



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
PATOLOGIA MOLECULAR

EXPRESSÃO TRANSIENTE DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES UTILIZANDO SISTEMA DE PLANTA

Ana Cláudia de Souza

Brasília, 2014



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
PATOLOGIA MOLECULAR

EXPRESSÃO TRANSIENTE DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES UTILIZANDO SISTEMA DE PLANTA

Ana Cláudia de Souza

Orientador: Dr. Tatsuya Nagata

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular, da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Patologia Molecular.

Brasília, 2014

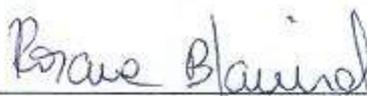
Tese de autoria de Ana Cláudia de Souza, intitulada “Expressão transiente de proteínas recombinantes utilizando sistema de planta”, apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Patologia Molecular da Universidade de Brasília, em 5 de setembro de 2014, pela banca examinadora abaixo assinada:



Prof. Dr. Tatsuya Nagata
Patologia Molecular – UnB (Orientador)



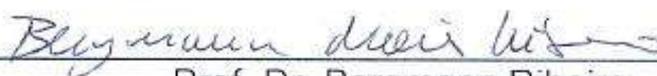
Profª. Dra. Virginia Carla de Oliveira
Biotecnologia – UFT



Dra. Rosana Blawid
Biologia Molecular - UnB



Dr. Elibio Leopoldo Rech Filho
EMBRAPA- Cenargen



Prof. Dr. Bergmann Ribeiro
Patologia Molecular - UnB

Dra. Anelise Franco Orílio
Biologia Celular – UnB (Suplente)

Brasília, 2014

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus, força maior que guia e protege minha caminhada.

Agradeço a toda minha família, meu alicerce. Especialmente, meus pais Sônia e José, saibam que todas as conquistas da minha vida são fruto não dos conselhos, mas do exemplo de vocês! Aos meus irmãos Alan e Adriano, obrigada pelo companheirismo e amizade, amo vocês incondicionalmente! A minha avó Ermelinda, obrigada pelos conselhos e pelo acolhimento. Ao meu marido Aldo, obrigada pela compreensão naqueles dias difíceis, pelos conselhos que não me deixaram desanimar, pelo companheirismo durante toda a trajetória do doutorado e pelo amor compartilhado. Obrigada às minhas irmãs de coração: cunhada Polyana, Jaqueline, Denise e Edvane que acompanharam toda minha trajetória, ouvindo minhas lamentações e dando todo apoio para que eu seguisse em frente!

Agradeço ao meu mestre e orientador Prof. Tatsuya, obrigada pela oportunidade de conhecer e conviver com a figura humana que você é, obrigada pela confiança depositada, pela paciência e ensinamentos. Aprendi muito com os seus exemplos de humildade e com sua maneira de educar.

Agradeço a todos os meus colegas de laboratório (André, Bruna, Fran, Karol, Kênia, Layssa, Raissa, Lorena, Raquel, Thaís, Rosana, Andressa, Stella, Simone, João, Beatriz, Câmara, Cícero) obrigada a todos pela convivência, pela paciência com minhas perguntas e meus erros, pelos ensinamentos. Cada um ocupa um espaço especial na minha vida!

Fran, nunca esquecerei dos nossos almoços e conversas infundáveis! Kelly, você é um amor de pessoa, se tornou mais que uma colega, uma amiga, sempre disposta a ajudar, e por sinal me ajudou muito, que Deus continue te iluminando sempre! Layssa e Bruna, as “crianças” do laboratório, obrigada pela ajuda nos protocolos difíceis e pelas risadas proporcionadas! Karol, obrigada por toda ajuda, como estou sentindo falta de nossas conversas! Thaís, companheira de dilemas e dúvidas, como foi bom compartilhar tantas coisas com você e hoje ter sua amizade! Raquel, sua disposição em me ajudar

desde o início, já demonstrava a pessoa altruísta que você é, como é bom poder confidenciar minha vida com você, obrigada pela amizade!

Obrigada a todos os colegas e professores responsáveis pelo laboratório Baculovirus e Virologia Vegetal, pela convivência e colaboração. Quero agradecer especialmente a Virginia pela amizade, pelas conversas, por me ajudar nos protocolos difíceis, nunca esquecerei de sua alegria e disposição em ajudar!

Obrigada ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

Obrigada a Prof. Dra. Alice K. Inoue Nagata por meio do CNPH (Embrapa) por colaborar com nosso trabalho.

Obrigada ao Programa de Pós-graduação em Patologia Molecular da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília pela oportunidade.

Obrigada à direção, professores e todos os profissionais da Faculdade LS, que pacientemente entenderam as minhas faltas e pelo estímulo para concluir esta caminhada.

RESUMO

A utilização de plantas como sistema de produção de proteínas é uma alternativa que está crescendo, e se tornando um importante recurso para a expressão de proteínas de uso terapêutico e de enzimas. Progressos significativos têm sido feitos no desenvolvimento de proteínas recombinantes produzidas em cultura celular e em tecidos de plantas, além de avanços no desenho e implementação de biorreatores. Portanto, o objetivo deste estudo é utilizar sistema de planta para expressão transiente de proteínas recombinantes. Um dos objetivos específicos é expressar a proteína do capsídeo de norovirus (NV CP) para montagem de *virus like particles* (VLP) utilizando vetor binário e os genes de supressor viral de silenciamento gênico (SG). Outro objetivo específico é produzir o antígeno multiepitopo do vírus da dengue utilizando vetor viral baseado no *Cucumber mosaic virus* (CMV). Como objetivo específico final o vetor baseado no CMV foi testado como vetor de indução de silenciamento gênico (VIGS). Para a expressão de NV CP, as proteínas VP1 e VP2 deste vírus foram clonadas em vetor binário e coexpressas com a proteína viral supressora de SG, 126 K de *Pepper mild mottle virus*, em *Nicotiana benthamiana*. Para visualização, as VLPs foram purificadas de folhas agroinfiltradas e observadas no microscópio eletrônico de transmissão. O uso de vetor binário e gene de supressor viral de SG foi viável para expressão e montagem de NV VLP. Para a expressão da proteína multiepitopo do vírus da dengue, foi realizada a modificação do vetor viral baseado no CMV. O RNA 2 do vírus foi modificado para conter os sítios de clonagem, e o genoma do vírus foi clonado em vetor binário para que o mesmo pudesse ser utilizado no sistema de agroinfiltração. Os resultados demonstraram que o vetor de expressão baseado no CMV produziu a proteína de interesse com baixo rendimento e que, portanto, deve ser aprimorado. Com o objetivo de testar, portanto, a viabilidade deste vetor como VIGS, o mesmo foi modificado novamente para que pudesse realizar a clonagem utilizando sistema de recombinação. Para isso, o gene da fitoeno desaturase (PDS) foi clonado neste vetor, e os resultados demonstraram que o mesmo é infeccioso, porém novos testes serão realizados para aprimorar seu uso como VIGS.

ABSTRACT

The use of plant system as protein expression is an alternative strategy for the mass production of therapeutic proteins and enzymes. Significant progress have been made in producing recombinant proteins in plant cell culture and in plant tissues for the implementation as bioreactors. Therefore, the aim of this study is to use plant system for transient expression of human virus antigen. One of viral proteins expressed was the capsid protein of norovirus (NV-CP) for assembly of virus like particles (VLP) using binary vector and viral suppressor silencing gene (SG). Another protein was the dengue multi-epitope antigen using *Cucumber mosaic virus* (CMV)-based viral vector. CMV-based vector was tested also as the vector induced gene silencing (VIGS) vector. For expression of NV-CP, the gene of VP1 and VP2 protein were cloned into binary vector and co-expressed with viral protein suppressor (SG), 126K protein of *Pepper mild mottle virus* in *Nicotiana benthamiana*. To confirm the VLPs assembly, the purified VP1 fraction was observed by transmission electron microscopy. The results demonstrated that the system using binary vector and SG is viable for the expression and assembly of NV VLPs. For dengue multiepitopo protein expression, the CMV-based vector was modified. CMV RNA 2 segment was modified to contain new cloning site and virus genome was cloned into the binary vector to be used in agroinfiltration system. The results showed that CMV-based protein expression vector produced the target protein with low levels and, therefore, should be improved the system. To evaluate the viability of the CMV as a VIGS vector, CMV vector was modified introducing Gateway recombination site (Invitrogen). The phytoene desaturase (PDS) gene was cloned into this vector and infiltrated expecting photo-breaching effect resulted as gene knock-down by VIGS. The results demonstrate that it was infectious, but clear knock-down phenotype as photo-breaching was not observed. The further tests are needed to enhance the effect as VIGS.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	iv
RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
CAPÍTULO I: Expressão transiente de proteínas recombinantes utilizando sistema de planta	1
1- Introdução Geral	1
1- Expressão de proteínas recombinantes em planta: relevância para a área biotecnológica e vantagens	1
1.2- Expressão de proteínas recombinantes em planta: desafios e limitações ..	3
1.3- Estratégias de expressão de proteínas recombinantes em sistema de planta : escolha da planta e do tipo de transformação	6
1.3.1- Sistema de expressão por meio de transformação nuclear estável e transplastômico: vantagens e limitações	7
1.3.2- Sistema de expressão por meio de cultura celular: vantagens e limitações	10
1.3.3- Sistema de expressão por meio de transformação transiente: vantagens e desvantagens.....	11
1.4- Perspectivas da utilização do sistema de planta na área biotecnológica ..	15
2- Objetivo geral do trabalho	17
3- Objetivos específicos	17
CAPÍTULO II: Expressão e montagem de “<i>virus like particles</i>” de norovirus em planta utilizando supressor viral de silenciamento gênico	18
1- Introdução	18
1.1- Norovírus - patogenia e epidemiologia, taxonomia e características estruturais.....	18
1.2- Sistemas de expressão de VLP de norovirus.....	23
1.3- Silenciamento gênico e proteínas virais supressoras de silenciamento....	27
2- Objetivo Geral	33
3- Objetivos específicos	33

4- Metodologia	34
4.1- Amplificação e clonagem de mGFP	34
4.2- Teste das proteínas virais supressoras de PTGS	36
4.3- Amostra de NV utilizada no estudo	38
4.4- Amplificação e clonagem de duas regiões do genoma do NVGII-4	38
4.5- Transformação das construções <i>vp1</i> e <i>vp1+vp2+3'UTR</i> em <i>A. tumefaciens</i>	39
4.6- Agroinfiltração das duas construções (<i>vp1</i> e <i>vp1+vp2+3'UTR</i>) em <i>N. benthamiana</i> e análise por <i>Western blot</i>	40
4.7- Agroinfiltração e purificação da construção <i>vp1+vp2+3'UTR</i> em GV3101 com supressor de PTGS	42
4.8- Alternativas para otimizar a produção de VLP	43
4.9- Otimização de códon da proteína VP1	44
5- Resultados	45
5.1- Amplificação de mGFP e teste com as proteínas virais supressoras de PTGS	45
5.2- Amplificação dos fragmentos de <i>vp1</i> e <i>vp1+vp2+3'UTR</i>	47
5.3- Análise da expressão das construções <i>vp1</i> e <i>vp1+vp2+3'UTR</i> com supressor de PTGS.....	48
5.4- Visualização de NV VLP a partir da expressão da construção <i>vp1+vp2+3'UTR</i> com o supressor viral de PTGS –Hc-Pro de BsMoV.....	50
5.5- Visualização de NV VLP a partir da expressão da construção <i>vp1+vp2+3'UTR</i> com o supressor viral de PTGS – 126K PMMoV	51
5.6- Otimização de códon de NV CP.....	52
6- Discussão e conclusão	54
CAPÍTULO III: Utilização do vetor viral tripartido de <i>cucumber mosaic virus</i> para expressão de antígeno multi epítopo da dengue	58
1- Introdução	58
1.1- <i>Cucumber mosaic virus</i> : características gerais e taxonomia.....	58

1.2- Vetores virais baseados no CMV	62
1.3- Principais aspectos da Dengue.....	68
1.3.1- Conceito e características do agente etiológico da dengue	68
1.3.2- Diagnóstico laboratorial da dengue	72
2- Objetivo geral	75
3- Objetivos específicos	75
4- Metodologia	76
4.1- Vetor tripartido baseado no CMV – origem do vetor original.....	76
4.2- Desenvolvimento do vetor de expressão baseado no CMV – modificação do cDNA2 do vírus	77
4.3- Agroinfiltração do vetor tripartido baseado no CMV	79
4.4- Amplificação e clonagem do gene repórter (mGFP) – teste do vetor baseado no CMV quanto a capacidade de expressão.....	83
4.5- Desenho e síntese da proteína multiepitopo DIII da dengue.....	85
4.6- Clonagem da proteína multiepitopo da dengue no vetor baseado no CMV e análise de sua expressão.....	85
5- Resultados.....	88
5.1- Construção do vetor de expressão baseado no genoma tripartido do CMV	88
5.2- Teste de infectividade do vetor viral baseado no genoma tripartido do CMV- vetor original e vetor modificado	92
5.3- Clonagem de mGFP no vetor de expressão baseado no CMV e teste de viabilidade deste vetor.....	94
5.4- Desenho da proteína multiepitopo da dengue – multiepitopo DIII.....	96
5.5- Clonagem de multiepitopo DIII no vetor de expressão baseado no CMV e teste de expressão em <i>N.benthamiana</i>	96
6 - Discussão e considerações finais.....	99
CAPÍTULO IV: Utilização do vetor viral tripartido de <i>cucumber mosaic vírus</i> como vetor de indução de silenciamento gênico em planta	103

1- Introdução	103
1.1- Silenciamento gênico induzido por vírus – <i>virus induced gene silencing</i> (VIGS) – conceito, histórico e relevância biotecnológica.....	103
1.2- Silenciamento gênico induzido por vírus – mecanismo, vantagens e limitações	105
1.3- Desenvolvimento da tecnologia baseada em VIGS – características do vetor, tipos de vírus e plantas, e genes repórteres mais comuns.....	107
2- Objetivo geral	111
3- Objetivos específicos	111
4- Metodologia	112
4.1- Construção do VIGS baseado no genoma tripartido do CMV	112
4.2- Modificação do gene de resistência do vetor de entrada pENTR 2B	115
4.3- Agroinfiltração do vetor tripartido baseado no CMV	117
4.4- Amplificação e clonagem do gene PDS no vetor de entrada pENTR 2B Amp ^R e posterior clonagem no vetor de destino	119
4.5- Agroinfiltração do VIGS baseado no genoma tripartido do CMV	120
5- Resultados parciais e discussão	121
5.1- Construção do vetor de destino baseado no cDNA2 modificado do CMV	121
5.2- Modificação do gene de resistência do vetor de entrada – criação do vetor pENTR 2B Amp ^R	123
5.3- Teste da infectividade do vetor de destino do sistema Gateway baseado no cDNA2 do CMV	125
5.4- Amplificação e clonagem do gene PDS no vetor de destino baseado no cDNA2 do CMV – cDNA2 asPDS.....	127
6- Metas e perspectivas	130
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	131
ANEXO I - ARTIGO PUBLICADO	151

CAPÍTULO I: Expressão transiente de proteínas recombinantes utilizando sistema de planta

1- Introdução Geral

1- Expressão de proteínas recombinantes em planta: relevância para a área biotecnológica e vantagens

As proteínas são amplamente utilizadas em pesquisas, na medicina e na indústria, algumas são difíceis ou impossíveis de serem produzidas naturalmente devido à baixa produtividade, ou seu uso na forma natural pode oferecer riscos biológicos. Neste contexto, o uso de proteínas recombinantes ganha importância nos cenários mencionados. Tradicionalmente a produção das mesmas ocorre por meio do uso de cultura celular de insetos, de mamíferos, fermentação microbiana e animais transgênicos, porém estes mecanismos são dispendiosos e não são totalmente seguros e autênticos (Ma *et al.*, 2003).

Com os avanços das técnicas de biologia molecular a partir da década de 80, o uso de plantas como sistema de expressão de proteínas recombinantes, passa a ser uma nova e promissora forma de gerar e produzir uma ampla variedade de proteínas funcionais tanto na área da saúde como na área industrial (Tiwari *et al.*, 2009).

Fisher *et al.* (1999), realizaram um trabalho comparando os vários sistemas de expressão: plantas transgênicas, bactérias, leveduras, células de mamíferos e animais transgênicos. Concluíram que em termos de riscos de contaminação por patógenos animais, os que possuem menor risco são as plantas e leveduras. Com relação aos custos de produção as plantas são as que apresentam menor custo, seguido de bactérias e leveduras, sendo células de mamíferos e animais transgênicos os mais onerosos. Outros itens também foram abordados como tempo gasto para expressão, custo para produção em larga escala, rendimento, autenticidade da proteína, dentre outros.

Concluiu-se que o uso de plantas como sistema de expressão possui várias vantagens quando comparado com outros sistemas como microbiano e animal. Outros trabalhos corroboraram estas vantagens: relacionadas ao baixo custo de produção, rápida produção em larga escala, não oferece risco de

contaminação por patógenos humanos ou animais, possui mecanismos pós traducionais semelhantes às células humanas e produz proteínas complexas com precisão (Merlin *et al.*, 2014; Xu *et al.*, 2012; Paul e Ma, 2011; Tiwari *et al.*, 2009; Boehm, 2007; Cañizares *et al.*, 2005; Ma *et al.*, 2003).

Historicamente a primeira proteína recombinante de interesse farmacêutico expressa em planta foi produzida por Barta *et al.* (1986). Os autores mencionaram em seu trabalho que: “no intuito de estudar se o RNA de mamíferos é transcrito funcionalmente em sistema de planta foi construído um gene quimérico utilizando o gene do hormônio de crescimento humano, flanqueado com fragmentos de DNA contendo o promotor e sítio de poliadenilação do gene da nopalina sintase.” Portanto, neste estudo foi expresso o hormônio do crescimento humano utilizando tabaco e girassol transgênicos via *Agrobacterium tumefaciens*.

Desde então, muitas outras proteínas humanas foram expressas utilizando sistema de planta, e a autenticidade estrutural de uma das primeiras proteínas recombinantes expressas foi confirmada em um trabalho realizado por Mason *et al.* (1992). Neste trabalho a proteína testada quanto a sua imunogenicidade foi a HBs do vírus da hepatite B. A expressão ocorreu de forma transiente utilizando vetor binário via *Agrobacterium tumefaciens* em folhas de tabaco, e a imunogenicidade foi testada *in vitro*.

No trabalho de revisão, Ma *et al.* (2003) descreveram a utilização de planta na produção de diversas proteínas recombinantes, como de enzimas de uso industrial, proteínas para utilização em pesquisas, proteínas do leite para serem utilizadas em suplementos alimentares e novos polímeros que possuem tanto uso medicinal como industrial. Os autores fazem um levantamento de trabalhos importantes que relatavam diversas proteínas diferentes de uso farmacêutico, de anticorpos, de subunidades vacinais, todas produzidas utilizando os diversos sistemas de expressão em plantas.

Os trabalhos de Merlin *et al.* (2014), Xu *et al.* (2012), Paul e Ma (2011), Sharma e Sharma (2009), Tiwari *et al.* (2009) corroboram o estudo anterior, ao relatarem que o uso de planta como sistema de produção de proteínas está em ascensão e possui relevância na área de biotecnologia, pois seu uso é bastante amplo e variado tanto na área industrial como terapêutica. Foram citadas a capacidade das plantas em expressar proteínas de uso terapêutico

como anticorpos, fatores de crescimento e hormônios/enzimas; proteínas nutricionais como peptídeos e carboidratos; antígenos vacinais como subunidades e peptídeos vacinais; produtos industriais como detergentes e têxtil; e plásticos biodegradáveis como poliésteres e polímeros.

De acordo com a revisão de literatura realizada por Xu *et al.* (2012) e Paul e Ma (2011), várias proteínas de uso terapêutico e industrial estão sendo produzidas, testadas e até comercializadas como: anticorpos contra o vírus West Nile produzidos em plantas pela empresa Planet Biotechnology Inc. (Hayward, CA; <http://www.planetbiotechnology.com>), que já completaram a fase II de estudos clínicos. Vacinas contra os vírus H5N1 e H1N1, que estão em fase II e fase I de estudos clínicos respectivamente, cujas pesquisas estão sendo desenvolvidas pela Medicago Inc. (Québec, Canadá; <http://www.medicago.com>). A enzima glicocerebrosidase usada no tratamento da doença de Gaucher, produzida pelo grupo Protalix BioTherapeutics, Inc. (Israel; <http://www.protalix.com>) que gerou o medicamento Cerezyme® (Genzyme's Cerezyme®, Genzyme, Cambridge, MA, USA) que já está sendo comercializado. São citados também biopolímeros como colágeno, com ensaios pré clínicos realizados pela Medicago Inc., proteína da seda da aranha e várias outras proteínas de uso industrial.

1.2 – Expressão de proteínas recombinantes em planta: desafios e limitações

Um dos desafios e limitações da expressão de proteínas utilizando sistema de planta é conseguir uma produção com alto rendimento. Para que este objetivo seja alcançado alguns pontos importantes devem ser observados quando se escolhe este sistema: utilizar promotores fortes, duplicados ou híbridos, promotores de indução, construir potencializadores e ativadores para favorecer o processo de transcrição; otimizar as regiões 5' e 3' (região *UTR*), utilizar otimização de códon para potencializar a tradução; sinalizar as proteínas para determinadas organelas como o retículo endoplasmático; coexpressar inibidores de protease ou cofatores/subunidades proteicas; e expressar a proteína fusionada com um peptídeo que tenha estabilidade e alta expressão, no intuito de melhorar o acúmulo e a estabilidade destas proteínas (Xu *et al.*, 2012; Obembe *et al.*, 2011; Sharma e Sharma 2009; Ma *et al.*, 2003).

Outra possibilidade de aumentar o rendimento proteico seria direcionar a produção para o cloroplasto ou mesmo produzir uma planta transplastômica (transformação estável do cloroplasto), a condição para a produção em cloroplasto é que a proteína não necessite de modificações pós traducionais como a glicosilação.

Outra limitação relacionada ao uso da planta como sistema de expressão é o processo de glicosilação, que apesar da semelhança com o sistema de células animais não é totalmente idêntico (Obembe *et al.*, 2011; Sharma e Sharma, 2009; Ma *et al.*, 2003). As semelhanças e diferenças entre a glicosilação realizada pelas células das plantas, e dos animais foi demonstrado em um esquema no trabalho de Ma *et al.* (2003) e está representado na Figura 1. A preocupação relacionada à diferença de glicosilação é se os glicanos específicos da planta poderiam desencadear reações alérgicas em humanos.

Bardor *et al.* (2003) relataram que anticorpos já foram encontrados em soro humano contra os resíduos de glicano específicos de planta, indicando que eles causam alguma reação adversa ao organismo. Entretanto, epitopos de carboidratos raramente são alergênicos e a presença de anticorpos no soro não é indicativa de uma reação adversa. Estes glicanos são encontrados normalmente em glicoproteínas de plantas que são utilizadas na dieta humana (Ma *et al.*, 2003).

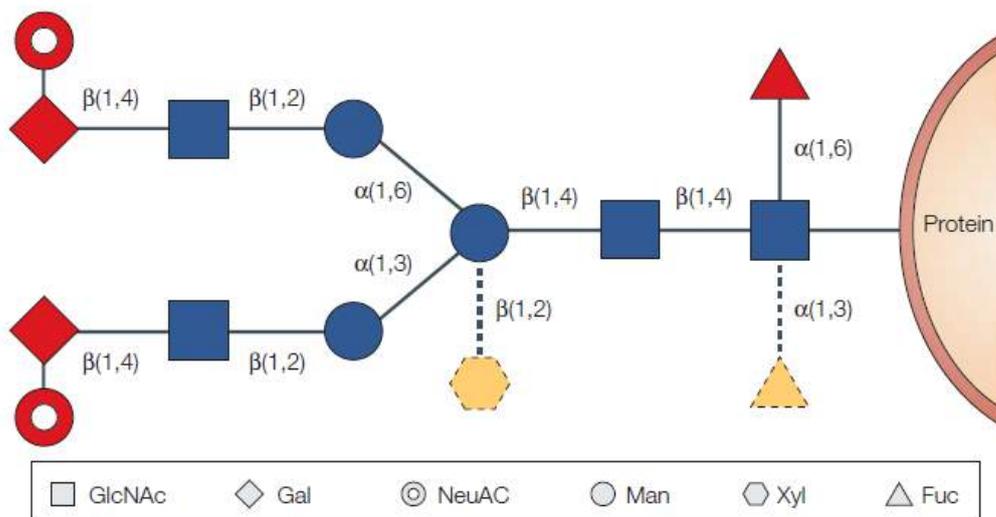


Figura 1 - Estrutura da cadeia longa de glicano em plantas e humanos. Os resíduos que estão em azul são comuns a plantas e humanos. Os resíduos que estão em vermelho são encontrados somente em humanos, e os resíduos amarelos são encontrados somente nas plantas. GlcNAc: N-acetilglicosamina; Gal: galactose; NeuAc: ácido siálico; Man: manose; Xyl: xilose; Fuc: fucose. Fonte: Ma *et al.* (2003).

Apesar das evidências de que os glicanos de planta não desencadeiam respostas alérgicas em humanos, o possível efeito negativo destas substâncias é uma das principais questões que afetam o uso e a aceitação das plantas na produção de proteínas recombinantes (Ma *et al.*, 2003).

Sharma e Sharma (2009) colocaram em sua revisão que as diferenças na glicosilação entre plantas e animais, prejudicam a expressão de anticorpos humanos utilizando este sistema, pois este modelo de glicosilação pode não ativar o sistema complemento de forma eficiente. Para que isso não ocorra, tentativas de “humanização” de anticorpos estão sendo realizadas, ao se criar plantas transgênicas incapazes de produzir enzimas específicas na glicosilação da xilose e da fucose, e realizar a glicosilação *in vitro* de galactose e ácido siálico dos anticorpos expressos (Bakker *et al.*, 2001).

Vários trabalhos foram realizados no intuito de criar plantas mutantes quanto à produção de glicanos. Nas revisões de literatura realizadas por Obembe *et al.* (2011) e Paul e Ma (2011), foram mencionados trabalhos que realizaram *knock-out* dos genes relacionados com enzimas que realizam a glicosilação de xilose (xilosiltransferase) e fucose (fucosiltransferase) em *Arabidopsis* e *Physcomitrella patens*. Foram relatados também trabalhos utilizando RNA interferente para silenciamento destas enzimas, e estratégias de *knock-in*, envolvendo expressão de enzimas híbridas obtidas a partir da fusão dos domínios de enzima humana e de enzima da planta relacionadas ao processo de glicosilação.

Paul e Ma (2011) colocaram outra possibilidade para que interferências pós traducionais não ocorram, como escolher um sistema de planta no qual o transgene fique efetivamente retido de forma precoce na via secretora, no intuito de limitar a adição de glicanos indesejáveis. O uso de sementes para expressão seria uma possibilidade. Mesmo sendo considerado um desafio, as alterações pós traducionais utilizando sistema de planta estão sendo aprimoradas em vários estudos para que este sistema seja cada vez mais utilizado (Xu *et al.*, 2012).

1.3- Estratégias de expressão de proteínas recombinantes em sistema de planta : escolha da planta e do tipo de transformação

Devido ao rápido desenvolvimento da engenharia genética existe uma variabilidade de plantas e de estratégias de expressão que podem ser utilizadas como plataformas para a produção de proteínas recombinantes utilizando este sistema. Não existem vantagens claras a respeito de um sistema líder de expressão, embora algumas espécies sejam usadas de forma preferencial, como o tabaco, arroz, milho, alface, alfafa, trevo e musgo. A escolha do tipo de planta depende de requisitos biológicos e econômicos específicos à proteína alvo, bem como sua finalidade. Portanto, não há restrição a determinadas espécies, a escolha deve atender aos requisitos mencionados (Boehm, 2007; Sharma e Sharma, 2009).

Um exemplo seria a escolha de uma planta para a produção de vacina oral, ela deve atender aos seguintes critérios: utilizar plantas que possam ser ingeridas cruas, o tecido alvo deve ser rico em proteínas, pois a proteína vacinal contribui com uma porcentagem menor no total proteico, o tecido alvo não pode produzir substâncias tóxicas e deve permitir a montagem correta da proteína com as alterações pós traducionais corretas (Tiwari *et al.*, 2009). Estes fatores são direcionados para produção de vacinas orais, na produção de outros tipos de proteínas, critérios diferentes devem ser analisados.

Além dos aspectos relacionados à proteína, os aspectos biológicos relacionados à planta também devem ser observados na sua escolha, como por exemplo: seu ciclo de vida, o rendimento relacionado à biomassa, fatores geográficos, compreensão dos fatores relacionados à especificidade de cada espécie e tecido que podem afetar na produção, acúmulo e qualidade na produção da proteína recombinante (Sharma e Sharma, 2009).

Quanto às possibilidades da utilização das plantas como plataforma de produção de proteínas, existem várias possibilidades, que vão desde a utilização da planta como um todo, o uso de cultura celular, das sementes, do tecido foliar, cloroplastos e plantas aquáticas. Os tipos de transformações podem ocorrer de forma estável gerando plantas transgênicas, ou transplastômicas; ou de forma transiente por meio de vetores virais e vetores binários via *Agrobacterium*.

Todos estes sistemas têm suas vantagens, desvantagens e desafios. A escolha do melhor sistema depende da natureza da proteína que se deseja expressar, sendo o conhecimento profundo da natureza bioquímica da mesma extremamente importante na escolha de qual estratégia será adotada. Outro ponto importante na escolha do sistema são os padrões de regulamentação, alguns sistemas já possuem estes padrões mais avançados que outros e isso também é um fator importante a se analisar (Paul e Ma, 2011).

1.3.1 – Sistema de expressão por meio de transformação nuclear estável e transplastômico: vantagens e limitações

Os sistemas que utilizam transformação nuclear estável (transgênicos) são caracterizados pela incorporação de um gene exógeno de interesse no genoma nuclear da planta, alterando assim sua composição genética. Este gene é associado a um promotor e um marcador, e a uma sequência terminadora gerando o transgene. Uma vez o transgene foi estavelmente integrado ao genoma da planta o mesmo será expresso por ela e será herdado pelas próximas linhagens (Obembe *et al.*, 2011). No decorrer dos anos várias tecnologias vem sendo desenvolvidas no intuito de promover a integração do transgene no genoma da planta, como a utilização do sistema de *Agrobacterium tumefaciens*; bombardeamento com micropartículas revestidas de DNA; transferência por eletroporação e microinjeção de DNA.

Quando se utiliza este sistema deve-se pensar no tipo de modificação pós traducional que a proteína produzida requer para se tornar funcional, a estabilidade da proteína exógena que será expressa, os níveis de expressão desejados, os custos da purificação desta proteína bem como o custo da planta transgênica no mercado. Todos estes fatores devem estar implícitos na escolha: do tipo de planta que se irá utilizar e do compartimento celular de acúmulo da proteína recombinante. As transformações estáveis nucleares são importantes quando a proteína que será expressa requer alterações pós traducionais como a glicosilação, pois a integração nuclear do transgene é necessária para que a proteína seja corretamente processada no sistema endomembranoso da célula. Essa estratégia tem sido utilizada com sucesso

para produzir mais de 100 tipos de proteínas glicosiladas como anticorpos, citocinas e hormônios (Xu *et al.*, 2012).

Muitos estudos já foram realizados no intuito de produzir proteínas de antígenos vacinais utilizando plantas transgênicas. A revisão realizada por Tiwari *et al.* (2009), descreve uma tabela com 104 trabalhos publicados entre os anos de 1992 e 2008, todos utilizando plantas transgênicas (de várias espécies diferentes) na produção de diversas proteínas antigênicas como toxina B do cólera, *virus like particles* do HPV 16, dentre outras. Historicamente os melhores estudos de expressão de proteínas exógenas utilizando plantas são por meio do uso de transgênicos.

O uso de plantas transgênicas possui como as demais técnicas de transformação vantagens e desafios. A vantagem do uso dessa técnica é que com uma única transformação serão obtidos frutos, sementes e folhas contendo a proteína recombinante desejada, as linhagens transgênicas são facilmente produzidas em larga escala, são competitivas com relação ao custo na produção em larga escala, possuem eficiência econômica associada com capacidade de expansão da produção, e possuem baixos custos de capitalização. Os desafios estão relacionados a considerações na contenção da produção devido a questões ligadas às práticas agrícolas, questões de silenciamento gênico do transgene interferindo no desempenho da produção, demora na introdução de um cronograma com padronizações para as linhas de produção comercial (Xu *et al.*, 2012).

Existem os sistemas que utilizam transformação estável do cloroplasto que são denominadas de transplastômicas. A transformável estável em cloroplasto é uma alternativa viável em comparação a nuclear, pois possui a vantagem de produzir o transgene em um compartimento específico da célula que é herdado pelos tecidos das plantas (transgênica), porém o pólen não contém cloroplastos, portanto, apesar de transgênico não corre o risco de se dissipar na natureza. A produção de uma planta transplastômica ocorre por bombardeamento dos explantes com micropartículas revestidas de DNA (transgene por recombinação homóloga), depois estes são selecionados após várias gerações de regeneração da planta em meios seletivos contendo antibióticos (Obembe *et al.*, 2011).

Uma das vantagens de se utilizar o sistema estável transplastômico é que a proteína alvo tem um excelente rendimento quando comparado ao rendimento em plantas transgênicas (em núcleo), pois em uma célula vegetal existem aproximadamente 100 cloroplastos e cada cloroplasto possui em torno de 100 cópias do genoma, isso permite a introdução de milhares de cópias dos transgenes por célula. Mais de 100 tipos de proteínas recombinantes já foram produzidos utilizando este sistema, dentre elas, enzimas de uso industrial, anticorpos, antígenos vacinais e proteínas de uso farmacêutico. Apesar de o cloroplasto possibilitar a expressão de proteínas complexas, uma de suas limitações é não promover a glicosilação, portanto, se a proteína alvo que se quer produzir necessita deste tipo de alteração pós traducional o sistema transplastômico não deve ser escolhido (Xu *et al.*, 2012; Obembe *et al.*, 2011; Paul e Ma, 2011; Sharma e Sharma, 2009; Boehm, 2007).

As plantas transgênicas (nuclear ou cloroplasto) requerem cultivo, colheita, extração e purificação das proteínas recombinantes para serem usadas em determinadas situações como para as vacinas, por exemplo. As plantas crescem em determinadas condições difíceis de serem padronizadas e controladas quanto ao nível de expressão proteica. Esses fatores fazem com que a utilização dos transgênicos seja dificultada pelas “*good manufacturing practices*” (GMP), pois há uma dificuldade na padronização da produção e a tentativa de aperfeiçoar acaba tornando o sistema oneroso (Tiwari *et al.*, 2009).

O uso de plantas transgênicas gera discussões a respeito de biossegurança e de questões regulatórias. A preocupação geral sobre os riscos potenciais na saúde e no meio ambiente estão associados à utilização de culturas de plantas comestíveis para serem utilizadas na produção de proteínas, pois podem trazer riscos econômicos para os agricultores e indústria de alimentos devido a possibilidade de misturar e contaminar a cadeia de alimentos, os transgenes podem se espalhar pelo pólen, sementes e frutos, pode ocorrer exposição a insetos, pássaros e microorganismos do solo que podem transferir os genes de forma horizontal. Existem métodos que podem ser utilizados para controlar cada um dos problemas mencionados anteriormente, porém isso aumentará os custos de produção (Obembe *et al.*, 2011; Sharma e Sharma, 2009).

1.3.2- Sistema de expressão por meio de cultura celular: vantagens e limitações

Outro sistema de expressão de proteínas em plantas é por meio de suspensão de cultura celular, este sistema se assemelha aqueles que utilizam cultura celular de mamífero (Boehm, 2007). A sua viabilidade está associada à utilização de biorreatores, que tornam o sistema de produção mais fácil de ser controlado. Segundo a Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, “biorreatores são equipamentos capazes de multiplicar mudas de plantas com muito mais higiene, segurança e economia. São utilizados para o cultivo de células, tecidos ou órgãos em meio de cultura líquida e visam produzir plantas com monitoramento e controle das condições de cultivo”.

Neste sistema as proteínas produzidas são constantemente secretadas e recuperadas das células e dos meios de cultura, minimizando o tempo e o custo no processo de padronização, tornando o processo fácil de ser reproduzido. A redução da degradação de proteínas durante o manuseio é menor, pois o mesmo é mais rápido, além da utilização de agentes estabilizadores ao meio líquido de cultura que reduzem a degradação aumentando o acúmulo da proteína recombinante (Tiwari *et al.*, 2009).

A uniformização do tamanho e do tipo das células utilizadas neste sistema reduz a heterogeneidade das proteínas produzidas, o que torna o sistema vantajoso, além de produzir condições estéreis de produção associadas a um alto nível de contenção, os custos relacionados à purificação das proteínas neste sistema são menores, portanto, são ideias para produção de fármacos que devem ter alta pureza. Apesar de ser um sistema barato, seguro e fácil de manipular e mais rápido que os outros sistemas convencionais, ainda não é a melhor plataforma para produção de proteínas, pois mesmo utilizando estabilizadores para conter a degradação das proteínas recombinantes ainda há ação proteolítica diminuindo o rendimento na produção. Além de o sistema estar limitado a um pequeno número de linhagens celulares (tabaco, arroz, cenoura e *Arabidopsis*) (Obembe *et al.*, 2011).

Paul e Ma (2011) mencionaram em seu trabalho que o uso de plantas como biorreatores na produção de proteínas recombinantes é mais vantajoso

que os biorreatores convencionais que utilizam células de mamíferos e insetos, porque não permite o crescimento de patógenos humanos, são caracteristicamente baratos na manipulação e rentáveis devido à simplicidade dos meios de crescimento utilizados para células de plantas. Este sistema atende as exigências do GMP, e possui vantagens na produção de fármacos, pois reduz o potencial do gene contaminar o meio ambiente e a cadeia de alimentos. Os desafios desta técnica estão associados ao rendimento, falta de maturidade das células relacionada à composição do meio, desenho do sistema de fermentação e desenvolvimento de uma linhagem celular.

Xu *et al.* (2012) descreveram as principais vantagens da utilização de cultura celular de planta em biorreatores: alta taxa de crescimento; livre de contaminação de patógenos, herbicidas ou pesticidas; independe das estações, do clima e de fatores ambientais; as proteínas expressas são de fácil purificação e separação; necessita de poucos padrões de regulamentação; e é consistente com os atuais padrões de regulação das indústrias farmacêuticas. Eles colocaram que esta técnica também possui desafios como: baixo rendimento de proteínas, relativa instabilidade de expressão quando se utiliza cultura celular e necessita de um alto investimento.

Duas empresas utilizam este sistema, a Dow Agrosciences (Indianapolis, IN; <http://www.dowagro.com>) que desenvolveu um biorreator para produção de vacinas veterinárias, vacina contra *Newcastle disease virus* (NDV) para galinhas, que foi aprovado pelo USDA Center of Veterinary Biologics. Outra empresa é a Protalix Biotherapeutics (Carmiel, Israel; <http://www.protalix.com>) que emprega biorreator para células de cenoura.

1.3.3- Sistema de expressão por meio de transformação transiente: vantagens e desvantagens

Outro sistema de transformação da planta é a denominada transformação/ expressão transiente, que é considerado como um mecanismo rápido de expressão, pois produz uma quantidade considerável de proteínas em poucos dias (Obembe *et al.*, 2011; Wydro *et al.*, 2006; Xu *et al.*, 2012; Circelli *et al.*, 2010). Segundo Obembe *et al.* (2011) existem dois métodos que utilizam este sistema: via *Agrobacterium tumefaciens* (agroinfiltração), via vetor viral (infecção viral) e dentro deste a utilização da *magniffection technology*.

As técnicas que utilizam o sistema de *A. tumefaciens*, denominado de agroinfiltração, foram desenvolvidas na década de 90 e se baseiam na infiltração (manual ou a vácuo) de uma suspensão fresca contendo a respectiva bactéria no tecido de folhas de tabaco (Obembe *et al.*, 2011). Esta técnica também denominada de *Agrobacterium tumefaciens transient expression* (ATTE) ocorre devido à capacidade natural destas bactérias de transferirem uma parte do seu material genético para a planta hospedeira (Circelli *et al.*, 2010).

Naturalmente essa transferência ocorre por indução de um grupo de genes de virulência encontrados no plasmídeo Ti (do inglês *tumor inducing*). A ativação destes genes é feita pela presença de substâncias produzidas pelas células lesadas denominadas moléculas-sinal (compostos fenólicos, açúcares e aminoácidos). Após indução a bactéria transfere para o genoma da planta outra região do plasmídeo Ti denominada região T-DNA; uma vez incorporada ao genoma os genes de T-DNA serão expressos, o que implementará a infecção, caracterizada pela formação de um tumor (Zupan *et al.*, 2000).

Para utilização da técnica de ATTE primeiro são necessárias linhagens desarmadas de *A. tumefaciens* (deleção dos genes indutores de tumor por meio de um processo de dupla recombinação), existem algumas linhagens desarmadas obtidas de linhagens selvagens. A escolha da linhagem para transformação de uma determinada espécie de planta deve levar em conta sua susceptibilidade e a virulência da linhagem selvagem (Zupan *et al.*, 2000).

Ainda na utilização de ATTE outro fator importante é a preparação de um vetor contendo o T-DNA com os genes de interesse. O plasmídeo Ti é muito grande (~200 Kb) ele não pode ser manipulado diretamente. Então plasmídeos (vetores) menores são utilizados e devem conter as áreas de transferência (extremidades da região T-DNA denominadas de RB e LB), entre as quais os genes de interesse serão clonados. Estes vetores podem ser do tipo binário ou co-integrado. Os vetores binários são derivados de plasmídeos que possuem origem de replicação tanto para *Escherichia coli* como para *Agrobacterium* e podem ser utilizados em qualquer linhagem de *Agrobacterium*, portanto são os mais utilizados (Hellens *et al.*, 2000; Zupan *et al.*, 2000).

Segundo Wydro *et al.* (2010), as vantagens da utilização deste sistema, comparado ao sistema de transformação estável é sua simplicidade e fácil

manuseio, além da rapidez na expressão das proteínas. Como é um sistema de fácil aplicação e com rapidez nos resultados, pode ser utilizado para testar variações no mesmo gene, diferentes promotores e diferentes locais intracelulares de acúmulo de proteínas com testes de direcionamento das proteínas para diferentes organelas (Rybicki, 2010).

Dentre as desvantagens deste sistema, Circelli *et al.* (2010) aponta o baixo rendimento na produção de proteínas, devido ao mecanismo natural de silenciamento gênico mediado por RNA interferente (RNAi), que é denominado em plantas como silenciamento gênico pós transcricional (PTGS). Porém, a utilização de supressores virais de PTGS, tem minimizado este problema. Os genes virais supressores podem ser clonados em vetores binários e serem co-infiltrados com a suspensão contendo o gene de interesse, como podem ser incorporados na construção de determinados vetores binários (Circelli *et al.*, 2010; Wydro *et al.*, 2006; Sainsbury *et al.*, 2009).

Segundo Ma *et al.* (2011), a expressão transiente utilizando o sistema de agroinfiltração tem alcançado um alto rendimento devido a otimização dos vetores utilizados. Estes vetores são desenhados para incluir múltiplos cassetes de expressão, para permitir a coexpressão de proteínas distintas, que podem representar a subunidade de uma proteína farmacêutica multimérica. Eles podem ainda ser utilizados para inibir genes pós transcricionais de silenciamento ou enzimas envolvidas nas etapas de glicosilação. Neste contexto, os esforços de melhoria da técnica de expressão transiente têm envolvido tentativas de usar plasmídeos desenhados com sequencias derivadas de vírus de plantas, um exemplo é o vetor pEAQ-HT que utiliza as regiões não traduzidas (UTR) 5' e 3' de *Cowpea mosaic virus* (Sainsbury *et al.*, 2009).

Neste contexto, gerou-se a necessidade e tentativas de criação de um sistema de vetores baseados na estrutura viral, porém para melhor entendimento se faz necessário distinguir os vetores baseados na estrutura viral do universo dos vetores virais. Os vetores virais se baseiam na utilização de vírus de plantas que são manipulados para conter o gene de interesse, e uma vez estes vírus são introduzidos na planta hospedeira (pode ser via inoculação ou via agroinfiltração) irão se replicar e a proteína será produzida em significantes quantidades.

As primeiras tentativas de utilização de vetores virais foram com vírus de DNA (Porta e Lomonosoff, 2002). Como a maioria dos vírus de plantas são de RNA senso positivo, atualmente tem tido uma maior atração por este tipo de vírus na construção dos vetores virais, tanto pela capacidade dele crescer em uma vasta gama de hospedeiros como também pelo fato de seu RNA ser diretamente traduzido (Cañizares *et al.*, 2005).

Os vetores virais são classificados em vários tipos. Existem aqueles utilizados para apresentação de epítomos, no qual o vetor viral expressa pequenos peptídeos fusionados na capa proteica do vírus que são expostas na superfície das partículas virais montadas. Este tipo de vetor tem um grande potencial para desenvolvimento de vacinas, e já foi utilizado para expressão de vários epítomos diferentes, que vão desde proteínas do HIV até proteínas de vírus que causam hepatites em camundongos (Cañizares *et al.*, 2005).

Existem aqueles vetores virais que são utilizados para produzirem polipeptídeos que não se fusionam ao vírus e são acumuladas dentro da planta. Segundo Santi *et al.* (2006) existem dois tipos de vetores que utilizam esta característica: vetores virais completos, e os vetores virais incompletos. Os vetores completos são considerados com comportamento semelhante ao vírus selvagem, com a diferença de possibilitar a expressão de uma sequência adicional de uma proteína heteróloga. Estes vetores são essencialmente funcionais, pois produzem partículas infecciosas que se locomovem por toda a planta com rapidez e alto rendimento. Uma restrição destes é a complexidade e o tamanho do transgene, pois a tendência dos mesmos é excluí-lo do seu genoma durante a replicação, ocorrendo o risco de propagação do mesmo para o meio ambiente.

Outro tipo são os vetores virais desconstruídos ou incompletos, que se caracterizam por vetores modificados que utilizam a manipulação do cDNA do vírus, substituindo genes virais não essenciais por genes exógenos importantes para expressão, criando os denominados sistemas *replicon* e MagnICON® (Marillonmet *et al.*, 2004). Este tipo de vetor viral classificado por Santi *et al.* (2006) como incompleto ou desconstruído é aquele caracterizado pela tentativa de criar um sistema de vetores baseados na estrutura viral para serem utilizados via *Agrobacterium*.

Segundo Obembe *et al.* (2011), a tecnologia MagniCON desenvolvida pela Icon Genetics, é o sistema mais robusto de expressão transiente, ou seja, produz proteínas (polipeptídeos) ou hetero oligômeros com alto rendimento, em comparação com o sistema via agroinfiltração utilizando vetores binários e os vetores virais completos. Este sistema foi desenvolvido pela remoção da capa proteica do *Tobacco mosaic virus* (responsável pela locomoção) e modificado para conter regiões do T-DNA para que seja incorporado ao genoma da planta via *Agrobacterium*.

As plantas comumente utilizadas para os sistemas de transformação e expressão transiente são as espécies de *Nicotiana*, de forma mais frequente *Nicotiana benthamiana*. Nos sistemas que utilizam vetores virais o uso de *N. benthamiana* é comum, pois esta espécie é mais susceptível às infecções virais, fato atribuído à presença natural nesta planta de uma mutação no RNA dependente de RNA polimerase (RDRP1), reduzindo sua eficiência de silenciamento gênico (Yang *et al.*, 2004).

As vantagens do uso destas plantas estão relacionadas ao fato de crescerem em ambientes facilmente controlados e fechados, como em casas de vegetação, facilitando o processo de automatização e produção em escalas, portanto, o uso da expressão transiente utilizando estas plantas requer uma casa de vegetação ampla com infraestrutura adequada para infiltração, processo de extração da biomassa folhear rápido e eficaz, e se a proteína expressa for utilizado para produtos humanos e animais um método de purificação que remova as toxinas derivadas da agroinfiltração (Xu *et al.*, 2012).

1.4- Perspectivas da utilização do sistema de planta na área biotecnológica

De uma forma geral, o uso de plantas na produção de proteínas recombinantes tem demonstrado um grande potencial nos últimos quinze anos na área de biotecnologia. Tanto que várias indústrias têm utilizado este sistema, como descrito nas recentes revisões de literatura (Xu *et al.*, 2012; Obembe *et al.*, 2011; Paul e Ma, 2011; Sharma e Sharma, 2009) e como pode ser observado no site *Molecular Farming* (<http://www.molecularfarming.org>).

Segundo Xu *et al.* (2012) as maiores companhias relacionadas atualmente com a produção de proteínas recombinantes em plantas são: Biolex

Therapeutics Inc. (Pittsboro, NC; <http://www.biolex.com>), BioStrategies LC (Jonesboro, AR; <http://www.biostrategies-lc.com>), Dow AgroSciences (Indianapolis, IN; <http://www.dowagro.com>), Fraunhofer Center for Molecular Biotechnology (Newark, DE; <http://www.fraunhofer.org>), Kentucky BioProcessing LLC (Owensboro, KY; <http://www.kbpllc.com/>), Medicargo Inc. (Québec, Canada; <http://www2.medicargo.com/en>), Meristem Therapeutics LLC (Cambridge, MA; <http://www.meristemtherapeutics.com>), Protalix Biotherapeutics (Carmiel, Israel; <http://www.protalix.com>), Planet Biotechnology (Hayward, CA; <http://www.planetbiotechnology.com>), SemBioSys (Calgary, Canada; <http://www.sembiosys.com>) and Ventria Bioscience (Fort Collins, CO; <http://www.ventria.com/>).

No Brasil está sendo implementado no município de Eusébio/Ceará o Centro Tecnológico de Plataformas Vegetais de Bio-Manguinhos (Fiocruz), para desenvolvimento e produção de imunobiológicos. O desenvolvimento deste centro conta com a colaboração do Ministério da Saúde, Governo do Ceará, Prefeitura de Eusébio e Fiocruz. A produção de vacinas, principalmente contra febre amarela, irá usar sistema de expressão em plantas em parceria com as empresas Protalix e Fraunhofer (<http://www.bio.fiocruz.br/index.php/noticias/597-o-futuro-em-novasplataformas-de-producao>).

Conclui-se que a utilização de plantas como sistema de produção de proteínas é uma alternativa que está crescendo e se tornando um importante recurso barato e seguro de produção de proteínas para uso terapêutico e de enzimas. Progressos significativos têm sido feitos no desenvolvimento de proteínas recombinantes produzidas em cultura celular e em tecidos de plantas, além de avanços no desenho e implementação de biorreatores. Os principais desafios relacionados a baixo rendimento e processo de glicosilação para aplicação farmacêutica das proteínas, tem sido superados e novos estudos estão sendo realizados para aprimorar e desenvolver soluções inovadoras ao competitivo e econômico impacto dos sistemas que utilizam planta.

2- Objetivo geral do trabalho

Utilizar sistema de planta para expressão transiente de proteínas recombinantes e indução de silenciamento gênico, no intuito de gerar uma ferramenta biotecnológica de produção de proteínas virais heterólogas de aplicação na área de saúde e estudo genético de plantas.

3- Objetivos específicos

- ✓ Expressar a proteína do capsídeo de norovirus para montagem de “*virus like particles*” utilizando vetor binário e supressor viral de silenciamento gênico (capítulo II)
- ✓ Utilizar o vetor viral tripartido de *Cucumber mosaic virus* para expressão de antígeno multi epítipo da dengue (capítulo III)
- ✓ Utilizar o vetor viral tripartido de *Cucumber mosaic virus* como vetor de indução de silenciamento gênico em planta (capítulo IV)

CAPÍTULO II: Expressão e montagem de “*virus like particles*” de norovirus em planta utilizando supressor viral de silenciamento gênico

1- Introdução

1.1- Norovírus – patogenia e epidemiologia, taxonomia e características estruturais

A gastroenterite aguda é uma patologia relacionada à morbidade e mortalidade principalmente de lactantes, infantis e idosos por todo mundo, tornando-se, portanto, um grave problema de saúde pública (Bereciartu *et al.*, 2002). Esta doença está relacionada a vários fatores etiológicos, dentre eles, as infecções virais, que atualmente têm sido relacionadas a surtos de gastroenterites não bacterianas (Guyader *et al.*, 2008; Borges e Cardoso, 2005).

Os vírus que podem infectar o trato gastrointestinal e que estão relacionados com a etiologia de gastroenterite são os rotavírus, os calicivírus que são representados pelos norovirus e sapovirus, os astrovírus, Aichi vírus, os enterovirus, os adenovirus e o vírus da hepatite A. Em uma pesquisa epidemiológica de rastreamento dos surtos de gastroenterite aguda em crianças hospitalizadas realizada na Europa nos anos de 1997 até 1999, demonstrou que das 438 amostras fecais estudadas neste intervalo, 138 foram positivas para vírus, sendo que destas 17,3% eram rotavíroses, 7,3% de calicivírus, 6,8% de astrovírus e 0,7% de adenovírus (Marie-Cardine *et al.*, 2002).

Outra pesquisa epidemiológica realizada na Europa no ano de 2006, em um surto de gastroenterite gerado por ingestão de ostra contaminada, analisou doze amostras de fezes, sendo que destas, nove (75%) foram positivas para norovírus, seis (50%) para Aichi vírus, seis (50%) para enterovírus, três para astrovírus (25%) e dois (17%) para rotavírus. Não foram encontrados adenovírus, sapovírus e vírus da hepatite A nas amostras fecais. Uma característica importante deste estudo foi a presença de vários vírus diferentes

na mesma amostra fecal e pela primeira vez foi descrito a presença de Aichi vírus em amostras de ostras contaminadas na Europa. (Guyader *et al.*, 2008)

Apesar da diversidade viral na etiopatogenia das gastroenterites, os estudos epidemiológicos e observacionais de detecção viral realizados na Europa e nos Estados Unidos têm demonstrado que a maioria dos surtos de gastroenterites estão relacionados à infecção por calicivírus, especificamente os norovírus (NV) (Patel *et al.*, 2009; Koopmans, 2009; Kroneman *et al.*, 2008; Guix *et al.*, 2007; Guyader *et al.*, 2008; Borges e Cardoso, 2005; Rockx *et al.*, 2002; Glass *et al.*, 2000; Smith *et al.*, 1998). Em uma revisão sistemática de artigos epidemiológicos relacionados à infecção por NV, foi estimado que anualmente mais de um milhão de hospitalizações por ano foram notificadas, e cerca de duzentas mil crianças morreram por infecção deste vírus em países em desenvolvimento (Patel *et al.*, 2008).

Segundo Karst (2010) os norovírus estão associados à etiologia de 95% dos surtos de gastroenterites não bacterianas e 50% dos surtos gerais de gastroenterites pelo mundo. Estima-se que em um ano cerca de trezentas mortes e cinquenta mil hospitalizações nos Estados Unidos sejam causadas por infecção pelo NV. Patel *et al.* (2009) relatou em seu trabalho que os NVs não estão associados somente a surtos de gastroenterites, como também com casos esporádicos da doença, ocorre por todo o mundo, em pessoas de todas as idades, e em diversos locais. Um dos locais que tem ocorrido gastroenterites graves relacionadas com NV é em ambiente hospitalar atingindo crianças menores de cinco anos.

No Brasil, segundo dados do Centro de Vigilância Epidemiológica do Instituto Adolfo Lutz, entre 1999 e 2008 foram registrados em São Paulo 2.712 surtos com 76.697 casos de gastroenterites sendo que 20,8% relacionadas a vírus, e 24% com positividade para rotavírus, como as detecções virais nesta época eram voltadas somente para a identificação deste vírus, 76% das amostras com suspeita viral ficaram sem diagnóstico definitivo (Fonte: IAL e DDTHA/CVE). Com a aprovação da vacina para rotavírus a partir de 2006 e com vistas a aprimorar a avaliação do impacto da mesma, foi implementado em 2008 testes para NV em amostras negativas para rotavírus, obtendo-se, conforme os dados de exames realizados pelo Instituto Adolfo Lutz (IAL), cerca de 16% de positividade para o NV. Em 2009, enquanto a positividade para

rotavírus declinou para pouco mais que 2%, a de NV foi de 31% (Fonte: IAL, 2009).

No trabalho de Fioretti *et al.* (2011) foi investigado a prevalência genômica do norovirus no Brasil entre os anos de 2005 e 2009, onde foram estudadas amostras colhidas de pacientes entre 2 anos até 51 anos de idade, dos diversos estados brasileiros que tiveram surtos de gastroenterites. Das noventa amostras estudadas, 71% foram positivas para norovirus do genogrupo II (GII), sendo que de 64 amostras que foram genotipadas e sequenciadas, 50 eram de GII-4, a caracterização molecular mostrou três variantes de genótipos de GII-4: variante 2004, 2006a e 2006b. Neste estudo pode-se concluir que dentro do período estudado GII-4 foi o mais prevalente no Brasil.

O genogrupo II genótipo 4 do norovirus não é prevalente somente no Brasil, mas há relatos de ser o grupo mais prevalente no mundo. Sua capacidade de mutação e recombinação é alta, pois aproximadamente a cada três anos surgem novas variantes de GII-4. Devido a estas características, Fioretti *et al.* (2014) realizaram um estudo com o objetivo de avaliar a circulação das variantes de GII-4 no Brasil durante oito anos (2004 até 2012). Entre este período aconteceram vários surtos de gastroenterites por todo o país. Os laboratórios e hospitais testaram 9.800 amostras fecais quanto à presença de norovirus, e encontraram positividade em 30,1% delas. Destas, foram selecionadas 147 amostras caracterizadas como sendo de GII-4, provenientes das regiões nordeste, sul e sudeste. Em uma análise por sequenciamento e genotipagem foram detectadas, dentre as amostras de GII-4, seis variantes distintas. Os autores concluem que devido a esta alta variabilidade de GII-4 e sendo este genogrupo o mais prevalente no Brasil e no mundo, medidas de vigilância devem ser tomadas com relação ao diagnóstico e identificação deste vírus para que métodos de prevenção possam ser implementados.

As infecções pelo NV eram comumente associadas aos períodos de inverno (Cubitt *et al.*, 1979). Entretanto trabalho recente que analisou surtos de 1995 até 2002 demonstrou que os casos de gastroenterites causadas por NV têm demonstrado maior prevalência no verão (Lopman *et al.*, 2003). A transmissão de NV ocorre primariamente pela infecção fecal-oral, e por vômitos, sendo altamente contagiosa, menos que 100 partículas virais são

suficientes para infectar um indivíduo. Por esse motivo, a transmissão pessoa-a-pessoa pode contribuir sobremaneira para a disseminação do surto, que normalmente se desenvolve 24-48 horas após a ingestão de alimento ou água contaminada (Benenson, 1995).

Os NV pertencem à família viral *Caliciviridae*, esta família engloba diversos vírus relacionados a uma gama de doenças em diferentes espécies de mamíferos, aves e animais marinhos. A família possui cinco gêneros aceitos e três gêneros que estão sendo estudados. Os cinco gêneros aceitos são *Lagovirus*, *Vesivirus*, *Norovirus*, *Sapovirus* e *Nebovirus*, e os três que estão em fase de estudo são *Recovirus* (gastroenterite em humanos), *Valovirus* (infecta suínos) e calicivírus de galinha (Smits *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2011; Rohayem *et al.*, 2010; Oliver *et al.*, 2006; Thiel e König, 1999). Os *Lagovirus* e *Vesivirus* infectam respectivamente animais como coelhos (lebres) e felinos, suínos e caninos, *Norovirus* e *Sapovirus* estão relacionados às gastroenterites humanas, mas também podem infectar outros animais e os *Nebovirus* infectam bovinos (Rohayem *et al.*, 2010).

Os NVs são classificados de acordo com a sequência completa de gene da proteína VP1 (capsídeo) em seis genogrupos; sendo os genogrupos GI, GII e GIV associados com infecções em humanos, GV com infecção em murinos, GIII em bovinos e GVI em caninos (White, 2014). O GII também pode infectar bovinos e suínos e o GIV pode infectar felinos e cães (Rohayem *et al.*, 2010; Bull *et al.*, 2007). De todos os genogrupos e genótipos, o que tem apresentado alta prevalência nas gastroenterites humanas em nível mundial é o genogrupo II genótipo 4 (GII-4) (Lindesmith *et al.*, 2008)

Os NVs contém um genoma de RNA de fita simples de polaridade positiva com aproximadamente 7,6 Kb, organizado em três regiões de leitura aberta (ORF): ORF 1, ORF 2 e ORF 3, possui uma ligação proteica na região 5' – VPg e cauda de poli-A na região 3' (Figura2). A ORF1 codifica uma poliproteína que será clivada e irá gerar as proteínas não estruturais, ORF 2 codifica a proteína VP1 (maior proteína estrutural) e ORF 3 codifica a proteína VP2 (menor proteína estrutural), portanto a capa proteica é codificada por VP1 e VP2 (Hardy, 2005).

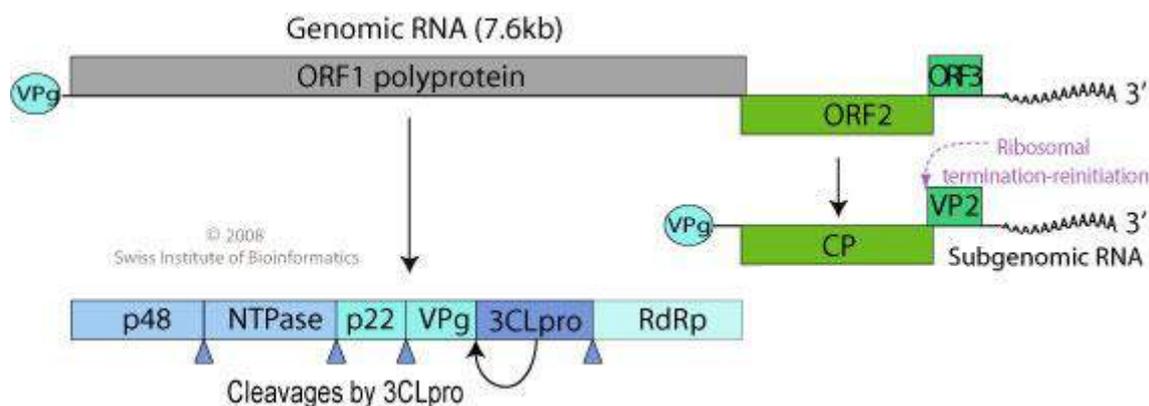


Figura 2 - Organização do genoma doNV. ORF 1 codifica poliproteína que será clivada pela protease 3CLpro nas proteínas não estruturais p48, NTPase, p22, VPg e RdRp. A ORF 2 e ORF 3 codificam respectivamente as proteínas VP1 e VP2 por meio de um único RNA subgenômico, sendo que a tradução de VP2 ocorre por meio da estratégia de iniciação-terminação dos ribossomos. O terminal 5' possui VPg e o terminal 3' cauda de poli A.
 Fonte: Viral Zone (http://viralzone.expasy.org/viralzone/all_by_species/194.html)

A proteína estrutural VP1 possui peso molecular de 58-60 kDa, e é a principal (maior) proteína relacionada a montagem do capsídeo (NV CP). Possui dois domínios conservados (domínio S e P1) e um domínio variável (P2). O domínio P2 contém os determinantes antigênicos que definem a especificidade das estirpes virais, e possui um papel importante como receptor, portanto está relacionado à susceptibilidade à infecção pelo NV (Hardy, 2005).

A proteína VP1 quando expressa de forma heteróloga possui capacidade de auto montagem de “virus like particles” (VLP). As VLPs são partículas que contêm o capsídeo do vírus sem o genoma, e são morfológica e antigenicamente semelhantes aos vírus selvagens. A VLP de NV (NV VLP) possui um diâmetro aproximado de 38 nm e simetria icosaédrica, são partículas altamente estáveis e podem ser estocadas a 4° C e congeladas, podem ser liofilizadas e são resistentes a condições variáveis de baixo pH (Kissman *et al.*, 2008; Ausar *et al.*, 2006; Murakami *et al.*, 2010).

A proteína VP2 possui peso molecular de aproximadamente 22-29 kDa, não tem um papel definido no ciclo de replicação do vírus, porém está relacionada a formação da partícula, sendo considerada a menor proteína estrutural na formação da partícula. A VP2 não é necessária para a montagem da VLP, porém o estudo realizado por Bertolotti-Ciarlet *et al.* (2009) demonstrou em sistema de baculovírus, que a presença de VP2 aumentou a estabilidade de VP1 tanto na montagem da partícula como na proteção contra degradação de proteases, além de aumentar os níveis de expressão.

VP1 e VP2 são codificadas pelo mesmo RNA subgenômico, não existe um mRNA que codifique somente VP2, muito menos a presença de *internal ribosome entry site* (IRES) que re-inicie a sua tradução. Este fato gerou questionamentos a respeito de como ocorre a iniciação da tradução desta proteína. Segundo Meyers (2003) e Naphine *et al.* (2009) a expressão de VP2 ocorre pelo mecanismo estratégico de tradução denominado terminação-reiniciação de ribossomos. Neste contexto, o códon terminal de VP1 é essencial para uma eficiente tradução de VP2, isso indica que a quantidade expressa de VP2 é regulada por VP1 (Hardy, 2005).

1.2- Sistemas de expressão de VLP de norovirus

Os NV humanos não possuem a capacidade de se propagar em culturas celulares, fato que constitui uma barreira nos estudos a respeito dos mecanismos de replicação e infectividade deste vírus. Entretanto, uma forma de estudar a sua morfologia e antigenicidade é por meio da expressão recombinante da proteína VP1. Uma vez expressa, esta proteína monta a VLP que será utilizada em estudos para interação vírus-hospedeiro e desenvolvimento de vacinas (Kissman *et al.*, 2008; Scotti e Rybicki, 2013).

Vários sistemas têm sido testados e utilizados para a expressão recombinante de VP1, e montagem de NV VLP. Dentre eles encontram-se: o sistema de expressão utilizando células de inseto infectadas por baculovírus, sistema utilizando bactéria, levedura, células de mamífero e uso de plantas, tanto transgênicas, quanto via expressão transiente. Todas essas plataformas de produção já foram testadas tanto na montagem da partícula, por meio do microscópio eletrônico de transmissão, como também teste da imunogenicidade da proteína recombinante em animais (Merlin *et al.*, 2014).

A primeira tentativa de produção de NV VLP foi utilizando células de inseto infectadas por baculovírus (Jiang *et al.*, 1992). As partículas conseguidas com este sistema de expressão foram semelhantes em forma e aspecto às partículas nativas do capsídeo. O sistema que utiliza baculovírus é um dos mais poderosos e versáteis tanto na expressão de VP1 quanto na montagem de NV VLP, porém se o objetivo for a geração de vacina, as culturas de células infectadas por baculovírus possuem como desvantagem o risco de um dos componentes importantes (soro fetal bovino) sofrer contaminação por

patógenos não conhecidos à preparação. Outra desvantagem deste sistema comparado com os outros é o alto custo, principalmente se for utilizado para produção da proteína em larga escala.

O sistema de produção de NV VLP em bactéria foi baseado na expressão de VP1 fusionada com maltose e tioredoxina, no intuito de aumentar a solubilidade da proteína expressa. A expressão utilizando este sistema teve um bom rendimento após purificação, e o teste de ELISA demonstrou a imunogenicidade das proteínas (Yoda *et al.*, 2000). Porém neste estudo, os autores não conseguiram visualizar as partículas montadas, portanto, não houve montagem da VLP, somente a expressão da NV CP.

A expressão de NV CP obteve um grande sucesso utilizando o sistema de *P. pastoris*, as proteínas recombinantes formaram NV VLPs com um rendimento final de 5-10 mg/L após purificação. As VLPs foram testadas utilizando o extrato cru da levedura na alimentação dos animais, o que desencadeou uma resposta imune nos mesmos, tanto sistêmica como intestinal (Xia *et al.*, 2007).

A expressão de NV VLP em células de mamífero (BHK) foi realizada por Baric *et al* (2002) que utilizaram vetor viral de *Venezuelan equine encephalitis* (VEE) para transfectar as células produzindo NV CP com alto rendimento após purificação e obtenção da montagem de NV VLP. Apesar de não montar a partícula de NV VLP, os vetores virais VEE contendo NV CP foram inoculados em camundongos que desenvolveram resposta imune sistêmica e mucosa contra NV CP. Os anticorpos produzidos foram testados contra várias estirpes diferentes de NV.

A expressão de NV VLP em plantas ocorre tanto de forma estável como transiente. A primeira tentativa de expressão foi utilizando plantas transgênicas, um dos primeiros trabalhos foi o de Mason *et al* (1996), que utilizou batata e tabaco transgênicos na produção da proteína do capsídeo (NV CP), porém neste trabalho o rendimento da proteína produzida foi baixo com montagem de poucas partículas. As batatas transgênicas foram usadas como alimento no intuito de imunizar os camundongos via oral, o que estimulou uma produção modesta de IgG, provavelmente devido ao baixo rendimento. NV VLPs purificadas do tabaco também foram utilizadas para imunizar camundongos e produziram uma resposta com produção tanto de IgA quanto de IgG.

Outra tentativa de planta transgênica para expressão de NV VLP foi realizada por Zhang *et al.* (2006) utilizando tomateiro. Neste trabalho foi realizado uma otimização do gene o que resultou em um maior rendimento na produção de NV CP, e as proteínas produziram uma resposta imune mais robusta nos camundongos imunizados. A imunização foi realizada via oral, com a ingestão dos tomates transgênicos, e foi observado que a utilização de tomates frescos gerava uma resposta imune mais potente do que de tomates que foram liofilizados.

Segundo Scotti e Rybick (2013) a transformação estável na geração de NV VLP é uma alternativa interessante, porém possui algumas desvantagens como uma demanda maior de tempo para conseguir produzir um rendimento satisfatório de proteínas com alto poder imunogênico. Outro problema do uso de plantas transgênicas é que ele se torna um sistema oneroso, já que para manter a estabilidade da produção da proteína no intuito de manter a produção com alto rendimento, investimentos devem ser feitos na padronização do sistema para que ele se enquadre nas normas de GMP (*Good Manufacture Practice*) (Herbest-Kralovetz *et al.*, 2010; Lai e Chen, 2012).

Uma das formas de agilizar o processo de produção de NV VLP em plantas com alto rendimento é por meio da expressão transiente. A expressão transiente relatada pela literatura para produção de NV VLP utiliza vetores virais modificados, como nos sistemas MagnICON de *Tobacco mosaic virus* e *replicon* de geminivirus via *Agrobacterium tumefaciens* (Scotti e Rybick, 2013).

No trabalho realizado por Santi *et al.* (2008), a produção de NV VLP utilizando o sistema MagnICON em tabaco, conseguiu um alto rendimento (em média 800 mg de proteína purificada por kg de folha) doze dias após a infiltração. Após purificação parcial das partículas, elas foram administradas a camundongos via oral, obtendo uma resposta imune com produção de IgA e IgG. Houve a correta montagem das partículas de NV VLP (Figura 3).

Huang *et al.* (2009) desenvolveram o sistema de vetor baseado no DNA do *Bean yellow dwarf virus* (BeYDV) que foi denominado sistema *BeYDV-derived DNA replicon*. Neste trabalho houve uma expressão rentável de NV VLP (em média 400 mg de proteína purificada por Kg de folha) após cinco dias de infiltração em folhas de tabaco. Neste sistema foi utilizada a coexpressão da

proteína p19 do *Tomato bushy stunt virus* como supressor de silenciamento gênico no intuito de aumentar o rendimento.

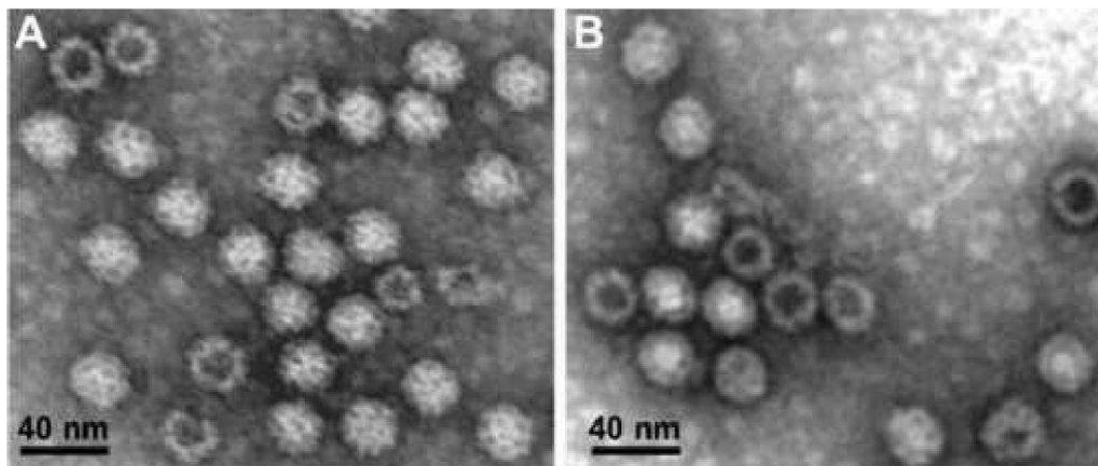


Figura 3 - NV VLP produzidas utilizando sistema MagniCON, visualizadas por contrastação negativa no microscópio eletrônico de transmissão. Fonte: Santi *et al.* (2008).

Estes sistemas baseados em vetores virais (MagniCON e DNA *replicon*) são utilizados em espécies de *Nicotiana*, este fato se torna uma desvantagem pois esta planta possui altos níveis de fenóis e alcaloides tóxicos, portanto para utilização na produção de proteínas de uso farmacêutico, elas têm que passar por um processo minucioso de purificação.

Neste sentido, Lai *et al.* (2012) utilizaram o sistema *BeYDV-derived DNA replicon* para expressão de NV VLP em alface. Com este sistema eles também produziram anticorpos contra *Ebola* e *West Nile virus*. Com relação à produção de NV VLP foi conseguido a produção de aproximadamente 200 mg de proteína purificada por Kg de folha e a observação destas ao microscópio demonstrou a montagem das partículas.

Para a expressão transiente em planta outra opção seria a utilização de vetores binários via *Agrobacterium tumefaciens*. Um dos tipos de vetores que utilizam esta técnica são os vetores pEAQ, que foram construídos contendo a proteína p19 como supressora de silenciamento gênico, no intuito de aumentar o rendimento na expressão proteica (Sainsbury *et al.*, 2009). Apesar de este sistema ter sido utilizado para a expressão de algumas proteínas (VLP) com intuito vacinal como do *Papilomavirus humano 16* (Matic *et al.*, 2011), e do *Avian Influenza virus A (H7N7)* (Kanagarajan *et al.*, 2012), para o NV VLP não havia trabalho publicado utilizando sistema de vetor binário.

O primeiro trabalho utilizando expressão transiente com vetor binário via *Agrobacterium* para montagem de NV VLP foi realizado pelo nosso grupo (Anexo I). O nosso trabalho tem como diferencial ter utilizado as duas proteínas do capsídeo (VP1 e VP2) para montagem da partícula além da coexpressão da proteína supressora de silenciamento gênico 126K de *Pepper mild mottle virus*.

1.3- Silenciamento gênico e proteínas virais supressoras de silenciamento

O uso dos vetores binários via *Agrobacterium* para expressão transiente de proteínas possui como vantagem ser uma técnica operacionalmente fácil e de baixo custo. Porém tem como limitação o baixo rendimento na produção das proteínas recombinantes, um dos motivos é a atuação do mecanismo natural de proteção genética de células eucariontes à invasão de genes exógenos, denominado silenciamento gênico mediado por RNA interferente (RNAi). Segundo Zerbini *et al.* (2005): “o termo silenciamento gênico refere-se a uma série de mecanismos por meio dos quais a expressão de um ou mais genes é regulada negativamente.”

Historicamente, a noção da existência de moléculas de RNA que regulam a expressão gênica data do início da década de 90, com a descoberta do gene *lin-4* de *Canorhabditis elegans*, porém a sua função de regulação na codificação de um miRNA só foi descoberta anos depois. A regulação da expressão gênica por moléculas de RNA é uma importante descoberta da última década (Kanzaki *et al.*, 2008).

Os trabalhos pioneiros de Van der Krol *et al.* (1990) e Napoli *et al.* (1990) em plantas abriram as portas para os estudos de RNAi. Estes pesquisadores tinham como objetivo criar petúnias transgênicas que expressassem a cor púrpura de forma mais intensa, para isso introduziram genes que quando expressos produziram o pigmento que iria intensificar a cor púrpura nestas plantas. Entretanto, foram surpreendidos quando observaram as flores com um fenótipo de cor branca ou mesclado de branco. A análise das linhagens transgênicas mostrou que a introdução do transgene para produção de pigmento bloqueou simultaneamente a expressão do gene endógeno pré-existente como do próprio transgene. Este mecanismo foi denominado de co supressão (Baulcombe, 2004; Zerbini *et al.*, 2005). Nas plantas o mecanismo de RNAi é conhecido como silenciamento gênico pós transcricional (PTGS).

O componente comum dos diferentes processos de silenciamento de RNA estudados em diversos organismos é o RNA de fita dupla (dsRNA). Dependendo do tamanho destas moléculas pode ocorrer dois tipos diferentes de respostas em células eucariontes. Em células de mamíferos, moléculas de dsRNA maiores que 30 bp podem induzir a produção de citocinas pró inflamatórias denominadas interferons (IFNs). Estas substâncias tem a capacidade de ativar o sistema imunológico contra a célula, como também ativar sua apoptose (Kanzaki *et al.*, 2008)

Em contrapartida moléculas de dsRNA menores que 30 pb não tem capacidade de produzir IFNs. Entretanto, tanto em células de mamíferos, como de outros eucariontes, como as plantas, existem três tipos naturais de pequenos RNAs que são gerados a partir do processamento do dsRNA. Estes pequenos RNAs são: siRNA (*small interfering RNA*), miRNA (micro RNA) e rasiRNA (*repeat associated small interfering RNA*) (Zerbini *et al.*, 2005; Kanzaki *et al.*, 2008).

Os siRNAs são produzidos no citoplasma da célula a partir de dsRNAs de origem exógena, como de um vírus ou elementos de transposons ou de dsRNA artificial introduzido nas células em ensaios de *knock down*. Os miRNAs são produzidos no núcleo da célula a partir do genoma celular, que produz um RNA precursor com estrutura secundária em forma de grampo conhecido como pré-miRNA. Os rasiRNAs são uma classe distinta de 28 nt siRNAs e atuam silenciando a expressão de cópias de transposons cromossomais. (Zerbini *et al.*, 2005; Kanzaki *et al.*, 2008)

Os pré-miRNA e os dsRNAs de origem exógena uma vez localizados no citoplasma irão sofrer a ação de uma RNase III denominada Dicer que irá processa-los gerando respectivamente os miRNA e os siRNA. Estas pequenas moléculas de RNA irão se associar a um complexo proteico conhecido como RISC (do inglês *RNA-induced silencing complex*). Após associação o complexo RISC irá encontrar no citoplasma fitas complementares de mRNA específicos, as quais serão alvos da ação de silenciamento gênico. Quando o pareamento é efetivo, este mRNA será degradado pela ação catalítica da enzima Argonauta (AGO) que faz parte do complexo RISC. Se o pareamento for parcial não ocorre a clivagem, mas o complexo atua inibindo o processo de tradução e este mRNA será degradado pela maquinaria celular (Bivalkar-Mehla *et al.*, 2011).

A importância biológica do silenciamento de RNA realizada pelos siRNAs está associada a um mecanismo de defesa da célula contra uma infecção viral, bem como na proteção da célula contra a transposição do DNA, funcionando como um sistema imune do genoma. Outro papel biológico importante realizado pelo silenciamento de RNA, mais especificamente pelos miRNAs, é a regulação pós transcricional de genes endógenos relacionados com mecanismos de apoptose, supressão de tumores, resistência a estresse oxidativo, e outros processos importantes no desenvolvimento celular (Zerbini *et al.*, 2005).

Sendo o silenciamento de RNA um sistema de resistência importante das células eucariontes contra infecções virais, os vírus evolutivamente criaram mecanismos de defesa para escaparem deste sistema. O mecanismo utilizado por vários vírus neste contexto é a expressão de proteínas supressoras de silenciamento gênico, que no caso específico dos vírus de plantas é conhecido como proteínas supressoras de PTGS. Essa capacidade adquirida pelos vírus foi descoberta a partir de estudos de coinfeções virais que mostraram um efeito de sinergismo entre os pares de vírus estudados (Shi *et al.*, 1997; Vance *et al.*, 1995).

Vance *et al.* (1995) demonstraram em seu trabalho o papel da proteína supressora de PTGS, por meio da análise do efeito sinérgico da coinfeção de *Potato virus X* (PVX) com outros três *Potyvirus*: *Tobacco vein mottling virus* (TVMV), *Tobacco etch virus* (TEV), e *Pepper mottle virus*. Em estudos prévios de PVX e estes demais *Potyvirus* os autores demonstraram um efeito sinérgico com sintomas bastante destrutivos para a planta, portanto, o objetivo deste trabalho foi descobrir se o efeito sinérgico de potencialização dos sintomas era devido às proteínas de replicação em si, ou se outras proteínas do vírus contribuíram para este efeito. Foi descoberto que os efeitos sinérgicos entre os vírus na apresentação dos sintomas estavam relacionados à região 5' do genoma. As proteínas estudadas nesta região foram P-1 e HC-Pro.

Segundo a revisão de literatura feita por Roth *et al.* (2004), após o estudo de Vance *et al.* (1995), outros trabalhos foram realizados tendo como alvo o papel da proteína HC-Pro e todos concluíram que ela tem um papel importante no controle do mecanismo de defesa da planta contra os *Potyvirus*.

Por meio de sucessivos estudos, o mecanismo supressor de HC-Pro foi então determinado.

Desde que o efeito supressor de HC-Pro foi descoberto, outras proteínas supressoras têm sido estudadas, e atualmente há o conhecimento de mais de quarenta tipos diferentes de proteínas virais supressoras identificadas em vírus de plantas, animais e insetos (Voinnet, 2005). Segundo Roth *et al.* (2004), várias são as metodologias que podem ser utilizadas no estudo de proteínas virais supressoras de silenciamento, como por exemplo, por meio de expressão transiente utilizando gene repórter (coinoculação utilizando *Agrobacterium*), ensaio utilizando expressão estável ou ensaio de silenciamento reverso.

Atualmente os esforços são no sentido de elucidar o mecanismo molecular pelo qual as proteínas supressoras atuam. Na revisão de literatura feita por Burguán e Havelda (2011) sobre os mecanismos moleculares de ação das proteínas supressoras virais em plantas, foi mencionado que os mesmos têm sido elucidados em poucos casos e que a maioria destas proteínas são multifuncionais, e esta característica dificulta o estudo destas, pois a inativação das mesmas poderia inviabilizar a infecção pelo vírus.

Sabe-se que o mecanismo de atuação destas proteínas supressoras pode ocorrer em diferentes etapas do silenciamento, incluindo a geração dos siRNAs, incorporação destes ao RISC, a atividade de RISC e a atividade do sinal sistêmico. No estudo de revisão de Burguán e Havelda (2011) foram descritos trabalhos que estudaram diversas proteínas supressoras diferentes de várias espécies de vírus diferentes e sua possível via de atuação no mecanismo de supressão de silenciamento de PTGS. A Tabela 1 mostra de forma resumida os dados coletados por este trabalho.

Com base no trabalho supracitado pode-se observar que algumas proteínas supressoras podem agir em vários mecanismos diferentes, como a proteína 2 b de *Cucumber mosaic virus* (CMV), que atua em três vias diferentes de silenciamento (Tabela 1).

No trabalho de dissertação realizado por Vasques-Bonnet (2010), foram testados três supressores virais de silenciamento gênico: a proteína HC-Pro de uma nova espécie de potyvírus relatada no Brasil (*Brugmansia suaveolens mottle virus*, BsMoV) (Lucinda *et al.*, 2008; Lucinda *et al.*, 2010); a proteína 126K do *Pepper mild mottle virus*, PMMoV (*Tobamovirus*) e AC2 do *Tomato*

severe rugose virus, ToSRV (*Begomovirus*). Neste trabalho estes supressores foram testados utilizando coexpressão destas proteínas supressoras com a proteína GFP (green fluorescent protein), em sistema transiente via *A. tumefaciens* em *Nicotiana benthamiana*. O efeito supressor das proteínas testadas foi comparado com o efeito supressor da proteína p19 de *Tomato bushy stunt virus* que já foi relatado em trabalhos anteriores como um potente supressor (Circelli *et al.*, 2010).

Tabela 1 – Principais mecanismos de ação das proteínas virais supressoras de silenciamento gênico mediado por RNAi (PTGS) e o nome das respectivas proteínas que atuam em cada mecanismo. Os dados foram extraídos da revisão de literatura de Burguán e Havelda (2011).

<u>Mecanismo de ação da proteína supressora de PTGS</u>	<u>Tipos de proteínas supressoras de PTGS</u>
1- Inibe a formação do dsRNA e ação da enzima Dicer	<ul style="list-style-type: none"> ✓ p14 de <i>Pothos latent aureusvirus</i> ✓ p38 de <i>Turnip crinckle virus</i> ✓ P6 de <i>Cauliflower mosaic virus</i>
2- Impedem a formação do complexo RISC (capturam siRNA antes da formação do complexo)	<ul style="list-style-type: none"> ✓ p19 de <i>Tombusvirus</i> ✓ 2b de <i>Tomato aspermy cucumovirus</i> ✓ HC-Pro de <i>Tobacco etch virus</i>
3- Impedem a formação do complexo RISC (interação com domínios da proteína Argonauta)	<ul style="list-style-type: none"> ✓ 2b de <i>Cucumber mosaic virus</i> ✓ P 38 de <i>Turnip crinckle virus</i> ✓ P0 de <i>Poleroviruses</i> ✓ P1 de <i>Sweet potato mild mottle ipomovirus</i> ✓ P19 de <i>Cymbidium ringspot virus</i>
4- Inibe silenciamento sistêmico	<ul style="list-style-type: none"> ✓ 2b de <i>Cucumber mosaic virus</i>
5- Amplifica a supressão de silenciamento (suprime as RdRps do hospedeiro)	<ul style="list-style-type: none"> ✓ 2b de <i>Cucumber mosaic virus</i> ✓ V2 de <i>Tomato yellow curl virus</i>
6- Supressores que interferem em modificações epigenéticas no genoma viral (ex: inibição de metilação de proteínas virais)	<ul style="list-style-type: none"> ✓ AL2 de <i>Tomato golden mosaic virus</i> ✓ L2 de <i>Beet curly top virus</i> ✓ AC2 de <i>Mungbean yellow mosaic virus</i>

No trabalho realizado por Vasques-Bonnet (2010), foi encontrado que todas as proteínas testadas (HC-Pro de BsMoV, 126K de PMMoV e AC2 de ToSRV) tiveram efeito supressor, pois potencializaram a expressão de GFP. Dentre elas, a proteína 126K de PMMoV demonstrou um efeito supressor maior comparado com as outras proteínas testadas, inclusive com o controle positivo (p19 de TBSV). Os dados foram obtidos tanto da observação da fluorescência de GFP nas folhas de *N. benthamiana*, quanto da análise da expressão de GFP feita mensurando o volume e a intensidade dos sinais da membrana de *Western blot*.

Neste capítulo, serão utilizados os mesmos supressores de PTGS testados no trabalho de Vasques-Bonnet (2010), no intuito de melhorar o nível de expressão da proteína VP1 e VP2 de NV para obtenção de VLPs.

2- Objetivo Geral

Expressar de forma transiente as proteínas do capsídeo de NV em planta utilizando vetor binário e coexpressão de proteínas supressoras de PTGS, para montagem de VLP de NV.

O intuito desta pesquisa é demonstrar uma metodologia nova de expressão transiente de NV CP e montagem de NV VLP em plantas, para demonstrar uma ferramenta biotecnológica de baixo custo e de fácil manipulação que pode ser utilizada para expressão não somente de proteínas de NV como também de outras proteínas.

3- Objetivos específicos

- ✓ Testar o efeito supressores virais utilizadas no trabalho de Vasques-Bonnet (2010) utilizando a expressão de mGFP (clonado no vetor pRAPs e sublonado no vetor pBINPLUS)
- ✓ Expressar NV CP utilizando associação do vetor pRAPs e vetor binário pBINPLUS e a coexpressão de proteína viral supressora
- ✓ Expressão NV CP e montagem de NV VLP utilizando duas proteínas da capa proteica (VP1 e VP2)
- ✓ Otimização de códon da proteína VP1 no intuito de aumentar a expressão
- ✓ Visualizar NV VLP no microscópio eletrônico de transmissão após purificação

4- Metodologia

4.1- Amplificação e clonagem de mGFP

A proteína verde fluorescente ou GFP (do inglês *green fluorescent protein*) foi descoberta em 1962 por Shimomura e colaboradores. É uma proteína produzida naturalmente pelo cnidário *Aequorea victoria* e sua principal característica é possuir fluorescência intrínseca, ou seja, emite fluorescência na zona verde do espectro visível sem necessidade de cofatores ou substratos. O uso de proteínas que emitem fluorescência é uma ferramenta importante em estudos biotecnológicos.

No intuito de potencializar o efeito fluorescente desta proteína, pesquisadores geraram versões mutantes de GFP, para que ele possa ser utilizado em vários sistemas diferentes. No sistema de plantas, Haseloff *et al.* (1997) criou um GFP com otimização de códon para que a sua expressão tivesse um maior rendimento. Outra modificação realizada pelos autores foi a marcação do GFP para que ele acumule no retículo endoplasmático, gerando assim a versão mGFP4-ER, que demonstrou uma ótima expressão de GFP em folhas de *Arabidopsis*.

A partir da geração deste mutante, outros trabalhos utilizaram este gene como marcador biológico e obtiveram um bom resultado, como no trabalho de Wydro *et al.* (2006). Segundo estes autores, o GFP é considerado um marcador sensível e não invasivo na detecção e visualização da expressão transiente em células transformadas, portanto, pode ser usado efetivamente como um repórter para otimizar a expressão transiente mediada por transformação em *A. tumefaciens*.

Com o objetivo de averiguar se o sistema utilizando o vetor pRAPs subclonado no vetor pBINPLUS é viável na expressão transiente, e testar as proteínas virais supressoras de PTGS, foi realizada a amplificação por PCR do gene mGFP4-ER utilizando os seguintes *primers*: mGFP NotI For 5' TTT GCG GCC GCA ACA ATG AAG ACT AAT CT -3' e mGFP XbaI Rev 5'- TTT TCT AGA TTA AAG CTC ATC ATG TTT GTA -3'. Para a reação de PCR foi utilizada a enzima termoestável LongAmpTM Taq DNA Polymerase do laboratório *New England Biolabs* (NEB) seguindo o protocolo estabelecido pelo fabricante.

Após amplificação o fragmento foi purificado em gel de agarose 1% utilizando kit Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification (GE Healthcare) e clonado no vetor pRAPs nos sítios de clonagem para XbaI e NotI. Este vetor possui dois promotores de 35S de *Cauliflower mosaic virus* (CaMV) antes da sequência principal do *Alfalfa mosaic virus* 5'-UTR, e na região final o terminador de nopalina sintase (NOS) de *Agrobacterium tumefaciens*.

Escherichia coli (*E. coli*), cepa DH5- α , foram transformadas por eletroporação com o clone obtido de GFP em pRAPs, utilizando o equipamento Gene Pulser II (BioRad). Os clones foram selecionados em meio LB (Sambrook *et al.*, 1989) com ampicilina (100 μ g/ml), e posteriormente foi realizada a extração dos plasmídeos com kit de purificação "PureLink™ Quick Plasmid Miniprep" (Invitrogen), conforme protocolo do fabricante. As amostras foram sequenciadas (Macrogen, Seoul, Coréia do Sul) para confirmação da presença do inserto. Importante ressaltar que os demais sequenciamentos realizados neste trabalho foram feitos por esta mesma empresa.

Após confirmação por sequenciamento, o clone de GFP em pRAPs foi digerido com as enzimas PacI e AclI utilizando protocolo estabelecido pelo laboratório *New England Biolabs* (NEB), após digestão foi realizada eletroforese em gel de agarose para confirmar a eficiência das enzimas. Em seguida, o gel foi corado em violeta cristal (40 μ g/ml) por 15 minutos e o fragmento contendo mGFP4-ER eluído utilizando o kit Illustra (GE Healthcare).

Este fragmento foi então subclonado no vetor binário pBINPLUS (Belknap *et al.*, 2008), como demonstrado no esquema (Figura 4). Este vetor foi desenvolvido especificamente para transformações em plantas e sua construção foi baseada no vetor pBIN19 (Engelen *et al.*, 1995).

Células de *E. coli* cepa DH5- α competentes foram transformadas por eletroporação com o clone em pBINPLUS, utilizando o equipamento Gene Pulser II (BioRad). Uma vez selecionados os clones em meio LB (Sambrook *et al.*, 1989) com canamicina (100 μ g/ml), foi realizada a extração dos plasmídeos com kit de purificação "PureLink™ Quick Plasmid Miniprep" (Invitrogen), e a amostra enviada para sequenciamento para confirmação da presença do inserto.

Após confirmação por sequenciamento o clone de mGFP em pBINPLUS foi transformado em *A. tumefaciens* GV3101, e os clones foram confirmados

por PCR de colônia, uma técnica na qual a colônia crescida na placa é utilizada como DNA molde para a amplificação.

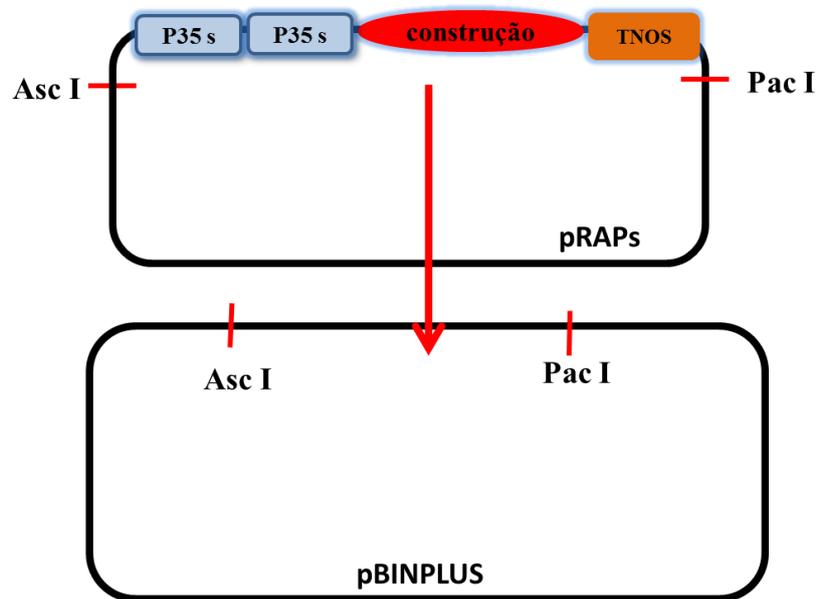


Figura 4- Esquema da subclonagem no vetor pBINPLUS. Vetor pRAPs : P35s – promotor de *Cauliflower mosaic virus* (CaMV); construção – gene (mGFP) ; TNOS – terminador de nopalina sintase

4.2- Teste das proteínas virais supressoras de PTGS

No intuito de aumentar o nível de expressão de NV VLP foram testadas três proteínas virais supressoras de PTGS: proteína Hc-Pro de *Brugmansia suaveolens mottle virus* (BsMoV) (Lucinda *et al.*, 2010), 126K de *Pepper mild mottle virus* (PMMoV) (Oliveira *et al.*, 2010) e AC2 de *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) (Barbosa *et al.*, 2009). Os vírus são de RNA (BsMoV e PMMoV) ou DNA (ToSRV) e foram recentemente relatados no Brasil, caracterizados por mostrarem sintomas severos em *Nicotiana benthamiana*. As proteínas supressoras foram clonadas durante trabalho de mestrado (Vasques Bonnet, 2010) no vetor pGreen II 62-SK e transformadas em *A. tumefaciens* GV 3101-pSoup (Fig 5).

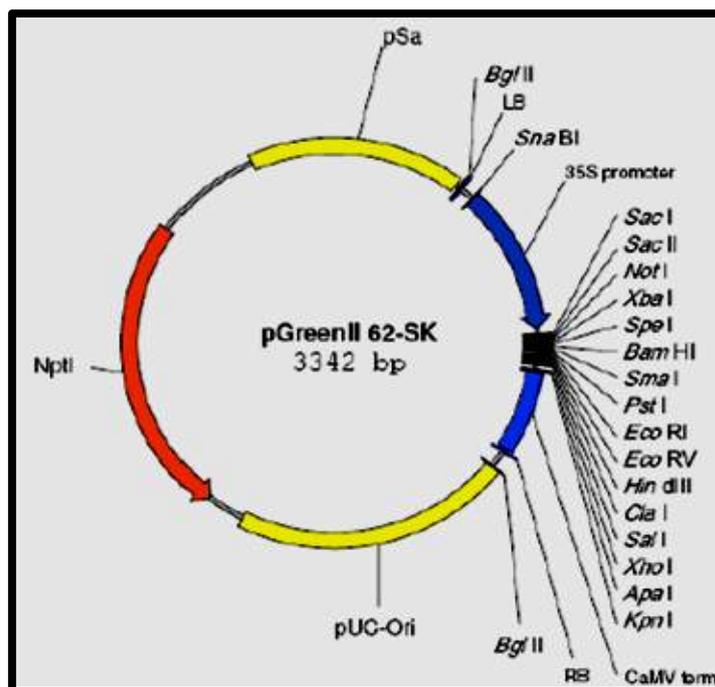


Figura 5- Mapa do pGreen II 62-SK. Origem de replicação: pUC-Ori de *E. coli*; NptI: gene de resistência a canamicina; pSa: origem de replicação de *Agrobacterium*. Fonte: www.pgreen.ac.uk

Para realização do teste, as proteínas virais supressoras foram coinfiltradas com a construção contendo mGFP em pBINPLUS. Para inoculação na planta, os clones de: mGFP, Hc-Pro de BsMoV, 126K de PMMoV e AC2 de ToSRV em *A. tumefaciens* foram colocadas separadamente em 3 ml de suspensão líquida contendo 50 μ M acetosyringone e 10 mM de MES (pH 5.5) crescida *overnight*. As suspensões foram submetidas a uma centrifugação de 1200 x g por 10 minutos. Os pellets foram ressuspensos com 2 ml de solução do meio *Murashige-Skoog* (Sigma-Aldrich) contendo 10 mM MES (pH 5.5) e 150 μ M de acetosyringone, com $OD_{600} = 1.0$; uma amostra de mGFP foi ressuspensa com $OD_{600} = 2.0$ para comparação.

Folhas de *N. benthamiana* com aproximadamente seis semanas de vida foram agroinfiltradas mecanicamente no lado abaxial, utilizando-se uma seringa sem agulha. Foram utilizadas cinco plantas, cujas folhas foram infiltradas com as seguintes construções:

- 1- mGFP sozinho com $OD_{600} = 1,0$
- 2- mGFP sozinho com $OD_{600} = 2,0$
- 3- mGFP+ Hc-Pro de BsMoV
- 4- mGFP+ 126K de PMMoV
- 5- mGFP + AC2 de ToSRV

As misturas de mGFP com as proteínas supressoras foram feitas na proporção de 1:1, com OD₆₀₀=1,0 (concentração final).

A fluorescência de GFP foi observada sob luz UV (365nm, lâmpada modelo UVLM-28 EL, UVP) durante 3 dpi (dias pós infiltração) e fotografada usando uma máquina digital NIKON e filtro amarelo com 15 segundos de exposição.

4.3- Amostra de NV utilizada no estudo

Trata-se de NV do genogrupo II genótipo IV subtipo 2004, isolado na cidade de Brasília, Distrito Federal em 2006. Para obtenção do fragmento de cDNA foi utilizado a reação de transcriptase reversa seguida de reação em cadeia de polimerase (RT-PCR). A transcrição reversa utilizou o seguinte *primer*: oligodT₅₀ M4 PacI (5'- TCA GCA CTG ACC CTT TTG AAT TAA T₅₀ - 3'), a reação de PCR utilizou como *primer* âncora: M4 (5'- TCA GCA CTG ACC CTT TTG-3') e *primer* Noro II 3'For (5'- GGA AAA ACG ACT GCT GGA ACG G -3') e enzima transcriptase reversa Superscript III (Invitrogen). O fragmento foi primeiro clonado no vetor pGEM-T Easy (Promega, Madison, WI, USA) e confirmado por sequenciamento.

4.4- Amplificação e clonagem de duas regiões diferentes do genoma do NVGII-4

As duas regiões utilizadas para amplificação e clonagem foram:

- 1- ORF2 região que codifica a proteína VP1 (maior proteína que compõe CP) formando então a construção *vp1*, e
- 2- ORF2 + ORF 3 (codifica VP2 ou menor proteína que compõe CP) + 3' *untranslated region* (UTR) e cauda de poly-A₅₀, formando a construção *vp1+vp2+3'UTR*.

As amplificações foram realizadas por PCR, sendo que para ambas as construções foi utilizada a enzima termoestável LongAmpTM Taq DNA Polymerase (NEB) seguindo o protocolo estabelecido pelo fabricante.

Para a construção *vp1* foram utilizados os seguintes *primers*: NoroGII4-7 NotI For 5'-AAA GCG CCG CAA CAA TGA AGA TGG CGT CGA ATG AC-3' e NoroGII4-7 SacI Rev 5'- AAG AGC TCT TAT AAT GCA CGT CTG CGC C-3'. Para a construção *vp1+vp2+3'UTR* foram utilizados os *primers*: NoroGII4-7

NotI For e PacI-M4-SacI Rev 5'- TTT GAG CTC TTT TCC CAG TCA CGA CTT AAT TAA-3'.

Após amplificação, cada construção foi purificada em gel de agarose 1% utilizando kit “Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification” (GE Healthcare) e clonada no vetor pRAPs nos sítios de clonagem para NotI e SacI. Após confirmação por sequenciamento, os clones de ambas as construções em pRAPs foram digeridos com as enzimas PacI e AscI utilizando protocolo estabelecido pela NEB. Os fragmentos digeridos de ambas as construções foram subclonados separadamente no vetor binário pBINPLUS, seguindo mesmo protocolo utilizado para mGFP (Figura4). Os clones de ambas as construções (*vp1* e *vp1+vp2+3'UTR*) em pBINPLUS foram separadamente transformados por eletroporação em células de *E. coli* cepa DH5- α competentes, utilizando o equipamento Gene Pulser II (BioRad).

Uma vez selecionados os clones em meio LB (Sambrook *et al*, 1989) com canamicina (100 μ g/ml), foi realizada a extração dos plasmídeos com kit de purificação “PureLink™ Quick Plasmid Miniprep” (Invitrogen), conforme protocolo do fabricante, e as amostras enviadas para sequenciamento para confirmação da presença dos insertos.

4.5- Transformação das construções *vp1* e *vp1+vp2+3'UTR* em *A. tumefaciens*

Após confirmação por sequenciamento dos clones de ambas as construções em pBINPLUS, cada construção foi transformada separadamente em duas cepas diferentes de *A. tumefaciens*: GV 3101 e LBA 4404, ambas competentes para eletroporação. Os clones foram selecionados utilizando meio LB3 (Sambrook *et al.*,1989) com canamicina (100 μ g/ml) e rifampicina (50 μ g/ml), e confirmados por meio de PCR de colônia com a utilização dos *primers* de amplificação descritos no tópico 4.4.

A escolha de duas cepas distintas tem como objetivo investigar se o tipo selecionado interfere no nível de expressão, pois estudos como o de Wydro *et al.* (2006) compararam o nível de expressão de GFP com quatro cepas distintas de *A. tumefaciens* (AGL0, EHA 105, LBA4404 e AGL1), e concluíram que o nível de fluorescência de GFP foi diferente entre as quatro cepas

analisadas, sendo que AGL0 e EHA105 demonstraram um nível significativamente mais alto que as outras.

4.6- Agroinfiltração das duas construções (*vp1* e *vp1+vp2+3'UTR*) em *N. benthamiana* e análise por *Western blot*

Os primeiros testes foram realizados infiltrando nas folhas de *N. benthamiana* as seguintes construções transformadas nas duas cepas diferentes de *A. tumefaciens* (Tabela 2).

Tabela 2 – Construções utilizadas para agroinfiltração nas folhas de *N.benthamiana* e as respectivas cepas de *A. tumefaciens* na qual estas construções foram transformadas.

Tipo de construção	Cepa de <i>A. tumefaciens</i> contendo a construção
1- <i>vp1</i>	GV3101
2- <i>vp1</i>	LBA4404
3- <i>vp1+vp2+3'UTR</i>	GV3101
4- <i>vp1+vp2+3'UTR</i>	LBA4404
5- <i>vp1</i> + HC-Pro de BsMoV	GV3101
6- <i>vp1</i> + HC-Pro de BsMoV	LBA4404
7- <i>vp1+vp2+3'UTR</i> + HC-Pro de BsMoV	GV3101
8- <i>vp1+vp2+3'UTR</i> + HC-Pro de BsMoV	LBA4404

Portanto, para este teste inicial foram utilizadas oito plantas de *N. benthamiana* de aproximadamente seis semanas de vida, sendo que cada planta recebeu uma das construções supracitadas (Tabela 2). Com este teste inicial, o propósito foi analisar a expressão das cepas distintas de *A. tumefaciens* nas duas construções diferentes da CP de NV, se propôs também analisar o efeito do supressor de PTGS nesta expressão, sendo o escolhido inicialmente o Hc-Pro de *Brugmansia suaveolens mottle virus* (BsMoV).

Para inoculação na planta, 600 µl de meio LB3 contendo os clones de *vp1*, *vp1+vp2+3'UTR* e Hc-Pro de BsMoV em *A. tumefaciens* foram colocadas separadamente em 3 ml de suspensão líquida contendo 50 µM de acetosyringone e 10 mM de MES (pH 5,5) crescidas *overnight*.

As suspensões foram submetidas a uma centrifugação de 1200 x g por 10 minutos. Os pellets foram ressuspensos com 2 ml de solução do meio *Murashige-Skoog* (Sigma-Aldrich) contendo 10 mM MES (pH 5,5) e 150 µM de

acetosyringone) com $OD_{600} = 1.0$ (concentração final). Nas construções que havia coexpressão de Hc-Pro de BsMoV, as misturas foram feitas na proporção de 1:1.

Folhas de *N. benthamiana* com aproximadamente seis semanas de vida foram agroinfiltradas mecanicamente no lado abaxial, utilizando-se uma seringa sem agulha. Foram escolhidas as folhas mais jovens do ápice da planta para infiltração, pois foram as que demonstraram melhor expressão em testes anteriores.

Três dias pós-infiltração (dpi), as folhas de cada planta foram colhidas e seis discos (total de 0,3 g) de cada construção foram removidos e armazenados em microtubos distintos para análise por *Western blot*.

Para análise, os discos de cada tubo foram macerados em tampão PBS 1X (NO_2HPO_4 10mM; KH_2PO_4 1,7 mM; NaCl 140 mM e KCl 2,7 mM) na proporção de 1 μ l de PBS por mg de folha. A solução extraída foi fervida por 5 minutos e incubada no gelo por 3 minutos para inativar possíveis proteases. Os extratos proteicos foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida 12% corado com Comassie Blue (Comassie 0,25%, metanol 50%, ácido acético 7%) e descorado com solução descorante (ácido acético 10%, etanol 30%) a fim de confirmar a integridade das amostras.

Após eletroforese, um segundo gel de poliacrilamida 12% foi transferido para membrana de Nitrocelulose (Hybond-C membrane) utilizando o equipamento *Transblot SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell* (Bio-Rad) sob 100 mA 15V regulados. Após transferência a membrana foi bloqueada em solução contendo PBS 1X e leite em pó desnatado 5% (tampão de bloqueio) por 40 minutos. Para detecção da expressão do capsídeo de NV o anticorpo policlonal de coelho anti-NV (gentilmente cedido pelo Dr. Shinich Kobayashi, Aichi Prefectural Institute of Public Health, Nagoya, Japão) foi diluído na proporção de 1: 5000 em tampão de bloqueio e colocado sobre a membrana agindo sob agitação por duas horas.

Posteriormente, a membrana foi lavada 3x por 3 minutos em PBS-Tween 0,1% (PBS1X e Tween 20 0,5%) e incubada por duas horas com anticorpo anti-coelho- IgG fosfatase alcalina conjugado (Sigma) na proporção de 1: 1000 em tampão de bloqueio. Após lavagem da membrana com PBS-Tween 0,1%, a mesma foi incubada com 66 μ L de NBT 10 mg/ml (Nitro-BlueTetrazolium em

dimetilformamida 70%) e 33 μ L de BCIP 10 mg/ml (5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato em dimetilformamida 100%) por 5-10 minutos sob agitação.

Após revelação da membrana a expressão das diferentes construções foi analisada de forma qualitativa. No intuito de confirmar a diferença de expressão de *vp1* e *vp1+vp2+3'UTR* em GV 3101, estas amostras foram novamente agroinfiltradas e analisadas por *Western blot* usando o mesmo protocolo relatado anteriormente.

4.7- Agroinfiltração e purificação da construção *vp1+vp2+3'UTR* em GV3101 com supressor de PTGS

Os resultados do teste comparando as construções do capsídeo de NV demonstraram que *vp1+vp2+3'UTR* transformada em GV3101 utilizando a proteína supressora Hc-Pro obteve um melhor nível de expressão e, portanto, foi a construção escolhida para expressão e montagem de VLP.

Para agroinfiltração, 42 ml de suspensão contendo *vp1+vp2+3'UTR* e 42 ml de suspensão contendo Hc-Pro de BsMoV foram submetidas a uma centrifugação de 1200 x g por 10 minutos. Cada pellet foi ressuspensionado com 14 ml de solução do meio *Murashige-Skoog* (Sigma-Aldrich) contendo 10 mM MES (pH 5.5) e 150 μ M deacetosyringone com $OD_{600} = 1.0$.

Vinte e oito *N.benthamiana* com aproximadamente seis semanas de vida foram selecionadas e suas folhas agroinfiltradas com a mistura de *vp1+vp2+3'UTR* e Hc-Pro de BsMoV na proporção de 1:1, com $OD_{600} = 1.0$ (concentração final).

Após 3 dpi as folhas foram extraídas e homogeneizadas com tampão de extração (0,1 M de Na_2HPO_4 , 0,1 M de NaH_2PO_4 , 50mM de sulfito de sódio, pH= 7,0) na proporção de 1 ml de tampão para cada grama de folha. Após homogeneização, foi coado com gaze e adicionado clorofórmio com n-butanol (50:50) na proporção de 500 μ l para cada grama de folha, a mistura foi centrifugada por 30 min a 1600 x g. O sobrenadante foi então coletado, sendo submetido a uma nova centrifugação de 3 horas a 33.000 rpm a 4 °C (rotor SW 40 Ti da Beckman), e o pellet produzido foi ressuspensionado em 1 ml de tampão de ressuspensão (50 mM $KHPO_4$, pH= 7,4). As suspensões contendo os pellets foram colocadas em um colchão de sacarose a 20% e centrifugadas por 3 horas a 35.000 rpm a 4°C (rotor Ti 70 da Beckman).

Os *pellets* formados a partir do colchão foram ressuspensos em 500 µl de tampão de ressuspensão e passaram por uma gradiente de sacarose 10-40% por 2 horas a 35.000 rpm a 4 °C (rotor Ti 70 da Beckman). A banda contendo as VLPs, formada após o gradiente de sacarose foi coletada utilizando-se uma seringa com agulha fina. O conteúdo coletado foi balanceado com tampão de ressuspensão e sofreu uma nova centrifugação de 1 hora a 40.000 rpm a 4 °C (rotor Ti 70 da Beckman), os *pellets* gerados foram ressuspensos com 500 µl de tampão de ressuspensão.

Após purificação por gradiente de sacarose a amostra contendo VLP foi preparada em uma telinha de 200 *mesh* utilizando a técnica de *immunosorbent electron microscopy* (ISEM) descrita por Maramorosch (1984) para visualização no microscópio eletrônico de transmissão JEOL JEM 1011.

Para confirmação da expressão da VLP esta mesma amostra também foi submetida a análise por *Western blot* seguindo o mesmo protocolo descrito no tópico 4.6.

4.8- Alternativas para otimizar a produção de VLP

A primeira tentativa de expressão e montagem de VLP utilizando a construção *vp1+vp2+3'UTR+ Hc-Pro* de BsMoV e o protocolo de purificação anteriormente relatado, não teve um bom rendimento em relação à expressão e montagem das partículas. Nesta fase, os testes que foram realizados com mGFP e as proteínas supressoras demonstraram que para construção em pBINPLUS, a proteína 126K de PMMoV obteve um ótimo nível de fluorescência. Baseado nestes resultados, optou-se por realizar uma nova agroinfiltração utilizando a construção *vp1+vp2+3'UTR* juntamente com 126K de PMMoV.

Foram utilizadas 30 ml de suspensão contendo *vp1+vp2+3'UTR* e 30 ml de suspensão contendo 126K de PMMoV que foram submetidas a uma centrifugação de 1200 x g por 10 minutos. Os *pellets* foram ressuspensos com 10 ml do meio *Murashige-Skoog* (Sigma-Aldrich) contendo 10 mM MES (pH 5,5) e 150 µM deacetosyringone com OD₆₀₀= 2,0. Quarenta *N. benthamiana* com aproximadamente seis semanas de vida foram selecionadas e suas folhas foram agroinfiltradas com a mistura de *vp1+vp2+3'UTR* e 126K de PMMoV na proporção de 1:1, com OD₆₀₀= 2,0 (concentração final) . Após 3

dpi as folhas foram extraídas e homogeneizadas com nitrogênio líquido e tampão ácido de extração (25 mM de tampão de fosfato de sódio, 100 mM de NaCl, 50 mM de ácido ascórbico, 10 µg/ml de leupeptina, pH 5,3) na proporção de 1ml de tampão para cada grama de folha. Após homogeneização o conteúdo foi filtrado com gaze e incubado a temperatura ambiente (TA) por 1 hora, após incubação o extrato foi centrifugado a 1500 x g por 30 min, a suspensão foi filtrada utilizando sucessivamente filtros de 0,45 e 0,22 µm (Millipore). Após filtração a amostra foi incubada em TA por 1 hora e na sequencia overnight à 4° C. A suspensão foi então centrifugada por 20 min a 1500 x g, o sobrenadante foi colocado em um filtro Amicon® Ultra Centrifugal Filters (Millipore) de 100 kDa e centrifugado por 30 min 4.000 x g. Após centrifugação 1,5 ml de concentrado contendo VLP semi-purificada foi coletada do interior do filtro e armazenada à 4° C. Este protocolo de semi-purificação foi baseado no estudo de Santi *et al.* (2008).

Para purificação do material semi-purificado, utilizou-se gradiente de sacarose 10-40%, com centrifugação a 35.000 rpm (rotor Ti 70 da Beckman) por 2 horas a 4 °C. Após coleta da banda contendo NV VLP o material foi dialisado utilizando PBS 0,5X, pH 5,5 (Sambrook *et al.*, 1989) por 3h.

Para visualização no microscópio eletrônico de transmissão JEOL JEM 1011 três amostras foram utilizadas: purificada antes da diálise, purificada depois da diálise e semi-purificada. Cada uma foi posicionada em uma telinha distinta de 200 *mesh* por 5 minutos, e em seguida passaram por contrastação negativa usando 2% de ácido fosfotúngstico (PTA) por 5 minutos.

Estas mesmas amostras também foram submetidas à análise por *Western blot*, seguindo o mesmo protocolo descrito no tópico 4.6, para confirmação da expressão da VLP.

4.9- Otimização de códon da proteína VP1

O sistema utilizando as proteínas virais supressoras de PTGS otimizam a transcrição do material genético aumentando assim o rendimento da proteína heteróloga, uma outra estratégia para aumentar ainda mais este rendimento é otimizar também a fase de tradução, para este propósito foi gerado o gene da ORF2 (VP1) com códon otimizado para expressão em planta. Para otimização de códon tem sido utilizado o banco de dados *Codon Usage Database*

(<http://www.kazusa.or.jp/codon>), que possui tabelas de frequência baseadas nos genes codificadores de proteínas do organismo, selecionados independentemente do seu nível de expressão.

O gene de VP1 com códon otimizado foi obtido a partir da empresa Epoch Life Science (TX, USA). A construção de VP1 otimizado (*vp1-codOpt*) foi clonada em pRAPs e pBINPLUS seguindo o mesmo protocolo anteriormente relatado para as construções anteriores (tópico 4.4). Após confirmação das clonagens por sequenciamento, a construção *vp1-codOpt* foi transformada em *A. tumefaciens* GV 3101.

Após transformação em GV3101, quatorze clones foram escolhidos e preparados para agroinfiltração em *N. benthamiana* segundo protocolo já descrito anteriormente (tópico 4.6).

O intuito desta primeira infiltração é testar se os clones em *A. tumefaciens* estão expressando CP NV. Portanto as folhas contendo cada clone foram maceradas e submetidas à análise por *Western blot* seguindo o mesmo protocolo descrito no tópico 4.6.

Após confirmação por *Western blot* de que realmente os clones de *vp1-codOpt* em GV3101 estavam expressando NV CP, foi realizado agroinfiltração (mesmo protocolo do tópico 4.6) das seguintes construções:

- 1- construção *vp1-codOpt* em GV3101 + 126K PMMoV
- 2- construção *vp1* em GV3101 + 126K PMMoV
- 3- construção *vp1+vp2+3'UTR* em GV3101 + 126K PMMoV

Três dias após a agroinfiltração, as folhas de cada construção foram removidas e foi realizado western blotting do extrato destas folhas seguindo o mesmo protocolo do tópico 4.6. Este teste tem por objetivo avaliar por meio de uma análise qualitativa da membrana de *Western blot* a expressão destas três construções.

5- Resultados

5.1- Amplificação de mGFP e teste com as proteínas virais supressoras de PTGS

A amplificação por PCR do gene de mGFP, apresentou um fragmento de aproximadamente 750 pares de bases (Figura 6).

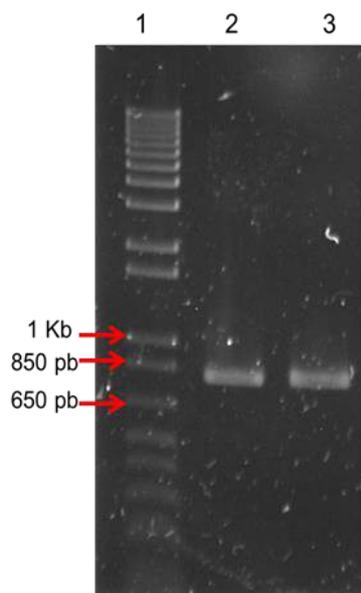


Figura 6- Eletroforese de gel de agarose mostrando amplificação de gene de mGFP. Tamanho esperado de mGFP é 750 pb. 1- 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen), 2 e 3 – gene amplificado de mGFP.

Após amplificação, o fragmento de gene de mGFP foi clonado em pRAPs e subclonado em pBINBLUS. Uma vez confirmado por seqüenciamento, o clone de mGFP em pBINPLUS foi transformado em *A. tumefaciens* GV 3101 para os testes subsequentes. Nesta etapa foram testadas as seguintes construções: 1- mGFP com $OD_{600} = 1$; 2- mGFP com $OD_{600} = 2$; 3- mGFP + HcPro de BsMoV; 4- mGFP + AC2 de ToSRV e 5- mGFP + 126 K de PMMoV.

A expressão de mGFP foi avaliada qualitativamente, por meio da análise da fluorescência emitida em cada construção. Os resultados demonstraram que a fluorescência de mGFP com $OD_{600}=2,0$ foi maior que com $OD_{600}=1,0$ (Figura7 - A e B). A análise da fluorescência de mGFP utilizando os diferentes supressores, apresentou maior nível nas construções com as proteínas 126 K de PMMoV, e com Hc-Pro de BsMoV e menor nível com a proteína AC2 de ToSRV (Figura7 - C, D e E). No trabalho de mestrado realizado por Vasques Bonnet (2010), foram obtidos os mesmos resultados na análise da fluorescência de mGFP utilizando estes supressores.

Em uma comparação entre a fluorescência de mGFP isolado e coinfiltrado com os supressores, o isolado com $OD_{600}=2,0$ obteve um nível de fluorescência similar aos coinfiltrados com as proteínas 126K e Hc-Pro. Deve-

se ressaltar que para esta análise foi realizado somente o método observacional sob luz UV, para uma comparação mais minuciosa é necessária uma avaliação de intensidade de sinal na reação de *Western blot*.

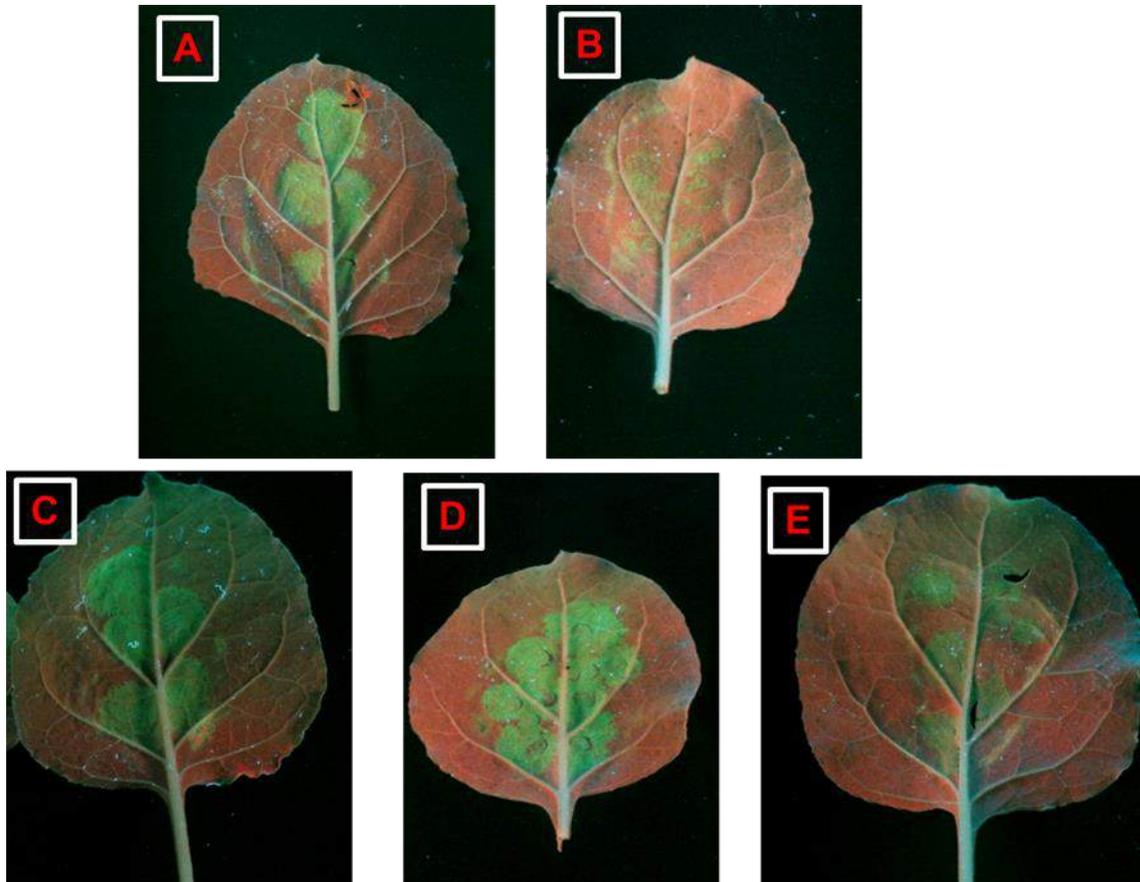


Figura 7- Sinais de fluorescência pelo mGFP nas folhas de *N. benthamiana* gerados por irradiação de UV. A – mGFP OD₆₀₀=2,0 ; B – mGFP OD₆₀₀=1,0; C – mGFP + 126K PMMoV; D - mGFP + Hc-Pro BsMoV; E – mGFP + AC2 ToSRV.

5.2- Amplificação dos fragmentos de *vp1* e *vp1+vp2+3'UTR*

Após amplificação por PCR da ORF2 (*vp1*), e ORF2+ORF3+3'UTR (*vp1+vp2+3'UTR*), foram obtidos fragmentos de 1,6K pares de bases e 2,2K pares de bases respectivamente (Figura 8).

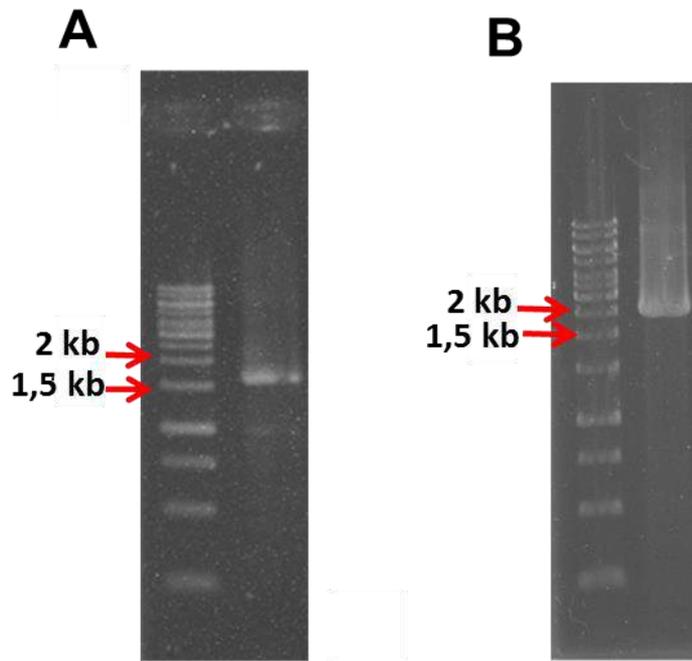


Figura 8- Eletroforese de gel de agarose mostrando amplificação de genes por PCR – A: PCR de VP1 (1,6 Kb), B- PCR de VP1+VP2 (2,2 Kb). Marcador GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder, (Fermentas).

5.3- Análise da expressão das construções *vp1* e *vp1+vp2+3'UTR* com supressor de PTGS

Foram testadas oito amostras, descritas na Tabela 2. A análise qualitativa feita por *Western blot* (Figura 9) com relação à expressão de CP, demonstrou que a construção de *vp1+vp2+3'UTR* obteve maior expressão que de *vp1* isolada, este resultado é corroborado pelo estudo de Bertolotti-Ciarlet *et al.* (2003) utilizando sistema de expressão em baculovírus, demonstrou que a presença de VP2 aumentou a estabilidade de VP1 tanto na montagem da partícula como na proteção contra degradação de proteases, além de aumentar os níveis de expressão. Embora não haja nenhum mecanismo ativo de VP2 durante a tradução, ocorre a expressão desta proteína em pequena quantidade, fato esperado e explicado pelo mecanismo estratégico de tradução terminação – reiniciação de ribossomos (Naphthine *et al.*, 2009). Para averiguar a diferença de expressão entre *vp1* e *vp1+vp2+3'UTR*, foi realizada nova agroinfiltração destas construções em GV3101 e novamente a expressão de *vp1+vp2+3'UTR* foi mais significativa que *vp1* (Figura 10).

Quanto às cepas de *A. tumefaciens* utilizadas, as construções que se encontravam na cepa GV3101 mostraram melhor expressão que as de LBA4404.

Na análise da proteína viral supressora de PTGS Hc-Pro de BsMoV, as construções que foram co-expressas com esta proteína demonstraram melhor expressão que as construções sem a proteína, enfatizando a teoria já consagrada na literatura de que a utilização de proteínas virais supressoras de PTGS na expressão transiente utilizando *A. tumefaciens* aumentam os níveis de expressão de proteínas heterólogas (Johansen e Carrington, 2001; Voinnet *et al.*, 2001).

Conclui-se que a construção que demonstrou maior expressão foi *vp1+vp2+3'UTR* em GV3101 co-expressa com Hc-Pro de BsMoV, que está representada na Figura 9 nos campos 9 e 10.

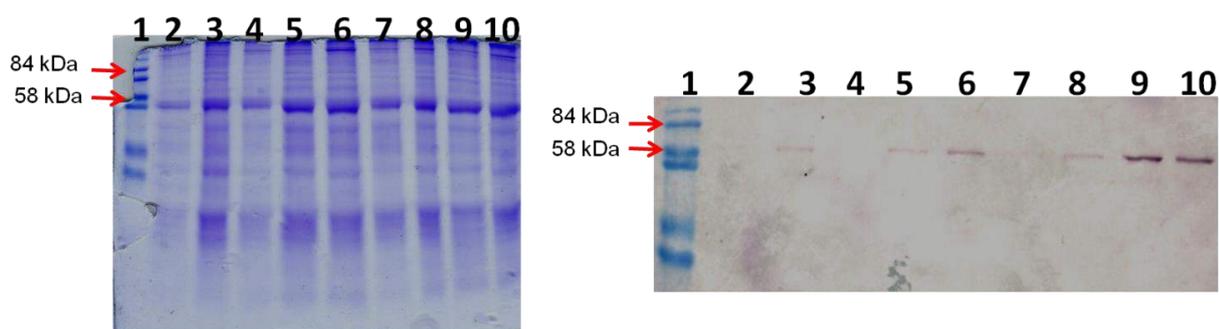


Figura 9– Eletroforese de SDS-PAGE e *Western blot* do extrato de folhas de *N. benthamiana* das amostras mencionadas na Tabela 2. Para cada amostra foi utilizado total de 0,3 g de folha macerada em PBS 1X. 1-Prestained protein marker 26-116 kDa (SIGMA), 2-extrato de folha de *N. benthamiana* (controle negativo), 3- *vp1+vp2+3'UTR* em LBA4404, 4- *vp1* em LBA4404, 5- *vp1* em GV3101, 6- *vp1+vp2+3'UTR* em GV3101, 7- *vp1+vp2+3'UTR* em LBA4404 com Hc-Pro, 8- *vp1* em LBA4404 com Hc-Pro, 9- *vp1+vp2+3'UTR* em GV3101 com Hc-Pro (clone 1), 10- *vp1+vp2+3'UTR* em GV3101 com Hc-Pro (clone 2). VP1= 58 kDa.

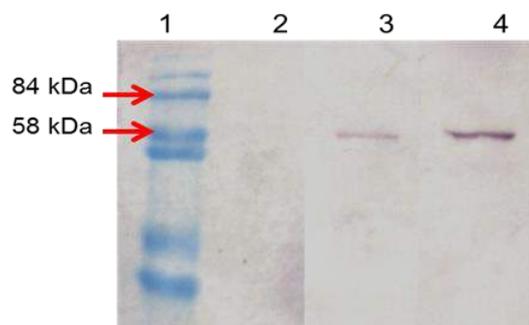


Figura 10- *Western blot* do extrato de folhas de *N. benthamiana* infiltrada com as construções de *vp1* e *vp1+vp2+3'UTR* em GV3101. Para cada amostra foi utilizado total de 0,3 g de folha macerada em PBS 1X. 1-Prestained protein marker 26-116 kDa (SIGMA), 2-extrato de folha de *N. benthamiana* (controle negativo), 3- *vp1* em GV3101, 4 - *vp1+vp2+3'UTR* em GV3101. VP1=58 kDa.

5.4- Visualização de NV VLP a partir da expressão da construção *vp1+vp2+3'UTR* com o supressor viral de PTGS –Hc-Pro de BsMoV

A construção *vp1+vp2+3'UTR* em GV3101 com Hc-Pro foi utilizada para identificar a montagem de NV VLP. Após purificação das folhas que foram infiltradas com a construção, foram observadas pelo microscópio eletrônico de transmissão (MET) partículas compatíveis com NV VLP (Figura 11). As partículas possuem diâmetro aproximado de 38 nm (Ausar *et al.*, 2006). Nesta primeira tentativa foram montadas partículas em pequena quantidade, e não obteve a concentração das mesmas, fato que pode ser atribuído a forma como foi realizada a purificação da amostra. Para confirmação da expressão de NV CP na amostra visualizada, foi feita análise por *Western blot* que confirmou a expressão da proteína (Figura 12).

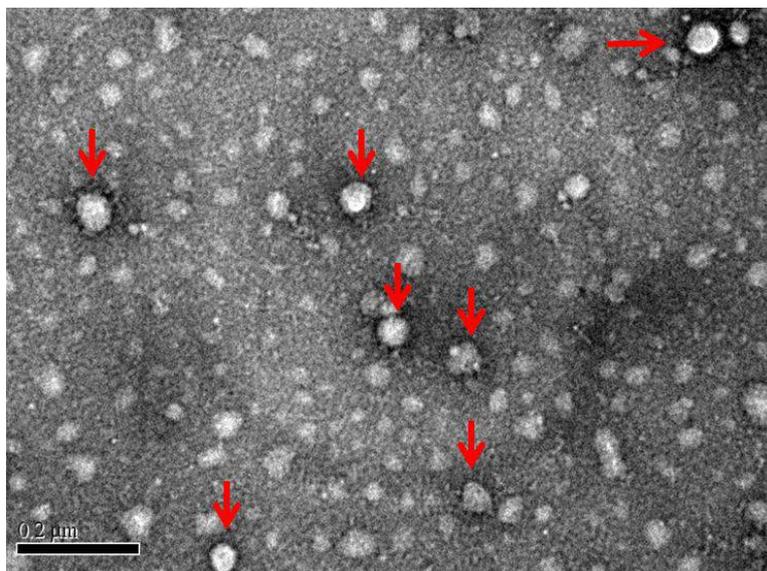


Figura 11– Microscopia eletrônica mostrando possíveis partículas de NV VLP. A imagem foi adquirida pelo MET com ampliação de 100,000 x, barra 0,2 μm. A amostra foi preparada pela técnica ISEM, as setas demonstram partículas compatíveis com NV VLP. Diâmetro aproximado = 38 nm.

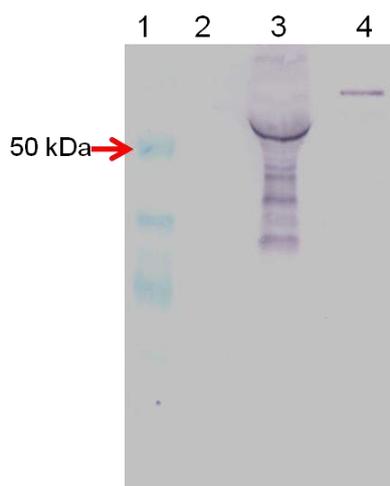


Figura 12– *Western blot* da amostra purificada de NV VLP para identificar a expressão da CP NV. 1- Prestained protein molecular weight marker 20-120 kDa (Fermentas), 2- folha sadia de *N.benthamiana* semi-purificada (controle negativo), 3- NV CP expresso em célula de inseto não purificada (controle positivo), 4- amostra semi-purificada de NV CP oriundo de folha agroinfiltrada com a construção. VP1= 58 kDa.

5.5 – Visualização de NV VLP a partir da expressão da construção *vp1+vp2+3'UTR* com o supressor viral de PTGS – 126K PMMoV

A partir do teste com os supressores, foi realizada a agroinfiltração da construção de NV com um novo supressor (126K PMMoV), utilizando na preparação das construções a $OD_{600}=2,0$. Nesta etapa foi utilizado um método diferente de extração e semi-purificação das partículas. Com este novo teste e metodologia, foram preparadas três amostras para visualização no MET: 1- NV CP semi-purificado; 2- NV CP purificado por gradiente de sacarose dialisado e; 3- NV CP purificado por gradiente de sacarose antes da diálise. Após análise pôde-se observar ao MET partículas de NV VLP na amostra 3 (Figura 13). Nesta imagem as partículas se encontravam mais concentradas, sugerindo que o método de semi-purificação utilizado nesta etapa (Santi *et al.* 2005) obteve um melhor resultado que o método de purificação utilizado na etapa anterior.

A análise por *Western blot* das amostras visualizadas no MET, demonstrou que a proteína de CP do NV estava sendo expressa (Figura 14).

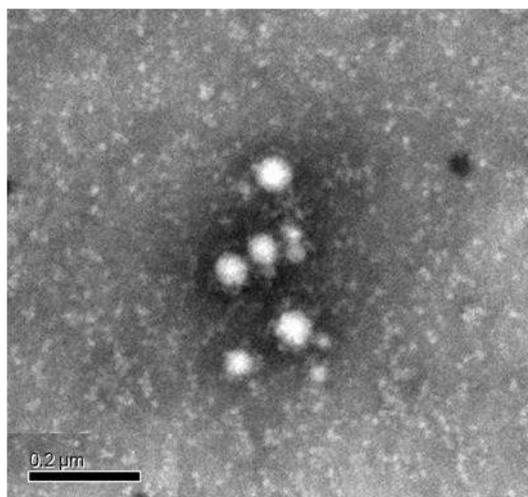


Figura13- Concentração de partículas de NV VLP visualizadas no MET 100,000 x, barra 0,2 μm, contrastação com PTA. Visualização da amostra 3 – material purificado por gradiente de sacarose antes da diálise. Diâmetro aproximado = 38 nm.

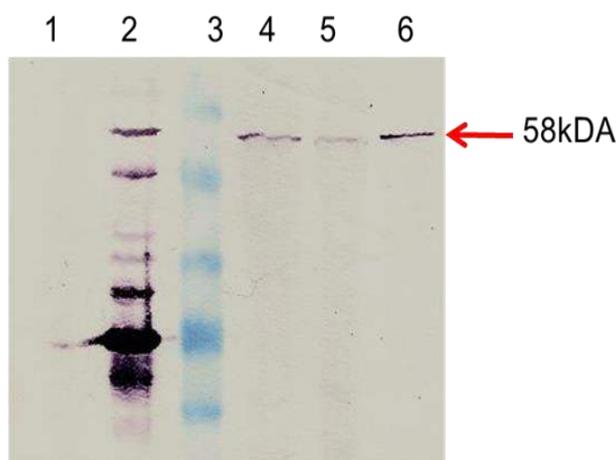


Figura14- *Western blot* das amostras de NV VLP que foram visualizadas no MET. 1- folha de *N. benthamiana* semi purificada (controle negativo); 2- proteína P de norovírus produzida em bactéria (controle positivo); 3- marcador (Prestained protein molecular weight marker 20-120 kDa - Fermentas); 4- NV CP semi-purificado (amostra 1); 5- NV CP purificado por gradiente de sacarose dialisado (amostra 2); 6- NV CP purificado por gradiente de sacarose antes da diálise (amostra 3). VP1= 58 kDa.

5.6 – Otimização de códon de NV CP

Neste ponto, a estratégia e objetivo do trabalho é aumentar o rendimento na produção de NV VLP, para este propósito foi realizada a otimização de códon do gene que codifica VP1. Este gene foi clonado no vetor pRAPs e suclonado no vetor pBINPLUS, após confirmação dos clones por sequenciamento, o clone de VP1 em pBINPLUS foi transformado em *A. tumefaciens*, os clones gerados foram infiltrados em folhas de *N. benthamiana* para averiguar a expressão de VP1. As folhas infiltradas foram maceradas e a

análise do extrato em gel de poliacrilamida e *Western blot* confirmaram a expressão (Figura 15).

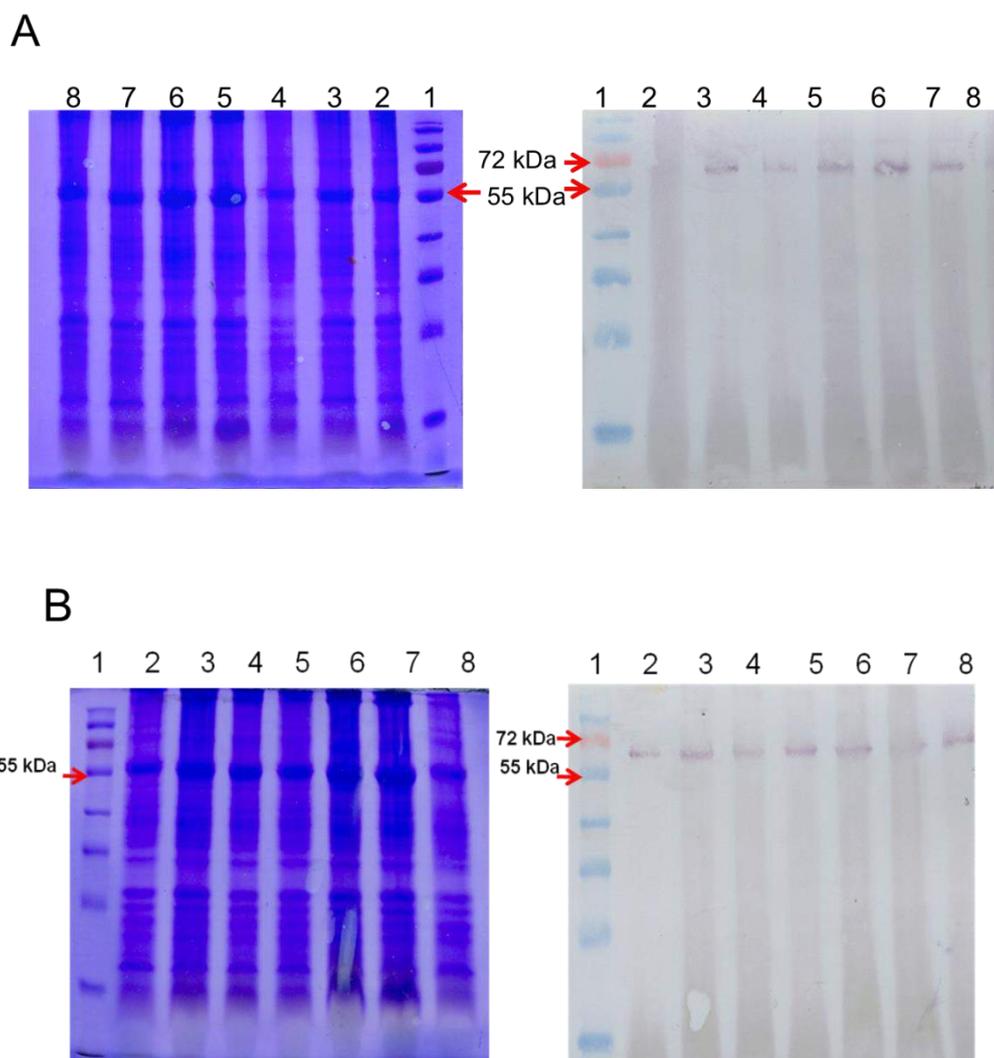


Figura 15- Eletroforese de SDS-PAGE e *Western blot* do extrato de folha de *N. benthamiana* com os clones de VP1 códon otimizado. A- Gel/membrana 1: 1- marcador (Page Ruler™ Prestained Protein Ladder - Fermentas), 2- clone 1, 3- clone 2, 4- clone 5, 5- clone 7, 6- clone 10, 7- clone 13, 8- clone 17. B - Gel/membrana 2: 1- marcador (Page Ruler™ Prestained Protein Ladder - Fermentas), 2- clone 14, 3- clone 20, 4- clone 23, 5- clone 32, 6- clone 30, 7- clone 48, 8- clone 40. VP1= 58 kDa.

O clone 32 de *vp1-codOpt* em GV3101 foi escolhido e a análise da expressão de *vp1-codOpt* em GV3101 foi comparada com a expressão de *vp1* e *vp1+vp2+3'UTR* ambas em GV 3101. Todas as amostras foram co infiltradas com a proteína 126K de PMMoV. A análise qualitativa da membrana de *Western blot* demonstrou que não houve diferença significativa de expressão entre *vp1-codOpt* e as demais construções, sendo que *vp1+vp2+3'UTR* demonstrou melhor expressão que as demais (Figura 16).

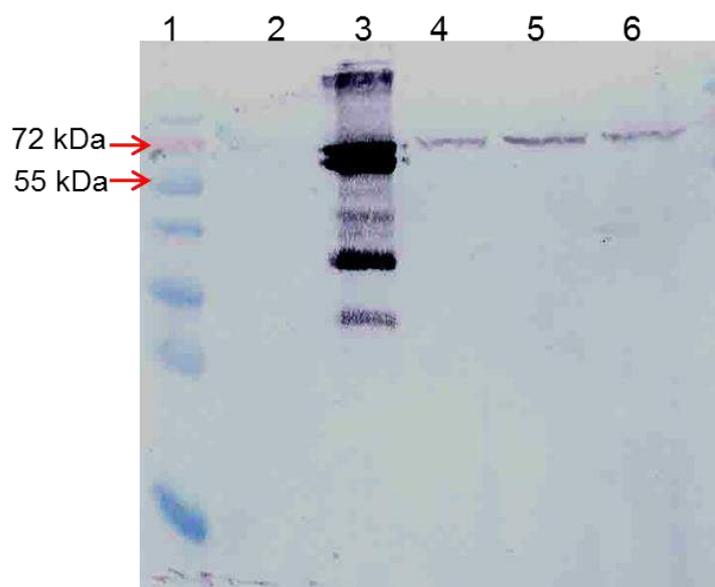


Figura 16 – Western blot de extratos de folhas de *N. benthamiana* infiltradas com as construções de *vp1-codOpt*, *vp1* e *vp1+vp2+3'UTR*. Para cada amostra foi utilizado total de 0,3 g de folha macerada em PBS 1X. 1- Marcador Prestained protein molecular weight marker (20-120 kDa - Fermentas); 2- folhas de *N. benthamiana* sem infiltração (controle negativo), 3- VLP produzida em células de inseto 7µg (controle positivo), 4- *vp1+126k* PMMoV, 5- *vp1+vp2+3'UTR +126K* PMMoV, 6- *vp1-codOpt + 126K* PMMoV.

6- Discussão e conclusão

O sucesso na produção de NV VLP utilizando sistema de planta já foi demonstrado por vários estudos (Zhang *et al.*, 2006; Santi *et al.*, 2008; Daniell *et al.*, 2009; Huang *et al.*, 2009; Tiwari *et al.*, 2009; Kralovetz *et al.*, 2010; Lai e Chen, 2012; Merlin *et al.*, 2014). A vantagem de se utilizar este sistema é atribuída ao fato do mesmo produzir partículas viáveis a baixo custo e em grande quantidade.

A expressão transiente utilizando vetores virais modificados (sistema magnICON) demonstrou dentre as várias outras formas de produção, ser a mais eficiente em termos de rendimento e velocidade (Santi *et al.*, 2008; Lai *et al.*, 2012; Huang *et al.*, 2009; Lai *et al.*, 2012). Entretanto, este sistema possui uma limitação com relação ao tamanho dos genes que podem ser inseridos neste vetor. Os ensaios realizados para produção de NV VLP utilizando magnICON utilizaram somente a expressão de VP1, se este mesmo sistema fosse utilizado para a expressão de insertos maiores como na construção de VP2+3'UTR (com aproximadamente 2,6 kb) ele não seria eficaz.

A importância da coexpressão de VP1 e VP2 é que a mesma aumenta a estabilidade das VLPs (Bertolotti-Ciarlet *et al.*, 2003) o que é uma vantagem se

o intuito da expressão e montagem das partículas for para uso vacinal. Com o propósito de coexpressar as duas proteínas nosso grupo então optou pela utilização de vetor binário como sistema de expressão de NV VLP em planta.

O vetor binário pEAQ é um pequeno vetor (7Kb), construído a partir do *backbone* e da região T-DNA do vetor pBINPLUS com a adição da proteína supressora de PTGS p19 de TBSV (Sainsbury *et al.*, 2009). Este vetor é uma ferramenta fácil e rápida para a produção de antígenos virais. Em uma análise da infectividade dos vírus em *N. benthamiana*, observa-se que alguns têm a capacidade de induzir infecções mais severas que outros, isso gera a hipótese de que as diferentes proteínas virais supressoras de PTGS podem levar a um nível de expressão proteica diferente. Portanto, o objetivo deste trabalho foi testar estes diferentes supressores de PTGS utilizando o vetor binário pBINPLUS (Engelen *et al.*, 1995).

Das proteínas supressoras testadas neste estudo, as que obtiveram uma melhor expressão de mGFP foram 126k PMMoV e Hc-Pro BsMoV em comparação com a AC2 ToSRV (Figura 7). Resultado semelhante foi encontrado no trabalho de dissertação de mestrado realizado por Vasques Bonnet (2010), no qual foi observado, uma maior expressão de mGFP quando coexpresso com os seguintes supressores (ordem decrescente): 126K PMMoV, seguido de Hc-Pro BsMoV, seguida de p19 TBMV, seguida de AC2 ToSRV. Os dados obtidos no trabalho de Wang *et al.* (2005) também corroboram estes resultados. Os autores observaram uma pequena expressão de GFP coexpresso com o supressor AC2 do begomovírus *Tomato golden mosaic virus* quando comparado com a expressão de GFP coexpresso com Hc-Pro de *Tobacco etch virus* e p19 de *Cymbidium ringspot virus*.

De acordo com Mallory *et al.* (2001), Hamilton *et al.* (2002), e Wydro *et al.* (2006), vários fatores como a natureza do transgene, o tempo que a amostra é analisada (dias pós infiltração), tipos de vetores binários utilizados, linhagens de *N. benthamiana* e *A. tumefaciens*, podem influenciar nas necessidades genéticas para o silenciamento e na resposta dos supressores, podendo gerar resultados diferentes com a mesma proteína viral. Portanto, os testes realizados com supressores de PTGS devem possuir uma padronização relacionada com estes fatores, principalmente com a escolha de um bom vetor binário.

Para a expressão de NV VLP, foi escolhida a construção *vp1+vp2+3'UTR*, pois a mesma apresentou uma maior expressão em comparação a *vp1*. Este resultado é corroborado pelo trabalho de Bertolotti-Ciarlet *et al.* (2003) que demonstrou em sistema de células de inseto que a expressão de VP1+VP2 é maior que de VP1 isolada, segundo os autores a presença de VP2 aumenta a estabilidade de VP1 tanto na montagem da partícula como na proteção contra degradação de proteases. Sendo a expressão de VP2 relacionada ao mecanismo de tradução terminação-reiniciação de ribossomos (Naphthine *et al.*, 2009), o presente trabalho conclui que o mecanismo de tradução supracitado é funcional em sistema de expressão em planta, e que portanto, o uso de vetor binário para expressão de proteínas representa uma alternativa viável ao uso de células de inseto.

Na análise por *Western blot* a expressão de NV VLP utilizando a construção *vp1+vp2+3'UTR* demonstrou a presença de somente uma banda, já a expressão da mesma proteína utilizando sistema de baculovírus (controle positivo) demonstrou a presença de mais de uma banda, duas bandas (58 kDa e 56 kDa) (Figura 16). A presença de duas bandas na análise por *Western blot* foi observada em outros estudos (Huhti *et al.*, 2010; Blazevic *et al.*, 2011; Koho *et al.*, 2012). A menor banda de 56 kDa representa um produto de 34 aminoácidos que foi retirado da extremidade N-terminal. Esta alteração foi possivelmente provocada pelas proteases da célula de inseto, como a protease K ou termolisina (Koho *et al.*, 2010). A expressão de NV VLP em sistema de planta, entretanto, apresentou somente uma banda, resultado corroborado por trabalhos prévios (Santi *et al.*, 2008; Lai e Chen, 2012), portanto, este resultado indica que as células de planta não contem proteases que possam clivar a NV VP1.

A tentativa de melhorar a expressão de VP1 utilizando a estratégia de otimização de códon não produziu o resultado esperado. A expressão de *vp1* isolada do cDNA viral por RT-PCR foi semelhante a expressão de *vp1 cod-Opt* (Figura 16). Resultado semelhante foi encontrado no trabalho de Maclean *et al.* (2007) que observaram que a expressão da proteína L1 do HPV obteve maior rendimento na forma nativa que quando expressa na forma otimizada. O sistema de expressão utilizado neste estudo foi vetor binário em *N. benthamiana*. Conclui-se que a otimização de códon nem sempre pode ser

considerada a melhor estratégia para aumentar a eficiência de expressão de proteínas.

Conclui-se que a expressão transiente utilizando vetor binário é eficaz na expressão e montagem de NV VLP, o aumento na produção de VLP utilizando este sistema é conseguido por meio da coexpressão de proteínas virais supressoras de PTGS. Entretanto, estudos adicionais devem ser realizados no intuito de aumentar o nível de acúmulo das proteínas, como por exemplo, modificando a localização subcelular para que se possa obter uma maior estabilidade e diminuição de proteólise.

CAPÍTULO III: Utilização do vetor viral tripartido de *cucumber mosaic virus* para expressão de antígeno multi epítopo da dengue

1- Introdução

1.1- *Cucumber mosaic virus*: características gerais e taxonomia

Cucumber mosaic virus (CMV) é um vírus de importância na área da agronomia, sendo responsável por grandes perdas em lavouras por todo o mundo. Dentre os vírus de planta é um dos mais amplos, pois infecta uma diversidade enorme de espécies (Jacquemond, 2012). Segundo Edwardson e Christie (1991) o CMV pode infectar cerca de 1240 espécies diferentes distribuídas em 101 famílias de plantas, incluindo monocotiledôneas e dicotiledôneas utilizadas em culturas diferentes (alimentação, vegetais, ornamental).

Sua distribuição é mundial, de forma mais abundante em regiões de clima tropical e temperado, os sintomas causados pelo CMV dependem da espécie da planta hospedeira e/ou da estirpe do vírus, de uma forma geral os sintomas incluem: mosaico, baixo crescimento, clorose, malformação da folha e necrose sistêmica. O vírus é primariamente transmitido por afídeos (pulgões) de modo não persistente (Edwardson e Christie, 1991).

Por ser um vírus que possui características que facilitam sua manipulação, o CMV é um importante modelo para pesquisas que utilizam vetores virais. Estas características são: possibilidade de transmissão de forma mecânica, possui alto acúmulo de partículas virais no hospedeiro infectado, o que permite fácil purificação de pequenas amostras, o cDNA de várias estirpes diferentes analisadas por genética reversa, se apresentou infeccioso (Jacquemond, 2012).

O CMV pertence ao gênero *Cucumovirus*, família *Bromoviridae* no qual também inclui o *Tomato aspermy virus* (TAV) e *Peanut stunt virus* (PSV), e o mais recente membro *Gayfeather mild mottle virus* (GMMV) (Adams *et al.*, 2009). De todos os componentes deste gênero o CMV é o que possui uma maior diversidade de hospedeiros. Suas partículas possuem simetria

icosaédrica de 29 nm de diâmetro com 180 subunidades proteicas formando o capsídeo e aproximadamente 18% de RNA. As partículas dos cucumovírus são indistinguíveis morfologicamente e possuem semelhança na sua composição física e química (Palukaitis e García-Arenal, 2003).

O genoma do CMV consiste de três fitas simples de RNA senso positivas, denominadas de RNA 1, RNA 2 e RNA 3 na ordem decrescente de tamanho. Cada um destes RNAs possuem *cap* na região 5'UTR e a região 3'UTR possui uma estrutura *tRNA-like*. Seu genoma possui dois RNAs subgenômicos, denominados de RNA 4 e RNA 4a, e possui ainda a presença de RNAs satélites, que são pequenos RNAs lineares que não são codificados. O genoma possui cinco ORFs, as proteínas 1a, 2a e 3a são traduzidas a partir dos RNAs genômicos 1 (ORF1a), 2 (ORF2a) e 3 (ORF3a), respectivamente. A proteína 2b é traduzida a partir do RNA subgenômico 4a (ORF2b), e a capa proteica (ou proteína 3b) é traduzida a partir do RNA subgenômico 4 (ORF3b) (Figura 17).

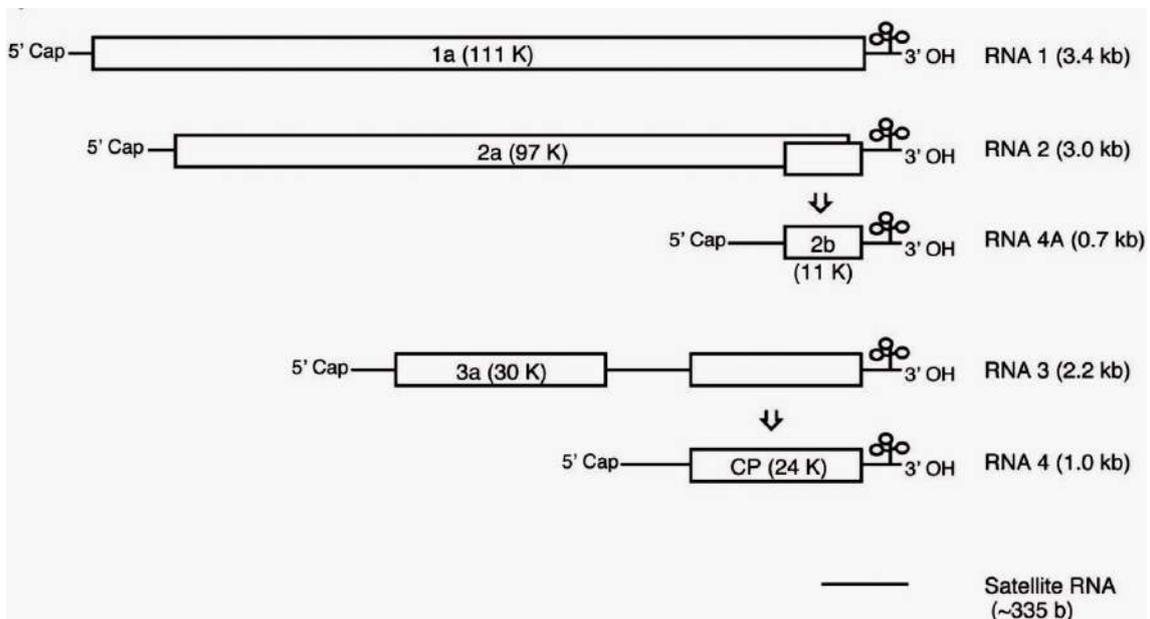


Figura 17- Estrutura genômica do CMV e do RNA satélite. As cinco ORFs estão representadas dentro das caixas. Fonte: Mochizuk e Ohki, 2012.

A proteína 1a codificada pelo RNA 1 é a replicase do vírus, sua região de domínio N-terminal é constituída pela metiltransferase, estando relacionada com formação do *cap* genômico e subgenômico, e a região de domínio C-terminal é constituído pela helicase viral. A proteína 2a codificada pelo RNA 2

possui motivos característicos da RNA dependente de RNA polimerase (RdRp). A proteína 3a codificada pelo RNA 3 é a proteína de movimento do vírus, não só do movimento célula a célula, como também do movimento sistêmico. A proteína 2b codificada pelo RNA 4a subgenômico é a proteína supressora de PTGS que age em várias vias diferentes de silenciamento: inibe o silenciamento sistêmico, age inibindo os siRNA e bloqueando a proteína Argonauta, além de inibir a produção de ácido salicílico e jasmônico pelas células (inibindo a resposta de hipersensibilidade pela planta). A proteína 3b ou proteína da capa proteica codificada pelo RNA 4 subgenômico, é a proteína formadora da capa proteica e é necessária para que o vírus possa se movimentar tanto célula a célula como em longas distâncias (Palukaitis e García-Arenal, 2003).

Segundo Jacquemond (2012), o CMV possui dois pequenos RNAs que são encapsidados juntamente com os RNAs genômicos e subgenômicos, o RNA 5 e RNA satélite. O RNA 5 é formado por aproximadamente 300 nt e estudos sugerem que sua formação está relacionada com a clivagem dos RNAs 2, 3 e 4, já que a estrutura do RNA 5 é semelhante a destes RNAs. Os RNAs satélites são pequenos RNAs lineares que não são codificados e não possuem similaridade com o RNA genômico viral, entretanto, é dependente das funções exercidas pelo genoma do CMV, é considerado como um “parasita viral”. Os RNAs satélites podem agir modificando os sintomas causados pelo CMV, em alguns casos podem atenuar ou em outros agravar estes sintomas.

Existem diversos tipos de isolados de CMV que se diferem tanto nas propriedades biológicas como moleculares, as estirpes do CMV são divididas em três subgrupos: I A, I B e II. Essa divisão é feita baseando-se na sequência da região 5' do RNA 3 do vírus. Segundo Roossinck (2001) as semelhanças nas sequências de nucleotídeos entre os diferentes subgrupos são de 92%-94% (IA/IB), 74%-78% (IA/II) e 73%-78% (IB/II). A alta diversidade genética das cepas de CMV explica suas diferentes propriedades biológicas. No geral as cepas do subgrupo I são mais virulentas que as do subgrupo II, as do subgrupo I causam sintomas mais severos como mosaico e nanismo já as do tipo II produzem sintomas mais brandos ou são assintomáticas.

Segundo Mochizuk e Ohki (2012) o desenvolvimento dos sintomas é determinado pela interação entre o vírus e a planta hospedeira, com relação ao

vírus fatores qualitativos e quantitativos de virulência estão envolvidos no desenvolvimento da doença. Os genes do CMV servem tanto para sua infectividade como também para sua patogenicidade, e todas as proteínas codificadas pelo genoma viral tem ação de virulência e participam ativamente na patogenicidade do vírus. No estudo de revisão feito por Mochizuki e Ohki (2012) o papel de virulência de cada proteína do CMV é estudado, incluindo os RNAs satélites.

Os sintomas produzidos pela infecção do CMV em tabaco são caracterizados pela produção de um mosaico com regiões amareladas e/ou verde claro que são locais onde tem uma maior concentração viral, e regiões verdes escuras que são locais onde tem uma menor concentração viral. (Loebenstein *et al.*, 1977). A utilização do CMV como vetor viral também produz este tipo de sintomatologia como foi demonstrado no trabalho de Matsuo *et al.*, (2007) (Figura 18).



Figura 18 – Sintomas em forma de mosaico produzidos pelo vetor viral baseado no CMV em *Nicotiana benthamiana*. Fonte: Matsuo *et al.* (2007).

A movimentação do CMV célula a célula e sistemicamente depende tanto da proteína de movimento (3a) quanto da capa proteica (3b). A proteína de movimento cria túbulos para o movimento célula a célula, e para que este possa ocorrer deve haver interação daquela proteína com a capa proteica, esta interação ocorre na região C-terminal da proteína de movimento. Para o movimento célula a célula ocorre também a interação da proteína de movimento com a proteína 2a; e a proteína supressora 2b também tem papel

importante neste tipo de movimento. Com relação ao movimento sistêmico, todas as proteínas virais participam desta função, entretanto, as mais importantes são a 2b, a 3a e 3b (Jacquemond, 2012).

1.2 – Vetores virais baseados no CMV

A expressão transiente de proteínas heterólogas utilizando vetores virais em detrimento a utilização de plantas transgênicas é vantajosa, pois a expressão ocorre de forma rápida, com alto rendimento e em número ilimitado e variado de plantas. Atualmente muitos pesquisadores tem se voltado para o desenvolvimento de vetores virais com o objetivo de produzir proteínas de uso farmacêutico que possam ser comercializadas e para desenvolvimento de vacinas. Outra aplicação destes vetores é o estudo da interação do vírus com a célula hospedeira compreendendo todos os aspectos da infecção viral, desde a replicação até fenômenos de silenciamento (Zhao *et al.*,2000).

A utilização do CMV como vetor viral para expressão de proteínas heterólogas, ou como ferramenta biotecnológica para estudos em biologia molecular é vantajosa, pois desde que houve seu primeiro estudo molecular detalhado em 1991 (Edwardson e Christie, 1991), outros trabalhos foram feitos no intuito de elucidar suas características. Atualmente, Jacquemond (2012) aponta em seu estudo vinte e três características importantes que já foram estudadas sobre o CMV, desde a classificação taxonômica e do papel de cada gene até estrutura tri dimensional do vírus.

As primeiras tentativas de se criar um vetor viral baseado no CMV surgiram com os avanços da tecnologia do DNA recombinante, que instigou alguns grupos a sintetizarem *in vitro* os RNAs virais do CMV e criar clones do genoma completo deste vírus (Rizzo e Palukaitis, 1990; Hayers e Buck, 1990). A princípio o intuito era gerar RNAs virais mutantes que pudessem ser usados para elucidar o papel do genoma viral relacionado à replicação do vírus e ao papel das proteínas virais.

No estudo de Hayers e Buck (1990), o cDNA dos três RNAs do CMV foram amplificados por PCR, os *primers* continham sítios de clonagem e promotor T7 para transcrição *in vitro*. Após amplificação, os insertos foram clonados no vetor pEMBL9(+) e após transcrição foram inoculados em *Nicotiana tabacum*. O objetivo do trabalho era mostrar a facilidade de se obter

cDNA completo utilizando PCR e a praticidade de se produzir transcritos infecciosos *in vitro*. Os resultados do trabalho demonstraram que o vetor viral produzido com a metodologia supracitada produziu sintomas na planta semelhantes à linhagem do vírus selvagem.

Estudo semelhante foi realizado por Suzuki *et al.* (1991), que construíram vetores contendo o cDNA completo do RNA 1, 2 e 3 do CMV-Y (Takanami,1981). Foi realizada transcrição *in vitro* utilizando bacteriófago T7 RNA polimerase, e o objetivo do trabalho foi avaliar os efeitos de nucleotídeos extras na região 5' na atividade biológica dos transcritos, os autores também avaliaram o efeito de mutações no RNA3, com deleções na região da proteína 3a e na capa proteica e analisaram os efeitos funcionais. Eles concluíram que modificações na região 5' do RNA 1 e 2 diminuiu a infectividade específica do vírus, porém não alterou o papel do RNA 3. Os testes com as mutações no RNA3 sugerem que as proteínas 3a e capa proteica estão envolvidas no transporte do vírus e que a montagem da partícula viral está associada com movimento a longa distância do CMV.

A partir da capacidade de amplificar e clonar os cDNAs do CMV e com eles produzirem clones infecciosos, estudos começaram a se voltar para a utilização deste vetor para expressão de proteínas.

Atualmente o CMV é utilizado como vetor viral tanto para expressão de proteínas mais complexas como para expressão de epítopos na capa proteica. Uma das primeiras tentativas de expressão de proteínas heterólogas utilizando CMV foi no trabalho realizado por Zhao *et al.* (2000), neste estudo os autores desenvolveram um vetor modificando o RNA 3 do vírus, dividindo-o em duas subunidades: RNA3A e RNA3B. Na subunidade RNA3A eles fusionaram GFP ao gene da capa proteica, e na subunidade RNA3B foram colocados sítios de clonagem próximos a proteína de movimento do vírus. Foram clonados os genes repórter de β glucoronidase bacteriana (GUS) e gene modificado da capa proteica de *Bean yellow mosaic virus* (BYMV-CP). Os resultados do trabalho demonstraram que houve a expressão dos genes supracitados, inclusive GFP, principalmente no local onde os transcritos foram inoculados. Em locais distantes houve pouca expressão, os autores atribuem este resultado ao fato de ter ocorrido recombinação entre as subunidades e

concluem que este vetor não é bom para expressão de proteínas, porém pode ser utilizado para estudar a interação do vírus com o hospedeiro.

Sudarshana *et al.* (2006) desenvolveram vetor viral baseado no CMV que denominaram de *CMViva*. Este vetor tem como princípio a expressão de proteínas heterólogas com o promotor regulado por indução química. Foi utilizado sistema via *Agrobacterium tumefaciens* contendo os cDNAs do genoma tripartido do vírus em um único vetor binário, fato que é inovador no caso do CMV já que trabalhos anteriores utilizaram transcrição *in vitro*. O trabalho modificou o RNA 3 para expressar a proteína α_1 antitripsina (rAAT), e utilizou coinfiltração da proteína supressora p19. Foi encontrada uma maior expressão de rAAT funcional quando era coexpressa com a proteína supressora p19. Os autores relataram que mesmo sendo o *CMViva* construído para expressar a proteína 2b supressora do CMV a coexpressão da p19 aumentou substancialmente a expressão de rAAT.

No trabalho de Matsuo *et al.* (2007) o objetivo foi expressar a proteína humana do fator de crescimento ácido de fibroblastos (aFGF) utilizando um vetor de CMV que pudesse ser utilizado em espécies diferentes de plantas (*Arabidopsis*, *N. benthamiana* e soja). Para este propósito, foram utilizadas duas estirpes diferentes de CMV (CMV-Y e CMV-Sj), o vetor foi construído utilizando o RNA 2 de CMV-Y e o RNA 1 e 3 da recombinação das duas cepas. O RNA 2 foi modificado para conter os sítios de clonagem (a modificação ocorreu substituindo a proteína 2b pelo gene de aFGF), e foi utilizado transcrição *in vitro*. Eles observaram que a quantidade de proteína expressa variou de acordo com o tipo de planta utilizada (*N. benthamiana* foi a que produziu com maior rendimento seguido da *Arabidopsis* e soja), e que os sintomas gerados pela infecção viral foram brandos. A proteína aFGF foi biologicamente ativa e produzida com alto rendimento.

Fujiki *et al.* (2008) produziram um vetor baseado no CMV que pudesse utilizar o forte promotor subgenômico da capa proteica para expressar as proteínas heterólogas sem perder a função de movimento do vírus. Para este propósito os autores modificaram a região C-terminal da proteína 3a para que ela pudesse gerar a movimentação do vírus independente da capa proteica. Foram testadas três construções: os cDNAs dos três componentes do genoma do CMV foram clonados em vetores binários distintos (tripartido), o cDNA 1 e 2

em um mesmo vetor binário (bipartido), e os três cDNAs todos em um único vetor (monopartido). Foram expressas as proteínas GFP e fator de crescimento humano. Houve movimento célula a célula, porém não houve movimento sistêmico. Os resultados demonstraram que os vetores bipartido e monopartido expressaram proteína mais rapidamente (2 dpi) em comparação com o tripartido (3 dpi) e que o nível de expressão de GFP observado nestes dias foi maior nos vetores bipartido e monopartido (não havendo diferença significativa entre os dois). Com estes resultados os autores concluíram que o sistema tripartido é menos eficiente em entregar as três unidades do cDNA para uma mesma célula. Em contrapartida, também foi observado que os três sistemas produziram um acúmulo de GFP semelhante após 5 dpi, fato atribuído ao movimento célula a célula.

Fukuzawa *et al.* (2011) desenvolveram um vetor baseado no CMV que não tivesse a capacidade de infectar sistemicamente a planta, no intuito de diminuir o risco do mesmo em se espalhar no meio ambiente caso seja usado em lavouras. Para este propósito, a proteína de movimento do vírus (3a) foi truncada e o RNA 2 foi utilizado para expressão das proteínas recombinantes: receptor de interleucina 1 e cadeia variável do anticorpo anti dioxina. O sistema utilizado foi transcrição *in vitro*, e o vetor foi construído tendo como base dois genogrupos do vírus (genogrupos I e II). Os autores concluíram que o sistema utilizando vetor viral baseado no CMV foi capaz de produzir as proteínas recombinantes em tabaco não havendo recombinação entre os dois genogrupos utilizados muito menos escape do vetor para o meio ambiente e que, portanto, é um sistema seguro para expressão de proteínas.

No trabalho de Hwang *et al.* (2012) foi utilizado vetor baseado no CMV para expressão de GFP e da proteína 1,4 β glucanase (E1) do *Acidothermus cellulolyticus*. Os autores utilizaram vetor tripartido do CMV (via *A. tumefaciens*), com modificação do RNA3 (capa proteica) para conter os sítios de clonagem (denominado *CMVar*) já que a expressão ocorria por replicação viral. A expressão utilizando o *CMVar* foi comparada com o vetor bipartido *CMVin* (contendo o RNA1 e 2 em um único vetor binário e o RNA3 isolado, cuja expressão era induzida quimicamente). Os autores também geraram alterações no RNA subgenômico da capa proteica. Os resultados do trabalho indicaram que os dois vetores *CMVin* e *CMVar* foram capazes de expressar tanto GFP

quanto E1, sem diferença significativa. O *CMV* apresentou expressão somente no local da infiltração, portanto, houve somente movimento célula a célula, sem movimentação sistêmica. As modificações no RNA 4 subgenômico demonstraram expressões diferentes da capa proteica. Os autores concluíram que o vetor utilizando CMV via *A. tumefaciens* é uma alternativa rápida e barata para expressão de E1 em comparação com plantas transgênicas.

O uso do CMV como vetor viral, não se restringe somente a expressão de proteínas complexas, ele também é utilizado para apresentação de epítomos e como via de administração de fármacos.

No trabalho de Zeng *et al.* (2013) o CMV foi utilizado para expressão de ácido fólico na superfície da capa proteica além de carregar no interior do capsídeo o medicamento doxorrubicina (quimioterápico). Portanto o objetivo do trabalho foi criar um vetor viral do CMV como ferramenta bionanotecnológica, cuja função era servir como via de administração de fármaco para tratamento do câncer, no intuito de reduzir os efeitos colaterais que este medicamento produz via endovenosa. A utilização do ácido fólico na superfície do vetor faz com que o fármaco seja direcionado somente para as células tumorais. Os testes foram realizados tanto *in vitro* como *in vivo* (camundongos). Os resultados *in vitro* demonstraram que os receptores celulares das células tumorais de ovário, útero e mesotélio conseguiram identificar o ácido fólico da superfície do vetor e o medicamento foi entregue para as células específicas. *In vivo*, o uso do vetor apresentou baixa toxicidade aos camundongos (diminuição dos efeitos colaterais) e conseguiu agir como quimioterápico no local das lesões cancerígenas. Portanto, os autores concluíram que o CMV tem potencial de uso para administração de quimioterápicos para o câncer de ovário.

O uso do CMV como vetor de apresentação de epítomos para confecção de vacinas foi estudado por vários autores (Natilla *et al.*, 2004; Natilla *et al.*, 2006; Nuzzaci *et al.*, 2007; Nuzzaci *et al.*, 2010; Vitti *et al.*, 2010; Gellért *et al.*, 2012). Nos trabalhos de Natilla *et al.* (2004) e Nuzzaci *et al.* (2007), a capa proteica do CMV foi utilizada para expressão dos epítomos do vírus da hepatite C (HCV), sendo que nos dois trabalhos as partículas de CMV expressando HCV foram testadas com soro de pacientes com hepatite C que demonstraram

alta afinidade dos anticorpos anti-HCV, sugerindo a possível utilização do CMV como vacina oral contra HCV.

No trabalho de Nuzzaci *et al.* (2010), testes *in vitro* e *in vivo* foram realizados para analisar a viabilidade da utilização do vetor viral de CMV como vacina oral para HCV. O vetor expressando epítopos de HCV foi testado *in vitro* quanto a sua viabilidade mediante ação das enzimas do sistema digestório, e os resultados apresentaram boa resistência. E *in vivo* foi testada a capacidade de produzir reação do sistema imunológico, sendo que os resultados foram positivos (teste em camundongos). Os autores concluíram que o vetor de CMV é um promissor candidato à vacina oral para hepatite C.

No trabalho de Nattila *et al.* (2006), os esforços de produção de um vetor de CMV para expressão de epítopos utilizou uma técnica diferente, com a participação do vetor viral de PVX, para a expressão da capa proteica do CMV contendo epítopos de *Newcastle disease virus* (NDV) em sua superfície. Os resultados demonstraram a viabilidade do sistema PVX/CMVCP na expressão e montagem de VLP de CMV, sendo que esta VLP expressava os epítopos de NDV.

Vitti *et al.* (2010) utilizaram o vetor de CMV para expressão na capa proteica de proteínas relacionadas com a doença de Alzheimer (proteína β amiloide) com o intuito de ser utilizado como sistema de vacina contra esta patologia. Após produção das partículas virais na planta foram feitas análises por *Western blot* e de imunomarcagem em eletromicroscopia eletrônica para avaliar a expressão da proteína. Os resultados mostraram que o vetor consegue expressar a proteína reagindo com anticorpos específicos e que é um promissor veículo vacinal para o Alzheimer, porém futuros testes devem ser realizados para que o mesmo possa ser utilizado.

Gellért *et al.* (2012) utilizaram o vetor de CMV para apresentação de epítopos para confecção de vacina na área veterinária. Os epítopos expressos foram do *Porcine circovirus* tipo 2 (PCV2), e os testes foram feitos tanto em camundongos como em porcos. Os resultados demonstraram que houve resposta do sistema imunológico dos porcos contra PCV2, concluindo que o vetor de CMV como veículo vacinal tem um promissor futuro na veterinária.

Com esta análise da literatura, conclui-se que o CMV é um vetor viral bastante versátil na área biotecnológica, mostrando-se como ferramenta útil

para produção de proteínas recombinantes e que, portanto deve ser explorado para produção de proteínas importantes na área de saúde com objetivo de reduzir custos.

1.3- Principais aspectos da Dengue

1.3.1- Conceito e características do agente etiológico da dengue

A dengue é uma doença aguda infecciosa cuja etiologia é um vírus, e é caracterizada por febre, dor de cabeça, dor em várias partes do corpo, prostração, erupções, linfadenopatia e leucopenia. Clinicamente ela pode se manifestar de forma assintomática, como uma doença febril ou como doença hemorrágica podendo levar até um choque hipovolêmico (Henchal e Putnak, 1990).

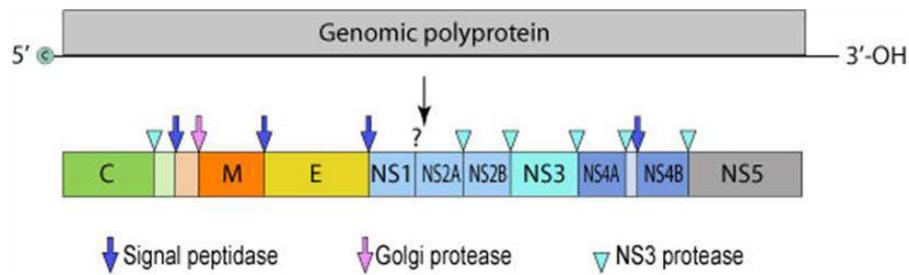
O agente etiológico é denominado de vírus da dengue (nome científico *Dengue virus*) e pertence à família *Flaviviridae*, do gênero *Flavivirus*. O vírus da dengue é um arbovírus (*Arthropod-borne viruses*), pois sua transmissão ocorre através da picada de um vetor artrópode. Entre as arboviroses que afetam o homem, treze são causadas por vírus da família *Flaviviridae*, gênero *Flavivirus*, porém os mais importantes são: o vírus da febre amarela, que possui um sorotipo e o vírus da dengue que possui quatro sorotipos descritos (Romanos, 2002). Os quatro sorotipos do vírus da dengue (DENV 1- 4) são classificados de acordo com critérios biológicos e imunológicos (Malavige *et al.*, 2004)

Os artrópodes que funcionam como vetores do vírus da dengue são do gênero *Aedes*, sendo o principal, o mosquito da espécie *Aedes aegypti*. A fêmea ao se alimentar em seres humanos que estão em período de viremia adquirem o vírus, que passa pelo trato gastrointestinal do mosquito. Após um período de incubação extrínseca, um processo que dura em torno de dez dias e é mais rápido em ambientes com altas temperaturas, o vírus passa para as glândulas salivares. Se o mosquito picar outra pessoa após os dez dias do período de incubação extrínseca, irá ocorrer a infecção (Guzman *et al.*, 2010)

O vírus da dengue é um vírus envelopado cujo genoma é de RNA fita simples senso positivo com aproximadamente 11 Kb, que codifica três proteínas estruturais e sete proteínas não estruturais (Figura 19 A). As três proteínas estruturais do vírion maduro são: proteína C (*core* ou cerne), proteína

associada à membrana (M) e a proteína do envelope (E), o vírus imaturo possui a proteína prM (pré proteína M) que é precursora da proteína M. As proteínas não estruturais são: NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5. O genoma é composto por uma única ORF que codifica uma poliproteína que será clivada por proteases do próprio vírus e do hospedeiro (Noisakran e Perng, 2008; Zhang *et al.*, 2003; Guzman *et al.*, 2010). O capsídeo possui formato icosaédrico com aproximadamente 30 nm de diâmetro, coberto por um envelope lipídico de aproximadamente 10 nm de profundidade. O vírion, portanto, possui cerca de 50 nm de diâmetro com assimetria icosaédrica (Figura 19 b) (Henchal e Putnak, 1990). A região 5' UTR do genoma é composta por cerca de 100 nucleotídeos e possui *cap*, a região 3' UTR do genoma é um pouco maior (cerca de 450 nucleotídeos), não possui cauda de poli A, mas contem um número conservado de estruturas de RNA que formam um *stem – loop* (Alvarez *et al.*, 2005).

A



B

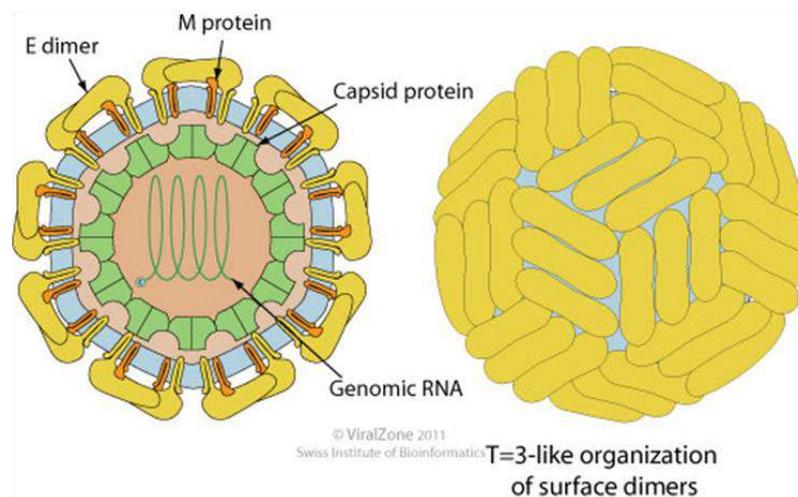


Figura 19- Estrutura do genoma e do vírion da dengue. a) estrutura do genoma: uma única ORF codifica uma poliproteína que é clivada por proteases virais e do hospedeiro gerando as proteínas estruturais e não estruturais, a região 5' contém *cap* e a região 3' não possui cauda de poli A. b) estrutura do vírion maduro da dengue com aproximadamente 50 nm de diâmetro com formato icosaédrico.

Fonte: Viral Zone (http://viralzone.expasy.org/viralzone/all_by_species/24.html)

Os genes que codificam as proteínas estruturais se encontram, portanto, na região 5' do genoma. A proteína C (capsídeo) é a primeira a ser traduzida e possui peso molecular de 13,5 kDa, sua região N-terminal é hidrofóbica, pois é nela que ocorrerá a interação com a prM que dará origem a proteína da membrana. A prM (proteína precursora de M) é uma proteína glicosilada de 22 kDa e que durante a maturação viral sofre ação de proteases dentro do complexo de golgi, resultando na formação da proteína da membrana (M) que possui peso molecular de 8 kDa. A formação da proteína M a partir de prM é um evento terminal e crucial na morfogênese do vírion, pois resulta no aumento da infectividade viral (Henchal e Putnak, 1990). A proteína M atua como uma

parte do nucleocapsídeo e associa-se a proteína do envelope (proteína E) para formar os vírions maduros (Kuhn *et al.*, 2002; Idrees e Ashfaq, 2012).

A proteína E é a glicoproteína do envelope viral (51 kDa), e é a última proteína estrutural a ser traduzida. Na forma madura a proteína apresenta-se como um homotrímero e na forma intracelular imatura como um heterodímero (Henchal e Putnak, 1990). A estrutura atômica da proteína E do *Tick-borne encefalitis virus*, mesmo gênero do dengue vírus, mostrou a presença de três domínios (Rey *et al.*, 1995). A análise por crio microscopia da proteína E do vírus da dengue (Figura 20) ratificou que cada monômero é composto por três domínios (Kuhn *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2003).

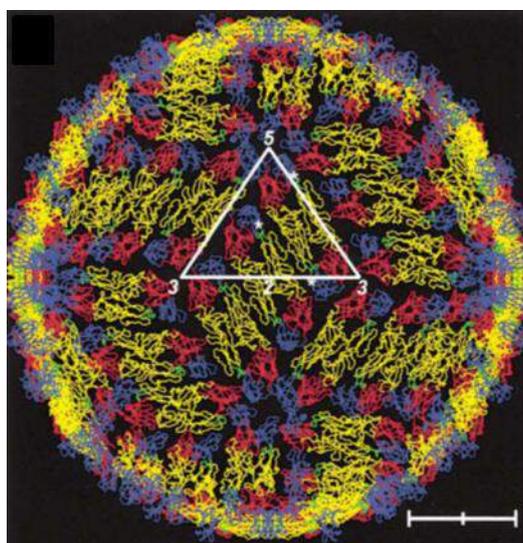


Figura 20- Crio microscopia do vírus da dengue mostrando os monômeros do envelope com seus respectivos domínios: domínio I (vermelho), domínio II (amarelo), domínio III (azul). Os peptídeos de fusão do envelope com a membrana estão de verde. A escala representa 100 Å. Fonte: Kuhn *et al.*, 2003.

De todas as proteínas não estruturais (NS1-NS5), a proteína NS1 pode ser secretada como um hexamero solúvel, que circula no sangue de pacientes com dengue desde o primeiro até o nono dia de infecção. Quando localizada dentro da célula, a NS1 tem um papel importante na replicação viral, porém a NS1 que é secretada está associada com diferentes vias de ativação do sistema complemento, e esta função está associada com reações de anafilaxia tanto local quanto sistêmica, de ataque à membrana celular vascular podendo levar a forma mais agressiva da doença que é a dengue hemorrágica e ao choque (Chuang *et al.*, 2013).

1.3.2- Diagnóstico laboratorial da dengue

Segundo Guzman *et al.* (2010) as técnicas laboratoriais para o diagnóstico da dengue se baseiam em:

- 1- isolamento viral;
- 2- testes sorológicos como o ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*), que possui as variações: MAC-ELISA e IgG ELISA. Existem também os testes sorológicos de IgG:IgM *ratio*, e testes de neutralização;
- 3- testes moleculares de amplificação do ácido nucleico: transcrição reversa e reação em cadeia de polimerase (RT-PCR), RT-PCR em tempo real (RT-qPCR);
- 4- testes de identificação do antígeno NS1 e de anticorpos anti-NS1 em tecidos do fígado, linfonodos e baço, por meio de imunohistoquímica.

Dentre os vários métodos diagnósticos da dengue, o isolamento viral é o que produz o resultado mais específico, porém não é o método mais acessível e sensível. Dentre os outros métodos tem-se a detecção do genoma viral ou de antígenos virais, porém os mesmos somente indicam evidências de uma infecção, além de serem testes onerosos para serem usados como exames de rotina. A detecção por meio da soroconversão de IgG e IgM são consideradas como padrão para confirmação sorológica da infecção pela dengue. Altos níveis de IgG e a presença de IgM no soro de um paciente com suspeita de dengue na fase aguda, sugere a presença de infecção pelo vírus (Guzman *et al.*, 2010; Malavige *et al.*, 2004).

Portanto, os testes sorológicos são os mais viáveis e utilizados para a detecção rápida da infecção viral. No Brasil, o método diagnóstico mais adotado para a dengue é o teste sorológico de ELISA, amplamente utilizado pela vigilância epidemiológica, por ser bastante sensível e de fácil manuseio (Gomes, 2011).

Existem numerosos kits com múltiplos formatos para utilização nos testes sorológicos. A maioria deles utiliza o vírus atenuado que é produzido em cultura celular ou em cérebro de camundongos, porém o uso destes sistemas oferece risco biológico e possuem alto custo. Alguns podem ser produzidos utilizando expressão recombinante do vírus em células de inseto e bactéria, porém são sistemas que geram kits onerosos que se tornam inviáveis de serem

aplicados em países em desenvolvimento. Além destas características, os kits que utilizam vírus atenuado promovem reação cruzada com outros *Flavivirus* como vírus da encefalite japonesa e vírus da febre amarela, resultando em falsos positivos. O soro de pacientes com febre tifoide, malária e leptospirose já mostraram positividade utilizando estes kits (AnandaRao *et al.*, 2005).

Segundo AnandaRao *et al.* (2006) uma maneira de amenizar a reatividade cruzada quando se utiliza a partícula viral inteira, é por meio de antígenos específicos, mais precisamente por meio da expressão de epitopos cuidadosamente escolhidos para esta função. Segundo os autores, as proteínas virais que possuem potencial de mapeamento de epitopos são as proteínas NS1 e a proteína do envelope (E) do vírus. Estas proteínas possuem características que as tornam adequadas para rastreamento de epitopos com objetivo de gerar uma proteína multiepitopo para utilização em kits de diagnóstico.

Alguns estudos produziram e mapearam epitopos recombinantes do vírus da dengue para finalidade diagnóstica (Goncalvez *et al.*, 2004; AnandaRao *et al.*, 2005; AnandaRao *et al.*, 2007; Lisova *et al.*, 2007; Gromowski *et al.*, 2008, Maldaner *et al.*, 2013). Nos trabalhos de AnandaRao *et al.* (2005) e AnandaRao *et al.* (2006), foi produzida a proteína recombinante multiepitopo da dengue, cujos epitopos utilizados foram mapeados das proteínas E, NS1 e NS3 do vírus. O sistema de expressão utilizado foi via bactéria e o objetivo era utilizar esta proteína multiepitopo para detecção respectivamente de IgG e de IgM.

Maldaner *et al.* (2013) expressaram a proteína tetra epitopo do vírus da dengue, cujos epitopos utilizados foram mapeados dos domínios I e II da proteína do envelope (E) dos quatro sorotipos virais. O sistema de expressão utilizado foi planta transplastômica, e os resultados demonstraram que as proteínas expressas utilizando este sistema são viáveis em termos de sensibilidade e especificidade para a confecção de kits de diagnóstico para a dengue.

O diagnóstico laboratorial da dengue é extremamente importante para o diagnóstico definitivo da doença, e deve ser feito o mais precoce possível para que se possa realizar o tratamento adequado, proporcionando assim prognóstico favorável ao paciente. O teste laboratorial deve ter uma boa

relação de custo-benefício, ser de fácil manipulação e deve ter alta sensibilidade e especificidade.

Os testes sorológicos que utilizam proteínas multiepítopos da dengue são os que atendem melhor a estes parâmetros. Se o objetivo maior é a redução de custos, a escolha do sistema de expressão é um fator que deve ser observado, e de todos os sistemas disponíveis o que utiliza planta é o que mais atende a esta característica. Neste contexto, o sistema de expressão utilizando vetor viral em planta é uma opção inovadora e de baixo custo na produção de proteínas recombinantes multiepítopo da dengue.

Apesar dos epítopos contidos no domínio III serem considerados os mais imunogênicos da proteína do envelope (E), eles ainda não foram expressos utilizando sistema de planta, portanto, a expressão de epítopos do domínio III da proteína E dos quatro sorotipos da dengue, via vetor viral baseado no CMV, é uma promissora ferramenta biotecnológica para a confecção de kits de diagnóstico de baixo custo.

2- Objetivo geral

Modificar o vetor viral tripartido baseado no *Cucumber mosaic virus* (CMV) para expressão de antígeno multi epitopo do vírus da dengue.

O intuito da pesquisa é construir um sistema de expressão de proteínas que seja confiável e tenha baixo custo e que, portanto, possa ser utilizado como sistema de produção de antígenos recombinantes viáveis para a confecção de kits diagnósticos. Nesta pesquisa foram escolhidos os antígenos do vírus da dengue devido a sua importância clínica e epidemiológica no Brasil.

3- Objetivos específicos

- ✓ Modificar o vetor viral tripartido baseado no CMV para que possa ser utilizado no sistema via *A. tumefaciens*
- ✓ Testar a infectividade do vetor baseado no CMV em *N.benthamiana*
- ✓ Clonar mGFP no vetor de CMV para testar sua viabilidade
- ✓ Desenhar e sintetizar a proteína multiepitopo da dengue baseando-se nos epitopos mapeados do domínio III da proteína E dos quatro sorotipos virais, e com otimização de códon para *N.benthamiana*
- ✓ Expressar a proteína multiepitopo da dengue utilizando vetor baseado no CMV e avaliação de sua expressão pelo ensaio de *Western blotting*;

4.2- Desenvolvimento do vetor de expressão baseado no CMV – modificação do cDNA2 do vírus

O cDNA 2 do CMV cedido do Japão, denominado de CMV2-A1 foi modificado por PCR utilizando *primers* específicos contendo sítios de restrição para permitir a clonagem dos genes de estudo. A reação de PCR foi realizada utilizando a enzima termoestável LongAmp™ Taq DNA Polymerase (NEB) seguindo o protocolo estabelecido pelo fabricante. Os *primers* utilizados nesta reação foram CMV2 A1 For: 5'- CCC GAG CCT GAG GCC TGG CGC GCC TGA CTA GTT -3' e CMV2 A1 Rev: 5'- TGA CTA GTTT AAT TAA ACC TCC CCT TCC GCA TCT C -3'. As regiões que estão de verde representam os sítios das enzimas *StuI* (For) e *SpeI* (Rev) e as regiões que estão de vermelho representam os sítios das enzimas *AsclI* (For) e *PacI* (Rev). O esquema da Figura 22 demonstra como foi realizada a amplificação.

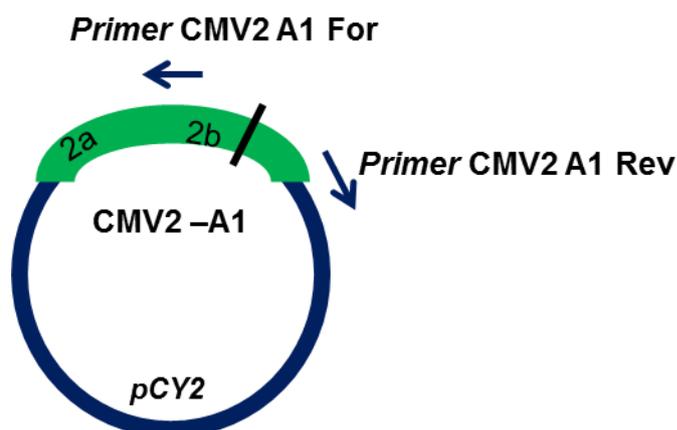


Figura 22- Esquema demonstrando como foi realizada a reação de PCR para modificação do CMV2-A1. O vetor pCY2 contendo o cDNA2 do CMV, construído no trabalho de Otagawa *et al.*(2008) foi utilizado como *template*. O traço preto na região da proteína 2b é a região de stop códon da proteína, a partir de onde ocorreu o anelamento dos *primers* CMV2 A1 FOR e CMV2 A1 REV, amplificando toda a construção com os sítios de clonagem para *StuI*-*AsclI*- stop- *SpeI*-*PacI*.

Após amplificação o cDNA2 modificado foi purificado utilizando o Kit Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification (GE Healthcare), logo após, este fragmento foi digerido com a enzima *SpeI* (NEB) e novamente purificado com o mesmo Kit supracitado. Após a purificação, *E. coli*, cepa DH5- α , foram transformadas por eletroporação utilizando o equipamento Gene Pulser II (BioRad). Uma vez selecionados os clones em meio LB (Sambrook *et al.*, 1989) com ampicilina (100 μ g/ml), foi realizada a extração dos plasmídeos com kit de purificação “PureLink™ Quick Plasmid Miniprep” (Invitrogen), conforme

protocolo do fabricante, e a amostra enviada para sequenciamento para confirmação da presença dos sítios de restrição. O sequenciamento foi realizado pela empresa Macrogen (Seoul, Coréia do Sul). Os demais sequenciamentos deste capítulo foram realizados pela mesma empresa. A análise do sequenciamento confirmou a inserção dos sítios de clonagem PacI e Ascl no cDNA2, gerando o cDNA2 modificado (Figura 23).

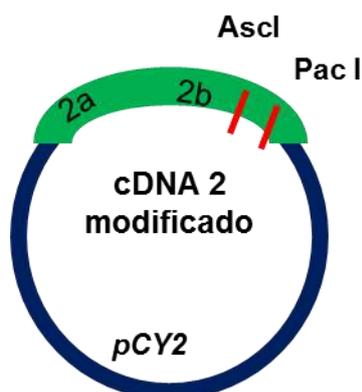


Figura 23- Esquema demonstrando o cDNA2 modificado no vetor pCY2 após a amplificação por PCR, estão representados os sítios Ascl e PacI que serão utilizados para clonagem dos genes exógenos.

Com o cDNA2 modificado pronto, a próxima etapa para criação do vetor de expressão baseado no CMV é clonar a região modificada do cDNA2 (região 2b com os sítios Ascl e PacI) no vetor binário pBI121 contendo o cDNA2 original. O esquema demonstrando como foi realizada esta clonagem está na Figura 31 B dos resultados.

Para o procedimento de clonagem da região modificada do cDNA2 no vetor binário pBI121, foi realizada a digestão com a enzima EcoRI (NEB) tanto do inserto quanto do vetor. Após digestão, o inserto foi eluído a partir de gel de agarose 1% utilizando kit Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification (GE Healthcare).

Antes da purificação, o vetor foi desfosforilado com a enzima CIP (NEB), seguindo protocolo estabelecido pelo fabricante. A eluição foi realizada utilizando o kit QIAEX II (Gel Extration Kit Qiagen).

Uma vez purificados, foi realizada a clonagem da região modificada do cDNA2 no vetor pBI121 no sítio de clonagem para EcoRI (NEB), o clone obtido desta construção foi transformado inicialmente em células competentes de *E.coli* para eletroporação (cepa DH5- α) utilizando o equipamento Gene Pulser

II (BioRad). Uma vez selecionados os clones em meio LB (Sambrook *et al*, 1989) com canamicina (100µg/ml), foi realizada a extração dos plasmídeos com kit de purificação “PureLink™ Quick Plasmid Miniprep” (Invitrogen), conforme protocolo do fabricante, e a amostra enviada para sequenciamento para confirmação da presença do inserto.

A análise por sequenciamento demonstrou que o inserto estava na orientação contrária. Portanto, os sítios de clonagem foram modificados para EcoRI e NotI. Com esta nova estratégia ocorreu uma perda de aproximadamente 7 kb do vetor (Figura 21).

Feita a modificação, inserto e vetor foram digeridos com as enzimas EcoRI (NEB) e NotI HF (NEB), sendo então purificados a partir de gel de agarose 1% utilizando respectivamente os kits Illustra GFX PCR DNA (GE Healthcare) e QIAEX II (Gel Extration Kit 150) da Qiagen, seguindo os respectivos protocolos estabelecidos pelo fabricante.

Após purificação foi realizada a clonagem, e o clone obtido da região modificada do cDNA2 em pBI121 foi transformado em células de *E.coli* competentes para eletroporação (cepa STBL-4) utilizando o equipamento Gene Pulser II (BioRad). Uma vez selecionados os clones em meio LB (Sambrook *et al*, 1989) com canamicina (100µg/ml), foi realizada a extração dos plasmídeos com kit de purificação “PureLink™ Quick Plasmid Miniprep” (Invitrogen), conforme protocolo do fabricante, e a amostra enviada para sequenciamento para confirmação da presença do inserto. Para melhor entendimento observar a Figura 31 B dos resultados.

Após confirmação por sequenciamento, o clone de cDNA2 modificado em pBI121 foi transformado em *A. tumefaciens* (cepa GV3101). Após transformação os clones foram confirmados utilizando PCR de colônia.

4.3- Agroinfiltração do vetor tripartido baseado no CMV

No intuito de testar se os clones originais do genoma tripartido do CMV oriundos do Japão (cDNA 1, 2 e 3 em pBI121) iriam gerar infectividade em *N. benthamiana*, as três construções originais foram transformadas em *A. tumefaciens* GV3101, e foi realizada a coinfiltração das mesmas em duas plantas de *N. benthamiana* de aproximadamente seis semanas de vida (Figura 24).

Para agroinfiltração foi realizado o seguinte protocolo: 600 µl de meio LB3 contendo os clones do cDNA1 original, cDNA2 original e cDNA3 original em *A. tumefaciens*, foram colocados separadamente em 3 ml de suspensão líquida contendo 50 µM de acetosyringone e 10 mM de MES (pH 5.5) crescidas *overnight*.

As suspensões foram submetidas a uma centrifugação de 1200 x g por 10 minutos. Os pellets foram ressuspensos com 2 ml de solução do meio *Murashige-Skoog* (Sigma-Aldrich) contendo 10 mM MES (pH 5.5) e 150 µM de acetosyringone) com OD 600= 2.0 (concentração final). Foi realizada a coinfiltração utilizando as três construções distintas na proporção de 1:1:1.

Folhas de *N. benthamiana* com aproximadamente seis semanas de vida foram agroinfiltradas mecanicamente no lado abaxial, utilizando-se uma seringa sem agulha.

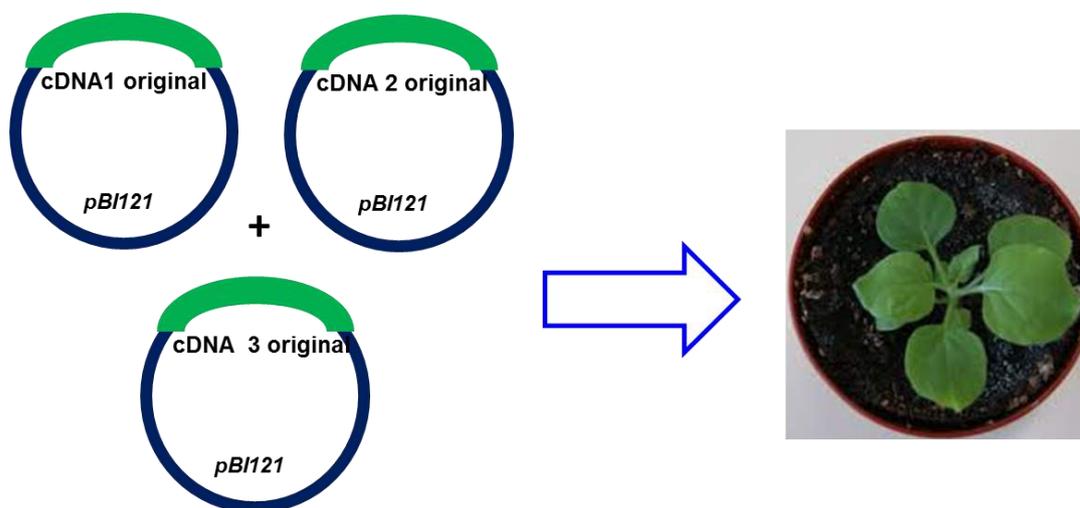


Figura 24- Esquema demonstrando os três clones contendo o cDNA original tripartido do CMV no vetor pBI121. As três construções em *A. tumefaciens* GV3101 foram coinfiltradas em *N. benthamiana* para testar a infectividade do vetor CMV original.

No intuito de testar se o vetor de expressão baseado no CMV contendo o cDNA2 modificado também produziria sintomas característicos deste vírus em *N. benthamiana*, o mesmo protocolo descrito acima foi realizado, só que ao invés de utilizar o cDNA2 original, foram testados dois clones diferentes do cDNA2 modificado transformados em *A. tumefaciens* GV3101 (clones 1 e 14) (Figura 25).

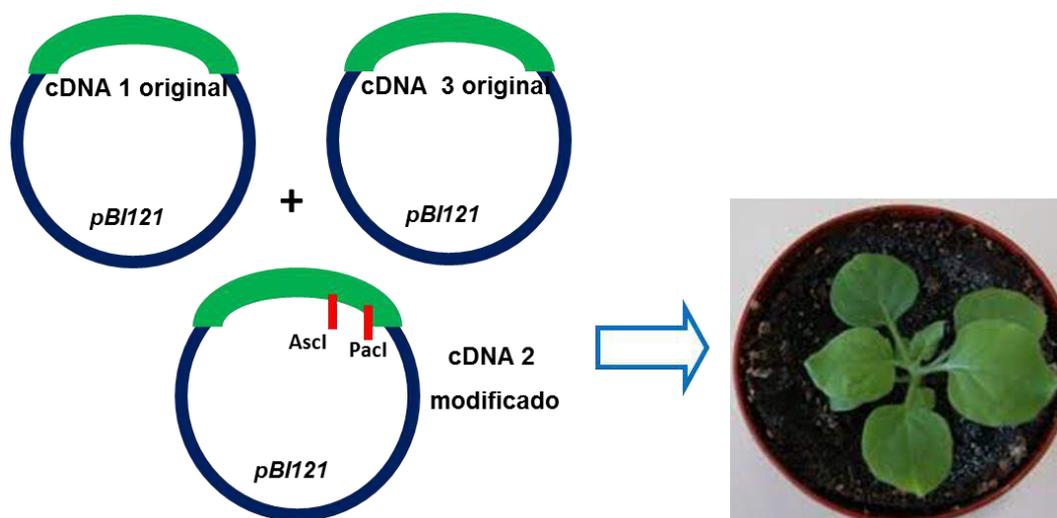


Figura 25- Esquema demonstrando os três clones contendo o cDNA 1 e 3 originais e o cDNA2 modificado (com sítios de PacI e Ascl) do CMV no vetor pBI121. As três construções em *A. tumefaciens* GV3101 foram coinfiltradas em *N. benthamiana* para testar a infectividade do vetor de expressão baseado no CMV (cDNA2 modificado).

Os ensaios para o vetor CMV original e para o vetor CMV modificado foram realizados de maneira concomitante, portanto, as plantas que foram agroinfiltradas com as duas construções foram submetidas às mesmas condições. Foram agroinfiltradas um total de 4 plantas:

- 1- agroinfiltrada com vetor original de CMV
- 2- agroinfiltrada com vetor original de CMV
- 3- agroinfiltrada com vetor modificado de CMV – clone 1
- 4- agroinfiltrada com vetor modificado de CMV - clone 14

Quatro dias após infiltração (4 dpi) as plantas agroinfiltradas com o vetor original e com o vetor modificado foram analisadas quanto a presença dos sintomas característicos de infecção pelo CMV. Para análise da presença do vírus, foi realizado ensaio de Dot-ELISA utilizando anticorpo contra a capa proteica do vírus (anti-CMV) produzido em coelho (gentilmente cedido pela Dr^a Alice K. Inoue Nagata – EMBRAPA HORTALIÇAS). Como controle positivo foi utilizado folhas de *N. benthamiana* infectada com o vírus selvagem e como controle negativo folhas de *N. benthamiana* saudáveis.

Para o ensaio de Dot-ELISA foram recolhidos discos de aproximadamente 0,005 g de cada planta (agroinfiltradas e controles), que foram macerados com PBS 1X em duas concentrações diferentes: 40x (concentrado) e 80x (diluído). Foram aplicados 3 µl de cada amostra na

superfície da membrana de Nitrocelulose (Hybond-C membrane, GE Lifesciences), obedecendo o esquema da Figura 26.

40x (concentrado)	80x (diluído)
Amostra CMV original 1	Amostra CMV original 1
Amostra CMV original 2	Amostra CMV original 2
Amostra CMV modificado clone 1	Amostra CMV modificado clone 1
Amostra CMV modificado clone 14	Amostra CMV modificado clone 14

40x (concentrado)	80x (diluído)
Controle negativo	Controle negativo
Controle positivo	Controle positivo

Figura 26- Esquema demonstrando como foram aplicadas as amostras nas membranas de Nitrocelulose para análise com anticorpo anti-CMV. A membrana foi dividida como demonstrado no esquema e os controles foram colocados em uma membrana separada.

Após aplicação das amostras, as membranas foram armazenadas a 4° C overnight. Após secarem, foram bloqueadas em solução contendo PBS 1X e leite em pó desnatado 5% (tampão de bloqueio) por 40 minutos. Para detecção da capa proteica do CMV o anticorpo policlonal de coelho anti-CMV foi diluído na proporção de 1: 1000 (1µg/ml) em tampão de bloqueio e colocado sobre a membrana agindo sob agitação por quatro horas.

A membrana foi então lavada 3x por 3 minutos em PBS-Tween 0,1% (PBS1X e Tween 20 0,5%) e incubada por duas horas com anticorpo anti-coelho- IgG fosfatase alcalina conjugado (Sigma) na proporção de 1: 3000 (0,3 µg/ml) em tampão de bloqueio. A membrana foi novamente lavada com PBS-Tween 0,1%, e incubada com 66 µl de NBT 10 mg/ml (Nitro-BlueTetrazolium em dimetilformamida 70%) e 33 µl BCIP 10 mg/ml (5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato em dimetilformamida 70%) diluídos em 10 mL de tampão alcalino de revelação (pH 8,0), por 5-10 minutos, sob agitação.

4.4- Amplificação e clonagem do gene repórter (mGFP) – teste do vetor baseado no CMV quanto a capacidade de expressão

No intuito de testar a viabilidade do vetor CMV modificado em expressar proteínas, foi utilizado o gene repórter mGFP. Este gene foi amplificado por PCR, utilizando a enzima termoestável Vent DNA polimerase (NEB) seguindo protocolo preconizado pelo fabricante. Os *primers* utilizados para esta reação foram: mGFP For Ascl : 5' - TAG **AGG CGC GCC** CCA TGA GTA AAG GAG AAC TTT TC - 3' e mGFP Rev Pacl : 5' – TAG **CTT AAT TAA** TTA TTT GTA TAG TTC ATC CAT GCC A – 3'. As regiões marcadas de vermelho correspondem respectivamente aos sítios para Ascl e Pacl.

Após amplificação o fragmento de genes de mGFP foi fracionado por eletroforese em gel de agarose 1% purificado utilizando kit “Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification” (GE Healthcare) e clonado no cDNA 2 modificado, nos sítios de clonagem para Asc I e Pac I (Figura 25).

O clone obtido de mGFP no cDNA2 modificado foi transformado em células competentes de *E.coli* para eletroporação (cepa STBL-4) utilizando o equipamento Gene Pulser II (BioRad). Uma vez selecionados os clones em meio LB (Sambrook *et al*, 1989) com canamicina (100µg/ml), foi realizada a extração dos plasmídeos com kit de purificação “PureLink™ Quick Plasmid Miniprep” (Invitrogen), conforme protocolo do fabricante, e a amostra enviada para sequenciamento para confirmação da presença de mGFP.

Após confirmação por sequenciamento, um clone de cDNA2 contendo mGFP foi transformado em *A.tumefaciens* GV 3101, e a presença de plasmídeos nos clones gerados por esta transformação foram confirmados por PCR de colônia.

No intuito de testar a viabilidade do vetor tripartido baseado no CMV em expressar proteína, um dos clones em *A.tumefaciens* contendo cDNA 2 com mGFP foi escolhido e coinfiltrado com o cDNA1 e cDNA3 originais do CMV (Figura 27).

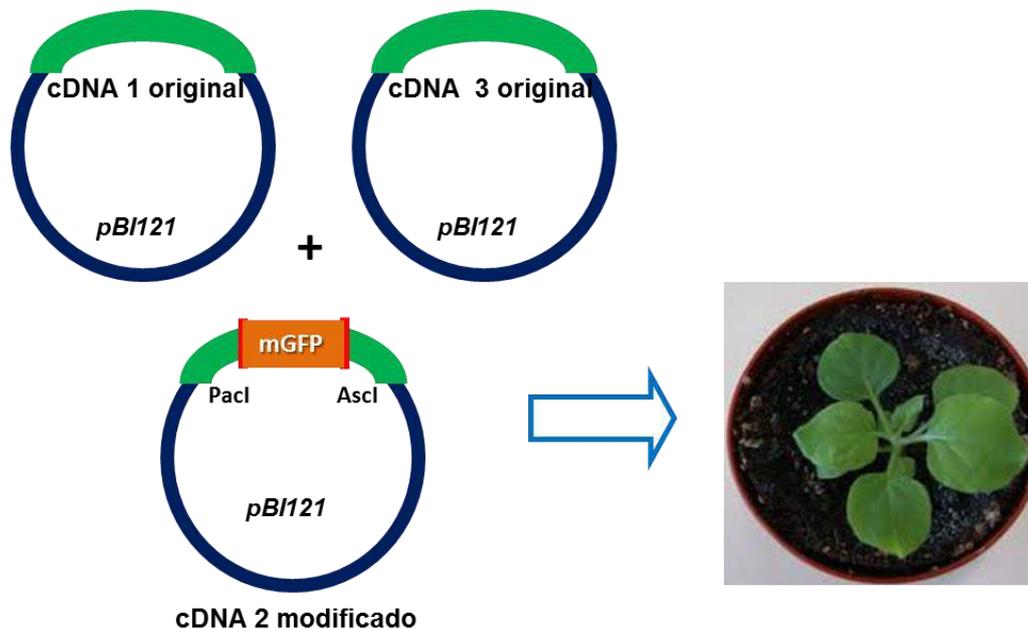


Figura 27- Esquema demonstrando os três clones contendo o cDNA 1 e 3 originais e o cDNA2 modificado do CMV no vetor pBI121 com o gene de mGFP clonado nos sítios de Pacl e Ascl. As três construções em *A.tumefaciens* GV3101 foram coinfiltradas em *N.benthamiana* para testar a capacidade do vetor modificado baseado no CMV de expressar proteína.

Para este ensaio foi realizado o seguinte procedimento:

- Seiscentos µl de meio LB3 contendo os clones do cDNA1 original, cDNA2 contendo mGFP e cDNA3 original, em *A. tumefaciens*, foram colocados separadamente em 3 ml de suspensão líquida contendo 50 µM de acetosyringone e 10 mM de MES (pH 5.5) crescidas *overnight*.

As suspensões foram submetidas a uma centrifugação de 1200 x g por 10 minutos. Os pellets foram ressuspensos com 2 ml de solução do meio *Murashige-Skoog* (Sigma-Aldrich) contendo 10 mM MES (pH 5.5) e 150 µM de acetosyringone) com OD 600= 2.0 (concentração final). Foi realizada a coinfiltração utilizando as três construções distintas na proporção de 1:1:1.

Folhas de *N. benthamiana* com aproximadamente seis semanas de vida foram agroinfiltradas mecanicamente no lado abaxial, utilizando-se uma seringa sem agulha. Após 4 e 7 dpi as folhas foram observadas quanto a presença de sintomas característicos de infecção pelo CMV e quanto a fluorescência gerada pelo mGFP. A fluorescência foi observada sob luz UV (365nm, lâmpada modelo UVLM-28 EL, UVP) e fotografada usando uma máquina digital NIKON e filtro amarelo com 15 segundos de exposição.

4.5- Desenho e síntese da proteína multiepitopo DIII da dengue

Estudos que realizaram o mapeamento de epitopos da proteína E do vírus da dengue (DENV) (Rohering *et al.*, 1998; Falconar, 1999; Beasley 2001) foram analisados, e com base nestes trabalhos, regiões do domínio III da proteína do envelope foram escolhidas no intuito de compor o epitopo que represente este domínio. Epitopos dos quatro sorotipos do vírus foram escolhidos (DENV 1-4), no intuito de criar uma proteína multiepitopo.

As sequências de aminoácidos dos epitopos dos quatro sorotipos (DENV 1-4) da dengue foram obtidas pelo Genbank (número de acesso AFI71647, BAD69799, CAR92196 e AAG45435, respectivamente). Após obtenção destas sequências as mesmas foram comparadas e alinhadas usando o Software CLUSTAL W (Thompson *et al.* 1994).

A proteína multiepitopo foi desenhada englobando as quatro sequências de epitopos na ordem 4-2-3-1, as sequências são unidas por cinco glicinas. Na região C-terminal foi adicionada uma cauda de hexa histidina (His Tag). Foi realizada otimização de codon para *N.benthamiana* utilizando o banco de dados *Codon Usage Database* (<http://www.kazusa.or.jp/codon>). A sequência gênica da proteína multiepitopo da dengue foi sintetizada pela Epoch Life Science (Missouri, TX, EUA) e denominada de multiepitopo DIII.

4.6- Clonagem da proteína multiepitopo da dengue no vetor baseado no CMV e análise de sua expressão

No intuito de inserir os sítios de restrição para clonagem no cDNA2 modificado do CMV, o gene multiepitopo DIII foi amplificado por PCR utilizando a enzima termoestável Vent DNA polimerase (NEB) seguindo protocolo preconizado pelo fabricante. Os *primers* utilizados para esta reação foram: DENV 4-2-3-1-DIII- FOR- Ascl: 5' – TAG **GCG CGC CAT** GGC CGG TGC ACC ATG TAA A – 3' e DENV 4-3-2-1- DIII- Rev- PacI: 5' – TAG **CTT AAT TAA** TTA ATG ATG ATG GTG ATG GTG AGT – 3'. As regiões marcadas de vermelho correspondem respectivamente aos sítios para Ascl e PacI.

A construção contendo o gene multiepitopo DIII foi clonado no cDNA 2 modificado do vetor baseado no CMV, nos sítios de Pac I e Asc I.

O clone obtido do multiepitopo DIII no cDNA2 modificado foi transformado em células de *E.coli* competentes para eletroporação (cepa

STBL-4) utilizando o equipamento Gene Pulser II (BioRad). Uma vez selecionados os clones em meio LB (Sambrook *et al.*, 1989) com canamicina (100µg/ml), foi realizada a extração dos plasmídeos com kit de purificação “PureLink™ Quick Plasmid Miniprep” (Invitrogen), conforme protocolo do fabricante, e a amostra enviada para sequenciamento para confirmação da presença do gene.

Após confirmação por sequenciamento, um clone de cDNA2 contendo multiepítipo DIII foi transformado em *A. tumefaciens* GV 3101, e a presença de plasmídeos nos clones gerados por esta transformação foram confirmados por PCR de colônia.

No intuito de testar a viabilidade do vetor tripartido baseado no CMV em expressar esta proteína, um dos clones em *A. tumefaciens* contendo cDNA 2 com multiepítipo DIII foi escolhido e coinfiltrado com o cDNA1 e cDNA3 originais do CMV, seguindo o mesmo raciocínio utilizado para o mGFP (Figura 27).

Neste ensaio foi testado o vetor viral tripartido do CMV contendo o gene multiepítipo DIII coexpresso com a proteína supressora de PTGS 126K de PMMoV. Portanto, foram agroinfiltradas duas construções: uma sem supressor e outra com supressor. O protocolo de agroinfiltração utilizado foi o mesmo do tópico 4.4.

A agroinfiltração de cada construção foi realizada em duplicata e as plantas agroinfiltradas foram observadas quanto à presença de sintomas típicos de infecção pelo CMV e colhidas amostras com 7 dpi e com 15 dpi. Foram colhidas folhas agroinfiltradas e folhas que não foram agroinfiltradas mas que apresentaram sintomas típicos do CMV (folhas infectadas). A coleta foi de 0,5 g de folha de cada planta (Figura 28).

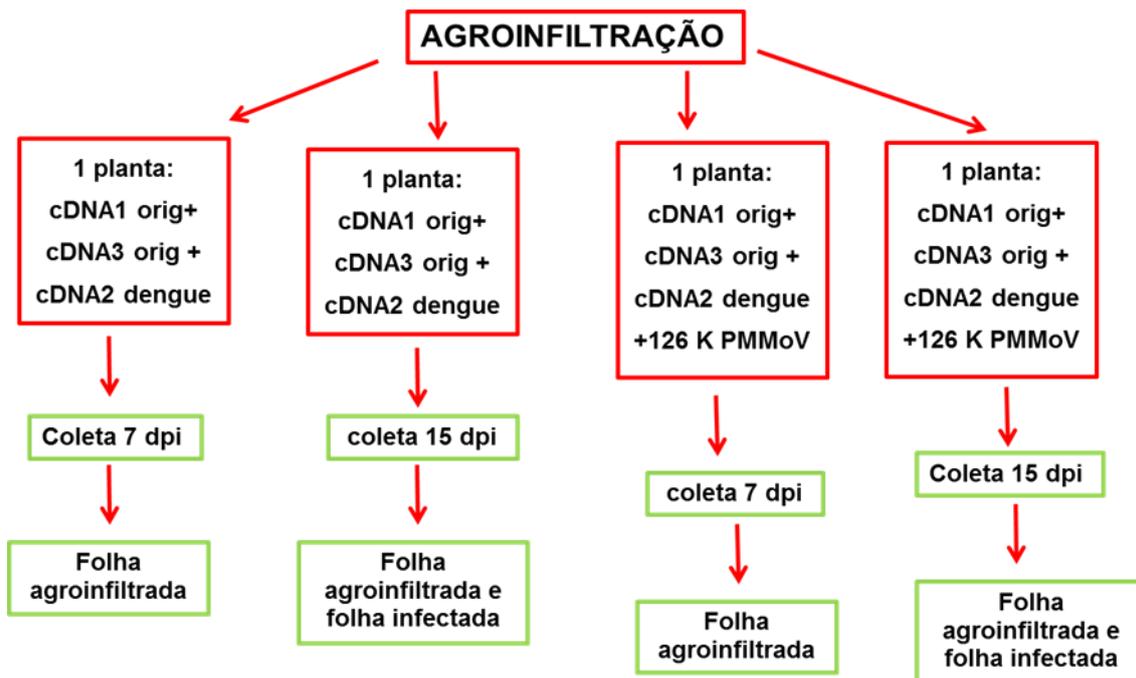


Figura 28- Organograma demonstrando como foi realizada a agroinfiltração das duas construções do vetor viral CMV contendo o gene multiepitopo da dengue (multiepitopo DIII). Em uma construção foi adicionado o supressor de silenciamento de PTGS 126 K PMMoV. A coleta de 0,5 g de folha de cada planta ocorreu com 7 e 15 dpi, e nas plantas com 15 dpi foram colhidas folhas que não foram infiltradas mas que mostraram sintomas de infecção.

Com o objetivo de identificar se a proteína multiepitopo DIII foi expressa e se houve realmente a infecção pelo CMV, as amostras coletadas foram analisadas por *Western blotting* utilizando respectivamente anticorpo anti –His e anticorpo anti-CMV.

Para execução do *Western Blotting* as folhas foram maceradas em tampão PBS 1X na proporção de 1 µl de PBS por mg de folha. A solução extraída foi fervida por 5 minutos e incubada no gelo por 3 minutos para inativar possíveis proteases. Os extratos proteicos foram submetidos à eletroforese em gel de poliácridamida 12% corado com Comassie Blue (Comassie 0,25%, metanol 50%, ácido acético 7%) e descorado com solução descorante (ácido acético 10%, etanol 30%) a fim de confirmar a integridade das amostras.

Após eletroforese, dois géis de poliácridamida 12% contendo as mesmas amostras, foram transferidos para duas membranas distintas de Nitrocelulose (Hybond-C membrane) utilizando o equipamento *Transblot SD Semi-Dry Eletrophoretic Transfer Cell* (Bio-Rad) sob 100 mA 15V regulados. Após transferência as membranas foram bloqueadas em solução contendo PBS 1X e leite em pó desnatado 5% (tampão de bloqueio) por 40 minutos.

Para detecção da expressão da proteína multiepitopo da dengue e da expressão da capa proteica do CMV (confirmar a infecção viral) foram utilizados respectivamente os anticorpo anti-His e anti-CMV, diluídos na proporção de 1:3000 e 1:1000 em tampão de bloqueio. Após diluição os anticorpos foram colocados sobre as membranas agindo sob agitação por duas horas.

Após, as membranas foram lavadas 3x por 3 minutos em PBS-Tween 0,1% (PBS1X e Tween 20 0,5%) e incubadas por duas horas com anticorpo anti-coelho- IgG fosfatase alcalina conjugado (Sigma) para a membrana que estava com anti-CMV e anticorpo anti-mouse- IgG fosfatase alcalina conjugado (Sigma) para a membrana que estava com anti-His. Ambos foram diluídos na proporção 1:3000 em tampão de bloqueio . Após lavagem das membranas com PBS-Tween 0,1%, as mesmas foram incubadas com 66 µl NBT 10 mg/ml (Nitro-BlueTetrazolium em dimetilformamida 70%) e 33 µl BCIP 10 mg/ml (5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato em dimetilformamida 70%) por 5-10 minutos sob agitação.

5- Resultados

5.1 - Construção do vetor de expressão baseado no genoma tripartido do CMV

O cDNA 2 (CMV2-A1) cedido pelo Dr. Chicara Masuta possui as seguintes modificações: a partir do vetor pCY2 (Suzuki *et al.*, 1991), foi realizada a deleção da região 3' da porção da ORF 2b e introduzida sítios de clonagem para MluI e SnaBI e na região *stop* códon da ORF2b foi adicionado sítios de clonagem de StuI e MluI. O cDNA 2 gerado a partir destas modificações foi denominado pelos autores de CMV2 -A1 (Otagaki *et al.*, 2006). A forma como os autores desenvolveram o vetor está demonstrado na Figura 29.

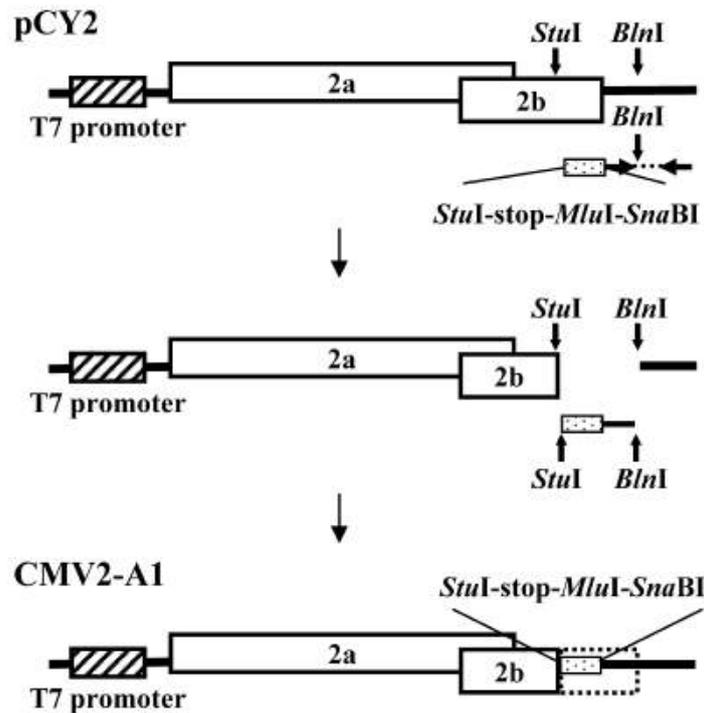


Figura 29- Representação esquemática da construção do vetor CMV2 A1. O fragmento *StuI* e *BlnI* localizado na região 3' foi deletado do plasmídeo pCY2. A porção deletada foi refeita por PCR com fragmentos de DNA contendo os sítios de clonagem na região *stop* códon da proteína 2b. Fonte: Otagaki *et al.*, 2006.

A partir do CMV2- A1, foi realizada a PCR com os *primers* contendo os sítios de clonagem para gerar o cDNA 2 modificado, que foi utilizado neste estudo para clonagem e expressão das proteínas recombinantes. A amplificação por PCR do cDNA2 modificado produziu um fragmento de 6 kb. O fragmento possui este tamanho, pois foi amplificado juntamente com o vetor pCY2 (Figura 30).

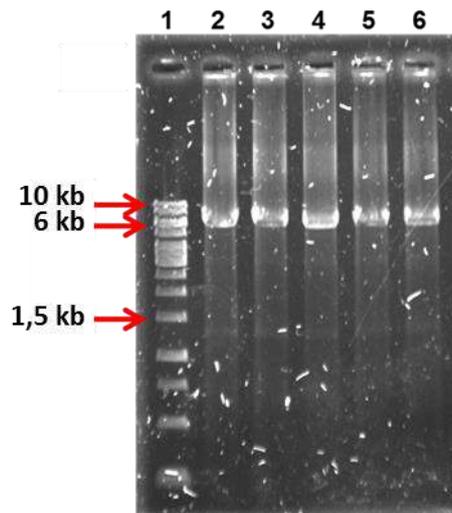


Figura 30 – Eletroforese de gel de agarose mostrando amplificação do gene cDNA2 modificado no vetor pCY2. Tamanho esperado é 6 kb. 1- Marcador GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder, (Fermentas), 2 ao 6 – genes amplificados de cDNA2 modificado no vetor pCY2.

O gene amplificado do cDNA2 modificado no vetor pCY2 foi digerido com as enzimas EcoRI e Not I HF (NEB) gerando dois fragmentos de respectivamente 800 pb, que corresponde ao gene 2b com as respectivas modificações e 5 Kb que corresponde ao restante do gene do cDNA2 e o vetor pCY2 (Figura 31 A). O fragmento do gene 2b contendo as modificações foi clonado no vetor binário pBI121 contendo o cDNA2 original, gerando a construção utilizada para clonagem dos genes de interesse desta pesquisa (mGFP e multiepitopo DIII) (Figura 31 B).

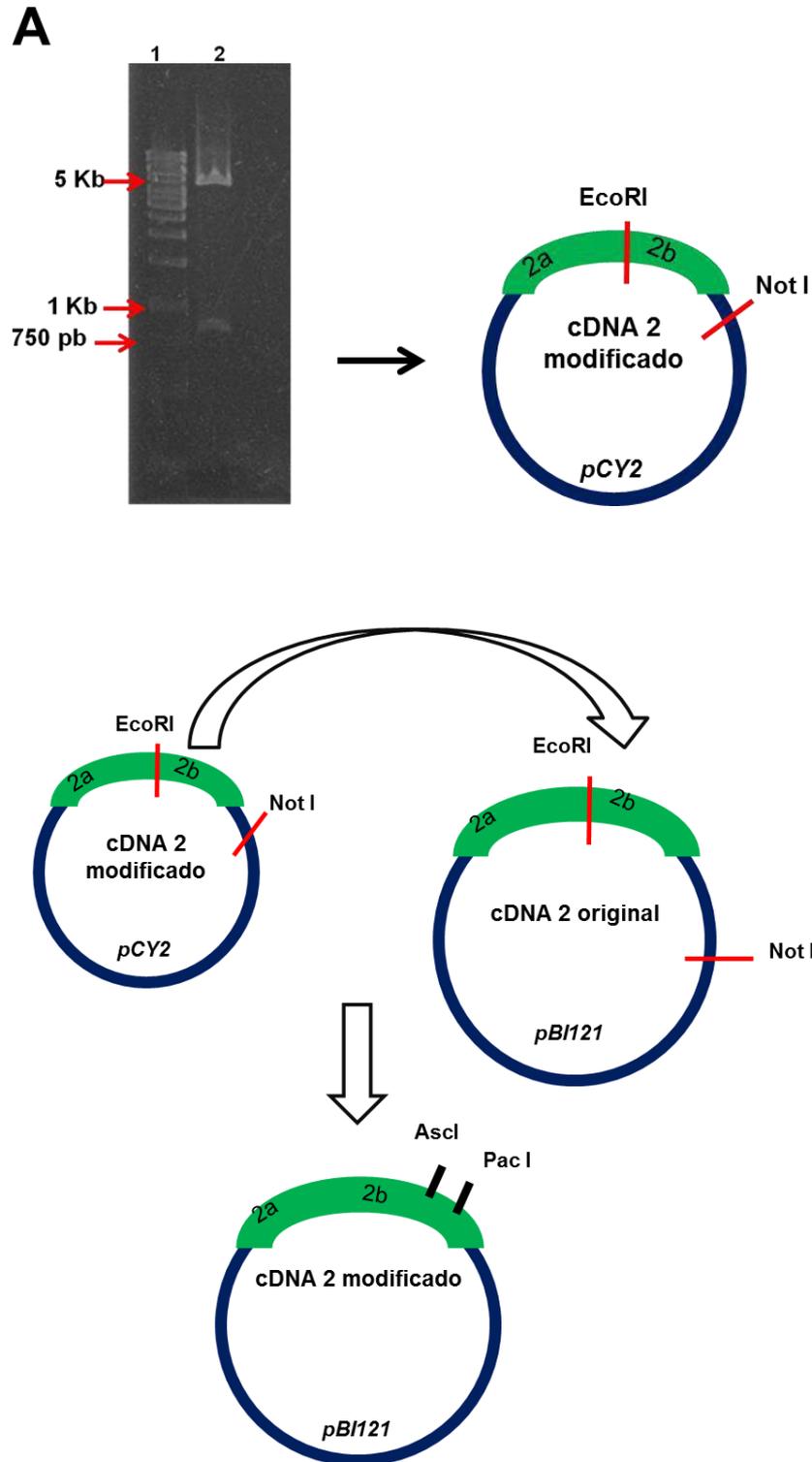


Figura 31 – Digestão da construção do cDNA2 modificado no vetor pCY2 e esquema da clonagem da região modificada do cDNA2 no vetor binário pBI121 contendo o cDNA2 original. A- Eletroforese de gel de agarose mostrando digestão do gene 2b modificado no vetor pCY2. O tamanho esperado de 2b modificado é de aproximadamente 800 pb e do vetor pCY2 com o restante do cDNA2 é de 5 Kb. 1- Marcador GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder, (Fermentas), 2 – vetor pCY2 e gene 2b modificado. B- esquema demonstrando a clonagem do gene 2b modificado no vetor binário pBI121 contendo o cDNA2 original nos sítios de restrição EcoRI e Not I – (vermelho), constituindo novamente o cDNA2 modificado agora no vetor pBI121 - com a presença dos sítios Pac I e Asc I – (preto) para clonagem de genes exógenos.

5.2- Teste de infectividade do vetor viral baseado no genoma tripartido do CMV- vetor original e vetor modificado

O vetor viral baseado no genoma tripartido do CMV com os cDNAs originais clonados em pBI 121 oriundos do Japão, foram transformados em *A. tumefaciens* e coinfiltrados em *N. benthamiana*. Após 4 dpi apresentaram sintomas característicos de infecção pelo CMV (Figura 32).



Figura 32 – Sintomas característicos de infecção pelo CMV em *N.benthamiana*. Sintoma de mosaico na folha de *N.benthamiana* produzido pelo vetor viral baseado no CMV original após 4 dpi.

O vetor viral de expressão baseado no CMV contendo o cDNA2 modificado também foi testado quanto a sua infectividade e após 4 dpi também apresentou sintomas característicos de infecção pelo CMV (Figura 33). Para confirmação da presença do vírus, foi realizado Dot- ELISA utilizando anticorpo contra a capa proteica do vírus (anti-CMV) das amostras contendo tanto o vetor baseado no CMV original, quanto o vetor modificado. O resultado de ambos foi positivo quanto à presença do CMV (Figura 34).



Figura 33 - Sintomas característicos de infecção pelo CMV em *N.benthamiana*. Sintomas de clorose e deformação foliar de *N.benthamiana* produzido pelo vetor viral de expressão baseado no CMV com cDNA2 modificado clone 14 após 4 dpi.

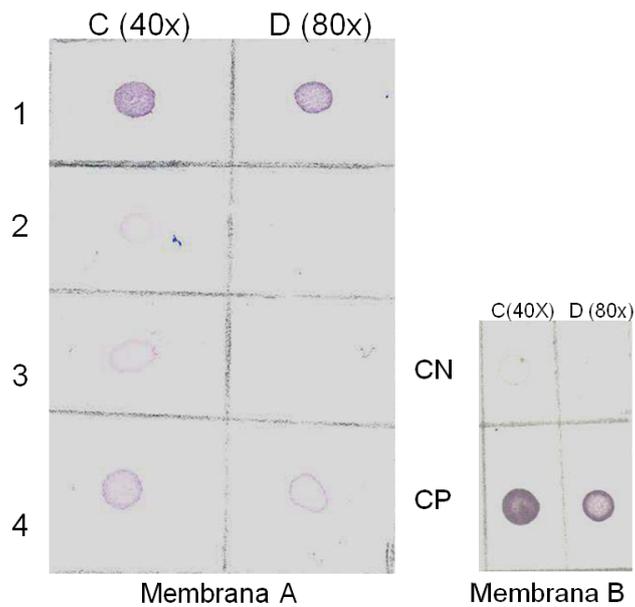


Figura 34 – Dot-ELISA de extrato de *N. benthamiana* das amostras coinfiltradas com o vetor baseado no CMV original e modificado. Membrana A: 1- Amostra CMV original 1, 2- amostra CMV original 2, 3- amostra CMV modificado clone 1, 4- amostra CMV modificado clone 14. Membrana B : CN - controle negativo – folha sadia de *N. benthamiana*, CP- controle positivo – vírus selvagem. C (40x) – amostra concentrada 40x, D (80x) – amostra diluída 80x.

5.3- Clonagem de mGFP no vetor de expressão baseado no CMV e teste de viabilidade deste vetor

O gene de mGFP foi amplificado por PCR para conter os sítios de restrição para que pudesse ser clonado no vetor de expressão baseado no CMV (Figura 35). Após clonagem, as três construções contendo o genoma tripartido do CMV foram coinfiltradas em *N. benthamiana* e após 7 dpi foram observados sintomas sistêmicos característicos de infecção pelo CMV (Figura 36 A). A fluorescência foi observada somente na folha agroinfiltrada, não ocorreu fluorescência de forma sistêmica, como demonstrado na Figura 36 B.

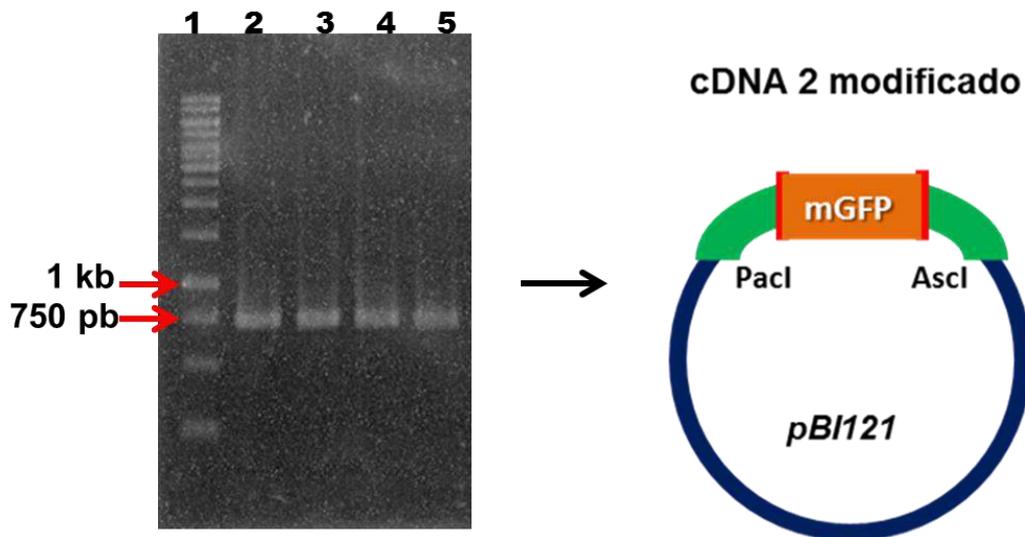


Figura 35- Eletroforese de gel de agarose mostrando amplificação do mGFP e esquema demonstrando clonagem no vetor de expressão baseado no CMV (cDNA2 modificado). O tamanho esperado é de 750 pb. 1- Marcador GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder, (Fermentas), 2 até 5 – gene mGFP

A



B

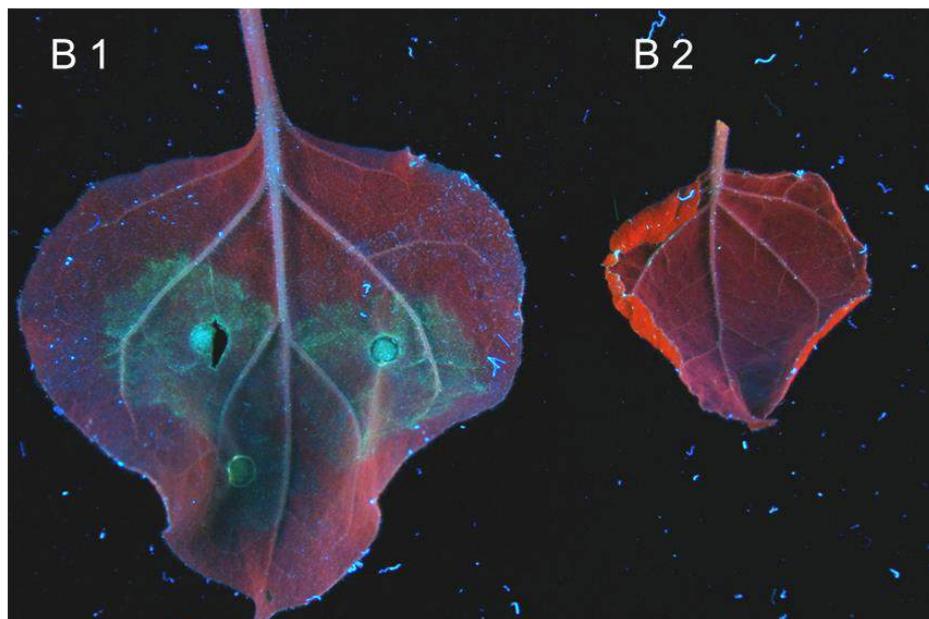


Figura 36- Sintomas característicos de infecção pelo CMV e sinais de fluorescência de mGFP. A- Folha apical de *N. benthamiana* demonstrando infecção sistêmica (deformação foliar) produzida pelo vetor de expressão baseado no CMV com mGFP após 7 dpi. B- Sinais de fluorescência da folha de *N. benthamiana* coinfiltrada com construção contendo mGFP gerados por irradiação de UV : B1 – folha agroinfiltrada com sinais de fluorescência B2 – folha apical infectada sem sinais de fluorescência.

5.4- Desenho da proteína multiepitopo da dengue – multiepitopo DIII

Para a construção da proteína multiepitopo da dengue, foi realizado alinhamento múltiplo da sequência de aminoácidos do domínio III da proteína do envelope dos quatro sorotipos da dengue comparando com do vírus da encefalite Japonesa (JEV), e vírus do Oeste do Nilo (WNV). O alinhamento demonstrou que não há similaridade entre eles suficiente para gerar reação cruzada entre os diferentes vírus (Figura 37 A).

A proteína multiepitopo DIII foi gerada pelas quatro sequências de epitopos na ordem dos sorotipos 4-2-3-1, unidas por cinco glicinas e na região C-terminal foi adicionada uma cauda de hexa histidina (His Tag) (Figura 37 B).

A

```
DEN-1    KGTSYVMCTGSGFKLEKEVAETQHGTVLVQVKYEGTDAPCKIPFS-TQDEKGVTONGRLIT 353
DEN-3    KGMSYAMCTNTFVLKKEVSETQHGTILIKVEYKGEDAPCKIPFS-TEDGQGAHNGRLIT 351
DEN-2    KGMSYSMCTGKFKIVKEIAETQHGTIVIRVQYEGDGSPCKIPFE-IMDLEKRHVLGRLIT 353
DEN-4    KGMSYTMCSGKFSIDKEMAETQHGTIVVVKYEGAGAPCKVPIE-IRDVNKEKVVGRIS 353
JEV      KGTTYGMCTEKFSFAKNPADTGHGTVVIELSYSGSDGPCKIPVSVASLNDMPVGRLLVT 356
WNV      KGTTYGVCSKAFKFLGTPADTGHGTVVLELQYTGTDGPCKVPISSVASLNDLTPVGRLLVT 357
```

B

V-DEN-I4231

```
NH2 - MAGAPCKVPIEIRDVNKEKVVGRIS GGGGG DGSPCKIPFEIMDLEKRHVLGRLIT GGGG
GEDAPCKIPFSTEDGQGAHNGRLIT GGGGG TDAPCKIPFSTQDEKGVTONGRLIT HHHHHH -
COOH
```

Figura 37 – Desenho da proteína multiepitopo DIII. A - alinhamento múltiplo da sequência do domínio III da proteína de envelope dos quatro sorotipos dos DENV, com a sequência que abrange o epitopo marcada em vermelho para os 4 sorotipos dos DENV e em verde para os *Flavivirus*, vírus da encefalite Japonesa (JEV), vírus do oeste do Nilo (WNV). B - Representação da sequência de aminoácidos dos epitopos dos quatro sorotipos compondo a proteína multiepitopo DIII com sorotipos 4-2-3-1 fusionados por ligações de penta-glicina e presença de cauda de hexa histidina.

5.5- Clonagem de multiepitopo DIII no vetor de expressão baseado no CMV e teste de expressão em *N.benthamiana*

No intuito de incorporar os sítios de restrição para clonagem no vetor de expressão baseado no CMV (cDNA2 modificado), o gene de multiepitopo DIII foi amplificado por PCR (Figura 38). Após clonagem as construções do vetor tripartido baseado no CMV contendo o gene multiepitopo DIII foram coinfiltradas em *N. benthamiana* e após 7 dpi foram observados sintomas sistêmicos característicos de infecção pelo CMV (Figura 39).

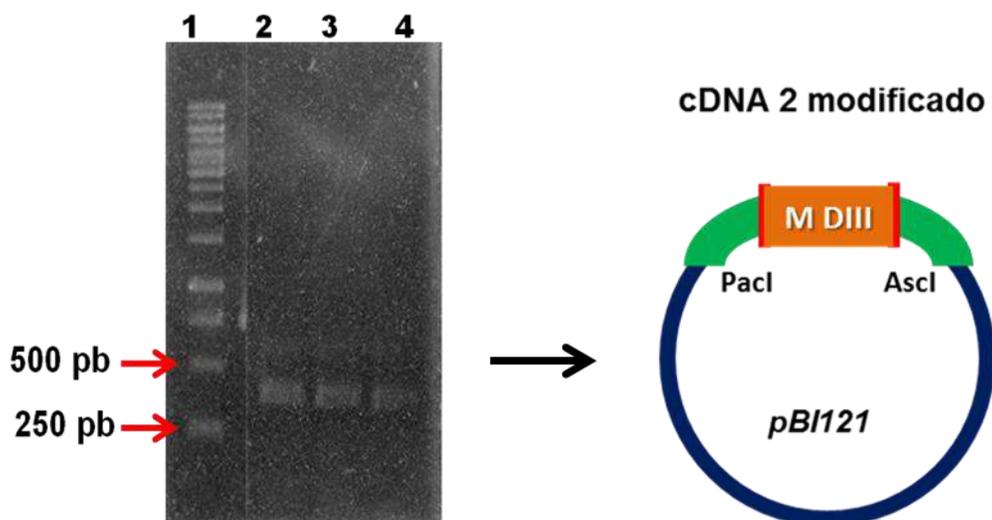


Figura 38- Eletroforese de gel de agarose mostrando amplificação de multiepitopo DIII (M DIII) e esquema demonstrando clonagem no vetor de expressão baseado no CMV (cDNA2 modificado). O tamanho esperado é de 300 pb. 1- Marcador GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder, (Fermentas), 2 até 4- gene multiepitopo DIII.



Figura 39- Sintomas sistêmicos característicos da infecção pelo CMV em *N. benthamiana*. Sintomas de clorose, mosaico e deformação foliar em *N. benthamiana* infectadas pelo vetor de expressão baseado no CMV contendo o gene multiepitopo DIII após 7dpi.

O ensaio com multiepitopo DIII foi realizado de acordo com o organograma da Figura 28 da metodologia. As amostras foram coletadas com 7 dpi e 15 dpi e analisadas por *Western blotting* quanto a expressão da proteína multiepitopo DIII (Figura 40 membrana A) e quanto a expressão da capa proteica do CMV (Figura 40 membrana B). As amostras com 7 dpi foram

armazenadas a 80 °C negativos para que pudessem ser analisadas juntamente com as amostras de 15 dpi.

O resultado do *Western blotting* da membrana A demonstrou que houve expressão da proteína multiepitopo DIII com 15 dpi, sem supressor 126K (amostra 7), porém na folha infectada da mesma planta não houve expressão (amostra 9). Quanto a infectividade pelo CMV (membrana B), houve a expressão da capa proteica do vírus em todas as amostras testadas com exceção da amostra 5. Nas amostras de folhas infectadas com 15 dpi (amostras 9 e 10) houve expressão da capa proteica indicando que o vetor de expressão baseado no CMV contendo o gene multiepitopo DIII gera infecção sistêmica. Em uma análise qualitativa quanto à expressão da capa proteica do CMV não houve diferença de expressão da mesma quando coexpressa com supressor 126K, e a expressão após 7 dpi (amostra 6) foi levemente menor que com 15 dpi (amostra 8).

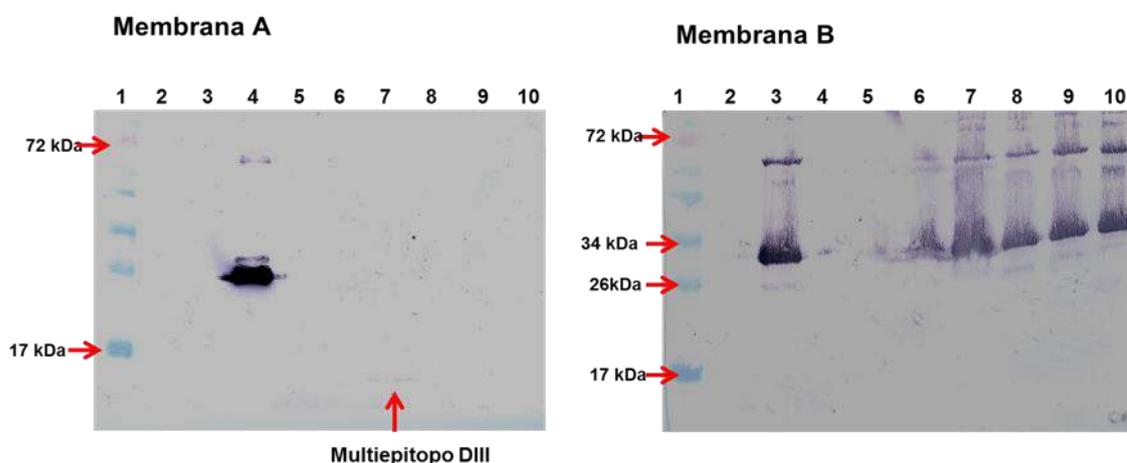


Figura 40 - *Western blotting* do extrato de folhas de *N. benthamiana* infectadas com o vetor viral de expressão baseado no CMV contendo gene multiepitopo DIII. Membrana A- foi utilizado o anticorpo anti-His para detecção da proteína multiepitopo DIII (M DIII) – tamanho esperado de 12 kDa. Membrana B – foi utilizado o anticorpo anti-CMV para detecção da capa proteica do CMV – tamanho esperado de 30 kDa. Nas duas membranas foram utilizadas as mesmas sequencias de amostras, sendo que para cada amostra um total de 0,5 g de folha foi macerada em PBS 1X. 1- Page Ruler™ Prestained Protein Ladder – Fermentas, 2- folha sadia de *N. benthamiana* (controle negativo), 3- folha infectada com vetor baseado no CMV original após 15 dpi (controle positivo); 4- controle positivo para anticorpo anti-His; 5- folha agroinfiltrada com vetor viral contendo M DIII sem 126K após 7 dpi; 6- folha agroinfiltrada com vetor viral contendo M DIII com 126K após 7 dpi; 7- folha agroinfiltrada com vetor viral contendo M DIII sem 126K após 15 dpi; 8- folha agroinfiltrada com vetor viral contendo M DIII com 126K após 15 dpi; 9- folha infectada com vetor viral contendo M DIII sem 126K após 15 dpi; 10- folha infectada com vetor viral contendo M DIII com 126K após 15 dpi.

6- Discussão e considerações finais

Os vetores virais possuem duas aplicações importantes, podem ser utilizados no estudo da interação do vírus com a célula hospedeira; e podem ser utilizados como ferramenta biotecnológica na produção de proteínas recombinantes de importância em diversas áreas, inclusive no campo da saúde. Uma vantagem do uso de vetores virais para produção de proteínas recombinantes é o seu baixo custo, e rapidez de produção (Zhao *et al.*, 2000).

Dentre os vários tipos de vírus de plantas que podem ser utilizados como vetores virais, o CMV é um dos vírus mais versáteis. Segundo Jacquemond (2012), o CMV possui várias vantagens e características que facilitam sua manipulação, fato que o torna viável para ser utilizado como vetor de expressão.

Alguns estudos utilizaram o CMV como vetor de expressão de proteínas recombinantes com sistema de transcrição *in vitro* (Zhao *et al.*, 2000; Matsuo *et al.*, 2007; Fukuzawa *et al.*, 2011). No nosso trabalho o vetor de expressão baseado no CMV utilizou sistema via *Agrobacterium tumefaciens*. Os trabalhos de Sudarshama *et al.* (2006), Fujiki *et al.* (2008) e Hwang *et al.* (2011) também utilizaram o vetor baseado no CMV com este sistema, e citam como vantagens do mesmo o fato da *A. tumefaciens* ser um mecanismo natural de transformação de planta, a proteína desejada ser produzida de forma mais rápida e acumular com alto rendimento, além de ser menos oneroso quando comparado a transcrição *in vitro*.

Como o genoma do CMV é naturalmente composto por três RNAs, o vetor de expressão foi gerado baseando-se nesta característica, sendo denominado de vetor tripartido. Segundo Fujiki *et al.* (2008) uma desvantagem de se usar o vetor tripartido no sistema via *A. tumefaciens* é que o mesmo é menos eficiente em entregar os três cDNAs para uma única célula, quando comparado com um vetor bipartido, tornando o tempo de expressão mais lento.

No nosso trabalho a análise da expressão de mGFP foi realizada com 4 dpi e 7 dpi porém obteve-se fluorescência somente com 7 dpi (Figura 36 B). No trabalho de Hwang *et al.* (2012) que também utilizou o genoma tripartido do CMV via *A. tumefaciens*, a fluorescência de GFP foi observada somente após 6 dpi. Portanto, uma semana para produção de proteínas recombinantes em

planta é um tempo que torna o vetor viral tripartido baseado no CMV um sistema viável quanto à rapidez.

A maioria dos trabalhos que utilizam o vetor viral baseado no CMV para expressão de proteínas, modificam o RNA 3 para inserção dos genes (Zhao *et al.*, 2000; Sudarshana *et al.*, 2006; Fujiki *et al.*, 2008; Fukuzawa *et al.*, 2011; Hwang *et al.*, 2012). No nosso trabalho a região do genoma que sofreu modificação foi o RNA2, especificamente na região da proteína supressora 2b.

O cDNA2 modificado da nossa pesquisa foi baseado no CMV2-A1 do trabalho de Otagaki *et al.* (2006), neste trabalho os autores utilizaram o vetor viral baseado no CMV como vetor de indução de silenciamento gênico (VIGS), com sistema de transcrição *in vitro*. No nosso trabalho o CMV2-A1 recebeu novos sítios de clonagem gerando o cDNA2 modificado (Figura 23), para permitir sua transformação no vetor binário pBI121 e assim ser utilizado como um vetor de expressão de proteínas heterólogas, com o sistema via *A. tumefaciens*.

A escolha pelo RNA 2, mais especificamente pela região da proteína 2b como local de clonagem é com o objetivo de diminuir a patogenicidade do vetor sem alterar a sua capacidade de expressão, pois modificando a proteína 2b a produção de sintomas na planta ocorre de forma mais branda (Otagaki *et al.*, 2006).

Os sintomas produzidos pelo vetor tripartido do nosso trabalho foram bastante heterogêneos, tanto na intensidade quanto no padrão. Foram observados sintomas mais brandos como na infecção pelo vetor de expressão contendo mGFP (Figura 36 A) e sintomas mais severos como na infecção pelo vetor de expressão contendo multiepitopo DIII (Figura 39). Este resultado sugere que fatores relacionados ao hospedeiro (*N. benthamiana*) e as demais proteínas virais estão envolvidos na produção dos sintomas. Segundo Jacquemond (2012) apesar de muitos trabalhos estarem envolvidos na determinação dos aspectos moleculares e bioquímicos que ocorrem em plantas infectadas pelo CMV, os mecanismos de desenvolvimento dos sintomas ainda são pouco conhecidos.

O vetor tripartido baseado no CMV foi capaz de expressar mGFP após 7 dpi, porém a intensidade da fluorescência foi fraca (Figura 36 B), quando comparada a tecnologia MagnICON, considerada como o sistema mais

robusto de produção de proteínas de forma transiente (Obembe *et al.*, 2011). Um importante fator que pode alterar os níveis de expressão quando se utiliza o sistema de vetor viral via *A. tumefaciens*, é que a transcrição primária do RNA viral ocorre no núcleo da célula podendo resultar em baixa infectividade, já que o CMV é um vírus de RNA que normalmente não tem estágio de replicação no núcleo da célula (Fujiki *et al.*, 2008).

Outro fator importante que pode alterar os níveis de expressão no sistema via *A. tumefaciens* é a temperatura em que as plantas são acondicionadas após a agroinfiltração (Del Toro *et al.*, 2014). Segundo Del Toro *et al.* (2014) alterações de temperatura podem interferir em vários mecanismos da patogenicidade do vírus, de defesa da planta, e da capacidade de transferência da *Agrobacterium*, modificando a expressão de proteínas quando se utiliza vetores virais via *A. tumefaciens*. O trabalho salienta que apesar de muitos autores preconizarem a temperatura de 25°C como padrão, a temperatura de 30°C também pode ser utilizada.

No nosso trabalho as plantas foram acondicionadas em estufas com temperatura ambiente, portanto, sem padronização da temperatura, o que pode justificar o baixo rendimento, portanto, novos ensaios serão realizados padronizando a temperatura de acondicionamento das plantas. Outro fator que pode ter contribuído para o baixo rendimento da expressão de proteínas na nossa pesquisa, é a perda da atividade supressora de 2b já que os sítios de restrição foram inseridos nesta proteína.

Entretanto, no trabalho de Sudarshana *et al.* (2006), o efeito supressor da proteína 2b do vetor viral baseado no CMV não foi suficiente para aumentar o rendimento na produção da proteína α_1 antitripsina (rAAT), pois quando utilizaram o vetor viral coexpresso com a proteína supressora p19 aumentou substancialmente os níveis de expressão de rAAT comparado ao uso do vetor de forma isolada.

No intuito de testar se o supressor de PTGS faria diferença na expressão das proteínas do nosso estudo, no ensaio com a proteína multiepitopo da dengue, foi testada a coexpressão da proteína supressora 126 K de PMMoV. Porém não obtivemos resultados conclusivos (Figura 40), já que a proteína multiepitopo DIII expressou fracamente em somente uma amostra, e

a análise qualitativa da infectividade (expressão da capa proteica) não mostrou diferença significativa entre as amostras com supressor e sem supressor.

O vetor tripartido baseado no CMV desenvolvido pelo nosso grupo foi capaz de infectar sistemicamente *N. benthamiana*, porém a expressão das proteínas heterólogas (mGFP e multiepitopo DIII), ocorreu somente no local da agroinfiltração, não ocorrendo expressão sistêmica (Figura 36 B e Fig 40), levantando a hipótese de que o gene foi excluído durante a replicação viral. Segundo os trabalhos de Dawson *et al.* (1989) e Choi *et al.* (2000), os vetores virais quando estão desenvolvendo a infecção excluem parcialmente ou totalmente a sequência gênica recombinante o que leva a não produção da proteína de interesse.

A expressão da proteína multiepitopo DIII também ocorreu com baixo rendimento (Figura 40). Para que a mesma possa ser utilizada como ferramenta para confecção de kit diagnóstico para dengue, que é o propósito desta pesquisa, vários desafios devem ser superados como: melhorar o rendimento da expressão da proteína utilizando o vetor tripartido do CMV, e avaliar a proteína multiepitopo DIII quanto ao seu potencial de reação sorológica na detecção de anticorpos IgG, quanto a sua especificidade, sensibilidade e eficiência.

Pode-se concluir, portanto, que o vetor viral tripartido baseado no CMV via *A. tumefaciens* desenvolvido neste trabalho foi capaz de infectar sistemicamente *N. benthamiana* e expressar proteínas heterólogas (mGFP e multiepitopo DIII), porém o seu uso biotecnológico para produção de kit diagnóstico para a dengue ainda depende de aprimoramento do vetor e de condições de seu uso, assim como de testes da viabilidade da proteína produzida por ele.

CAPÍTULO IV: Utilização do vetor viral tripartido de *cucumber mosaic virus* como vetor de indução de silenciamento gênico em planta

1- Introdução

1.1- Silenciamento gênico induzido por vírus – *virus induced gene silencing* (VIGS) – conceito, histórico e relevância biotecnológica

O mecanismo de silenciamento gênico mediado por RNA interferente (RNAi) é conhecido em plantas como silenciamento gênico pós- transcricional (PTGS). Este é um mecanismo natural de defesa das plantas contra infecção viral. Sabendo que a replicação do vírus dentro da célula irá ativar naturalmente o PTGS, a inserção no genoma viral de um fragmento de um gene não silenciado (endógeno ou transgene) irá promover o silenciamento do (trans) gene correspondente na planta. A indução de PTGS por meio da replicação viral é denominada de silenciamento gênico induzido por vírus (*virus induced gene silencing* – VIGS).

Segundo Baulcombe (1999) a expressão gênica em plantas pode ser silenciada por uma infecção viral, desde que o vetor viral que causou esta infecção carregue uma sequência gênica específica homóloga a que foi silenciada. O mecanismo que desencadeia esta resposta está relacionado à proteção natural das células contra infecção viral mediado pelo RNA, relacionado com silenciamento pós- transcricional mediado pela co supressão de genes endógenos ou de transgenes. O autor relata que a tecnologia baseada no silenciamento gênico induzido por vírus está sendo desenvolvida e adaptada para o estudo rápido da função genômica das plantas.

Historicamente a descoberta de que os vírus poderiam desencadear mecanismo de silenciamento gênico ocorreu durante a década de 90. Trabalhos como o de Lindbo e Dougherty (1992) que observaram resistência à infecção pelo *Tobacco etch virus* (TEV) em plantas transgênicas expressando a capa proteica deste vírus, colaboraram para que o mecanismo de silenciamento mediado por vírus em planta fosse estudado.

A partir deste trabalho, outros estudos foram desenvolvidos tanto com plantas transgênicas, como não transgênicas e na observação de infecções naturais com os vírus selvagens. Todos os estudos chegaram à conclusão de que existe um RNA endógeno gerando um mecanismo de defesa que afeta tanto vírus de DNA como de RNA, fazendo com que as plantas não apresentem infecção viral, ou se recuperem rapidamente de uma infecção viral natural. A ocorrência deste fenômeno associado ao de co supressão observado nos trabalhos de Van der Krol *et al.*, (1990) e Napoli *et al.* (1990) ajudaram os cientistas a entenderem que ambos fenômenos estão relacionados com o mecanismo natural de defesa da planta denominado PTGS.

O termo *virus induced gene silencing* (VIGS) foi criado por Van Kammen (1997), que em seu trabalho utilizou esta terminologia para designar o mecanismo de resistência à infecção viral de determinadas plantas que possuíam de forma transgênica parte do vírus ou aquelas plantas que não eram transgênicas, mas que se recuperavam rapidamente de uma infecção viral natural. A partir de então o termo VIGS tem sido utilizado em todos os trabalhos que utilizam a infecção viral como uma ferramenta para silenciar genes/transgenes de plantas, e atualmente é um dos métodos mais escolhidos para o estudo da função gênica de planta (Purkayastha e Dasgupta, 2009)

Um dos pioneiros da utilização do VIGS para o estudo da função gênica em planta foi o trabalho de Kumagai *et al.* (1995). O objetivo deste estudo foi observar a via de biossíntese de carotenóides em planta, para isso o *Tomato mosaic virus* (ToMV) foi manipulado para conter uma parte do gene da fitoenol desidrogenase (PDS). Após inoculação do mesmo em *N. benthamiana* os autores observaram um fenótipo branco decorrente da degradação da clorofila e concluíram que um vetor viral de RNA pode ser utilizado para manipular uma grande via de biossíntese de uma célula eucariótica, e que o transcrito do PDS no citoplasma da célula da planta “desligou” a expressão endógena deste gene. A partir deste trabalho, o VIGS se tornou uma ferramenta rápida de silenciamento gênico (*gene knock-down*) para o estudo da função gênica em plantas.

Outra aplicação dos vetores VIGS além das supracitadas é sua utilização no estudo da função de determinadas proteínas que atuam como

supressores virais de silenciamento gênico. Nos trabalhos de Anandalakshmi *et al.* (1998) a função dos domínios da proteína candidata a supressora HC-Pro do *Tobacco etch virus* foi estudada utilizando um vetor VIGS baseado no *Potato virus X* (PVX). Outro trabalho que seguiu esta mesma linha foi de Voinnet *et al.* (1999) que testaram a função de três proteínas virais diferentes candidatas a supressoras de PTGS : a proteína AC2 de geminivirus, a proteína 19K de *Tomato bushy stunt virus* (TBSV) e a proteína P1 de *Rice yellow mottle virus* (RYMV), também utilizando o vetor VIGS baseado no PVX.

Apesar da maioria dos autores que estudam os vetores VIGS relatarem que os mesmos são uma ferramenta rápida e fácil de estudo de genética reversa, autores como Godge *et al.* (2008), Baulcombe (1999) e Ruiz *et al.* (1998), mencionaram a utilização de vetores VIGS para o estudo rápido de genética direta, denominado pelos autores de “*fast forward genetics*”.

O uso de VIGS no estudo de genética direta requer a construção de bibliotecas de cDNAs randomizados clonados em vetores virais e uma análise sistemática de um grande número de plantas infectadas. Segundo Godge *et al.* (2008) o melhoramento dos vetores virais e das técnicas de inoculação tem oportunizado a utilização dos VIGS nesta área.

1.2- Silenciamento gênico induzido por vírus – mecanismo, vantagens e limitações

Como já mencionado anteriormente, o mecanismo responsável pelo VIGS está relacionado com o mecanismo de defesa das células mediado pelo RNA, que nas plantas é conhecido como PTGS. Portanto, o mecanismo se baseia na origem de uma fita dupla de RNA (dsRNA) no citoplasma da célula. No sistema de vetores VIGS, este dsRNA é originado como um complexo intermediário da replicação de vírus de RNA fita simples (ssRNA) no citoplasma da célula. Este dsRNA é processado por uma RNase em pequenos fragmentos de RNA denominados de RNA interferentes (siRNA) (Pukayastha e Dasgupta, 2009; Voinnet, 2005; Lu *et al.*, 2003).

Estas pequenas moléculas de RNA (siRNA) irão se associar a um complexo proteico conhecido como RISC (do inglês *RNA-induced silencing complex*). Após associação o complexo RISC irá encontrar no citoplasma fitas complementares de mRNA específicos, as quais serão alvo da ação de

silenciamento gênico. Quando o pareamento é efetivo, este mRNA será degradado pela ação catalítica da enzima Argonauta (AGO) que faz parte do complexo RISC. Se o pareamento for parcial não ocorre a clivagem, mas o complexo atua inibindo o processo de tradução e este mRNA será degradado pela maquinaria celular (Bivalkar-Mehla *et al.*, 2011; Unver e Budak, 2009).

Segundo Lu *et al.* (2003) nos estágios tardios da infecção viral em que há um aumento da replicação do vírus a quantidade de dsRNA e siRNA são mais abundantes na célula, ativando mais efetivamente o mecanismo de silenciamento gênico, cujo alvo é o mRNA viral, causando portanto uma diminuição da infecção.

O estudo desenvolvido por Ruiz *et al.* (1998) ajudou a decifrar o mecanismo de silenciamento descrito por Lu *et al.* (2003). Os autores concluíram que os vírus são necessários para induzir o silenciamento gênico, porém não são necessários para manter esse silenciamento. Esta conclusão foi baseada nos resultados da expressão de GFP em plantas transgênicas quando se utilizou o vetor VIGS baseado no PVX contendo o gene de GFP. Os autores observaram silenciamento de GFP no início da infecção viral indicando que o vírus é necessário para induzir o silenciamento. Porém, após a recuperação do tecido foliar não foi observada infecção viral, entretanto o GFP (transgene) continuou sendo silenciado, indicando que a manutenção do silenciamento independe do vírus, além da planta ter adquirido resistência ao PVX. Portanto, estes resultados indicaram a atuação dos siRNAs (associados ao complexo RISC) no silenciamento dos mRNAs tanto de GFP como do PVX. O papel e a importância dos siRNAs para a ocorrência do fenômeno de silenciamento sistêmico foi minuciosamente estudado no trabalho de Hamilton e Baulcombe (1999).

Segundo Voinnet (2005) um resultado surpreendente dos vetores VIGS, foi sua ação no silenciamento transcricional. Esta característica foi observada em estudos que clonaram promotores homólogos a promotores naturais nos vetores VIGS, que ao infectarem a planta produziam o silenciamento gênico em nível de transcrição. No trabalho de Otagaki *et al.* (2006) este mecanismo também é descrito, os autores mencionaram que os vetores VIGS podem ser utilizados para induzir silenciamento transcricional, dsRNAs que contem uma sequência homóloga a uma sequência de um promotor pode induzir metilação

na sequencia promotora no DNA nuclear e conseqüentemente induzir um silenciamento da transcriçãõ.

A utilizaçãõ de vetores VIGS tem inúmeras vantagens, dentre elas, a rapidez e a facilidade no estudo da função gênica quando comparado com outros sistemas (Tian *et al.*, 2014; Under e Budak, 2009; Velásquez *et al.*, 2009; Purkayastha e Dasgupta, 2009; Godge *et al.*, 2008; Lu *et al.*, 2003; Baulcombe, 1999; Ruiz *et al.* 1998).

O silenciamento múltiplo de genes utilizando sistema VIGS é aplicado também quando se utiliza uma sequencia gênica conservada entre genes da mesma família. Este fenômeno é designado como redundância funcional provocada pelo vetor VIGS e é citado por alguns autores (Unver e Budak., 2009; Godge *et al.*, 2008; Baulcombe, 1999). Esta redundância consiste na capacidade do vetor em silenciar múltiplos genes que pertencem a uma mesma família.

Uma das limitações citadas por Unver e Budak (2009) e Godge *et al.* (2008) relacionadas ao sistema VIGS é que ele não consegue silenciar 100% um gene, geralmente a regulação da expressão gênica feita pelos VIGS ocorre entre 75-90%, portanto, algumas proteínas que se esperava suprimir são produzidas e são suficientes para gerar o fenótipo que se esperava silenciar. Portanto, a utilização do VIGS não pode excluir o envolvimento de um gene em um contexto funcional particular se o fenótipo esperado não acontecer.

Outra limitação colocada por Unver e Budak (2009) é que o sistema VIGS depende da interação patógeno- hospedeiro, logo a infecção pelo patógeno (vírus) pode manipular a função do hospedeiro e alterar o seu desenvolvimento e morfologia, fazendo com que o fenótipo produzido pelo gene silenciado seja mascarado pela infecção. Portanto, é necessário um controle positivo em todos os ensaios de VIGS para analisar os efeitos da inoculação viral na planta silenciada.

1.3- Desenvolvimento da tecnologia baseada em VIGS – características do vetor, tipos de vírus e plantas, e genes repórteres mais comuns

Alguns vírus de RNA e DNA têm sido modificados para o desenvolvimento de vetores VIGS. O gene que se deseja silenciar é clonado neste vetor infeccioso que pode ser derivado do DNA viral (*DNA virus-based*

vectors) ou do cDNA viral (*RNA virus-based vectors*). Os vetores VIGS são introduzidos nas plantas por inoculação mecânica dos transcritos (transcrição *in vitro*), ou agroinfiltração (infiltração de *A. tumefaciens*), ou para os vetores baseados no DNA, método de biobalística (Purkayastha e Dasgputa, 2009).

Nos estudos iniciais dos VIGS as plantas mais utilizadas foram da espécie de tabaco, como a *N. benthamiana*, devido a sua maior susceptibilidade à infecção viral. O *Tobacco mosaic virus* (TMV) foi o primeiro vírus de RNA a ser utilizado como vetor de silenciamento (Kumagai *et al.*, 1995). Logo em seguida o *Potato virus X* (PVX) também foi utilizado como vetor VIGS (Ruiz *et al.*, 1998). O vetor baseado no PVX demonstrou maior estabilidade comparado ao TMV, porém o TMV possui a capacidade de infectar um número maior de famílias de plantas comparado ao PVX. Os vetores de silenciamento baseados no TMV e PVX têm como desvantagem não infectar os tecidos da planta que estão em crescimento e o meristema (Godge *et al.*, 2008).

Para suprir esta deficiência dos vetores baseados no TMV e PVX, foi desenvolvido o vetor VIGS baseado no *Tobacco rattle virus* (TRV) (Ratcliff *et al.*, 2001). O vetor baseado no TRV tem como vantagem o fato deste vírus infectar facilmente algumas espécies de solanáceas, ter uma enorme facilidade de se espalhar por todos os tecidos da planta incluindo o meristema, e seus sintomas durante a infecção são brandos. Na revisão feita por Unver e Budak (2009) os autores mencionaram vários trabalhos que utilizaram o TRV em estudos de silenciamento gênico em diferentes espécies de plantas e possuem alta eficiência na indução de silenciamento.

No trabalho de Otagaki *et al.* (2006) o vetor VIGS baseado no *Cucumber mosaic virus* (CMV) foi capaz de gerar silenciamento gênico transcricional e pós-transcricional de forma eficiente em *N. benthamiana* linhagem 16 c. Os autores construíram o vetor modificando o RNA 2 do vírus, mais precisamente na região da proteína 2b para conter os sítios de clonagem, e realizaram transcrição *in vitro*. Os genes que foram clonados no cDNA2 modificado e que serviram como alvo de silenciamento foram o GFP e o gene do promotor 35S de *Cauliflower mosaic virus*. Com os resultados obtidos tanto da observação do fenótipo como da quantificação de mRNA dos genes silenciados, os autores

concluíram que o CMV pode ser utilizado como um VIGS e que sua ação ocorre de forma rápida e eficaz.

No trabalho de Nagamatsu *et al.* (2009), o vetor de silenciamento baseado no CMV foi o mesmo desenvolvido por Otagawa *et al.* (2006). Nagamatsu *et al.* (2009) utilizaram o vetor para silenciar o gene responsável pela produção do flavonoide 3' hidroxilase de soja em desenvolvimento, e observaram que esta enzima está relacionada a pigmentação desta planta durante o seu crescimento. Este resultado ratifica que o vetor de silenciamento baseado no CMV é uma ferramenta eficaz e que pode ser utilizada em várias espécies de plantas.

A escolha de um vírus para se construir um VIGS deve se basear no tipo de planta que se deseja estudar. Portanto, a escolha por um vírus que infecta um número maior de espécies é vantajoso, pois amplia a capacidade de estudo deste vetor (Lu *et al.*, 2003). Segundo Unver e Budak (2009), outro fator importante que deve ser analisado na escolha do vírus é a sua virulência, pois vírus que causam sintomas severos na planta não são bons candidatos à VIGS, pois estes sintomas podem mascarar o fenótipo que se deseja observar. Balcombe (1999) mencionou que para o desenvolvimento da tecnologia VIGS, os vírus que possuem fortes supressores de PTGS não são bons candidatos, já que a tecnologia necessita do silenciamento mediado por RNA interferente.

Para Purkayastha e Dasgupta (2009), outro fator que tem relevância no silenciamento gênico promovido pelo vetor VIGS é a orientação do inserto. Lacomme *et al.* (2003) clonaram 40-60 nucleotídeos dos genes de GFP e PDS no vetor VIGS baseado no TMV. Esses nucleotídeos foram clonados utilizando uma metodologia denominada pelos autores como *inverted-repeats*. Ela consiste em clonar duas sequências gênicas idênticas, porém em sentidos contrários no mesmo vetor. As sequências são separadas por cerca de oito nucleotídeos para que se forme uma estrutura em forma de grampo. Com esta estratégia aumenta-se a quantidade de moléculas de dsRNA devido ao pareamento intermolecular ou intramolecular por alto hibridização das moléculas individuais de RNA. Os autores concluíram que a utilização desta técnica de *inverted-repeats*, produz silenciamento mais eficaz se comparado a clonagem do inserto no sentido *senso* ou *antisense*.

Para se testar a viabilidade de um vetor de silenciamento, existem vários genes repórteres diferentes que podem ser utilizados. Segundo Godge *et al.* (2008), os genes repórteres mais comuns utilizados para este fim são: o gene da fitoeno desaturase (PDS), o gene da proteína verde fluorescente (GFP), o gene da chalcone sintase (CHS), *sulfur* gene (SU) e antígeno de proliferação celular nuclear (PCNA). A escolha de qual tipo de gene repórter utilizar depende da conveniência do ensaio, da sensibilidade, simplicidade e dinâmica.

O gene PDS codifica uma enzima denominada de fitoeno desaturase cuja função está relacionada a biossíntese de carotenoides da planta, ou seja, ela protege a planta de fotodegradação. Os carotenoides são pigmentos necessários para a proteção do aparato fotossintético da planta. A enzima PDS participa na catalização do fitoeno em beta caroteno (Scolnik e Bartley, 1993). O silenciamento do gene PDS promove na planta o fenótipo de fotodegradação tornando o tecido foliar branco, como observado no trabalho de Wang *et al.* (2009) que promoveu o silenciamento com a utilização da técnica do RNAi em planta transgênica de *N. tabacum* (Figura 41).



Figura 41- Fenótipo produzido pelo silenciamento do gene PDS. Fonte: Wang *et al.* (2009)

2- Objetivo geral

Construir um vetor de indução de silenciamento gênico (VIGS) baseado no genoma tripartido do CMV. O intuito desta pesquisa é desenvolver uma ferramenta biotecnológica de genética reversa para estudos de funções gênicas.

3- Objetivos específicos

- ✓ Modificação do cDNA2 do CMV para conter região de recombinação do sistema Gateway (Invitrogen), e portanto ser utilizado como vetor de destino neste sistema
- ✓ Modificação do gene de resistência do vetor de entrada (pENTR 2B) de canamicina para ampicilina – criação do vetor pENTR 2B Amp^R
- ✓ Testar o vetor de destino do sistema Gateway (Invitrogen) baseado no CMV quanto à infectividade em *N.benthamiana*
- ✓ Amplificação e clonagem do gene da fitoeno desaturase (PDS) no vetor de destino baseado no cDNA2 do CMV
- ✓ Agroinfiltração do cDNA2 contendo o gene PDS em *N.benthamiana* para testar a capacidade do vetor tripartido do CMV de atuar como VIGS

4- Metodologia

4.1 – Construção do VIGS baseado no genoma tripartido do CMV

Para a construção do VIGS baseado no genoma tripartido do CMV foi utilizado o mesmo vetor do capítulo III para expressão de proteínas heterólogas. Portanto, foram utilizados o cDNA1 e 3 originais do CMV clonados no vetor binário pBI 121 e o cDNA2 modificado (contendo os sítios de *PacI* e *AscI*) também clonado no vetor binário pBI 121 (Figura 42).

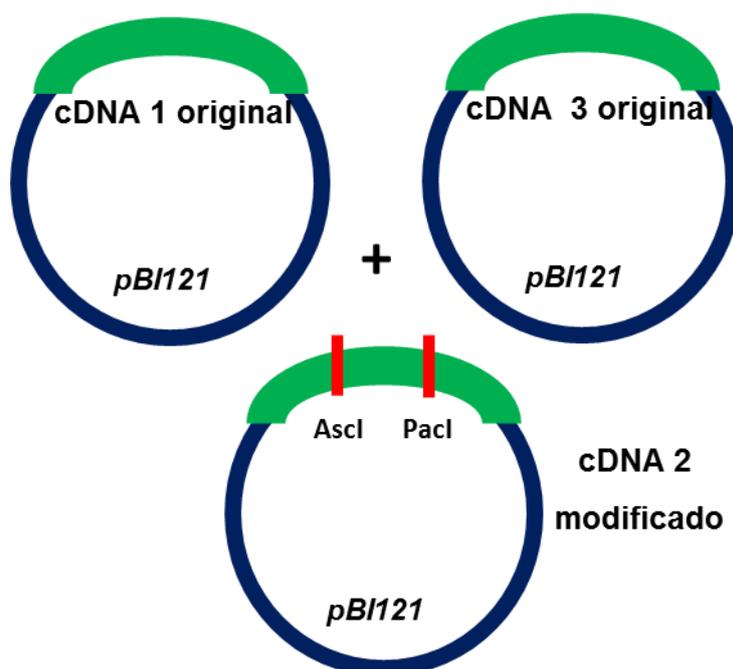


Figura 42 – Esquema demonstrando o vetor tripartido baseado no CMV com os cDNAs 1 e 3 clonados no vetor binário pBI 121 e o cDNA2 modificado contendo os sítios de clonagem *AscI* e *PacI* também clonado em pBI121. O cDNA2 modificado será utilizado para construir o VIGS baseado no CMV.

A estratégia de clonagem do vetor baseado no CMV para ser utilizado como VIGS será utilizando a tecnologia Gateway (Invitrogen). Para este propósito a região de recombinação do vetor pK2GW7 (*attR1* e *attR2*) será clonada no cDNA2 modificado nos sítios de *AscI* e *PacI*, para que ele possa ser utilizado como vetor de destino no sistema Gateway (Invitrogen).

Esta tecnologia é um método universal de clonagem baseada em sítios específicos de recombinação do bacteriófago lambda. Na tecnologia Gateway os componentes do sistema de recombinação do bacteriófago são modificados para melhorar a especificidade e eficiência do sistema. O mecanismo de

recombinação baseado no lambda envolve dois componentes principais: os sítios *att* que são as sequencias do DNA recombinante, e a proteína que irá mediar a reação de recombinação que é a enzima Clonase (Invitrogen).

O sistema Gateway possui duas formas de recombinação, a que foi desenvolvida neste trabalho é a reação *LR* que se baseia na recombinação do substrato *attL* (vetor de entrada) com o substrato *attR* (vetor de destino) para criar o *attB* (vetor de expressão) contendo o clone que será expresso (Figura 43) (Gateway Technology, Catalog nos. 12535-019 and 12535-027). Neste estudo o vetor de entrada é o pENTR 2B e o vetor de destino é o cDNA2 modificado do CMV.

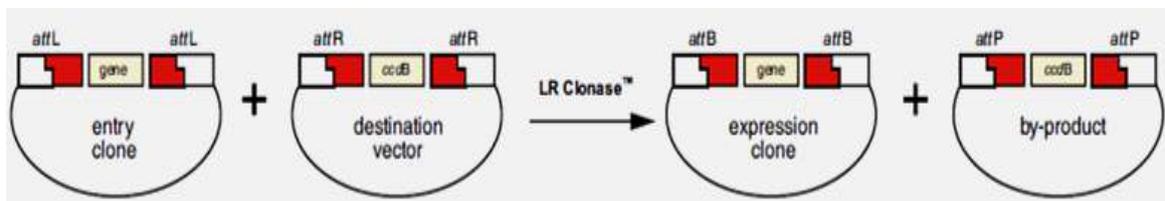


Figura 43- Esquema demonstrando o sistema de recombinação Gateway (Invitrogen) pela reação *LR*: demonstrando o vetor de entrada contendo as regiões de recombinação *attL*, o vetor de destino contendo as regiões *attR* e após ação da enzima LR Clonase (Invitrogen) tem se o vetor de expressão contendo o gene e a região *attB* e o produto da recombinação contendo a região *attP*.

Fonte: Gateway Technology,Invitrogen, Catalog nos. 12535-019 and 12535-027

Para a construção do vetor de destino do nosso trabalho, a região contendo *attR* e *ccdB* do vetor pK2GW7 (Figura 44) foram amplificadas por PCR utilizando a enzima termoestável Vent DNA polimerase (NEB) seguindo protocolo preconizado pelo fabricante. Os *primers* utilizados para esta reação foram: For *Ascl attR1*: 5' - TTG GCG CGC CAC AAG TTT GTA CAA AAA AGC TGA A - 3' e Rev *attR2 PacI* : 5'- TTT TAA TTA ACC ACT TTG TAC AAG AAA GCT - 3'.

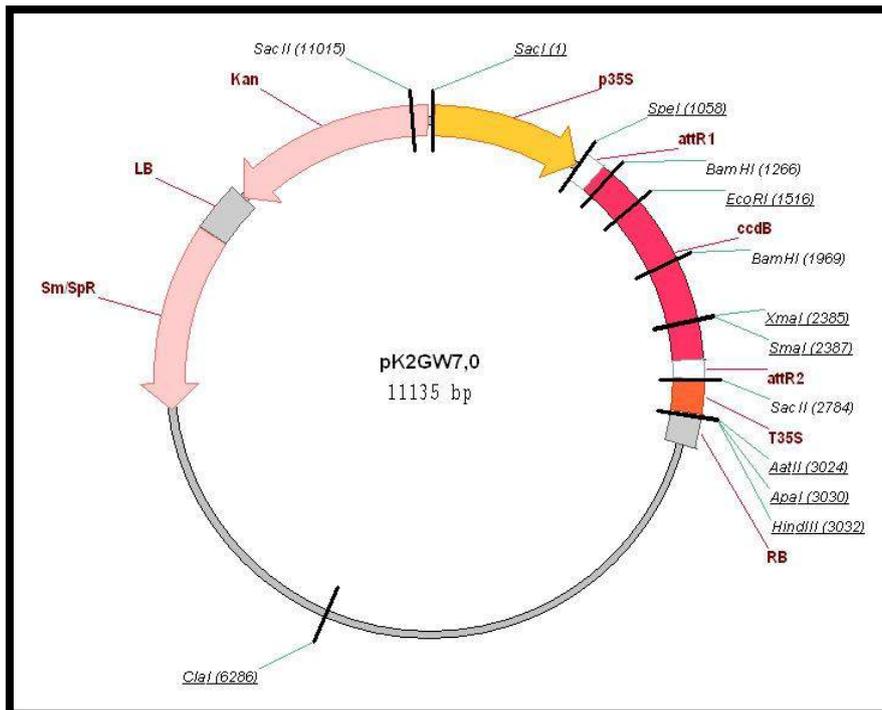


Figura 44 – Esquema demonstrando o mapa do vetor binário de expressão pK2GW7.

Após amplificação o fragmento contendo as regiões *attR* e *ccdB* do vetor pK2WG7, foi purificado em gel de agarose 1% utilizando kit “Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification” (GE Healthcare) e clonado no cDNA 2 modificado, nos sítios de clonagem para *Ascl* e *Pacl*. Este clone gera o vetor de destino pelo sistema Gateway baseado no cDNA2 do CMV (Figura 45).

E. coli competentes para eletroporação (cepa DB 3.1) foram transformadas com o clone obtido de *attR* e *ccdB* no cDNA2 modificado, utilizando o equipamento Gene Pulser II (BioRad). Os clones foram selecionados em meio LB (Sambrook *et al.*, 1989) com canamicina (100 µg/ml), sendo então realizada a extração dos plasmídeos com kit de purificação “PureLink™ Quick Plasmid Miniprep” (Invitrogen), conforme protocolo do fabricante. A amostra foi enviada para sequenciamento para confirmação da presença das regiões de recombinação (*attR* 1 e *attR* 2) e do *ccdB*.

Após confirmação por sequenciamento, um clone de cDNA2 contendo *ccdB* foi transformado em *A. tumefaciens* GV 3101, e os clones gerados por esta transformação foram confirmados por PCR de colônia.

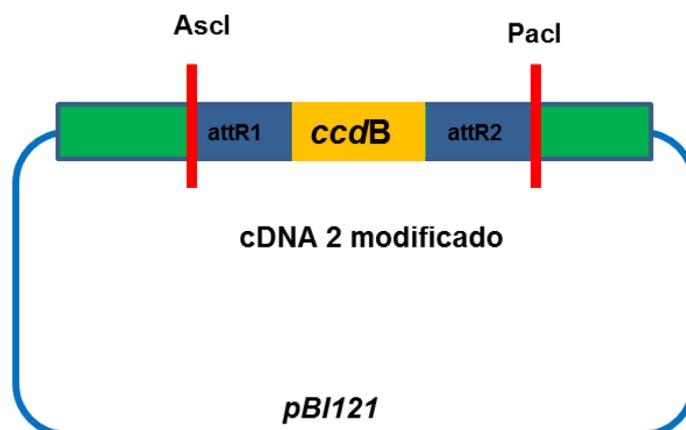


Figura 45 – Esquema demonstrando a construção do vetor de destino baseado no cDNA2 do CMV. As regiões de recombinação *attR1* e *attR2* (azul) com o *ccdB* (amarelo) foram clonadas no cDNA2 modificado (verde) nos sítios de *AscI* e *PacI* (vermelho), formando assim o vetor de destino para o sistema de Gateway baseado no cDNA2 do CMV.

4.2- Modificação do gene de resistência do vetor de entrada pENTR 2B

O vetor de entrada do sistema Gateway (Invitrogen) utilizado neste estudo é o pENTR 2B (Figura 46). Este vetor apresenta como gene de resistência a canamicina, essa característica é um problema, pois o vetor de destino baseado no cDNA2 do CMV está no vetor binário pBI 121 que também apresenta o mesmo gene de resistência. O problema é que após a recombinação, não tem como diferenciar quais são os clones que contem o gene no vetor de expressão (*attB*) e os clones que se formaram do produto da reação (*attP*), pois ambos foram selecionados pelo mesmo gene de resistência a canamicina.

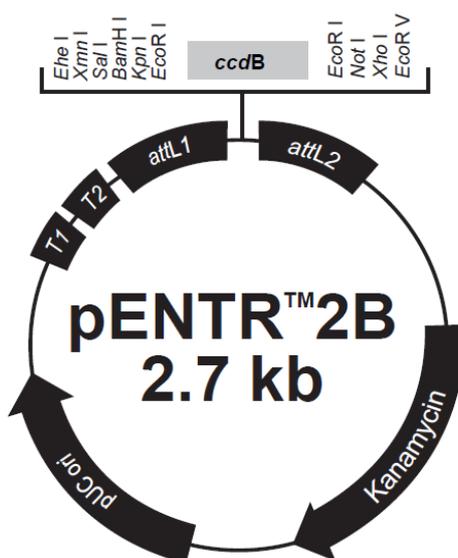


Figura 46- Esquema representando o vetor de entrada do sistema Gateway(Invitrogen) pENTR 2B. Fonte: Invitrogen Life Technologies.

No intuito de resolver este problema, a estratégia utilizada foi mudar o gene de resistência do pENTR 2B de canamicina para ampicilina, criando o vetor pENTR 2B Amp^R (Figura 47).

Com este propósito, o gene da ampicilina do vetor pBluescript foi amplificado por PCR utilizando a enzima termoestável *Phusion* High-Fidelity DNA polymerase (Thermo Scientific) seguindo protocolo preconizado pelo fabricante. Os *primers* utilizados para esta reação foram: Amp-For: 5' – TAC ATT CAA ATA TGT ATC CGC TCA TG -3' e Amp-Rev: 5' – TCA CGT TAA GGG ATT TTG GTC -3'.

Para remover o gene da canamicina, o vetor pENTR 2B foi amplificado por PCR utilizando a enzima termoestável *Phusion* High-Fidelity DNA polymerase (Thermo Scientific) seguindo protocolo preconizado pelo fabricante. Os *primers* utilizados para esta reação foram: pENTR 2B Amp For: 5' – CCC CGT AGA AAA GAT CAA AGC -3' e pENTR 2B Amp Rev: 5' – GTG CAA TGT AAC ATC AGA GAT TTT -3' (ver Figura 52 B nos resultados).

Após amplificação os fragmentos do gene da ampicilina e do gene de pENTR 2B sem canamicina foram purificados utilizando o Kit Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification (GE Healthcare).

O fragmento purificado correspondente ao gene da ampicilina foi submetido à fosforilação pela enzima T4 Polynucleotide Kinase “PNK” (NEB), seguindo protocolo preconizado pelo fabricante.

Uma vez fosforilado, o gene de ampicilina foi clonado no vetor pENTR 2B formando o vetor pENTR 2B Amp^R (Figura 47). *E. coli* competentes para eletroporação (cepa DB 3.1) foram transformadas com o clone obtido desta construção, utilizando o equipamento Gene Pulser II (BioRad). Uma vez selecionados os clones em meio LB (Sambrook *et al.*, 1989) com ampicilina (100 µg/ml), foi realizada a extração dos plasmídeos com kit de purificação “PureLinkTM Quick Plasmid Miniprep” (Invitrogen), conforme protocolo do fabricante, e a amostra enviada para sequenciamento para confirmação da presença do gene de resistência à ampicilina no vetor pENTR 2B.

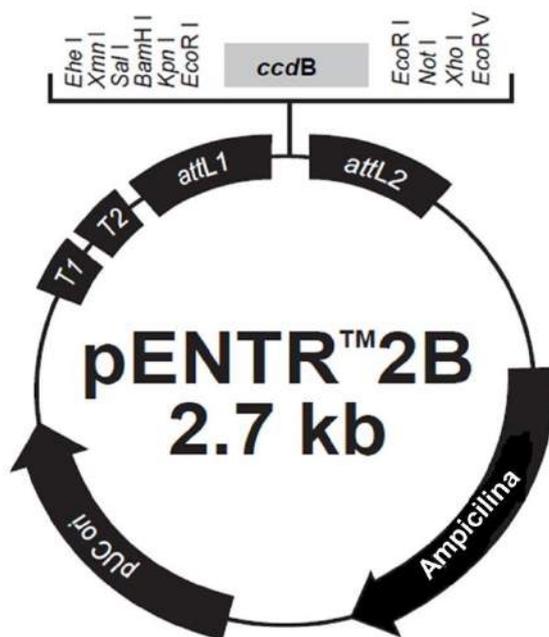


Figura 47- Esquema do vetor de entrada pENTR 2B Amp^R. O esquema demonstra que a única modificação feita no vetor foi a troca do gene de resistência de canamicina para ampicilina. Fonte: Modificado de Invitrogen Life Technologies.

4.3- Agroinfiltração do vetor tripartido baseado no CMV

Para testar se o vetor de destino baseado no cDNA2 do CMV produz sintomas característicos deste vírus em *N. benthamiana*, os clones em *A. tumefaciens* do cDNA 1 e 3 originais e o clone de *A. tumefaciens* contendo o vetor de destino baseado no cDNA2 do CMV foram coinfiltados em *N. benthamiana* de aproximadamente seis semanas de vida (Figura 48). O protocolo de agroinfiltração foi o mesmo utilizado no tópico 4.3 do capítulo III.

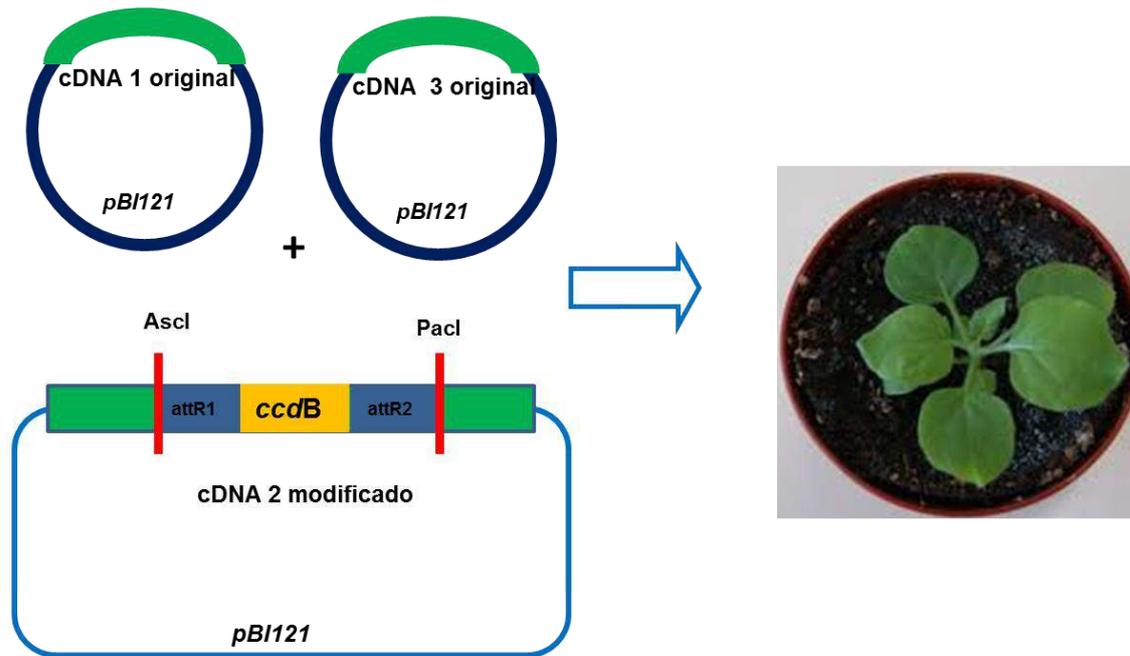


Figura 48- Esquema demonstrando os três clones contendo o cDNA 1 e 3 originais e o vetor de destino baseado no cDNA2 modificado do CMV. As três construções em *A. tumefaciens* GV3101 foram coinfiltradas em *N.benthamiana* para testar a infectividade do vetor de destino baseado no CMV.

Foram testados três clones diferentes (clones 35, 39 e 40) do vetor de destino baseado no cDNA2 modificado. Portanto foram agroinfiltradas um total de 4 plantas, uma para controle positivo (vetor de CMV original) e as outras três plantas para os respectivos clones do vetor de destino.

Sete dias após infiltração (7 dpi) as plantas agroinfiltradas com o vetor de destino baseado no cDNA2 modificado do CMV foram analisadas quanto a presença dos sintomas característicos de infecção pelo CMV. Para análise da presença do vírus, foi realizado ensaio de Dot Elisa utilizando anticorpo contra a capa proteica do vírus (anti-CMV). Foram colhidas amostras de folhas agroinfiltradas e de folhas que não foram agroinfiltradas, mas que apresentavam sintomas de infecção (folhas infectadas). Como controle positivo foi utilizado folhas de *N. benthamiana* agroinfiltrada com vetor CMV original e como controle negativo folhas de *N.benthamiana* saudáveis. O Dot Elisa foi realizado seguindo o mesmo protocolo do tópico 4.3 do capítulo III.

4.4- Amplificação e clonagem do gene PDS no vetor de entrada pENTR 2B Amp^R e posterior clonagem no vetor de destino

A sequência gênica do PDS foi obtida a partir de mRNA do gene phytoene desaturase (PDS) da *N. benthamiana* (Número de acesso: EU165355) na posição do nt 852-557 (antisense).

O gene do PDS foi amplificado por PCR utilizando a enzima termoestável Vent DNA polimerase (NEB) seguindo protocolo preconizado pelo fabricante. Os *primers* foram desenhados para que o gene pudesse ser amplificado de forma complementar (anti-sense) gerando o asPDS. Os *primers* utilizados para esta reação foram: PDS For BamHI antisense: 5' – TAT AGG ATC CAA ATC AAA GCG GCT GAA CTC- 3' e PDS Rev XhoI antisense: 5' – TAT ACT CGA GGA GAT TGT TAT TGC TGG TGC A -3'.

Após amplificação o fragmento de asPDS foi purificado em gel de agarose 1% utilizando kit “Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification” (GE Healthcare) e clonado no vetor de entrada pENTR 2B Amp^R, nos sítios de clonagem para BamHI e XhoI.

O clone obtido de asPDS no pENTR 2B Amp^R foi transformado em células de *E.coli* competentes para eletroporação (cepa DH5α) utilizando o equipamento Gene Pulser II (BioRad). Uma vez selecionados os clones em meio LB (Sambrook *et al*, 1989) com ampicilina (100µg/ml), foi realizada a extração dos plasmídeos com kit de purificação “PureLink™ Quick Plasmid Miniprep” (Invitrogen), conforme protocolo do fabricante, e a amostra enviada para sequenciamento para confirmação da presença do gene asPDS.

Confirmada a presença do gene asPDS no vetor de entrada pENTR 2B Amp^R foi realizada a clonagem no vetor de destino baseado no cDNA2 do CMV, por meio do sistema de Gateway (Invitrogen). O clone contendo pENTR 2B AMPasPDS foi recombinado com o clone contendo o vetor de destino baseado no cDNA2 do CMV numa reação mediada pela enzima LR Clonase (Invitrogen), seguindo o protocolo estabelecido pelo fabricante, formando a construção denominada cDNA2asPDS (Figura 49).

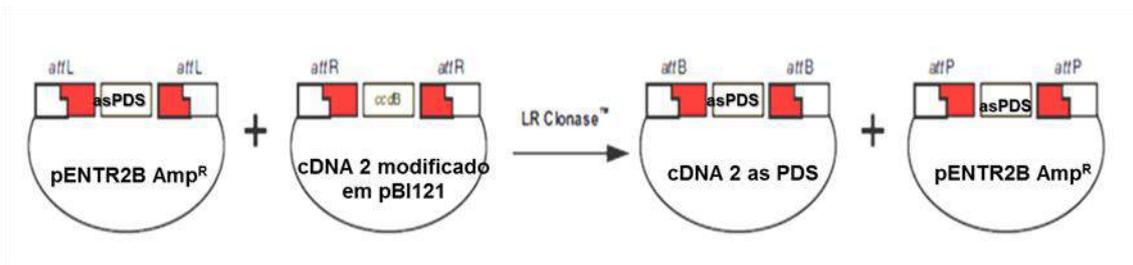


Figura 49- Esquema demonstrando o sistema de recombinação Gateway (Invitrogen). Foi utilizado como vetor de entrada o pENTR 2B Amp^R contendo o gene asPDS, e como vetor de destino o cDNA2 modificado em pBI121 contendo as regiões de recombinação, após recombinação tem-se a construção cDNA2asPDS que será utilizada como VIGS baseado no genoma tripartido do CMV, e o pENTR 2B Amp^R asPDS. Fonte: Modificado de Gateway (Invitrogen) Technology, Catalog nos. 12535-019 and 12535-027.

O produto da recombinação foi transformado em células de *E. coli* competentes para eletroporação (cepa STBL-4) utilizando o equipamento Gene Pulser II (BioRad). Uma vez selecionados os clones em meio LB (Sambrook *et al*, 1989) com canamicina (100 µg/ml), foi realizada a extração dos plasmídeos com kit de purificação “PureLink™ Quick Plasmid Miniprep” (Invitrogen), conforme protocolo do fabricante, e a amostra enviada para sequenciamento para confirmação do gene asPDS.

Após confirmação por sequenciamento, um clone de cDNA2 asPDS foi transformado em *A. tumefaciens* GV 3101, e os clones gerados por esta transformação foram confirmados por PCR de colônia.

4.5- Agroinfiltração do VIGS baseado no genoma tripartido do CMV

No intuito de testar se o vetor baseado no CMV tem a capacidade de atuar como VIGS, foi realizada a coinfiltração das construções do cDNA1 e 3 originais do CMV e da construção cDNA2asPDS em *N. benthamiana* de aproximadamente seis semanas de vida (Figura 50). O protocolo de agroinfiltração foi o mesmo utilizado no tópico 4.3 do capítulo III.

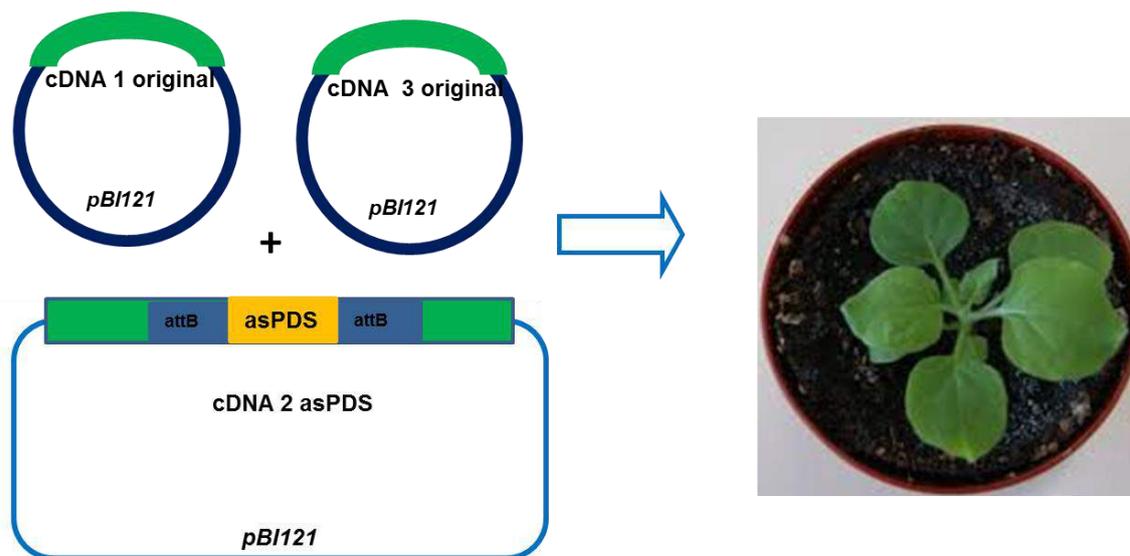


Figura 50- Esquema demonstrando os três clones contendo o cDNA 1 e 3 originais e o vetor de cDNA2asPDS em pBI121. As três construções em *A.tumefaciens* GV3101 foram coinfiltradas em *N.benthamiana* para testar a capacidade do vetor baseado no genoma tripartido do CMV atuar como VIGS.

Após 7 e 15 dpi as plantas agroinfiltradas com a construção cDNA2 asPDS foram observadas quanto a presença de sintomas característicos da infecção pelo CMV e quanto ao silenciamento do gene PDS que deve gerar o fenótipo de cor branca nas folhas.

5- Resultados parciais e discussão

5.1- Construção do vetor de destino baseado no cDNA2 modificado do CMV

Para construir o vetor de destino do sistema Gateway baseado no cDNA2 modificado do CMV, o gene contendo a região de recombinação *attR*- 1 e 2 e *ccdB* do vetor pK2GW7 foi amplificado por PCR, gerando um fragmento de aproximadamente 1,7 kb. O fragmento contendo as regiões de recombinação foi clonado no vetor cDNA2 modificado do CMV formando o vetor de destino baseado no cDNA2 do CMV (Figura 51).

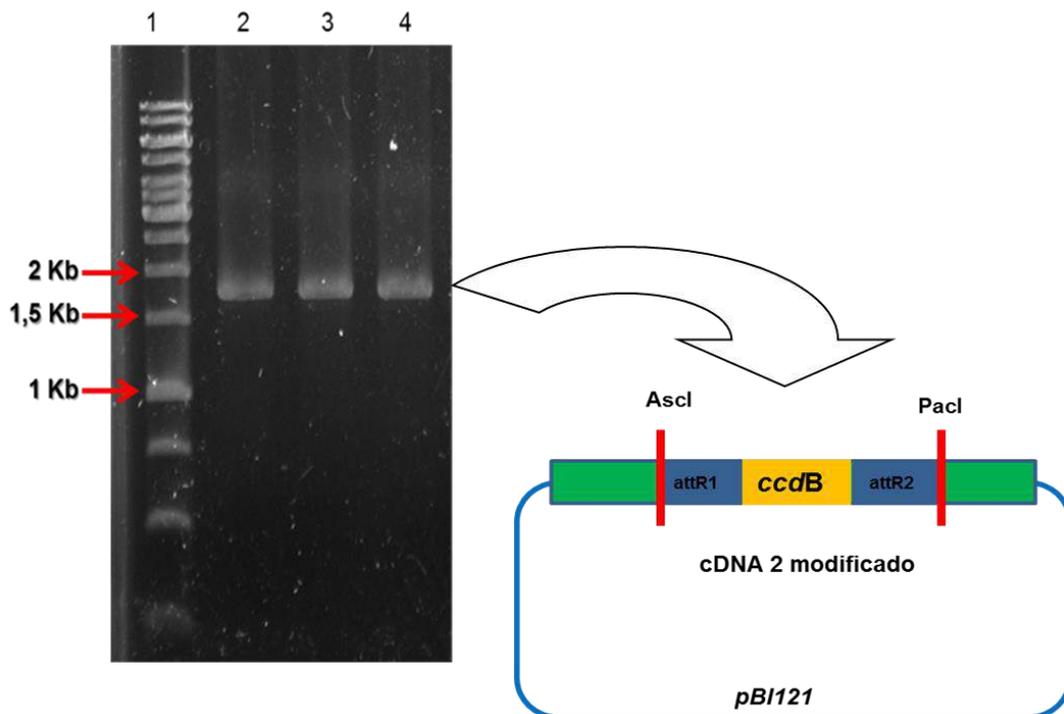


Figura 51- Eletroforese de gel de agarose mostrando amplificação do fragmento contendo as regiões *attR* 1 e 2 e *ccdB* do vetor pK2GW7 e subsequente clonagem no vetor cDNA2 modificado em pBI121, formando o vetor de destino baseado no cDNA2 do CMV. 1- Marcador GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder, (Fermentas), 2, 3 e 4- fragmento do gene *attR* 1 e *attR*2 e *ccdB* – tamanho esperado de 1,7 kb.

É importante ressaltar, que o vetor de destino baseado no cDNA2 do CMV utilizado como VIGS neste trabalho, foi baseado no vetor CMV2A-1 do trabalho de Otagaki *et al.* (2006), como foi relatado no tópico 5.1 do capítulo III. Neste trabalho o vetor tripartido do CMV também foi utilizado como VIGS, os autores utilizaram transcrição *in vitro*, e o sistema de clonagem com sítios de restrição. A diferença para o nosso estudo, é que o nosso vetor utiliza sistema de clonagem pela tecnologia Gateway, além de utilizar o sistema via *A. tumefaciens*. A utilização conjunta de clonagem via Gateway e sistema via *A. tumefaciens* tem como vantagem em relação ao trabalho de Otagaki *et al.* (2006) o fato de serem mecanismos mais rápidos e fáceis de manipulação, além do sistema via *A. tumefaciens* ser menos oneroso que o sistema de transcrição *in vitro*.

Baulcombe (1999) mencionou em seu trabalho que os vírus que possuem supressores de PTGS não são bons candidatos a vetores que funcionam como VIGS. Dentre alguns vírus, ele cita o CMV como não sendo um bom vírus para ser utilizado como VIGS devido à presença da proteína supressora 2b. Entretanto, os trabalhos já relatados pela literatura que

utilizaram o CMV como VIGS (Nagamatsu *et al.*, 2009; Nagamatsu *et al.*, 2007; Otagaki *et al.*, 2006) modificaram o cDNA2 do CMV, mais precisamente a região de 2b gerando uma proteína truncada, este fator não só inibe a ação da proteína 2b como supressora como também minimiza os sintomas produzidos pela infecção viral para que os mesmos não influenciem negativamente no fenótipo que se deseja observar. E em todos os trabalhos supracitados o CMV atuou como um eficiente vetor de indução de silenciamento gênico.

5.2- Modificação do gene de resistência do vetor de entrada – criação do vetor pENTR 2B Amp^R

Para tentar resolver o problema do gene comum de resistência dos vetores de entrada e destino do nosso trabalho, o gene de resistência a canamicina do vetor pENTR 2B foi modificado para o gene de resistência a ampicilina, criando o vetor pENTR 2B Amp^R. Para isso, o gene da ampicilina do vetor pBluescript foi amplicificado por PCR (Fig 52 A) amostras de 2 até 5 – produzindo um fragmento de aproximadamente 1 Kb, e o vetor pENTR 2B foi amplificado por PCR com primers específicos para remover o gene da canamicina (Figura 52 A e B) amostras de 6 até 8 – produzindo um fragmento de aproximadamente 2 Kb. Após amplificação de ambos os fragmentos, o gene da ampicilina foi ligado ao vetor pENTR 2B sem a canamicina, formando o vetor pENTR 2B Amp^R.

O intuito da criação do vetor pENTR 2B Amp^R é melhorar a eficiência da seleção dos clones gerados pela recombinação com o vetor de destino baseado no CMV, e também como ferramenta para outros trabalhos do nosso grupo que necessitam utilizar vetores de destino que possuem a canamicina como gene de resistência.

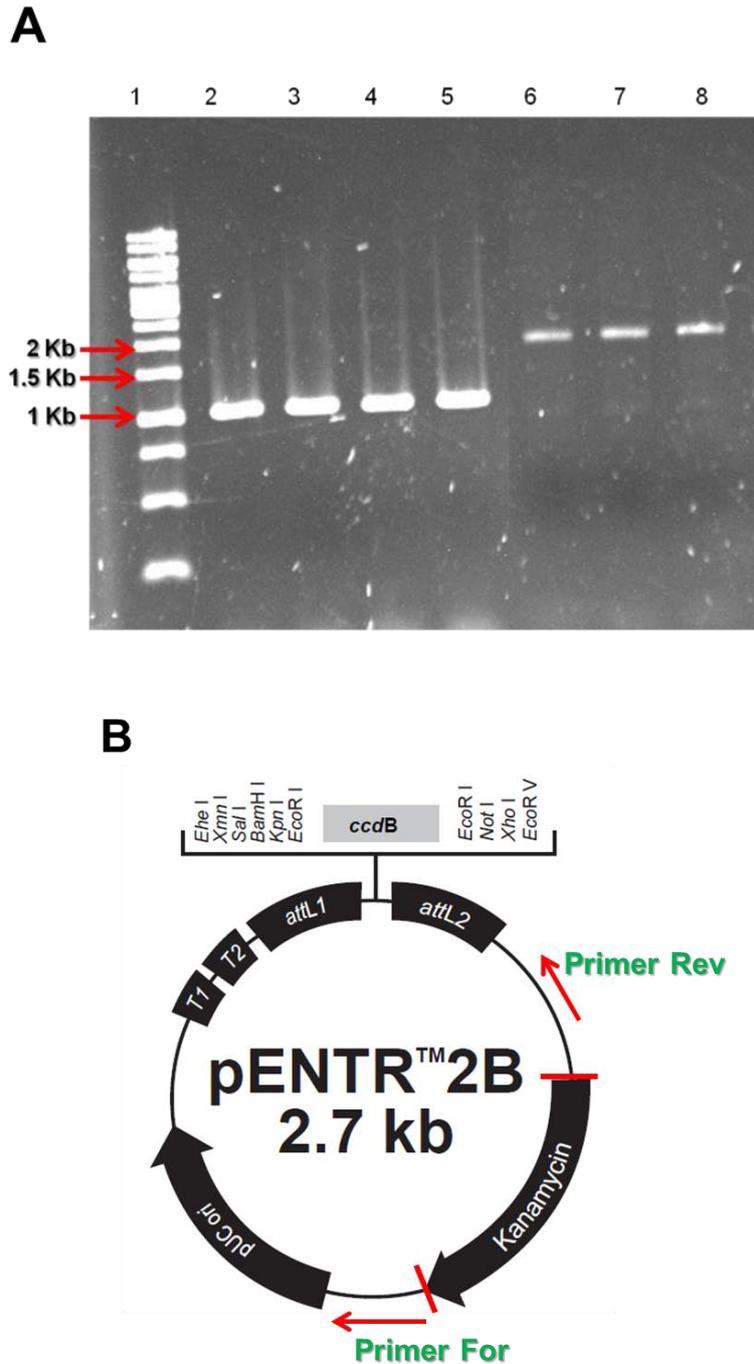


Figura 52 – Eletroforese em gel de agarose dos fragmentos do gene da ampicilina e de pENTR2B sem canamicina, e esquema demonstrando como foi realizada a PCR do pENTR2B. A- eletrofores em gel de agarose: 1- Marcador GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder, (Fermentas), 2 até 5 – fragmento do gene da ampicilina com tamanho esperado de aproximadamente 1 Kb, 6 até 8 – fragmento do gene de pENTR 2b sem canamicina, tamanho esperado de aproximadamente 2 Kb. B- esquema demonstrando como foi realizada a PCR do vetor pENTR 2B com os primers específicos para remover o gene da canamicina.

5.3- Teste da infectividade do vetor de destino do sistema Gateway baseado no cDNA2 do CMV

Após sete dias da agroinfiltração do vetor tripartido do CMV contendo o vetor de destino baseado no cDNA2 modificado, foram observados sintomas característicos de infecção pelo CMV em *N. benthamiana* (Figura 53) Os sintomas foram observados tanto em folhas que foram agroinfiltradas (Figura 54 – folha B) como em folhas que não foram agroinfiltradas (Figura 54 – folha A).



Figura 53- Sintomas característicos de infecção pelo CMV em *N. benthamiana*. Sintoma de clorose e deformação foliar de *N. benthamiana* produzido pelo vetor tripartido do CMV contendo o vetor de destino baseado no cDNA2 após 7 dpi.



Figura 54 – Folhas de *N. benthamiana* agroinfiltrada e infectada com o vetor tripartido do CMV contendo o vetor de destino baseado no cDNA2 apresentando sintomas característicos de infecção pelo vírus. A- folha que não foi agroinfiltrada apresentando sintoma de clorose e deformação foliar (folha infectada); B- folha agroinfiltrada apresentando os mesmos sintomas; C- folha sadia de *N. benthamiana* (controle negativo).

Para confirmar a presença de infecção pelo CMV dos clones do vetor de destino baseado no cDNA2, foi realizado o Dot-Elisa utilizando anticorpo anti-CMV em folhas que foram agroinfiltradas e folhas infectadas de três clones diferentes do vetor de destino baseado no cDNA2 (clones 35, 39 e 40) (Figura 55).

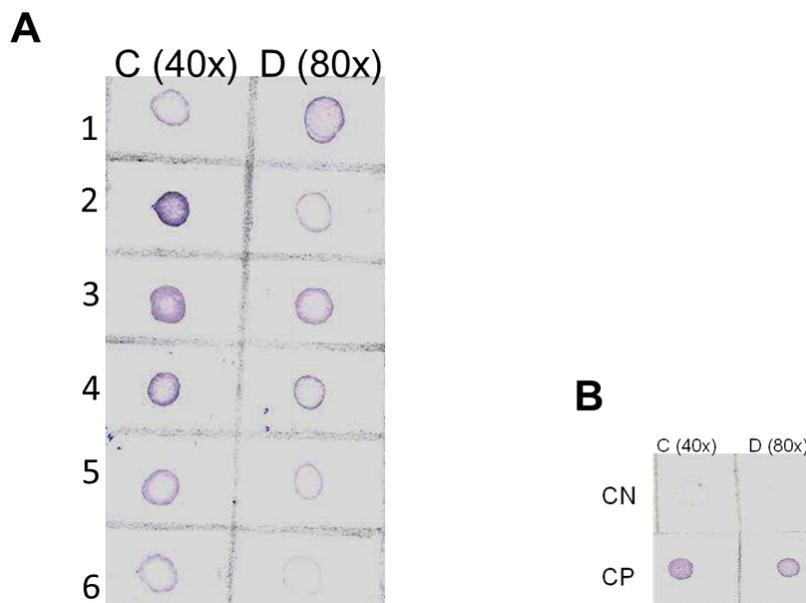


Figura 55- Dot Elisa de extrato de *N. benthamiana* das amostras coinfiltradas com o vetor de destino baseado no cDNA2 do CMV. Foram utilizadas 0,5 g de folha de cada amostra, maceradas com PBS1X. A: 1- folha infectada com o clone 35 do vetor de destino baseado no cDNA2 ; 2- folha agroinfiltrada com o clone 35 do vetor de destino baseado no cDNA2; 3- folha infectada com o clone 39 do vetor de destino baseado no cDNA2; 4- folha agroinfiltrada com clone 39 do vetor de destino baseado no cDNA2; 5- folha infectada com o clone 40 do vetor de destino baseado no cDNA2; 6- folha agroinfiltrada com o clone 40 do vetor de destino baseado no cDNA2. B : CN- controle negativo, folha sadia de *N. benthamiana*; CP- controle positivo – vetor viral baseado no CMV original. C(40x) – amostra concentrada 40X; D(80x)- amostra diluída 80X.

Os resultados obtidos indicam que o vetor de destino baseado no cDNA2 do CMV quando coinfiltrado com os cDNAs 1 e 3 originais do vírus produzem sintomas característicos de infecção viral em *N. benthamiana* após 7 dpi. Os sintomas não se restringem somente a região agroinfiltrada como também em folhas que não foram agroinfiltradas, concluindo que o vírus está infectando a planta de forma sistêmica.

5.4 - Amplificação e clonagem do gene PDS no vetor de destino baseado no cDNA2 do CMV – cDNA2 asPDS

O gene do fitoeno desaturase (PDS) participa da via de biossíntese de carotenoides, o silenciamento deste gene causa a deficiência de carotenoides e leva a foto oxidação da clorofila causando descoloração nas folhas silenciadas (Kumagai *et al.*,1995). O gene de PDS foi amplificado por PCR produzindo um fragmento de 300 pb (Figura 56). Os *primers* foram desenhados de maneira que o gene fosse amplificado de forma complementar formando o asPDS. Segundo Gray *et al.* (1992) vários trabalhos estão utilizando os genes no sentido complementar quando querem super expressar as enzimas de fitoeno desaturase, e que o RNA antisense consegue suprimir a expressão desta proteína, porém o mecanismo como isso ocorre ainda não é totalmente conhecido. Segundo Kumagai *et al.* (1995), no núcleo o RNA antisense interfere diretamente na transcrição ou forma complexos com os heterogêneos RNAs nucleares (pre-mRNA) e no citoplasma ele pode formar uma fita dupla com o mRNA complementar e prevenir a tradução do mRNA em proteína.

Apesar de muitos trabalhos que utilizam VIGS trabalharem com o gene no sentido complementar, não há pesquisas comprovando que o uso do RNA complementar (antisense) é melhor que o RNA senso. No trabalho de Ruiz *et al.* (1998), o gene PDS foi clonado no vetor PVX nos dois sentidos (sendo e antisense) para serem utilizados como VIGS. Os resultados demonstraram que ambos promoveram silenciamento, e que, portanto, a orientação não influenciou diretamente na atuação do PVX como VIGS.

Após amplificação o gene de asPDS foi clonado no vetor de entrada pENTR 2B Amp^R para recombinar com o vetor de destino baseado no cDNA2 do CMV (Figura 48 na metodologia).

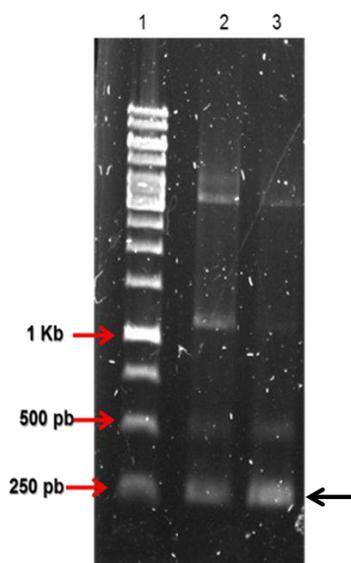


Figura 56- Eletroforese em gel de agarose demonstrando os fragmentos de asPDS. 1- Marcador GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder, (Fermentas), 2 e 3- fragmento da amplificação do gene de asPDS com 300 pb e fragmentos inespecíficos gerados por erros durante a amplificação.

O clone cDNA2 asPDS obtido pela recombinação, foi sequenciado e os dados produzidos foram organizados e analisados pelo programa Staden Package (Staden *et al.*, 1996), confirmando a presença do gene asPDS no vetor de destino baseado no cDNA2 do CMV.

O clone de cDNA2 asPDS foi coinfiltrado com os cDNAs 1 e 3 originais do CMV em *N. benthamiana* e após 15 dpi foram observados sintomas característicos de infecção pelo CMV (Figura 57 A), porém o fenótipo esperado pela super expressão do gene asPDS utilizando o vetor viral tripartido baseado no CMV não foi observado, levantando a hipótese de que o vetor não funcionou como um VIGS (Figura 57 B).

A**B**

Figura 57- *N. benthamiana* e folhas de *N. benthamiana* agroinfiltradas com o vetor tripartido do CMV contendo o cDNA2 asPDS apresentando sintomas característicos de infecção pelo CMV. A- planta mostrando sintomas de clorose, mosaico e deformação foliar. B- folhas que foram agroinfiltradas com o vetor contendo cDNA2 asPDS demonstrando clorose, porém não apresentam o fenótipo esperado pela super expressão de PDS.

Segundo Velásquez *et al.* (2009) e Lu *et al.* (2003), o silenciamento nunca ocorre com 100% de eficiência podendo influenciar no resultado que é esperado, um resultado negativo não quer dizer necessariamente que o vetor não promoveu o silenciamento, mas que restaram proteínas não silenciadas suficientes para promover o fenótipo que se desejava silenciar. Uma hipótese, portanto, para o nosso resultado seria uma baixa porcentagem de silenciamento de PDS, permitindo que a célula produza a enzima de forma

suficiente para que a folha continue produzindo clorofila. Portanto, os autores colocam que é importante quantificar a eficiência de silenciamento dos genes alvos, seja por RT-PCR ou por *Northern blot*.

No trabalho de Otagaki *et al.*(2006), cujo cDNA2 serviu de base para a confecção do nosso trabalho, o teste do vetor baseado no CMV como VIGS ocorreu utilizando o gene repórter GFP em plantas transgênicas linha 16c. Após 12 dpi houve a indução do silenciamento da expressão de GFP nas plantas observadas com luz ultravioleta, e a análise por *Northern blot* confirmou a redução na produção do mRNA do GFP. Na análise das plantas com a luz ultravioleta após 6 dpi não foi detectado o silenciamento da expressão de GFP, porém a análise por *Northern blot* demonstrou redução do mRNA do GFP.

No trabalho de Ruiz *et al.* (1998) o gene PDS foi clonado no vetor PVX para ser utilizado como VIGS e os autores observaram que houve uma redução do mRNA do PDS tanto em locais que apresentaram o fenótipo de branqueamento dos tecidos foliares como em locais que não apresentaram este fenótipo, portanto, os autores concluíram que a visualização de áreas esbranquiçadas na folha não reflete completamente a capacidade do vetor em gerar o silenciamento.

No nosso trabalho não foi realizado o *Northern blot* para averiguar a presença do mRNA de PDS, foi observado somente o fenótipo e por meio deste foi levantada a hipótese de que o vetor baseado no CMV não funcionou como VIGS. Porém novos testes, incluindo a realização do *Northern blot* devem ser realizados para confirmar esta hipótese. A criação do vetor baseado no CMV como VIGS ainda está em fase de testes, e para o encerramento do trabalho algumas metas devem ser concluídas.

6- Metas e perspectivas

- ✓ Testar o gene asPDS novamente no vetor baseado no CMV e realizar *northern blot* das folhas agroinfiltradas;
- ✓ Testar o gene asPDS em um vetor de silenciamento gênico controle – *Tobacco rattle virus* (TRV);
- ✓ Testar o vetor tripartido do CMV como VIGS utilizando o gene repórter mGFP em plantas transgênicas 16c.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adams, I. P.; Glover, R. H.; Monger, W. A.; Mumford, R.; Jackeviciene, E.; Navalinskiene, M.; Samuitiene, M.; Boonham, N. Next-generation sequencing and metagenomic analysis: A universal diagnostic tool in plant virology. *Molecular Plant Pathology*, v. 10, p. 537–545, 2009.

Alvarez, D. E.; Lella Ezcurra, A. L. D.; Fucito, S.; Gammarnik, A. V. Role of RNA structures present at the 3'UTR of dengue virus on translation, RNA synthesis, and viral replication. *Virology*, v.339, p. 200-212, 2005.

Anandalakshmi, R.; Pruss, G.J.; Ge, X.; Marathe, R.; Mallory, A. C.; Smith, T. H.; Vance, V. B. A viral suppressor of gene silencing in plants. *Proceedings of National Academy of Science*, v. 95, p. 13079-13084, 1998.

AnandaRao, R.; Swaminathan, S.; Fernando, S. A custom-designed recombinant multiepitope protein as a dengue diagnostic reagent. *Protein Expression and Purification*, v. 41, p. 136-147, 2005.

AnandaRao, R.; Swaminathan, S.; Fernando, S.; Jana, A. M.; Khanna, N. Recombinant multiepitope protein for early detection of Dengue infections. *Clinical and Vaccine Immunology*, v. 13, p. 59–67, 2006.

Ausar, S. F; Foubert, T. R; Hudson, M. H; Vedvick, T. S; Middaugh, C.S. Conformational stability and disassembly of Norwalk virus-like particles effect of pH and temperature. *Journal of Biological Chemistry*, v. 281, p. 19478-88, 2006.

Bakker, H.; Bardor, M.; Molthoff, J. W.; Gomord, V.; Elbers, I.; Stevens, L. H.; Jordi, W.; Lommen, A.; Faye, L.; Lerouge, P.; Bosh, D. Galactose-extended glycans of antibodies produced by transgenic plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v.98, p. 2899-2904, 2001.

Barbosa, J. C; Barreto, S. S; Inoue-Nagata, A. K; Reis, M. S; Firmino A. C; Bergamin Filho, A; Rezende, J. A. M. Natural infection of *Nicandra physaloides* by Tomato severe rugose virus in Brazil. *Journal of General Plant Pathology*, v. 75, p. 440–443, 2009.

Bardor, M., Faveeuw, C., Fitchette, A.C., Gilbert, D., Galas, L., Trottein, F., Faye, L. and Lerouge, P. Immunoreactivity in mammals of two typical plant glycol-epitopes: core α (1,3)-fucose and core xylose. *Glycobiology*, v.13, p.427-434, 2003

Barta, A.; Sommergruber, K.; Thompson, D.; Hartmuth, K.; Matzke, M.A.; Matzke A.J.M. The expression of a nopaline synthase - human growth hormone chimaeric gene in transformed tobacco and sunflower callus tissue. *Plant Molecular Biology*, v.6, p.347-357, 1986.

Baric, R.S.; Yount, B.; Lindesmith, L.; Harrington, P.R.; Greene, S.R.; Tseng, F.-C.; Davis, N.; Johnston, R.E.; Klapper, D.G.; Moe, C.L. Expression and self-assembly of Norwalk virus capsid protein from Venezuelan Equine Encephalitis Virus replicons. *Journal of Virology*, v. 76, p.3023-3030, 2002.

Baulcombe, D. C. Fast forward genetics based on virus-induced gene silencing. *Current Opinion in Plant Biology*, v. 2, p. 109-113, 1999.

Baulcombe, D. C. RNA silencing in plants. *Nature*, v. 431, p. 356–363, 2004.

Beasley, D. W.; Aaskov, J. G. Epitopes on the dengue 1 virus envelope protein recognized by neutralizing IgM monoclonal antibodies. *Virology*, v. 279, p. 447-458, 2001.

Belknap, W.R; Rockhold, D.R; McCue, K.F. (2008) pBINPLUS / ARS: an improved plant transformation vector based on pBINPLUS. *Biotechniques*, v. 44, p.753-756, 2008.

Benenson, A.S. *Control of Communicable Diseases Manual*. Washington, DC: APHA Edition, p. 200-201, 1995.

Bereciartu, A.; Bok. K.; Gómez, J. Identification of viral agents causing gastroenteritis among children in Buenos Aires, Argentina. *Journal of Clinical Virology*, v. 25, p.197-203, 2002.

Bertolotti-Ciarlet, A; Crawford, S.E; Hutson, A.M; Estes, M.K .The 3' end of Norwalk virus mRNA contains determinants that regulate the expression and

stability of the viral capsid protein VP1: a novel function for the VP2 protein. *Journal of Virology*, v. 77, p. 11603- 11615, 2003.

Bivalkar-Mehla, S.; Vakharia, J.; Mehla, R.; Abreha, M.; Kanwar, J.R; Tikoo, A.; Chauhan, A. Viral RNA silencing suppressors (RSS): novel strategy of viruses to ablate the host RNA interference (RNAi) defense system. *Virus Research*, v. 155, p. 1-9, 2011.

Blazevic, V.; Lappalainen, S.; Nurminen, K.; Huhti, L., Vesikari, T . Norovirus VLPs and rotavirus VP6 protein as combined vaccine for childhood gastroenteritis. *Vaccine*, v. 29, p. 8126–8133, 2011.

Borges, A.M.T; Cardoso, D.D.P. Calicivirus humanos. *Revista de Patologia Tropical*, 34:17-26, 2005.

Boehm, R. Bioproduction of therapeutic proteins in the 21st century and the role of plants and plant cells as production platforms. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 1102, p. 121-134, 2007.

Bull, R.A.; Tanaka, M.M.; White, P.A. Norovirus recombination. *Journal of General Virology*, v. 88, p. 3347–3359, 2007.

Burgyán, J.; Havelda, Z. Viral suppressors of RNA silencing. *Trends in Plant Science*, v. 16, p. 265-272, 2011.

Cañizares, M.C.; Nicholson, L.; Lomonosof, G.P. Use of viral vectors for vaccine production in plants. *Immunology and Cell Biology*, v. 83, p.263-270, 2005.

Choi, I. R.; Stenger, D. C.; French, R. A plant virus vector for systemic expression of foreign genes in cereals. *Plant Journal*, v. 23, p. 547- 555, 2000.

Chuang, Y-C.; Wang, S-Y.; Lin, Y-S.; Chen, H-R.; Yeh, T-M. Re-evaluation of the pathogenic roles of nonstructural protein 1 and its antibodies during dengue virus infection. *Journal of Biomedical Science*, v. 20, p. 42- 49, 2013.

Circelli, P.; Domini, M.; Villani, M.E; Benvenuto, E.; Marusic, C. Efficient *Agrobacterium*-based transient expression system for the production of biopharmaceuticals in plants. *Bioengineered Bugs*, v. 1, p. 221-224, 2010.

Cubitti, W.D.; McSwiggan, D.A.; Moore, W. Winter vomiting disease caused by calicivirus. *Journal of Clinical Pathology*, v. 32. P. 786-793, 1979.

Daniell, H.; Singh, N.D.; Mason, H.; Streatfield, S.J. Plant made vaccine antigens and biopharmaceuticals. *Trends of Plant Science*, v. 14, p. 669–679, 2009.

Dawson, W. O.; Lewandowski, D. J.; Hilf, M. E.; Bubrick, P.; Raffo, A. J.; Shaw, J. J.; Grantham, G. L.; Desjardins, P. R. A tobacco mosaic virus-hybrid expresses and loses an added gene. *Virology*, v. 172, p. 285- 292, 1989.

Del Toro, F.; Tenllado, F.; Chung, B-N.; Canto, T. A procedure for the transient expression of genes by agroinfiltration above the permissive threshold to study temperature-sensitive processes in plant–pathogen interactions. *Molecular Plant Pathology*, 2014, doi: 10.1111/mpp.12136.

Edwardson, J. R.; Christie, R. G. Cucumoviruses. In: *CRC Handbook of Viruses Infecting Legumes*. CRC Press, Boca Raton, pp. 293–31, 1991.

Engelen, V.; Molthoff, F.A.; Conner, A.J.; Nap, J.P.; Pereira, A.; Stiekema, W.J. pBINPLUS- an improved plant transformation vector based on pBIN19. *Transgenic Research*, v. 4, p. 288-290,1995.

Falconar, A. K. Identification of an epitope on the dengue virus membrane (M) protein defined by cross-protective monoclonal antibodies: design of an improved epitope sequence based on common determinants present in both envelope (E and M) proteins. *Archives of Virology*, v. 144, p. 2313-2330, 1999.

Fioretti, J.M.; Bello, G.; Rocha, M.S.; Victoria, M.; Leite, J.P.G.; Miagostovich, M.P. Temporal Dynamics of Norovirus GII.4 Variants in Brazil between 2004 and 2012. *Plos One*, v. 9, p. 1-7, 2014.

Fioretti, J.M.; Ferreira, M.S.R.; Victoria, M.; Vieira, C.B.; Xavier, M.P.T.P.; Leite, J.P.G.; Miagostovich, M.P. Genetic diversity of noroviruses in Brazil. *Memorias Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, v.106, p. 942-947, 2011.

Fisher, R.; Drossard, J.; Commandeur U.; Schillberg, S.; Emans, N. Toward molecular farming in the future: moving from diagnostic protein and antibody

production in microbes to plants. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, v. 30, p. 101-108, 1999.

Fujiki, M.; Kaczmarczyk, J. F.; Yusibov, V.; Rabindran, S. Development of a new cucumber mosaic virus-based plant expression vector with truncated 3a movement protein. *Virology*, v. 381, p. 136- 142, 2008.

Fukuzawa, N.; Ishihara, T.; Itchoda, N.; Tabayashi, N.; Kataoka, C.; Masuta, C.; Matsumura, T. Risk-managed production of bioactive recombinant proteins using a novel plant virus vector with a helper plant to complement viral systemic movement. *Plant Biotechnology Journal*, v. 9, p. 38-49, 2011.

Gellért, Á.; Salánki, K.; Tombácz, K.; Tuboly, T.; Balázs, E. A Cucumber mosaic virus based expression system for the production of porcine circovirus specific vaccines. *Plos One*, v. 7, p.1-8, 2012.

Glass, R.I.; Noel, J.; Ando, T.; Fankhauser, R.; Belliot, G.; Mounts, A.; Parashar, U.D.; Bresee, J.S.; Monroe, S.S. The Epidemiology of Enteric Caliciviruses from Humans: a reassessment using new diagnostics. *The Journal of Infectious Disease*, v. 181, p. 254-261, 2000.

Godge, M. R.; Purkayastha, A.; Dasgputa, I.; Kumar, P. P. Virus-induced gene silencing for functional analysis of selected genes. *Plant Cell Reports*, v. 27, p. 209-219, 2008.

Gomes, A. L. d. V. Expressão de genes relacionados com a indução da resposta imune inata da dengue: implicações no prognóstico. 2011, 121f. Tese (Doutorado em Saude Publica do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães) – Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2011.

Goncalvez, A. P.; Purcell, R. H.; Lai, C-J. Epitope determinants of a chimpanzee Fab Antibody that efficiently cross-neutralizes Dengue type 1 and type 2 viruses map to inside and in close proximity to fusion loop of the Dengue type 2 virus envelope glycoprotein. *Journal of Virology*, v. 78, p. 12919–12928, 2004.

Gray, J., Picton, S., Shabbeer, J., Schuch, W. & Grierson, D. Molecular biology of fruit ripening and its manipulation with antisense genes. *Plant Molecular Biology*, v. 19, p. 69-87, 1992.

Gromowski, G. D.; Barrett, N. D.; Barrett, A. D. Characterization of dengue virus complex-specific neutralizing epitopes on envelope protein domain III of dengue 2 virus. *Journal of Virology*, v. 82, p. 8828–8837, 2008.

Guix, S.; Asanaka, M.; Katayama, K.; Crawford, S.E; Neill, F.H.; Atmar, R.L.; Estes, M.K. Norwalk Virus RNA Is Infectious in Mammalian Cells. *Journal of Virology*, v. 82, p. 12238–12248, 2007.

Guzman, M. G.; Halstead, S. B.; Artsob, H.; Buchy, P.; Farrar, J.; Gubler, D. J.; Hunsperger, E.; Kroeger, A.; Margolis, H. S.; Matínez, E.; Nathan, M. B.; Pelegrino, J. L.; Simmons, C.; Yoksan, S.; Peeling, R. W. Dengue: a continuing global threat. *Nature Reviews Microbiology*, p. 7-16, 2010.

Gyader, F.S; Saux J.C; Ambert-Balay, K.; Krol, J.; Serais, O.; Parnaudeau, S.; Giraudon, H.; Delmas G.; Pommepeuy, M.; Pothier, P., Atmar, R.L. Aichi virus, norovirus, astrovirus, enterovirus, and rotavirus involved in clinical cases from a French oyster-related gastroenteritis outbreak. *Journal Clinical Microbiology*, v. 46, p. 4011-4017, 2008.

Hayes, R. J.; Buck, K. W. Infectious cucumber mosaic virus RNA transcribed *in vitro* from clones obtained from cDNA amplified using the polymerase chain reaction. *Journal of General Virology*, v. 71, p. 2503- 2508, 1990.

Hamilton, A.; Voinnet, O.; Chappell, L.; Baulcombe, D. Two classes of short interfering RNA in RNA silencing. *The EMBO Journal*, v. 21, p. 4671– 4679, 2002.

Hamilton, A. J, Baulcombe, D. C. A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science*, v. 286, p. 950–952, 1999.

Hardy, M.E. Norovirus protein structure and function. *FEMS Microbiology Letters*, v. 253, p. 1-8, 2005.

Haseloff, J.; Siemering, K.R.; Prasher, D.C.; Hodge, S. Removal of a cryptic intron and subcellular localization of green fluorescent protein are required to mark transgenic *Arabidopsis* plants brightly. *Proceedings of the National Academy of Science*, v. 94, p. 2122–2127, 1997.

Hellens, R.; Mullineaux, P.; Klee, H. Technical focus: a guide to *Agrobacterium* binary Ti vectors. *Trends of Plant Science*, v. 5, p.446-551, 2000.

Henchal, E.A.; Putnak, J.R. The dengue viruses. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 3, p. 376- 389, 1990.

Herbst-Kralovetz, M.; Mason, H.S.; Chen, Q. Norwalk virus-like particles as vaccines. *Expert Reviews Vaccines*. v.9, p. 299-307, 2010.

Huang, Z.; Chen, Q.; Hjelm, B.; Arntzen, C.; Mason, H. A DNA replicon system for rapid high-level production of viruslike particles in plants. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 103, p. 706–714, 2009.

Huhti, L.; Blazevic, V.; Nurminen, K.; Koho, T.; Hytonen, V.P.; Vesikari, T. A comparison of methods for purification and concentration of norovirus GII-4 capsid virus-like particles. *Archives of Virology*, v. 155, p.1855–1858, 2010.

Hwang, M. S.; Lindenmuth, B. E.; McDonald, K. A.; Falk, B. W. Bipartite and tripartite *Cucumber mosaic virus*-based vectors for producing the *Acidothermus cellulolyticus* endo-1,4- β -glucanase and other proteins in non-transgenic plants. *BMC Biotechnology*, v. 12:66, 2012.

Idrees, S.; Ashfaq, U. A. A brief review on dengue molecular virology, diagnosis, treatment and prevalence in Pakistan. *Genetic Vaccines and Therapy*, v.10, p. 6- 16, 2012.

Instituto Adolfo Lutz – Divisão de doenças de transmissão hídrica e alimentar (DDTHA), Centro de Vigilância Epidemiológica (CVE) – São Paulo. Informe técnico componente do "Informe Net - Manual de Doenças Transmitidas por Alimentos" (material eletrônico). Última atualização abril (2010). Disponível ftp://ftp.cve.saude.sp.gov.br/doc_tec/hidrica/doc/IF10_Norovirus.pdf

Jacquemond, M. Cucumber mosaic virus. *Advances in Virus Research*, v.84, p. 439-503, 2012.

Jiang, X.I; Wang, M.I.N; Graham, D.Y; Estes, M.K. Expression, self-assembly, and antigenicity of the Norwalk virus capsid protein. *Journal of Virology*, v. 66, p. 6527–6532, 1992.

Johansen, J.K; Carrington, J.C. Silencing on the spot. Induction and suppression of RNA silencing in the *Agrobacterium*-mediated transient expression system. *Plant Physiology*, v. 126, p. 930-938, 2001.

Kanagarajan, S.; Tolf, C.; Lundgren, A.; Waldenström, J.; Brodelius, P.E. Transient Expression of Hemagglutinin Antigen from Low Pathogenic Avian Influenza A (H7N7) in *Nicotiana benthamiana*. *PloS One*, v. 7, p. e33010, 2012.

Kanzaki, L.I.B.; Ornelas, S.S.; Argañaraz, E.R. RNA interference and HIV-1 infection. *Reviews in Medical Virology*, v.8, p.5-18, 2008.

Karst, S. Pathogenesis of Noroviruses, Emerging RNA Viruses. *Viruses*, v. 2, p. 748-781, 2010.

Kissmann, J.; Ausar, S.F; Roubert, T.R; Brock, J.; Switzer, M.H; Detzi, E.J.; Vedyick, T.S.; Middaugh, R. Physical stabilization of Norwalk virus-like particles. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 97 , p. 4208- 4212, 2008.

Koopmans, M. Noroviruses in healthcare settings: a challenging problem. *Journal of Hospital Infection*, v. 73, p.331-337, 2009.

Koho, T.; Mantyla, T.; Laurinmaki, P.; Huhti, L.; Butcher, S.J.; Vesikari, T.; Kulomaa, M.S.; Hytonen, V.P. Purification of norovirus-like particles (VLPs) by ion exchange chromatography. *Journal of Virology Methods*, v. 181, p. 6–11, 2012.

Kralovetz, M.H.; Mason, H.S.; Chen, Q. Norwalk virus-like particles as vaccines. *Expert Review of Vaccines*, v. 9, p. 299–307, 2010.

Kroneman, A.; Verhoef, L.; Harris, J.; Vennema, H.; Duizer, E.; Van Duynhoven, Y.; Gray, J.; Iturriza, M.; Bottiger, B.; Falkenhorst, G.; Johnsen, C.; Von Bonsdorff, C-H.; Maunula, L.; Kuusi, M.; Pothier, P. et al. Analysis of Integrated

virological and epidemiological reports of Norovirus outbreaks collected within the foodborne viruses in Europe network from 1 July 2001 to 30 June 2006. *Journal of Clinical Microbiology*, v.46, p. 2959–2965, 2008.

Kuhn, R. J.; Zhang, W.; Rossmann, M. G.; Pletnev, S. V.; Corver, J.; Lenches, E.; Jones, C. T.; Mukhopadhyay, S.; Chipman, P. R.; Strauss, E. G.; Baker, T. S.; Strauss, J. H. Structure of Dengue Virus: Implications for Flavivirus organization, maturation, and fusion. *Cell*, v. 108, p. 717-725, 2002.

Kumagai, M. H.; Donson, J.; Della-Cioppa, G.; Harvey, D.; Hanley, K.; Grill, L. K. Cytoplasmic inhibition of carotenoid biosynthesis with virus-induced RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 92, p. 1679-1683, 1995.

Lacomme, C.; Hrubikova, K.; Hein, I. Enhancement of virus-induced gene silencing through viral-based production of inverted-repeats. *The Plant Journal*, v. 34, p. 543-553, 2003.

Lai, H.; Chen, Q. Bioprocessing of plant-derived virus-like particles of Norwalk virus capsid protein under current good manufacture practice regulations. *Plant Cell Reports*, v. 31, p. 573-584, 2012.

Lai, H.; He, J.; Engle, M.; Diamond, M.S.; Chen, Q. Robust production of virus-like particles and monoclonal antibodies with geminiviral replicon vectors in lettuce. *Plant Biotechnology Journal*, v.10, p. 95–104, 2012.

Lindbo, J. A.; Dougherty, W. G. Pathogen-derived resistance to a potyvirus: immune and resistant phenotypes in transgenic tobacco expressing altered forms of a potyvirus coat protein nucleotide sequence. *Molecular Plant – Microbe Interactions*, v. 5, p. 144-153, 1992.

Lindesmith, L.C.; Donaldson, E.F.; Lobue, A.D.; Cannon, J.L; Zengh, D.P; Vinje, J; Baric, R.S. Mechanisms of GII.4 norovirus persistence in human populations. *PLoS Medicine*, v. 5, p. 269-290, 2008.

Lisova, O.; Hardy, F.; Petit, V.; Bedouelle, H. Mapping to completeness and transplantation of a group-specific, discontinuous, neutralizing epitope in the

envelope protein of dengue virus. *Journal of General Virology*, v. 88, p. 2387–2397, 2007.

Loebenstein, G.; Cohen, J.; Shabtal, S.; Coutts, R. H. A.; Wood, K. R. Distribution of cucumber mosaic virus in systemically infected tobacco leaves. *Virology*, v. 81, p. 117–125, 1977.

Lopman, B.A; Reacher, M.; Gallimore, C.; Adak, G.K.; Gray, J.J.; Brown, D.W. A summertime peak of “winter vomiting disease”: surveillance of noroviruses in England and Wales, 1995 to 2002. *BMC Public Health*, v. 3, p. 1-13, 2003.

Lu, R.; Martin-Hernandez, A. M.; Peart, J.R.; Malcuit, I.; Baulcombe, D. C. Virus-induced gene silencing in plants. *Methods*, v. 30, p. 296-303, 2003.

Lucinda, N.; Inoue-Nagata, A.K; Kitajima, E.W; Nagata, T. Complete genome sequence of *Brugmansia suaveolens* mottle virus, a potyvirus from an ornamental shrub. *Archives of Virology*, v. 155, p. 1729-1732, 2010.

Lucinda, N., Nagata, T., Inoue-Nagata, A.K.; Salaroni, R.B.; Kitajima, E.W. *Brugmansia suaveolens* mottle virus, a novel potyvirus causing leaf mottling of *Brugmansia suaveolens* in Brazil. *Archives of Virology*, v.153, p.1971-1976. 2008.

Ma, J. K-C.; Drake, P.M.W.; Christou, P. The production of recombinant pharmaceutical proteins in plants. *Nature Reviews*, v. 4, p. 794-805, 2003.

Macleon, J.; Koekemoer, M.; Olivier, A.J.; Stewart, D.; Hitzeroth, I.I.; Rademacher, T.; Fischer, R.; Williamson, A.L.; Rybicki, E.P. Optimization of human papillomavirus type 16 (HPV-16) L1 expression in plants: comparison of the suitability of different HPV- 16 L1 gene variants and different cell-compartment localization. *Journal General Virology*, v. 88, p. 1460–1469, 2007.

Malavige, G. N.; Fernando, S.; Fernando, D. J.; Seneviratne, S. L. Dengue viral infections. *Postgraduated Medical Journal*, v.80, p. 588-601, 2004.

Maldaner, F. R.; Aragão, F. J. L.; Santos, F. B.; Franco, O. L. F.; Lima, M. R. Q.; Resende, R. O.; Vasques, R. M.; Nagata, T. Dengue virus tetra-epitope

peptide expressed in lettuce chloroplasts for potential use in dengue diagnosis. *Applied of Microbiology and Biotechnology* , v. 97, p. 5721–5729, 2013.

Mallory, A.C.; Ely, L.; Smith, T.H.; Marathe, R.; Anandalakshmi, R.; Fagard, M.; Vaucheret, H.; Pruss, G.; Bowman, L.; Vance, V.B. HC-Pro suppression of transgene silencing eliminates the small RNAs but not transgene methylation or the mobile signal. *Plant Cell*, v. 13, p. 571–583, 2001.

Maramoroshi, K.; Koprowski, H. Immunosorbent electron microscopy in plant virus studies. In: Maramorosch, K. and H.Koprowski (eds), *Methods in Virology*, v. 3, p. 85–101, 1984.

Marie-Cardine, A.; Goullain, K.; Mouterde, O.; Castignolles, N.; Hellot, M-F.; Mallet, E.; Janvresse, C.B. Epidemiology of Acute Viral Gastroenteritis in Children Hospitalized in Rouen, France. *Clinical Infectious Diseases*, v.34, p. 1170-1178, 2002.

Marillonnet, S.; Giritch, A.; Gils, M.; Kandzia R.; Klimyuk, V.; Gleba, Y. In planta engineering of viral RNA replicons: efficient assembly by recombination of DNA modules delivered by *Agrobacterium*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 101, p. 6852-6857, 2004.

Mason, H.S.; Lam, D.M-K.; Arntzent, C.J. Expression of hepatitis B surface antigen in transgenic plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 89. P. 11745-11749, 1992.

Mason, H.S.; Ball, J.M.; Shi Jian-Jian.; Jiang Xi., Estes, M.K., Charles, J. Expression of Norwalk virus capsid protein in transgenic tobacco and potato and its oral immunogenicity in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 93, p.5335-5340,1996.

Matić, S.; Rinaldi, R.; Masenga, V.; Noris, E .Efficient production of chimeric human papillomavirus 16 L1 protein bearing the M2e influenza epitope in *Nicotiana benthamiana* plants. *BMC Biotechnology*, v. 11, p.1-12, 2011

Matsuo, K.; Hong, J-S.; Tabayashi, N.; Ito, A.; Masuta, C.; Matsumura, T. Development of *Cucumber mosaic virus* as a vector modifiable for different host species to produce therapeutic proteins. *Planta*, v. 225, p. 277- 286, 2007.

Merlin, M.; Gecchele, E.; Capaldi, S.; Pezzoti, M.; Avesani, L. Comparative evaluation of recombinant protein production in different biofactories: the green perspective. *BioMed Research International*, v. 2014, p.1-14, 2014.

Meyers, G. Translation of the minor capsid protein of a calicivirus is initiated by a novel termination-dependent reinitiation mechanism. *Journal Biological Chemistry*. V. 278, p. 34051-34060, 2003.

Mochizuki, T.; Ohki S. T. *Cucumber mosaic virus*: viral genes as virulence determinants. *Molecular Plant Pathology*, v. 13, p. 217-225, 2012.

Murakami, K.; Suzuki, S.; Aoki, N.; Nadano, D.; Uchida, K.; Yamashita, K.; Oka, T.; Katayama, K.; Takeda, N.; Matsuda, T. Binding of Norovirus virus-like particles (VLPs) to human intestinal Caco-2 cells and the suppressive effect of pasteurized bovine colostrum on this VLP binding. *Bioscience Biotechnology Biochemistry*, v. 74, p. 541-547, 2010.

Nagamatsu, A.; Masuta, C.; Matsuura, H.; Kitamura, K.; Abe, J.; Kanazawa, A. Down-regulation of flavonoid 30-hydroxylase gene expression by virus-induced gene silencing in soybean reveals the presence of a threshold mRNA level associated with pigmentation in pubescence. *Journal of Plant Physiology*, v. 166, p. 32-39, 2009.

Nagamatsu, A.; Masuta, C.; Senda, M.; Matsuura, H.; Kasai, A.; Hong, J.S.; Kitamura, K.; Abe, J.; Kanazama, A. Functional analysis of soybean genes involved in flavonoid biosynthesis by virus-induced gene silencing. *Plant Biotechnology*, v.5, p. 778–90, 2007.

Napoli, C.; Lemieux, C.; Jorgensen, R. Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous genes in trans. *Plant Cell*, v. 2, p. 279-289, 1990.

Naphtine, S.; Lever, R.A.; Powell, M.L.; Jackson, R.J.; Brown, T.D.K.; Brierley, I. Expression of the VP2 protein of murine norovirus by a translation termination-reinitiation strategy. *Plos One*, v. 4, p. e8390, 2009.

Natilla, A.; Piazzolla, G.; Nuzzaci, M.; Saldarelli, P.; Tortorella, C.; Antonaci, S.; Piazzolla, P. Cucumber mosaic virus as carrier of a hepatitis C virus- derived epitope. *Archives of Virology*, v. 149, p. 137- 154, 2004.

Natilla, A.; Hammond, R. W.; Nemchinoy, L. G. Epitope presentation system on cucumber mosaic virus coat protein expressed from a potato virus X-based vector. *Archives of Virology*, v. 151, p. 1373-1385, 2006.

Noisakran, S.; Perng, G. C. Alternate hypothesis on the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever (DHF)/ dengue shock syndrome (DSS) in dengue virus infection. *Experimental Biology and Medicine*, p. 233-401, 2008.

Nuzzaci, M.; Piazzolla, G.; Vitti, A.; Lapelosa, M.; Tortorella, C.; Stella, I.; Natilla, A.; Antonaci, S.; Piazzolla, P. Cucumber mosaic virus as a presentation system for a Double hepatitis C virus-derived epitope. *Archiver of Virology*, v. 152, p. 915-928, 2007.

Nuzzaci, M.; Vitti, A.; Condelli, V.; Lanorte, M. T.; Tortorella, C.; Boscia, D.; Piazzolla, P.; Piazzolla, G. In vitro stability of Cucumber mosaic virus nanoparticles carrying a Hepatitis C virus-derived epitope under simulated gastrointestinal conditions and in vivo efficacy of an edible vaccine. *Journal of Virological Methods*, v. 165, p. 211–215, 2010.

Obembe, O.O.; Popoola J.O.; Leelavathi S.; Reddy, S.V. Advances in plant molecular farming. *Biotechnology Advances Journal*, v. 29, p. 210-222, 2011.

Oliveira, L.M, Inoue-Nagata, A.K; Nagata, T. Complete genome nucleotide sequence of *Pepper mild mottle virus* isolated in the Federal District, Brazil. *Tropical Plant Pathology*, v. 35, p. 373-76, 2010.

Oliver, S.L.; Sobayire, E.; Dastjerdi, A.M.; Bridger, J.C. Genomic characterization of the unclassified bovine enteric virus Newbury agent-1 (Newbury1) endorses a new genus in the family *Caliciviridae*. *Virology*, v. 350, p. 240-250, 2006.

Otagaki, S.; Arai, M.; Takahashi, A.; Goto, K.; Hong, J-S.; Masuta, C.; Kanazawa, A. Rapid induction of transcriptional and post-transcriptional gene

silencing using a novel *Cucumber mosaic virus* vector. *Plant Biotechnology*, v. 23, p. 259- 265, 2006.

Paul, M.; Ma, J. K-C. Plant-made pharmaceuticals: leading products and production platforms. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, v. 58, p.58-64, 2011.

Palukaitis, P.; García-Arenal, F. Cucumoviruses. *Advances in Virus Research*, v. 62, p.241- 323, 2003.

Patel, M.M.; Widdowson, M.A.; Glass, R.I.; Akazawa, K.; Vinjé, J.; Parashar, U.D. Systematic Literature Review of Role of Noroviruses in Sporadic Gastroenteritis. *Emerging Infectious Disease*, v.14, p. 1224- 1231, 2008.

Patel, M.M.; Hall, A.J.; Vinjé, J.; Parashar, U.D. Noroviruses: a comprehensive review. *Journal of Clinical Virology*, v.44, p.1-8, 2009.

Porta, C.; Lomonosoff, G.P. Viruses as vectors for the expression of foreign sequences in plants. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, v. 19, p. 245-291, 2002.

Pukayastha, A.; Dasgputa, I. Virus- induced gene silencing: a versatile tool for discovery of gene functions in plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 47, p. 967-976, 2009.

Ratcliff, A.; Martín- Hernández, A. M.; Baulcombe, D. C. Tobacco rattle virus as a vector for analysis of gene function by silencing. *The Plant Journal*, v. 25, p. 237-245, 2001.

Rey, F. A.; Heinz, F. X.; Mandl, C.; Kunz, C.; Harrison, S. C. The envelope glycoprotein from tick-borne encephalitis virus at 2 Å resolution. *Nature*, v. 375, p. 291-298, 1995.

Rizzo, T. M.; Palukaitis, P. Construction of full-length cDNA clones of *Cucumber mosaic virus* RNAs 1, 2 and 3: generation of infectious RNA transcripts. *Molecular Genetics and Genomics*, v. 222, p. 249-256, 1990.

Rockx, B.; Wit, M.; Vennema, H.; Vinje, J.; Bruin, E.; Van Duynhoven, Y.; Koopmans, M. Natural History of Human *Calicivirus* Infection: A Prospective Cohort Study. *Clinical Infectious Diseases*, v. 35, p. 246–53, 2002.

Roehrig, J. T.; Bolin, R. A.; Kelly, R. G. Monoclonal antibody mapping of the envelope glycoprotein of the dengue 2 virus, Jamaica. *Virology*, v. 246, p. 317-328, 1998.

Rohayem, J.; Bergmann, M.; Gebhardt, J.; Gould, E.; Tucker, P.; Mattevi, A.; Unge, T.; Hilgenfeld, R.; Neyts, J. Antiviral strategies to control calicivirus infections. *Antiviral Research*, v. 87, p. 162-178, 2010.

Romanos, M. T. V. Febre amarela e dengue. In: Santos, N. S. O.; Romanos, M. T. V.; Wigg, M. D. *Introdução à virologia humana*. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara, 2002. p. 177- 182.

Roossinck, M. J. *Cucumber mosaic virus*, a model for RNA virus evolution. *Molecular Plant Pathology*, v. 2, p. 59-63, 2001.

Roth, B.M.; Pruss, G.J.; Vance, V.B. Plant viral suppressors of RNA silencing. *Virus Research*, v. 102, p. 97-108, 2004.

Ruiz, M. T.; Voinnet, O.; Baulcombe, D. C. Initiation and maintenance of virus-induced gene silencing. *The Plant Cell*, v. 10, p. 937-946, 1998.

Rybicki, E.P. Plant-made vaccines for humans and animals. *Plant Biotechnology Journal*, v. 8, p. 620-637, 2010.

Sainsbury, F.; Thuenemann, E.C.; Lomonossoff, G.P. pEAQ: versatile expression vectors for easy and quick transient expression of heterologous proteins in plants. *Plant Biotechnology Journal*, v. 7, p. 682-693, 2009.

Sambrook, J.; Fritsch, E.F.; Maniatis, T. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

Santi, L.; Batchelor, L.; Huang, Z.; Hjelm, B.; Kilbourne, J.; Arntzen, C.J.; Chen, Q.; Mason, H.S. An efficient plant viral expression system generating orally immunogenic Norwalk virus-like particles. *Vaccine*, v. 26, p. 1846-1854, 2008.

Santi, L.; Huang, Z.; Mason, H. Virus like particles production in green plants. *Methods*, v. 40, p. 66-76, 2006.

Scolnik, P. A.; Bartley, C. E. Phytoene Desaturase from *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, v. 103, p. 1475, 1993.

Scotti, N.; Rybicki, E.P. Virus-like particles produced in plants as potential vaccines. *Expert Review Vaccines*, v. 12, p. 211-224, 2013.

Sharma A.K.; Sharma, M.K. Plants as bioreactors: recent developments and emerging opportunities. *Biotechnology Advances*, v. 27, p. 811-832, 2009.

Shi, X.M.; Miller, H.; Verchot, J.; Carrington, J.C.; Vance, V.B., 1997. Mutations in the region encoding the central domain of helper component-proteinase (HC-Pro) eliminate potato virus X/potyviral synergism. *Virology*, v. 231, p. 35–42, 1997.

Shimomura, O.; Johnson, F.H.; Siaga, Y. Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*. *Journal of Cellular Physiology*, v.59, p.223-39, 1962.

Smith, A.W.; Skilling, D.E.; Cherry, N.; Mead, J.H.; Matson, D.O. Calicivirus Emergence from Ocean Reservoirs: Zoonotic and Interspecies Movements. *Emerging Infectious Diseases*, v. 4, p.13-20, 1998.

Smits, S.L.; Rahman, M.Z.; Schapendonk, C.M.E.; Leeuwen, M.V.; Faruque, A.S.G.; Haagmans, B.L.; Endtz, H.P.; Osterhaus, A.D.M.E. Calicivirus from Novel Recovirus genogroup in human diarrhea, Bangladesh. *Emerging Infectious Diseases* , v. 18, p. 1192- 1195, 2012.

Staden, R. The Staden sequence analysis package. *MolecularBiotechnology*, v. 5, n. 3, p. 233-241, 1996.

Sudarshana, M. R.; Plesha, M. A.; Uratsu, S. L.; Falk, B. W.; Dandekar, A. M.; Huang, T-K.; McDonald, K. A. A chemically inducible cucumber mosaic virus amplicon system for expression of heterologous proteins in plant tissues. *Plant Biotechnology Journal*, v. 4, p. 551- 559, 2006.

Suzuki, M.; Kuwata, S.; Kataoka, J.; Masuta, C.; Nitta, N.; Takanami, Y. Functional analysis of deletion mutants of *Cucumber mosaic virus* RNA3 using an in vitro transcription system. *Virology*, v. 183, p. 106- 113, 1991.

Takanami, Y. A striking change in symptoms on cucumber mosaic virus-infected tobacco plants induced by a satellite RNA. *Virology*, v. 109, p. 120-126, 1981.

Thiel, H-J.; Konig, M. Caliciviruses: an overview. *Veterinary Microbiology*, v. 69, p. 55-62, 1999.

Thompson JD, Higgins, D. G.; Gibson, T. J. Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acid Research*, v. 22, p. 4673-4680, 1994.

Tian, J.; Pei, H.; Zhang, S.; Chen, J.; Chen, W.; Yang, R.; Meng, Y.; You, J.; Gao, J.; Ma, N. TRV: GFP: a modified Tobacco rattle virus vector for efficient and visualizable analysis of gene function. *Journal of Experimental Botany*, v. 65, p. 311-322, 2014.

Tiwari, S.; Verma, P.C.; Singh, P.K.; Tuli, R. Plants as bioreactors for the production of vaccine antigens. *Biotechnology Advances*, v. 27, p. 449-467, 2009.

Unver, T.; Budak, H. Virus-induced gene silencing, a post transcriptional gene silencing method. *International Journal of Plant Genomics*, v. 2009, p. 1-8, 2009.

Van der Krol, A.R.; Mur, L.A.; Beld, M.; Mol, J.N. Stuitje, A.R. Flavonoid genes in petunia: addition of a limited number of gene copies may lead to a suppression of gene expression. *Plant Cell*, v. 2, p. 291-299, 1990.

Van Kammen, A. Virus-induced gene silencing in infected and transgenic plants. *Trends in Plant Science*, v. 2, p. 409- 411, 1997.

Vance, V.B.; Berger, P.; Carrington, J.C.; Hunt, A.G.; Shi, X.M. 5' Proximal potyviral sequences mediate Potato Virus X/Potyviral Synergistic disease in transgenic tobacco. *Virology*, v.206, p. 583-590, 1995.

Vasques Bonnet, R.M. Efeito de candidatos a supressores de silenciamento gênico viral em expressão de proteína recombinante em planta. 2010. 49 f. (Dissertação de Mestrado em Ciências Genômicas e Biotecnologia). Universidade Católica de Brasília. Brasília, 2010.

Velásquez, A. C.; Chakravarthy, S.; Martin, G. B. Virus-induced gene silencing (VIGS) in *Nicotiana benthamiana* and Tomato. *Journal of Visualized Experiments*, p. 1-14, 2009.

Vitti, A.; Piazzolla, G.; Condelli, V.; Nuzzaci, M.; Lanorte, M. T.; Boscia, D.; Stradis, A. De.; Antonaci, S.; Piazzolla, P.; Tortorella, C. Cucumber mosaic virus as the expression system for a potential vaccine against Alzheimer's disease. *Journal of Virological Methods* , v. 169, p. 332–340, 2010.

Voinnet, O. Induction and suppression of RNA silencing: insights from viral infections. *Nature Reviews Genetics*, v. 6, p. 206-220, 2005.

Voinnet, O. RNA silencing as a plant immune system against viruses. *Trends in Genetics*, v. 17, p. 449-459, 2001.

Voinnet, O.; Pinto, Y. M.; Baulcombe, D. C. Suppression of gene silencing: a general strategy used by diverse DNA and RNA viruses of plants. *Plant Biology*, v. 96, p. 14147- 14152, 1999.

Wang, Q.; Scheuer, K.; Zhang, Z.; Gebreyes, W.A.; Molla, B.Z.; Hoet, A.E.; Saif, L.J. Characterization and Prevalence of a New Porcine Calicivirus in Swine, United States. *Emerging Infectious Diseases*, v.. 17, p.1104- 1106, 2011.

Wang, M.; Wang, G.; Wang, J. J. J. The effect of pds gene silencing on chloroplast pigment composition, thylakoid membrane structure and photosynthesis efficiency in tobacco plants. *Plant Science*, v. 177, p. 222-226, 2009.

Wang, H.; Buckley, K.J.; Yang, X.; Buchamann, R.C.; Bisaro, D.M . Adenosine kinase inhibition and suppression of RNA silencing by geminivirus AL2 and L2 proteins. *Journal of Virology*, v. 79, p. 7410–7418, 2005.

White, P. A. Evolution of norovirus. *Clinical Microbiology and infection*, v. 20, p.741-745, 2014.

Wydro, M.; Kozubek, E.; Lehmann. P. Optmization of transient *Agrobacterium*-mediated gene expression system in leaves of *Nicotiana benthamiana*. *Acta Biochimica Polonica*, v. 53, p. 289–298, 2006.

Xia, M.; Farkas, T.; Jiang, X.I. Norovirus capsid protein expressed in yeast forms virus-like particles and stimulates systemic and mucosal immunity in mice following an oral administration of raw yeast extracts. *Journal Medical Virology*, v. 79, p. 74-83, 2007.

Xu, J.; Dolan, M.C.; Medrano, G.; Cramer, C.L.; Weathers, P.J. Green factory: Plants as bioproduction platforms for recombinant proteins. *Biotechnology Advances*, v. 30, p.1171-1184, 2012.

Yang, S.J.; Carter, S.A; Cole, A.B.; Cheng, N.H.; Nelson, R.S .A natural variant of a host RNA-dependent RNA polymerase is associated with increased susceptibility to viruses by *Nicotiana benthamiana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v.101, p. 6297-6302, 2004.

Yoda, T.; Terano, Y.; Shimada, A.; Suzuki, Y.; Yamazaki, K.; Sakon, N.; Oishi, I.; Utagawa, E.T.; Okuno, Y.; Shibata, T. Expression of recombinant Norwalk – like virus capsid proteins using a bacterial system and the development of its immunologic detection. *Journal Medical Virology*, v. 60, p. 475-481, 2000..

Zeng, Q.; Wen, H.; Wen, Q.; Chen, X.; Wang, Y.; Xuan, W.; Liang, J.; Wan, S. Cucumber mosaic virus as drug delivery vehicle for doxorubicin. *Biomaterials*, v. 34, p. 4632-4642, 2013.

Zerbini, F.M.; Alfenas, P.F.; Andrade, E.C. O silenciamento de RNA como um mecanismo de defesa de plantas a virus. *Revisão Anual de Patologia de Planta*, v. 13, p. 191-244, 2005

Zhang, W.; Chipman, P. R.; Corver, J.; Johnson, P. R.; Zhang, Y.; Mukhopadhyay, D.; Baker, T. S.; Strauss, J. H.; Rossmann, M. G.; Kuhn, R. J. Visualization of membrane protein domains by cryo-electron microscopy of dengue virus. *Nature Structural Biology*, v. 10, p. 907-912, 2003.

Zhang, X.; Buehner, N.A.; Hutson, A.M.; Estes, M.K.; Mason, H.S. Tomato is a highly effective vehicle for expression and oral immunization with Norwalk virus capsid protein. *Plant Biotechnology Journal*, v. 4, p. 419-432, 2006.

Zhao, Y.; Hammond, J.; Tousignant, M. E.; Hammond, R. W. Development and evaluation of a complementation-dependent gene delivery system based on *cucumber mosaic virus*. *Archives Virology*, v. 145, p. 2285-2295, 2000.

Zupan, J.; Muth, T.R.; Draper, O.; Zambryski, P. The transfer of DNA from *Agrobacterium tumefaciens* into plants: a feast of fundamental insights. *The Plant Journal*, v. 23, p. 11-28, 2000.

ANEXO I - ARTIGO PUBLICADO

Expression and assembly of Norwalk virus-like particles in plants using a viral RNA silencing suppressor gene

Ana Cláudia Souza, Raquel Medeiros Vasques, Alice Kazuko Inoue-Nagata, Cristiano Lacorte, Franciele Roberta Maldaner, et al.

Applied Microbiology and
Biotechnology

ISSN 0175-7598

Appl Microbiol Biotechnol
DOI 10.1007/s00253-013-5077-5



Applied and Microbiology Biotechnology

Volume 97 Number 16 August 2013

Mini-Reviews

Current studies on physiological functions and biological production of lactosucrose

W. Ma · Q. Chen · X. Wang · T. Zhang · B. Jiang 7073

Nematocidal enzymes from microorganisms and their applications

J. Yang · L. Liang · J. Li · K.-Q. Zhang 7083

Aptamers: versatile probes for flow cytometry

M. Meyer · T. Scheper · J.-G. Walter 7097

Identification of microorganisms by FTIR spectroscopy: perspectives and limitations of the method

H. Weonang · S. Scherer 7111

Inducible cell lysis systems in microbial production of bio-based chemicals

Y. Gao · X. Feng · M. Xian · Q. Wang · G. Zhao 7121

Biotechnological products and process engineering

Flavinin in *Chaetomium globosum* CDW7, an endophytic fungus from *Ginkgo biloba*, contributes to antioxidant activity

Y. Ye · Y. Xiao · L. Ma · H. Li · Z. Xie · M. Wang · H. Ma · H. Tang · J. Liu 7131

Antifungal activity of the lipopeptides produced by *Bacillus amyloliquefaciens* anti-CA against *Candida albicans* isolated from clinic

B. Song · Y.-J. Rong · M.-X. Zhao · Z.-M. Chi 7141

A novel combinatorial biocatalytic approach for producing antibacterial compounds effective against *Mycobacterium tuberculosis* (TB)

R. McClure · B. Wan · Y. Wang · S. Chao · J. Yu · B. Santanero · S. Mchibeb · M. Johnson · S. Franzblau · R. Steffan 7151

Direct L-lysine production from cellobiose by *Corynebacterium glutamicum* displaying beta-glucosidase on its cell surface

N. Adachi · C. Takahashi · N. Oso-Muroma · R. Yamaguchi · T. Tanaka · A. Kondo 7165

From amino alcohol to aminopolyol: one-pot multienzyme oxidation and aldol addition

M. Pešić · C. López · J. López-Santín · G. Álvarez 7173

Highly enantioselective oxidation of racemic phenyl-1,2-ethanediol to optically pure (R)-(+)-mandelic acid by a newly isolated *Brevibacterium linens* CCZU12-1

Y.-C. He · C.-L. Mu · X. Zhang · L. Li · J.-H. Xu · M.-X. Wu 7185

Biosynthesis of bioactive O-methylated flavonoids in *Escherichia coli*

M.-J. Kim · B.-G. Kim · J.-H. Ahn 7195

Biotechnologically relevant enzymes and proteins

Molecular cloning and characterization of a GH11 endoxylanase from *Chaetomium globosum*, and its use in enzymatic pretreatment of biomass

R.K. Singh · M.K. Tiwari · D. Kim · Y.C. Kang · P. Ramachandran · J.-K. Lee 7205

Optimized expression of the dirigent protein ADR6 in *Pichia pastoris* and impact of glycosylation on protein structure and function

C. Kaczmarek · J. Kiebasberger · S. Richter · J. Pfannstiel · U. Gurken · B. Pöckel · A. Schaller · B. Hauer 7215

Isolation, biochemical characterization, and cloning of a bacteriocin from the poultry-associated *Staphylococcus aureus* strain CH-91

B. Władyska · K. Władyska · M. Włoka · O. Bochenka · G. Dubin · A. Dubin · P. Mak 7229

An esterase from the basidiomycete *Pleurotus sapidus* hydrolyzes feruloylated saccharides

D. Loske · R. Maubius · M. Nitzel · H. Zorn · M. Bunzel · R.G. Berger 7241

Engineering and refolding of a novel trimeric fusion protein TKAH₁-collagen XVIII NC1

L.Q. Pan · Z.M. Xie · N.J. Tang · M. Wu · F.R. Wang · H. Narasimandra · S.Q. Chen 7253

The production of glycans via glucanases from *Lactobacillus arizonensis* isolated from a fermented beverage starter culture

G.L. Côté · C.D. Skory · S.M. Unser · J.O. Rich 7265

Nanoscale mono- and multi-layer cylinder structures formed by recombinant S-layer proteins of mesostructural *Bacillus sporocera* C3-41

J. Li · L. Yang · X. Hu · D. Zheng · J. Yan · Z. Yuan 7275

A thermostable L-aspartate oxidase: a new tool for biotechnological applications

D. Bifalco · L. Pollegioni · D. Tessaro · S. Servi · G. Molla 7285

Applied genetics and molecular biotechnology

Bhamnolipids are converted to bioactants molecules: implications for their biotechnological potential

A. Perfumo · M. Rodden · T.P. Smyth · R. Marchant · P.S. Stevenson · N.J. Perry · I.M. Banat 7297

The LysR-type transcriptional regulator (LTR) Ahr indirectly regulates expression of the *Bacillus subtilis* bdxA gene encoding 2,3-butanediol dehydrogenase

R.R. de Oliveira · W.L. Nicholson 7307

(Continued on inside front cover)

Springer

Springer

Your article is protected by copyright and all rights are held exclusively by Springer-Verlag Berlin Heidelberg. This e-offprint is for personal use only and shall not be self-archived in electronic repositories. If you wish to self-archive your article, please use the accepted manuscript version for posting on your own website. You may further deposit the accepted manuscript version in any repository, provided it is only made publicly available 12 months after official publication or later and provided acknowledgement is given to the original source of publication and a link is inserted to the published article on Springer's website. The link must be accompanied by the following text: "The final publication is available at link.springer.com".

Expression and assembly of Norwalk virus-like particles in plants using a viral RNA silencing suppressor gene

Ana Cláudia Souza · Raquel Medeiros Vasques ·
Alice Kazuko Inoue-Nagata · Cristiano Lacorte ·
Franciele Roberta Maldaner · Eliane Ferreira Noronha ·
Tatsuya Nagata

Received: 11 April 2013 / Revised: 18 June 2013 / Accepted: 18 June 2013
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2013

Abstract Binary vector-based transient expression of heterologous proteins in plants is a very attractive strategy due to the short time required for proceeding from planning to expression. However, this expression system is limited by comparatively lower yields due to strong post-transcriptional gene silencing (PTGS) in the host plants. The aim of this study was to optimize a procedure for expression of norovirus virus-like particles (VLPs) in plants using a binary vector with co-expression of a PTGS suppressor to increase the yield of the target protein. The effects of four plant viral PTGS suppressors on protein expression were evaluated using green fluorescent protein (GFP) as a reporter. Constructs for both GFP and PTGS suppressor genes were co-infiltrated in *Nicotiana benthamiana* plants, and the accumulation of GFP was evaluated. The most effective PTGS suppressor was the 126K protein of *Pepper mild mottle virus*. Therefore, this suppressor was selected as the norovirus capsid gene co-expression partner for subsequent studies. The construct containing the major (*vp1*) and minor capsid (*vp2*) genes with a 3'UTR produced a greater amount

of protein than the construct with the major capsid gene alone. Thus, the *vp1-vp2-3'UTR* and 126K PTGS suppressor constructs were co-infiltrated at middle scale and VLPs were purified by sucrose gradient centrifugation. Proteins of the expected size, specific to the norovirus capsid antibody, were observed by Western blot. VLPs were observed by transmission electron microscopy. It was concluded that protein expression in a binary vector co-expressed with the 126K PTGS suppressor protein enabled superior expression and assembly of norovirus VLPs.

Keywords Binary vector · Virus like particle (VLP) · Norovirus capsid gene co-expression · Post-transcriptional gene silencing · PTGS suppressor gene

Introduction

Norwalk virus (NV) is the only member of the genus *Norovirus* in the family Caliciviridae. The NV genome is composed of single stranded positive sense RNA (approximately 7.7 kb in length), which generally encodes three open reading frames (ORFs). ORF1 encodes a nonstructural protein, ORF2 encodes the major capsid protein VP1, and ORF3 encodes the minor structural protein VP2 (Hardy 2005). Human NV is still uncultivable in cell culture systems, which limits studies on the mechanisms of NV infection and replication.

The expression of recombinant capsid proteins may result in the self-assembly of empty, non-infectious virus like particles (VLPs). VLPs of morphologically and antigenically similar to wild type virions have general application to study interaction and expression within the host (Kissmann et al. 2008; Ausar et al. 2006; Murakami et al. 2010). Several expression systems have been developed for the production of NV VLPs, including baculovirus-infected insect cell (Jiang et al. 1992), bacterial (Yoda et al. 2000), yeast (Xia et al.

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00253-013-5077-5) contains supplementary material, which is available to authorized users.

A. C. Souza · R. M. Vasques · F. R. Maldaner · E. F. Noronha ·
T. Nagata (✉)
Departamento de Biologia Celular, UnB,
CEP 70910-900 Brasília, DF, Brazil
e-mail: tatsuya@unb.br

A. K. Inoue-Nagata
Embrapa Vegetables, Km 09 BR 060, Rodovia Brasília-Anápolis,
Caixa Postal 218, CEP 70359-970 Brasília, DF, Brazil

C. Lacorte
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Parque Estação
Biológica—PqEB, Av. W5 Norte (final),
CEP 70770-917 Brasília, DF, Brazil

2007), transgenic plant (Zhang et al. 2006) and plant transient expression systems (Santi et al. 2008).

Initial assays of NV VLP production in plants focused on constitutive expression systems in transgenic plants; however, the system showed low VLP yields (Lai and Chen 2012). The plant virus-based transient expression systems have overcome the limitations in NV VLP yield and production speed (Santi et al. 2008; Huang et al. 2009). Nonetheless, these systems have some disadvantages as size limitations and instability of the target genes (Sainsbury et al. 2009).

As an alternative, *Agrobacterium*-mediated transient gene expression is a rapid and useful method for recombinant protein expression. This technique uses binary vectors harboring the gene of interest and is faster compared to the transgenic plant systems (Wydro et al. 2006; Belknap et al. 2008; Sainsbury et al. 2009). The main limitations of this technique, however, are low protein expression and high risks of triggering post-transcriptional gene-silencing (PTGS), which is part of the RNA interference mechanism for plant defense (Baulcombe 2005). This phenomenon greatly reduces and can eventually impede the expression of a recombinant protein (Wydro et al. 2006). Recently, it was demonstrated that the use of plant virus PTGS suppressors greatly reduces PTGS, increasing the expression levels of heterologous proteins by several fold in agro-infiltrated leaves (Sainsbury et al. 2009; Circelli et al. 2010).

The aim of this study was to develop a strategy to produce high amounts of NV VLPs in plants. For this purpose, four PTGS suppressor genes (HC-Pro from the potyvirus *Brugmansia suaveolens mottle virus* (BsMoV), 126K from the tobamovirus *Pepper mild mottle virus* (PMMoV), AC2 from the begomovirus *Tomato severe rugose virus* (ToSRV), and p19 from the tombusvirus *Tomato bushy stunt virus* (TBSV) were co-expressed with green fluorescent protein (GFP) reporter to test their effects on NV VLP production.

During the construction of the expression vector for the NV VLPs, a possible positive effect of *vp2* positioned downstream of *vp1* in a bicistronic construct was evaluated in the baculovirus expression system (Bertolotti-Ciarlet et al. 2003). NV uses the “ribosomal termination–initiation mechanism” to express the second cistron (VP2) instead of producing additional subgenomic RNA (Herbert et al. 1996). This mechanism seems to function in insect cells as well (baculovirus systems). In this study, the expression efficiency of the NV *vp1* construct with or without the *vp2* gene in plants was evaluated.

Material and methods

Amplification and cloning of RNA silencing suppressor genes and the GFP gene

Three suppressors were selected, HC-Pro from BsMoV (accession number NC_014536–Lucinda et al. 2010), 126K from PMMoV (AB550911–Oliveira et al. 2010), and AC2 from

ToSRV (NC_009607–Barbosa et al. 2009). The well-characterized, potent PTGS suppressor TBSV p19 protein (AJ288942) (Sainsbury et al. 2009; Lindbo 2007; Garabagi et al. 2012; Yoon et al. 2012) was used as the standard protein for comparison with the three other suppressor proteins.

Each gene was amplified by RT-PCR with the following primers: BsMoV–HC-Pro (*SacII*) Fwd (5'-TTA CCG CGG ACA ATG GCA ACC TCA TCA ACT TTT TGG-3') and BsMoV–HC-Pro (*KpnI*) Rev (5'-CGG CGG TAC CTT AAC CTA CCA AGT AAT GTT TCA TTT-3'), PMMoV-126K (*SacII*) Fwd (5'-TTA CCG CGG ACA ATG GCT TAC ACA CAA CAA GCT ACC-3') and PMMoV-126 K (*KpnI*) Rev (5'-CGC CGG TAC CCT ATT GAG TCG ACA CAT CAA CTT TG-3'), ToSRV-AC2 (*SacII*) Fwd (5'-TTA CCG CGG ACA ATG GCA AAT TCG TCT TCC TTA ACA CCC-3') and ToSRV-AC2 (*KpnI*) Rev (5'-CGG TCG GTA CCC TAG TTA AAT ATG TCG TCC CAG AAG-3'), TBSV-p19 (*SacII*) Fwd (5'-TTT CCG CGG ATG GAA CGA GCT ATA CAA GGA-3') and TBSV-p19 (*XhoI*) Rev (5'-TTT CTC GAG TTA CTC GCT TTC TTT TTC GAA GGT-3').

The amplified cDNA fragments were cloned into the pGreenII 62-SK vector (Hellens et al. 2005). After confirming the sequences of these clones, the plasmids were transferred into *Agrobacterium tumefaciens* GV3101-pSOUP (Hellens et al. 2005) (from the collection of EMBRAPA Genetic Resources and Biotechnology, Brasília, Brazil). Similar to the approach of Wydro et al. (2006), a modified version of GFP optimized for plant expression, mGFP4-ER (U87625) (Haseloff et al. 1997), was used as a sensitive, non-invasive reporter to assess the efficiency of PTGS suppressor accumulation. The mGFP4-ER gene was amplified using primers for SigPep-mGFP4(*SacII*) Fwd (5'-TCC GCG GAA CAA TGA AGA CTA ATC TTT TTC TCT TTC TCA TCT TTT CAC TTC TCC TAT CAT TAT CCT CGG CCG AAT TCA GTA AAG GAG AAG AAC TTT TCA C-3') and mGFP_HDEL (*KpnI*) Rev (5'-TGG TAC CTT AAA GCT CAT CAT GTT TGT ATA GTT CAT CCA TGC CAT G-3') and cloned into pGreenII 62-SK to generate the plasmid pGreenII-mGFP4-ER.

Co-infiltration of PTGS suppressor candidates and mGFP4-ER genes

Agrobacterium suspensions (2 ml in volume) were sedimented at 1,200×g for 10 min. The resulting pellets were resuspended in 5 ml of a solution containing 10 mM MES (pH 5.5) and 150 μM acetosyringone to an OD₆₀₀ of 1.0. Leaves from *Nicotiana benthamiana* plants, approximately 6 weeks old, were infiltrated with the bacterial suspensions on their abaxial sides using a syringe without a needle. The mGFP-ER construct was co-infiltrated at a ratio of 1:1 with each of the four constructs coding the suppressors. The mGFP-ER construct and the empty pGreenII plasmid were also infiltrated as negative controls.

Observation of fluorescence intensity and Western blot analysis

GFP fluorescence was observed by UV irradiation (365 nm, lamp model UVLM-28 EL, UVP) at 10 dpi (days post-infiltration) and photographed using a digital camera (CANON model EOS) with a yellow filter with a 15-s exposure. For Western blot analysis, five agro-infiltrated leaf disks from the different plants of the same treatment (0.1 g) were homogenized in 500 μ l of 1 \times PBS (10 mM Na₂HPO₄, 1.7 mM KH₂PO₄, 140 mM NaCl, and 2.7 mM MgCl₂, pH 7.0) containing a protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

Each homogenate (10 μ l) was loaded and separated by electrophoresis on 12 % polyacrylamide gels. Proteins were either visualized directly by Coomassie Brilliant Blue staining or analyzed by Western blot using rabbit anti-GFP serum (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and anti-rabbit IgG alkaline phosphatase conjugate with colorimetric development in nitro blue tetrazolium and 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate solution. Signals were measured using an Image Scanner III (LabScan 6.0, GE Healthcare) and Image Master 2D Platinum 7 software (GE Healthcare).

Amplification and cloning of three different constructs from the NV isolate

For production of NV VLPs, three constructs were tested. The first construct contained only the *vp1* ORF (accession number KC715794). The second construct was codon-optimized *vp1* gene to *N. benthamiana* codon usage (*vp1-CodOpt*, synthesized at Epoch Life Science, TX, USA) (KC907392). The third construct contained the *vp1*, *vp2*, and the 3'UTR containing a poly(A₅₀) tail of an isolate from NV genogroup II genotype 4 (GII.4) subtype 2004 (isolated in 2006 at Brasilia, Brazil) (KC715794). To obtain the genomic fragment, reverse transcription (RT)-PCR was performed using the oligodT₅₀M4 *PacI* primer (5'-TCA GCA CTG ACC CTT TTG AAT TAA T₅₀-3') for the RT reaction, followed by PCR using the anchor primer M4 (5'-TCA GCA CTG ACC CTT TTG-3') and the Noro II 3' For primer (5'-GGA AAA ACG ACT GCT GGA ACG G-3'). PCR was performed using LongAmp DNA polymerase (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA). Amplicons were cloned into the pGEM-T Easy vector (Promega, Madison, WI, USA). Three clones were selected and sequenced for confirmation. A second PCR was performed using a selected cDNA clone with the following primer pairs: NoroGII4-7 *NotI* for (5'-AAA GCG CCG CAA CAA TGA AGA TGG CGT CGA ATG AC-3') and NoroGII4-7 *SacI* Rev (5'-AAG AGC TCT TAT AAT GCA CGT CTG CGC C-3') for *vp1* construct or NoroGII4-7 *NotI* For and *PacI*-M4-*SacI* (5'-TTT GAG CTC TTT TCC CAG TCA CGA CTT AAT TAA-3') for *vp1-vp2-3'*

UTR construct. These two amplicons, *vp1* and *vp1-vp2-3'UTR* and one synthesized construct *vp1-CodOpt* were then cloned into the pRAPs vector at the *NotI* and *SacI* sites. The pRAP plasmid contains dual *Cauliflower mosaic virus* 35S promoters upstream of the leader sequence from the *Alfalfa mosaic virus* 5'UTR and downstream a nopaline synthase terminator. The cassette was digested with *AscI* and *PacI* and subcloned into the binary vector pBINPLUS (Engelen et al. 1995). *A. tumefaciens* GV3101 strain (from the collection of EMBRAPA Genetic Resources and Biotechnology, Brasilia, Brazil) was transformed with the final binary vector after confirmation of subcloning by restriction enzyme profiling of the selected plasmids.

Expression of NV coat proteins in plants and partial purification of NV VLPs

Overnight, *Agrobacterium* suspensions (28 °C at 180 rpm) containing NV *vp1*, *vp1-CodOpt*, *vp1-vp2-3'UTR*, and 126K PTGS suppressor gene constructs were centrifuged separately at 1,200 \times g for 10 min. Each pellet was resuspended in a solution containing 10 mM MES (pH 5.5) and 50 μ M acetosyringone and then incubated at 28 °C overnight for transgene induction. These suspensions were centrifuged again (1,200 \times g for 10 min), and the resulting pellets were resuspended with Murashige-Skoog medium (Sigma-Aldrich) containing 150 μ M acetosyringone to an OD₆₀₀ of 2.0. Each NV construct (*vp1*, *vp1-CodOpt*, or *vp1-vp2-3'UTR*) was mixed with the *Agrobacterium* suspension containing the 126K PTGS suppressor (OD₆₀₀=2.0) at a 1:1 proportion. *N. benthamiana* leaves, 6 to 7 weeks old, were infiltrated with this mixed suspension as described previously. Coat protein accumulation was evaluated at 3 dpi by Western blot using a polyclonal antibody against NV GII.4 (kindly provided by Dr. Shinich Kobayashi, Aichi Prefectural Institute of Public Health, Nagoya, Japan).

After choosing *vp1-vp2-3'UTR* as the optimal construct, 40 *N. benthamiana* plants were infiltrated as described previously for VLP purification. Leaves were harvested at 3 dpi and NV VLPs were partially purified according to Santi et al. (2008) with modifications. VLPs were purified using a continuous 10–40 % sucrose gradient prepared in phosphate buffer (pH 5.3) with centrifugation at 217,485 \times g using a Beckman SW40 rotor (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA) for 2 h at 4 °C. The purified NV VLPs were analyzed by SDS-PAGE and Western blot as previously described. The assembly of VLPs was evaluated by observation of semi-purified VLP preparations using a 200 mesh grid and a JEM 1011 electron microscope (JEOL, Tokyo, Japan) according to Maramorosch and Koprowski (1984).

Results

mGFP-ER accumulation in plants co-infiltrated with suppressor gene constructs

The mGFP4-ER construct was used as a reporter gene to evaluate the enhancement effects of PTGS suppressor genes on heterologous protein accumulation. Half of each leaf was infiltrated with the mGFP-ER construct and the empty pGreen II 64-SK (control). The other half of each leaf was infiltrated with both constructs (mGFP-ER and the suppressor). After 5 dpi, a higher intensity of GFP fluorescence was observed for all tested constructs (HC-Pro of BsMoV, 126K of PMMoV, AC2 of ToSRV, and p19 of TBSV) compared to the control (mGFP-ER + empty pGreenII) (Fig. 1). This experiment was repeated three times to confirm the results. It was remarkable that the infiltration of 126K from PMMoV in one half of the *N. benthamiana* leaf influenced mGFP-ER expression on the other half of the leaf (Fig. 1). In all cases, the expression of mGFP-ER after infiltration with mGFP-ER + empty pGreenII was higher when PMMoV 126K was infiltrated on the other side. By visual evaluation, the expression of PMMoV 126K resulted in the strongest mGFP-ER expression, followed by BsMoV HC-Pro, TBSV p19, and ToSRV AC2. To select the best suppressor for the expression of an NV protein, the mGFP-ER accumulation level was analyzed by Western blot at 6 dpi (Fig. 2 and Fig. S1). The level of mGFP-ER accumulation detected by Western blot was recorded using an Image Scanner III (LabScan 6.0, GE Healthcare) to confirm that the highest intensity occurred for 126K from PMMoV, followed by HC-Pro from BsMoV, p19 from TBSV, and AC2 from ToSRV. The highest level of mGFP-ER accumulation occurred with co-expression of 126K from PMMoV (Fig. 2), followed by BsMoV HC-Pro and AC2 from ToSRV. Therefore, the 126K PTGS suppressor gene from PMMoV was chosen for expression of the NV VLPs.

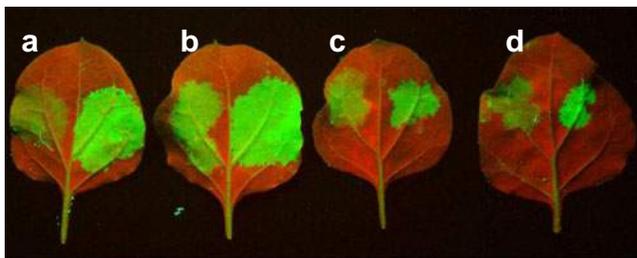


Fig. 1 Comparison of mGFP-ER signal intensity by co-infiltrations of PTGS suppressors. Fluorescence was observed by UV radiation on infiltrated *N. benthamiana* leaves, 5 dpi. The left side of each leaf was infiltrated with only mGFP. The right side of each leaf was infiltrated with mGFP-ER and the suppressors **a** HC-Pro BsMoV, **b** 126K PMMoV, **c** AC2 ToSRV, and **d** p19 TBSV

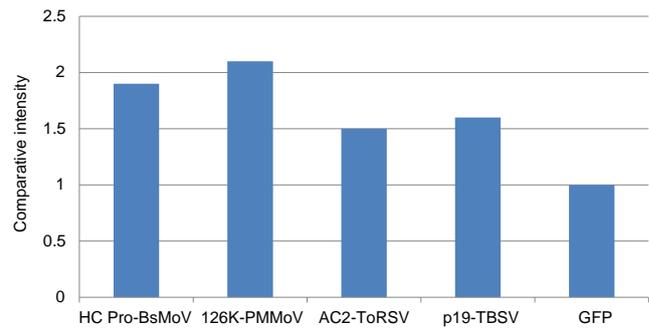


Fig. 2 Volume and intensity proportion from Western blot signals obtained for each construct. Vertical line assigned values relative to 1 for mGFP without silencing suppressor. Horizontal line, mGFP-ER + HC-Pro BsMoV, mGFP-ER + 126K PMMoV, mGFP-ER + AC2 ToSRV, mGFP-ER + p19 TBSV, and mGFP-ER without suppressor (empty pGreenII)

The *vp1-vp2-3'UTR* construct increased the expression of NV-CP

It is known that NV VLPs can be obtained by expression of only the major capsid protein (VP1). However, in a baculovirus expression system, the simultaneous expression of VP1 and VP2 (minor capsid gene) further increased VLP accumulation (Bertolotti-Ciarlet et al. 2003). Because higher VP1 expression levels are desired, we tested three strategies, expression of VP1, expression of *vp1-CodOpt* (Codon optimized to *N. benthamiana* plant expression), and simultaneous expression of VP1 and VP2 from an isolate of the NV GII.4 subtype 2004 (isolated in 2006 at Brasilia, Brazil). In the latter strategy, the *vp2* (ORF3) gene and 3'UTR including a poly (A₅₀) tail were added to further contribute to the expression efficiency. These constructs were agro-infiltrated into *N. benthamiana* leaves. After 3 dpi, six leaf disks (total of 0.3 g) from each treatment were macerated together with 1 × PBS (600 μl) and only a part of the solution (10 μl, corresponding to 6 mg of fresh tissue) was analyzed by Western blot using an anti-VP1 antibody. This experiment was repeated three times, and in all cases, the highest protein accumulation was observed for the *vp1-vp2-3'UTR* construct (Fig. 3), and the production efficiency of VP1 was estimated at approximately 1 mg per 1 g of fresh leaf by Western blot image analysis. Inoculation with the *vp1* construct alone or *vp1-CodOpt* resulted in lower VP1 accumulation. Therefore, the *vp1-vp2-3'UTR* construct was chosen for expression of NV VLPs in a co-expression system with the 126K PTGS suppressor gene.

The NV VP1 protein expressed in plants showed only single band by Western blot, although the positive NV VP1 control made by insect cells showed the double bands. This difference was also observed in previous reports (in “Discussion” section).

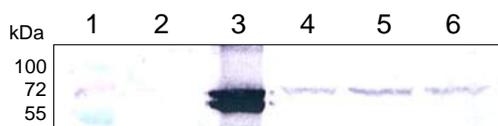


Fig. 3 Western blot analysis of extracts from *N. benthamiana* leaves inoculated with VP1 expression constructs at 3 dpi using an anti-VP1 antibody. **1** Protein marker (Fermentas pre-stained), **2** negative control (*N. benthamiana* leaf with mock inoculation), **3** positive control (VLPs made in insect cells, 7 μ g), **4** *vp1* + 126K PMMoV, **5** *vp1-vp2-3'UTR* + 126K PMMoV, and **6** *vp1-CodOpt* + 126K PMMoV

NV VLP assembly in tissue infiltrated with *vp1-vp2-3'UTR* and the 126K suppressor

A total of 40 *N. benthamiana* plants (two to three upper leaves for each plant) were infiltrated with the constructs containing NV *vp1-vp2-3'UTR* and the 126K PMMoV suppressor gene. VLPs were semi-purified from these tissues and observed with an electron microscope. Centrifuged gradients were collected in ten fractions. The CP-rich fraction was confirmed by Western blot (Fig. 4a). Particles of approximately 40 nm in diameter were clearly detected in this fraction by transmission electron microscopy (Fig. 4b). It was concluded that the co-inoculation of the constructs containing *vp1-vp2-3'UTR* and the 126K PMMoV enabled production of NV VLPs.

Discussion

Several reports of NV VLP production using plant protein expression systems have been available (Kralovetz et al. 2010; Lai and Chen 2012; Santi et al. 2006, 2008; Tiwari

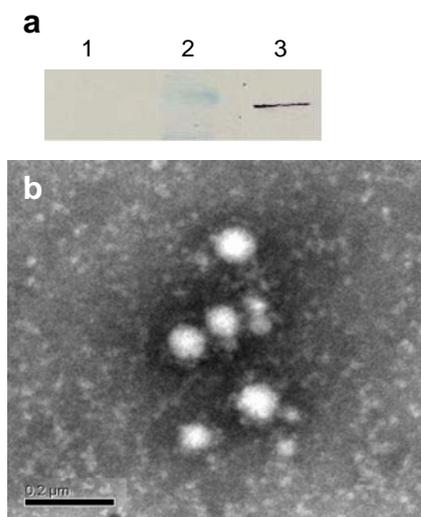


Fig. 4 The analysis of semi-purified VLPs from plant extracts. **a** Western blot analysis of the gradients from the VLP suspensions. **1** Negative control, **2** protein marker (SIGMA-ALDRICH, pre-stained; Blue band showed 90 kDa), and **3** *vp1-vp2-3'UTR* + 126K PMMoV. **b** Electron micrograph of the VLP suspension. Bar=0.2 μ m

et al. 2009; Daniell et al. 2009; Zhang et al. 2006; Huang et al. 2009). These reports provide protocols for production of viable VLPs at low costs and in large quantities. More recently, modified transient expression systems using viral vectors (known as magnICON) have offered high efficiency, rapid VLP production (Santi et al. 2008; Lai and Chen 2012; Huang et al. 2009). However, magnICON systems could be limited by the size of the gene insert that can be accommodated. Trials for NV VLP expression are all based upon constructs that only encode *vp1*. Therefore, longer inserts (for example the *vp1-vp2-3'UTR* cassette, ca. 2.6 Kbp) have not been attempted in plant expression system. It is expected that co-expression of VP1 and VP2 enhances the stability of VLPs (Bertolotti-Ciarlet et al. 2003), an essential property for vaccine development. Therefore, our group used binary vector systems for VLP production.

The pEAQ vectors are known for their small plasmid size (ca. 7 Kbps). These vectors were constructed by removing more than 7 Kbp of the non-essential region from the pBINPLUS backbone and T-DNA region and by adding the TBSV p19 PTGS suppressor gene (Sainsbury et al. 2009). The vector provided an easy and quick tool for production of viral antigens. We postulated that other PTGS suppressors may increase expression efficiency because some viruses that infect *N. benthamiana* induce more severe symptoms in this plant than others. Thus, we sought to utilize putative PTGS suppressor gene from these viruses. The choice of the 126K protein from PMMoV as the PTGS suppressor partner for production of NV VLPs was made due to its superior enhancement effect on expression of mGFP-ER compared to the other tested suppressors (HC-Pro BSMoV, AC2 from ToSRV, and p19 TBSV). Lower target protein accumulation occurred for AC2 from the begomovirus *Tomato golden mosaic virus* compared to HC-Pro from *Tobacco etch virus* and p19 from *Cymbidium ringspot virus* according to Wang et al. (2005). Our trial corroborated these results. According to Hamilton et al. (2002), Mallory et al. (2001), and Wydro et al. (2006), several factors influence the genetic requirements for gene silencing and the suppressor response including the nature of the target protein, the time point that the sample is analyzed (dpi), the types of binary vectors used and the lines of *N. benthamiana* and *A. tumefaciens*. Therefore, tests performed with PTGS suppressors must be standardized for selection of a good binary vector.

For NV VLP expression, the *vp1-vp2-3'UTR* construct was chosen because it produced a higher protein yield compared to the *vp1* only construct. This finding is supported by the observations of Bertolotti-Ciarlet et al. (2003) in insect cells, implying that the “ribosomal termination–initiation mechanism” is also functional in plant cells. For a stable NV VLP production, the simultaneous expression of VP2 with VP1 seems very important. Therefore, our binary vector system may represent a valuable alternative to baculovirus expression systems.

In this study, the plant-expressed NV VP1 always showed as single band in Western blot analysis. However, VP1 prepared by baculovirus system showed often double bands (58 kDa and 56 kDa) by Western blot in previous reports (Huhti et al. 2010; Blazevic et al. 2011; Koho et al. 2012) and also in our study when used as a positive control (Fig. 3). The smaller 56 kDa band represents a product that is truncated by 34 amino acids from its N-terminal end possibly by host protease as protease K or thermolysin (Koho et al. 2012). However, NV VP1 expressed in plants showed only a single band by Western blot as reported previously (Santi et al. 2008; Lai and Chen 2012) and also in our study (Fig. 3). It is indicative that the plant cells do not contain such proteases which cleave NV VP1.

It was remarkable that the NV expression using the *vp1-CodOpt* construct produced a similar protein accumulation level as the *vp1* construct, which was isolated from viral cDNA by RT-PCR (Fig. 3). In this study, the attempt to use the codon optimization did not produce the expected result. Such observations were already reported by Maclean et al. (2007) who observed that the native L1 protein of HPV accumulated in higher amounts than the plant codon-optimized gene using binary expression vectors in *N. benthamiana* plants. It was concluded that the codon optimization cannot always be considered the best strategy to increase the protein expression efficiency.

In our study, four different PTGS suppressor genes were preliminary evaluated and the best one was chosen to produce an efficient expression tool. The target protein expression using a binary vector co-expressed with this PTGS suppressor (126K from PMMoV) enabled higher accumulation and assembly of norovirus VLPs. However, additional studies will be required to improve the target protein accumulation level, such as those related to their subcellular localization and reduction of plant cell proteolysis.

Acknowledgments The work was funded by Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal (FAPDF, Brazil) for a research grant and by “Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico” (CNPq, Brazil) for the DSC scholarship to the first author. The third, sixth, and seventh authors are research fellows of CNPq.

References

- Ausar SF, Foubert TR, Hudson MH, Vedvick TS, Middaugh CS (2006) Conformational stability and disassembly of Norwalk virus-like particles effect of pH and temperature. *J Biol Chem* 281:19478–19488. doi:10.1074/jbc.M603313200
- Barbosa JC, Barreto SS, Inoue-Nagata AK, Reis MS, Firmino AC, Bergamin Filho A, Rezende JAM (2009) Natural infection of *Nicandra physaloides* by *Tomato severe rugose virus* in Brazil. *J Gen Plant Pathol* 75:440–443. doi:10.1007/s10327-009-0198-5
- Baulcombe D (2005) RNA silencing. *Trends Biochem Sci* 30:290–293. doi:10.1016/j.tibs.2005.04.012
- Belknap WR, Rockhold DR, McCue KF (2008) pBINPLUS/ARS: an improved plant transformation vector based on pBINPLUS. *Biotech* 44:753–756. doi:10.2144/000112731
- Bertolotti-Ciarlet A, Crawford SE, Hutson AM, Estes MK (2003) The 3' end of Norwalk virus mRNA contains determinants that regulate the expression and stability of the viral capsid protein VP1: a novel function for the VP2 protein. *J Virol* 77:11603–11615. doi:10.1128/JVI.77.21.11603-11615.2003
- Blazevic V, Lappalainen S, Nurminen K, Huhti L, Vesikari T (2011) Norovirus VLPs and rotavirus VP6 protein as combined vaccine for childhood gastroenteritis. *Vaccine* 29:8126–8133. doi:10.1016/j.vaccine.2011.08.026
- Circelli P, Domini M, Villani ME, Benvenuto E, Marusic C (2010) Efficient *Agrobacterium*-based transient expression system for the production of biopharmaceuticals in plants. *Bioeng Bugs* 1:221–224. doi:10.4161/bbug.1.3.11722
- Daniell H, Singh ND, Mason H, Streatfield SJ (2009) Plant made vaccine antigens and biopharmaceuticals. *Trends Plant Sci* 14:669–679. doi:10.1016/j.tplants.2009.09.009
- Engelen V, Molthoff FA, Conner AJ, Nap JP, Pereira A, Stiekema WJ (1995) pBINPLUS—an improved plant transformation vector based on pBIN19. *Transgenic Res* 4:288–290. doi:10.1007/BF01969123
- Garabagi F, Gilbert E, Loos A, McLean MD, Hall JC (2012) Utility of the P19 suppressor of gene-silencing protein for production of therapeutic antibodies in *Nicotiana* expression hosts. *Plant Biotechnol J* 10:1118–1128. doi:10.1111/j.1467-7652.2012.00742.x
- Hamilton A, Voinnet O, Chappell L, Baulcombe D (2002) Two classes of short interfering RNA in RNA silencing. *EMBO J* 21:4671–4679. doi:10.1093/emboj/cdf464
- Hardy ME (2005) Norovirus protein structure and function. *FEMS Microbiol Lett* 253:1–8. doi:10.1016/j.femsle.2005.08.031
- Haseloff J, Siemering KR, Prasher DC, Hodge S (1997) Removal of a cryptic intron and subcellular localization of green fluorescent protein are required to mark transgenic *Arabidopsis* plants brightly. *Proc Natl Acad Sci* 94:2122–2127
- Hellens RP, Allan AC, Friel EN, Bolitho K, Grafton K, Templeton MD, Karunairatnam S, Gleave AP, Laing WA (2005) Transient expression vector for functional genomics, quantification of promoter activity and RNA silencing in plants. *Plant Methods* 1:13. doi:10.1186/1746-4811-1-13
- Herbert TP, Brierley I, Brown TD (1996) Detection of the ORF3 polypeptide of feline calicivirus in infected cells and evidence for its expression from a single, functionally bicistronic, subgenomic mRNA. *J Gen Virol* 77:123–127. doi:10.1099/0022-1317-77-1-123
- Huang Z, Chen Q, Hjelm B, Arntzen C, Hugh M (2009) A DNA replicon system for rapid high-level production of virus like particles in plants. *Biotechnol Bioeng* 103:706–714. doi:10.1002/bit.22299
- Huhti L, Blazevic V, Nurminen K, Koho T, Hytonen VP, Vesikari T (2010) A comparison of methods for purification and concentration of norovirus GII-4 capsid virus-like particles. *Arch Virol* 155:1855–1858. doi:10.1007/s00705-010-0768-z
- Jiang XI, Wang MIN, Graham DY, Estes MK (1992) Expression, self-assembly, and antigenicity of the Norwalk virus capsid protein. *J Virol* 66:6527–6532
- Kissmann J, Ausar SF, Roubert TR, Brock J, Switzer MH, Detzi EJ, Vedyick TS, Middaugh R (2008) Physical stabilization of Norwalk virus-like particles. *J Pharm Sci* 97:4208–4212. doi:10.1002/jps.21315
- Koho T, Mantyla T, Laurinmaki P, Huhti L, Butcher SJ, Vesikari T, Kulomaa MS, Hytonen VP (2012) Purification of norovirus-like particles (VLPs) by ion exchange chromatography. *J Virol Methods* 181:6–11. doi:10.1016/j.jviromet.2012.01.003
- Kralovetz MH, Mason HS, Chen Q (2010) Norwalk virus-like particles as vaccines. *Expert Rev Vaccines* 9:299–307. doi:10.1586/erv.09.163

- Lai H, Chen Q (2012) Bioprocessing of plant-derived virus-like particles of Norwalk virus capsid protein under current good manufacturing practice regulations. *Plant Cell Rep* 31:573–584. doi:10.1007/s00299-011-1196-6
- Lindbo JA (2007) High-efficiency protein expression in plants from agroinfection-compatible *Tobacco mosaic virus* expression vectors. *Plant Physiol* 145:1232–1240. doi:10.1104/pp.107.106377
- Lucinda N, Inoue-Nagata AK, Kitajima EW, Nagata T (2010) Complete genome sequence of *Brugmansia suaveolens* mottle virus, a potyvirus from an ornamental shrub. *Arch Virol* 155:1729–1732. doi:10.1007/s00705-010-0798-6
- Maclean J, Koekemoer M, Olivier AJ, Stewart D, Hitzeroth II, Rademacher T, Fischer R, Williamson AL, Rybicki EP (2007) Optimization of human papillomavirus type 16 (HPV-16) L1 expression in plants: comparison of the suitability of different HPV-16 L1 gene variants and different cell-compartment localization. *J Gen Virol* 88:1460–1469. doi:10.1099/vir.0.82718-0
- Mallory AC, Ely L, Smith TH, Marathe R, Anandalakshmi R, Fagard M, Vaucheret H, Pruss G, Bowman L, Vance VB (2001) HC-Pro suppression of transgene silencing eliminates the small RNAs but not transgene methylation or the mobile signal. *Plant Cell* 13:571–583. doi:10.1105/tpc.13.3.571
- Maramorosch K, Koprowski H (1984) Immunosorbent electron microscopy in plant virus studies. In: Maramorosch K, Koprowski H (eds) *Methods in Virology*, vol III. Academic, New York, pp 85–101
- Murakami K, Suzuki S, Aoki N, Nadano D, Uchida K, Yamashita K, Oka T, Katayama K, Takeda N, Matsuda T (2010) Binding of Norovirus virus-like particles (VLPs) to human intestinal Caco-2 cells and the suppressive effect of pasteurized bovine colostrum on this VLP binding. *Biosci Biotechnol Biochem* 74:541–547. doi:10.1271/bbb.90729
- Oliveira LM, Inoue-Nagata AK, Nagata T (2010) Complete genome nucleotide sequence of *Pepper mild mottle virus* isolated in the Federal District, Brazil. *Trop Plant Pathol* 35:373–376
- Sainsbury F, Thueemann EC, Lomonosoff GP (2009) pEAQ: versatile expression vectors for easy and quick transient expression of heterologous proteins in plants. *Plant Biotechnol J* 7:682–693. doi:10.1111/j.1467-7652.2009.00434.x
- Santi L, Huang Z, Mason H (2006) Virus like particles production in green plants. *Methods* 40:66–76. doi:10.1016/j.ymeth.2006.05.020
- Santi L, Batchelor L, Huang Z, Hjelm B, Kilbourne J, Arntzen CJ, Chen Q, Mason HS (2008) An efficient plant viral expression system generating orally immunogenic Norwalk virus-like particles. *Vaccine* 26:1846–1854. doi:10.1016/j.vaccine.2008.01.053
- Tiwari S, Verma PC, Singh PK, Tuli R (2009) Plants as bioreactors for the production of vaccine antigens. *Biotechnol Adv* 27:449–467. doi:10.1016/j.biotechadv.2009.03.006
- Wang H, Buckley KJ, Yang X, Buchamann RC, Bisaro DM (2005) Adenosine kinase inhibition and suppression of RNA silencing by geminivirus AL2 and L2 proteins. *J Virol* 79:7410–7418. doi:10.1128/JVI.79.12.7410-7418.2005
- Wydro M, Kozubek E, Lehmann P (2006) Optimization of transient *Agrobacterium*-mediated gene expression system in leaves of *Nicotiana benthamiana*. *Acta Biochim Pol* 53:289–298
- Xia M, Farkas T, Jiang XI (2007) Norovirus capsid protein expressed in yeast forms virus-like particles and stimulates systemic and mucosal immunity in mice following an oral administration of raw yeast extracts. *J Med Virol* 79:74–83. doi:10.1002/jmv.20762
- Yoda T, Terano Y, Shimada A, Suzuki Y, Yamazaki K, Sakon N, Oishi I, Utagawa ET, Okuno Y, Shibata T (2000) Expression of recombinant Norwalk-like virus capsid proteins using a bacterial system and the development of its immunologic detection. *J Med Virol* 60:475–481. doi:10.1002/(SICI)1096-9071(200004)60:4<475::AID-JMV17>3.0.CO;2-B
- Yoon JY, Han KS, Park HY, Choi SK (2012) Comparative analysis of RNA silencing suppression activities between viral suppressors and an endogenous plant RNA-dependent RNA polymerase. *Virus Genes* 44:495–504. doi:10.1007/s11262-012-0725-x
- Zhang X, Buehner NA, Hutson AM, Estes MK, Mason HS (2006) Tomato is a highly effective vehicle for expression and oral immunization with Norwalk virus capsid protein. *Plant Biotechnol J* 4:419–432. doi:10.1111/j.1467-7652.2006.00191.x