papillomavirus infection, its dissemination and progression to cervical cancer are close related to socio-economic factors. Of 274,000 deaths due to cervical cancer each year, more than 80% occur in developing countries, and this proportion is expected to increase to 90% by 2020 (Parkin and Bray, 2006). Currently, the vaccines approved for use in humans are based on high risk HPVs 16 and 18 VLPs, leaving out at least 13 oncogenic HPV types responsible for almost 30% of all cases of cervical cancer (Gasparic et al, 2007). Moreover, the cost of these vaccines is still prohibitive for the majority of the population in developing countries. Geographic variations in the HPV type distribution should be considered to right public health decisions. In Brazil, HPV types 31 and 33 have an important frequency in the Northeast and Central West regions, so the creation of vaccines more suitable to these regions is necessary to control the cervical cancer. There are many expression systems that have been used to express HPV L1 protein such as recombinant baculovirus (Kirnbauer et al, 1993; Liao et al, 2008), transgenic plant (Liu et al, 2005), yeast (Sasagawa et al, 2005; Woo et al, 2008), mammalian cells (Plesa et al, 2003) and insect cells (Volpers et al, 1994). In the present work, we used *Pichia pastoris* cells for heterologous production of HPV 16, 18 and 33 L1 protein.

The *P. pastoris* expression system has gained acceptance as an important host for the production of foreign proteins, as illustrated by the fact that a great number of proteins synthesized in *P.pastoris* have been tested for use as pharmaceuticals. As an eukaryote, *P. pastoris* have many advantages of eukaryotic expression systems, such as protein processing, protein folding, and posttranslational modification, while being as easy to manipulate as *E. coli* or *S. cerevisiae*. *P. pastoris* can produce 10-100-fold more heterologous protein and do not add core terminal oligosaccharides α 1,3 glycan linkages, which are believed to be primarily responsible for the hyperantigenic nature of recombinant proteins, making them particularly unsuitable for therapeutic use (Daly and Hearn, 2005; Torres and Moraes, 2002). We have constructed the expression vectors pPICZL1H16, pPICZL1H18 and pPICZL1H33. These vectors were used to transform cells of the yeast *P. pastoris* and thus express the L1 gene and consequently produce the HPV L1 protein. In *Saccharomyces* it was verified a premature termination of transcription in TA rich sequences such as TTTTATA, that resembles a sequence in HIV-1 gp 120, which resulted in premature termination of the mRNA when expressed in *Pichia* (Daly and Hearn, 2005). We have checked the transcription of the L1 gene of recombinant clones by RT-PCR and it was confirmed that all recombinant clones tested were positive for L1 mRNA transcription.

To detect the presence of L1 protein in the total intracellular yeast extract, SDS-PAGE gels were made, with various protein concentrations, but the presence of the 55-58-KDa band could not be verified. The large number of native proteins into the yeast cell, combined to a possible low expression level, could have hampered the visualization of the band in the SDS-PAGE gel. In order to detect if there were some protein production, even if it was not possible to confirm with protein electrophoresis, we made a dot blot analysis using an anti-his antibody to identify the L1 6-his tag fused protein and the HPV16 L1 antibody (CAMVIR-1), with positive results in all samples tested. CAMVIR-1 identifies an epitope on HPV-16 L1 that is strongly reactive against HPV-16 and -33 and, to a much lesser extent, with HPV-6 and -11 (McClean et al, 1990). In the HPV-18 clones we also observed positive reactions, but less intense if compared with HPV-16 clones, resulting from cross-reaction with the anti L1 HPV-16 linear sequence. The epitope to which CAMVIR-1 is directed is highly conserved among the different HPV types, which could explain the weak cross reactivity with other virus types, including HPV-18 and BPV-1 (McClean et al, 1990; Jesus ALS, unpublished results). Western blots were made with the positive samples in dot blot, with anti-His and CAMVIR-1 antibody. None of these showed satisfactory results even after optimizing the procedure, including the transfer of proteins to the nitrocellulose membrane and protein concentrations

used. Taking into account the specific antibodies that gave positive results in dot blot assays, we found that the failure to detect the protein in the western blot could be linked to some protein degradation when it was submitted to lysis with glass beads, or a low expression level of the heterologous gene, limiting the sensitivity of the technique.

The methylotrophic yeast *Pichia pastoris* has developed into a highly successful system for the production of a variety of heterologous proteins (Cregg et al, 2000). However, many proteins have been produced with varying degrees of success. There are still some unpublished failed trials caused by several factors (Cregg et al, 2000; Porro et al, 2005), including the target gene not being expressed at all in the selected expression system and the expression level being too low to be evidenced by SDS-PAGE or function-based assay because the available characterization method is inconvenient in practice.

Eukariotic cells genes are GC-rich, therefore it is more efficiently translated than viral genes, which generally are AT-rich (Haas et al, 1996). HPV-16 L1 vaccine is relatively non-immunogenic, in contrast to the immunogenic cottontail rabbit papillomavirus (CRPV) L1 vaccine. In general, CRPV codon usage is similar to other papillomavirus genes, however, CRPV L1 gene is relatively GC-rich, with a GC content close to the mammalian genome consensus, and several codons not frequently used in mammalian genes are significantly less common in CRPV L1 than in HPV-16 (Sundaram et al, 1996).

Recent reports (Byrne et al, 2000; Valencik and McDonald, 2001; Massaer et al, 2001) have shown that codon optimization can improve expression levels in various expression systems. Codon optimization was considered to improve expression by using DNA rebuilding for replacement of rare codons to preferred codons for efficient translation in *P. pastoris*. The optimization of genes result in high levels of expression according to various authors as Teng et al (2007) which increased 10-fold the expression of *Bacillus licheniformis* β -1,3-1, 4-glucanase gene; and Outchkourov et al (2002) which increased by 20-fold the expression of equistatin, the proteinase inhibitor from the sea anemone *Actinia equine*, both compared with wild type gene expression in *Pichia pastoris* cells.

Additionally, inhibitory factors have been identified among the first 514 nucleotides in the HPV 16 L1 gene, which prevent the production of L1 protein because of its action on the mRNA. These elements are able to reduce the expression of the L1 gene to undetectable levels in mammalian cells (Collier et al, 2002; Schwartz, 2000).

The data presented in this work confirm the viability of the *P. pastoris* cells system to heterologous production of L1 HPV protein, a natural candidate for a vaccinal strategy against infection. It was hypothesized that synonymous codon usage bias differences were the more probable cause of the observed translational barriers. A special attention is needed to more relevant HPV types in the population, such as HPV 33 and 31, allowing the inclusion of these vaccines in a broad effective vaccination program.

References

- Balmelli C, Roden R, Potts A, Schiller J, et al. (1998). Nasal Immunization of Mice with Human Papillomavirus Type 16 Virus-Like Particles Elicits Neutralizing Antibodies in Mucosal Secretions. *J Virol.* 72: 8220-8229.
- Bosch FX, Manos MM, Muñoz N, Sherman M, et al. (1995). Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. *J Natl Cancer Inst.* 87: 796-802.
- 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.
- Breitburd F, Kirnbauer R, Hubbert NL, Nonnenmacher B, et al. (1995). Immunization with virus-like particles from cottontail rabbit papillomavirus (CRPV) can protect against experimental CRPV infection. *J Virol.* 69: 3959-63.
- Byrne MP, Titball RW, Holley J and Smith LA (2000). Fermentation, purification, and efficacy of a recombinant vaccine candidate against botulinum neurotoxin type F from *Pichia pastoris*. *Protein Expr Purif.* 18: 327-337.
- Cavalcanti SM, Frugulhetti IC, Passos MR, Fonseca MF, et al. (1994). Prevalence of human papillomavirus DNA in female cervical lesions from Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 89: 575-580.
- Chauhan AK, Arora D and Khanna N. (1999). A novel feeding strategy for enhanced protein production by fed-batch fermentation in recombinant *Pichia pastoris*. *Process Biochemistry.* 34: 139-145.
- Christensen ND, Kreider JW, Cladel NM and Galloway DA. (1990). Immunological cross-reactivity to laboratory-produced HPV-11 virions of polysera raised against bacterially derived fusion proteins and synthetic peptides of HPV-6b and HPV-16 capsid proteins. *Virology.* 175: 1-9.
- Christensen ND, Kirnbauer R, Schiller JT, Ghim SJ, et al. (1994). Human papillomavirus types 6 and 11 have antigenically distinct strongly immunogenic conformationally dependent neutralizing epitopes. *Virology.* 205: 329-335.
- Collier B, Oberg D, Zhao X and Schwartz S. (2002). Specific inactivation of inhibitory sequences in the 5' end of the human papillomavirus type 16 open reading frame results in production of high levels of L1 protein in human epithelial cells. *J Virol.* 76: 2739-2752.
- Cregg JM, Vedvick TS and Raschke WC. (1993). Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris*. *Biotechnology (NY).* 11: 905-910.
- Cregg JM, Cereghino JL, Shi J. and Higgins DR. (2000). Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. *Mol Biotechnol.* 16: 23-52.
- Daly R and Hearn TW. (2005). Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production. *J Mol Recogn.* 18: 119-138.
- Eluf-Neto J, Booth M, Munõz N, Bosch FX, et al. (1994). Human papillomavirus and invasive cervical cancer in Brazil. *Br J Cancer.* 69: 114-119.

- Fifis T, Gamvrellis A, Crimeen-Irwin B, Pietersz GA, et al. (2004). Size-dependent immunogenicity: Therapeutic and protective properties of nano-vaccines against tumors. *J Immunol.* 173: 3148-3154.
- Files D, Ogawa M, Scaman CH and Baldwin SA. (2001). A *Pichia pastoris* fermentation process for producing highlevel of recombinant human cychatin-C. *Enzyme Microb Technol.* 29: 335-340.
- Gasparic M, Rubio I, Thönes N, Gissmann L, et al. (2007). Prophylactic DNA immunization against multiple papillomavirus types. *Vaccine.* 25: 4540-4553.
- Gietz RD and Schiestl RH. (1996). Transformation of lithium-treated yeast cells and the selection of auxotrophic and dominant markers. In: *Methods in Molecular Biology* (Evans IH, ed). Humana Press, Totowa, NJ.
- Gonçalves MA, Massad E, Burattini MN and Villa LL. (1999). Relationship between human papillomavirus (HPV) genotyping and genital neoplasia in HIV-positive patients of Santos City, São Paulo, Brazil. *Int J STD AIDS.* 10: 803-807.
- Guimarães V, Guimarães R, Brandão L, Silva MFPTB, et al. (2008). Association between *MBL2* gene functional polymorphisms and high-risk human papillomavirus infection in Brazilian women. *Hum Immunol.* 69: 273-278.
- Haas J, Park EC and Seed B. (1996). Codon usage limitation in the expression of HIV-1 envelope glycoprotein. *Curr Biol.* 6: 315-324.
- Harper DM, Franco EL, Wheeler CM, Moscicki AB, et al. (2006). Sustained efficacy up to 4.5 years of a bivalent L1 virus-like particle vaccine against human papillomavirus types 16 and 18: Follow-up from a randomised control trial. *Lancet.* 367: 1247-1255.
- Hasslacher M, Schall M, Hayn M, Bona R, et al. (1997). High-level intracellular expression of hydroxynitrile lyase from the tropical rubber tree *Hevea brasiliensis* in microbial hosts. *Protein Expression Purification.* 11: 61-71.
- Hollenberg CP and Gellissent G. (1997). Production of recombinant proteins by methylotrophic yeasts. *Curr Opin Biotechnol.* 8: 554-560.
- Invitrogen (2007). EasySelect *Pichia* Expression Kit. A manual of methods for expression of recombinant proteins using pPICZ and pPICZα in *Pichia pastoris*. Catalog no. K1740-01.
- Kirnbauer R, Taub J, Greenstone H, Roden R, et al. (1993). Efficient self-assembly of human papillomavirus type 16 L1 and L1-L2 into virus-like particles. *J Virol.* 67: 6929-6936.
- Kirnbauer R, Chandrachud LM, O'neil BW, Wagner ER, et al. (1996). Virus-like Particles of Bovine Papillomavirus Type 4 in Prophylactic and Therapeutic Immunization. *Virology.* 219: 37-44.
- Liao S, Wang S, Xu L, Deng D et al. (2008). Production and verification of human papillomavirus type 18 vaccine *in vitro*. *Oncol Rep.* 20: 211-217.

- Liu RS, Yang KY, Lin J, Lin YW, et al. (2004). High-yield expression of recombinant SARS coronavirus nucleocapsid protein in methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *World J Gastroenterol.* 10: 3602-3607.
- Liu HL, Li WS, Lei T, Zheng J, et al. (2005). Expression of human papillomavirus type 16 L1 protein in transgenic tobacco plants. *Acta Biochim Biophys Sin.* 37: 153-158.
- Lorenzato F, Ho L, Terry G, Singer A, et al. (2000). The use of human papillomavirus typing in detection of cervical neoplasia in Recife (Brazil) *Int J Gynecol Cancer.* 10: 143-150.
- Lowndes CM. (2006). Vaccines for cervical cancer. *Epidemiol. Infect.* 134: 1-12.
- Massaer M, Mazzu P, Haumont M, Magi M, et al. (2001). High-level expression in mammalian cells of recombinant house dust mite allergen ProDer p 1 with optimized codon usage. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 125: 32-43.
- McLean CS, Churcher MJ, Meinke J, Smith GL, et al. (1990). Production and characterisation of a monoclonal antibody to human papillomavirus type 16 using recombinant vaccinia virus. *J Clin Pathol.* 43: 488-492.
- Muñoz N, Bosch FX, de Sanjose S, Herrero R, et al. (2003). Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med.* 348: 518-527.
- Muñoz N, Castellsagué X, González AB and Gissmann L (2006). Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. *Vaccine.* 24S3: 1-10.
- Ning D, Junjian X, Qing Z, Sheng X, et al. (2005). Production of recombinant humanized anti-HBsAg Fab fragment from *Pichia pastoris* by fermentation. *J Biochem Mol Biol.* 38: 294-299.
- Noronha V, Mello W, Villa L, Brito A, et al. (1999). Human papillomavirus associated with uterine cervix lesions. *Rev Soc Bras Med Trop.* 32: 235-40.
- Outchkourov NS, Stiekema WJ and Jongsma MA. (2002). Optimization of the Expression of Equistatin in *Pichia pastoris*. *Protein Expr Purif.* 24: 18-24.
- Paavonen J, Jenkins D, Bosch FX, Naud P, et al. (2007). Efficacy of a prophylactic adjuvanted bivalent L1 virus-like particle vaccine against infection with human papillomavirus types 16 and 18 in young women: An interim analysis of a phase III double-blind, randomised controlled trial. *Lancet.* 369: 2161-2170.
- Parkin D M. (2006). The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002. *Int. J. Cancer.* 118: 3030-3044.
- Parkin DM and Bray F. (2006). Chapter 2: the burden of HPV-related cancers. *Vaccine.* 24S3: 11-25.
- Plesa A, Anton G, Diaconu C, Stoian M, et al. (2003). Cloning and expression of the L1 major capsid protein of the human papillomavirus 18 in murine cells. *Int J Mol Med.* 12: 1021-1026.

- Pfister H. (2003). Chapter 8: Human papillomavirus and skin cancer. *J Natl Cancer Inst Monogr.* 31: 52-56.
- Porro D, Sauer M, Branduardi P and Mattanovich D. (2005). Recombinant protein production in yeasts. *Mol Biotechnol.* 31: 245-259.
- Roden R, Monie A and Wu TC. (2006). The impact of preventive HPV vaccination. *Discov Med* 6: 175-181.
- Rose RC, White WI, Li M, Suzich JA, et al. (1998). Human Papillomavirus Type 11 Recombinant L1 Capsomeres Induce Virus-Neutralizing Antibodies. *J Virol.* 72: 6151-6154.
- Sambrook J, Fritsch EF and Maniatis T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. *NY Cold Spring Harbor Laboratory Press.* 2 ed.
- Singer A, Ho L, Terry G, and Kwie TS. (1995). Association of human papillomavirus with cervical cancer and precancer. In: Genital warts: human papillomavirus infection (A. Mindel, ed.) Edward Arnold, London, United Kingdom. 105-129.
- Sasagawa T, Tani M, Basha W, Rose RC, et al. (2005). A human papillomavirus type 16 vaccine by oral delivery of L1 protein. *Virus Res.* 110: 81-90.
- Schwartz S. (2000). Regulation of human papillomavirus late gene expression. *Upsala J Med Sci.* 105: 171-192.
- Sreekrishna K, Brankamp RG, Kropp KE, Blankenship DT, et al. (1997). Strategies for optimal synthesis and secretion of heterologous protein in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Gene.* 190: 55-62.
- Sundaram P, Xiao W and Brandsma JL. (1996). Particle-mediated delivery of recombinant expression vectors to rabbit skin induces high-titered polyclonal antisera (and circumvents purification of a protein immunogen. *Nucleic Acids Research.* 24: 1375-1377.
- Teng D, Fan Y, Yang Y, Tian Z, et al. (2007) Codon optimization of *Bacillus licheniformis* β -1,3-1, 4-glucanase gene and its expression in *Pichia pastoris*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 74: 1074-1083.
- 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.
- Torres FAG and Moraes LMP. (2002). Proteínas recombinantes produzidas em leveduras *Biotecnolog Cienc Desenvolv.* 29: 20-22.
- Valencik ML and McDonald JA. (2001). Codon optimization markedly improves doxycycline regulated gene expression in the mouse heart. *Transgenic Res.* 10: 269-275.
- Volpers C, Schirmacher P, Streeck RE and Sapp M. (1994). Assembly of the major and the minor capsid protein of human papillomavirus type 33 into virus-like particles and tubular structures in insect cells. *Virology.* 200: 504-512.

White WI, Wilson SD, Bonnez W, Rose RC, et al. (1998). In Vitro Infection and Type-Restricted Antibody-Mediated Neutralization of Authentic Human Papillomavirus Type 16. *J. Virol.* 72: 959-964.

White WI, Wilson SD, Palmer-Hill FJ, Woods RM, et al. (1999). Characterization of a Major Neutralizing Epitope on Human Papillomavirus Type 16 L1. *J. Virol.* 73: 4882-4889.

Woo MK, An JM, Kim JD, Park SN, et al. (2008). Expression and purification of human papillomavirus 18 L1 virus-like particle from *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch Pharm Res.* 31: 205-209.