



# **Desenvolvimento de vetores virais para produção de proteínas recombinantes**

**Raquel Medeiros Vasques Bonnet**

**Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biodiversidade da Universidade de Brasília, para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia e Biodiversidade.**

**Orientador: Dr. Tatsuya Nagata**

**Brasília, 2018**



# **Desenvolvimento de vetores virais para produção de proteínas recombinantes**

***Capítulo I:***  
**Introdução Geral**

***Capítulo II:***  
**Development of a new tobamovirus-based viral vector for protein expression in plants**

***Capítulo III:***  
**Replicon baseado no tymovirus *Tomato blistering mosaic virus* para apresentação de peptídeos**

***Capítulo IV:***  
**Tymovirus-like particle formation in binary system baculovirus/insect cell and its potential use as a carrier structure for small epitopes**

***Capítulo V:***  
**Conclusão geral**

**RAQUEL MEDEIROS VASQUES BONNET**

**Desenvolvimento de vetores virais para produção de  
proteínas recombinantes**

**Banca Examinadora:**

---

**Dr. Tatsuya Nagata (Orientador)**  
**(CEL-UnB)**

---

**Dr. Renato de Oliveira Resende**  
**(CEL-UnB)**

---

**Dr. Elibio Rech**  
**(Embrapa-Recursos Genéticos e Biotecnologia)**

---

**Dr. Nicolau Brito da Cunha**  
**(Universidade Católica de Brasília-UCB)**

---

**Dra. Eliane Noronha**  
**(CEL-UnB)**

*“The important thing is not to stop questioning. Curiosity has its own reason for existence. One cannot help but be in awe when he contemplates the mysteries of eternity, of life, of the marvelous structure of reality. It is enough if one tries merely to comprehend a little of this mystery each day.”*

**— Albert Einstein**



# SUMÁRIO

Lista de abreviaturas e símbolos .....	8
Lista de figuras.....	11
Resumo .....	13
Abstract .....	14
Objetivos .....	15
Objetivo geral.....	15
Objetivos específicos .....	15
Capítulo 1 – Introdução geral .....	16
1. Sistemas de expressão de proteína recombinante .....	17
1.1 Plantas como biofábricas de proteínas .....	19
1.2 Sistema de expressão em células de inseto via baculovírus.....	35
Capítulo 2 – Development of a new tobamovirus - based viral vector for protein expression in plants.....	39
2. Development of a new tobamovirus-based viral vector for protein expression in plants .....	40
2.1 Abstract .....	40
2.2 Introduction.....	41
2.3 Material and Methods .....	44
2.3.1 Modification of PMMoV-based Vector.....	44
2.3.2 Bacterial Strains and Agroinfiltration.....	46
2.3.3 Plants and GFP Imaging .....	47
2.3.4 Protein Extraction and Analysis.....	47
2.4 Results and Discussion .....	48

2.4.1 GFP expression using the PMMoV–based vector .....	48
2.4.2 Western blotting Analysis.....	50
2.5 References.....	53
Capítulo 3 – Replicon baseado no tymovirus <i>tomato blistering mosaic virus</i> com potencial para apresentação de peptídeos .....	58
3. Replicon baseado no tymovirus <i>tomato blistering mosaic virus</i> com potencial para apresentação de peptídeos.....	59
3.1 Resumo .....	59
3.2 Introdução .....	60
3.3 Materiais e Métodos.....	63
3.3.1 Construção do mutante com deleção na N-terminal CP .....	63
3.3.2 Transformação de bactérias e Agroinfiltração em <i>Nicotiana benthamiana</i> ...	64
3.3.3 Infectividade e Extração de Proteínas.....	65
3.4 Resultados e Discussão .....	66
3.4.1 Construção, Infectividade e Expressão do mutante CP em plantas .....	66
3.5 References.....	69
Capítulo 4 – Tymovirus-like particle formation in binary system baculovirus/ insect cell and its potential as a carrier structure for small epitopes .....	71
4. Tymovirus-like particle assembly from baculovirus/insect cell binary system and its potential use as a carrier structure for small epitope display.....	72
4.1 Abstract.....	72
4.2 Introduction.....	73
4.3 Materials and Methods.....	75
4.3.1 Construction of recombinant bacmids harboring the ToBMV <i>cp</i> gene and versions .....	75
4.3.2 Protein expression analyses in Tn5B cell .....	77

4.3.3 Light and Immunofluorescence microscopy.....	78
4.3.4 tVLPs purification and negative-stained transmission electron microscopy ..	78
4.4 Results.....	79
4.4.1 Virus construction and protein expression.....	79
4.4.2 Immunofluorescence analysis of infected cells .....	80
4.4.3 Tymovirus-like particle (tVLP) formation during baculovirus infection .....	81
4.4.4 ToBMV coat protein carrying the CHIKV epitope .....	82
4.5 Discussion .....	85
4.6 References.....	88
Capítulo 5 - Conclusão Geral.....	93
5. Conclusão geral.....	94
Referências.....	97

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

μL	microgramas
μL	microlitro
AcMNPV	<i>Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus</i>
ATTE	expressão transiente via <i>Agrobacterium tumefaciens</i>
BEVS	sistema de expressão em baculovírus
BSA	albumina de soro bovino
°C	grau Celsius
cDNA	DNA sintetizado a partir de um molde de RNA
CHIKV	<i>Chikungunya virus</i>
CP	capa proteica
DNA	ácido desoxirribonucleico
EUA	Estados Unidos da América
dpi	dias pós infiltração
FDA	U.S. Food and Drug Administration
FMDV	<i>Foot-and-mouth disease virus</i>
g	grama
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>
h	hora
h.p.i.	horas pós-infecção
ICTV	Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus
kb	kilobase
kDa	kiloDalton
LB	meio de cultura Luria-Bertani

M	molar
MS	meio de cultura Murashige and Skoog
<i>mgfp5</i>	gene que codifica a proteína verde fluorescente modificada 5
min	minutos
mL	mililitro
mM	milimolar
NBT/BCIP	nitro-blue tetrazolium and 5-bromo-4-chloro-3'-indolyphosphate
MP	proteína de movimento
nm	nanômetros
nt	nucleotídeos
ORF	<i>open reading frame</i>
P10	10-kDa protein
pb	pares de bases
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
pH	potencial hidrogeniônico
PMF	<i>plant molecular farming</i>
PMMoV	<i>Pepper mild mottle virus</i>
polh	poliedrina
PTGS	<i>pós transcriptional gene silencing</i>
RDR1	RNA polimerase dependente de RNA tipo 1
RdRp	RNA polimerase dependente de RNA
RNA	ácido ribonucleico
RNA <sub>m</sub>	ácido ribonucleico mensageiro
s	segundos

Sf	<i>Spodoptera frugiperda</i>
ssRNA	ácido ribonucleico de fita simples
TBS	<i>tris-buffered saline</i>
TBST	<i>tris-buffered saline</i> with Tween 20
TMGMV	<i>Tomato mild green mosaic virus</i>
TMV	<i>Tobacco mosaic virus</i>
T.ni	<i>Trichoplusia ni</i>
ToMV	<i>Tomato mosaic virus</i>
T-DNA	<i>transferred DNA</i>
Ti plasmid	<i>tumor inducing</i>
UTR	região não traduzida
UV	ultra violeta
VLP	<i>virus-like particle</i>
tVLP	<i>tymovirus-like particles</i>

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO 1

<b>Figura 1:</b> Representação esquemática simplificada da estratégia dos vetores virais.....	31
---	----

### CAPÍTULO 2

<b>Figura 1:</b> Representação esquemática do vetor baseado em PMMoV .....	46
<b>Figura 2:</b> Agrobacterium-mediated transient expression of GFP in <i>Nicotiana benthamiana</i> leaves.....	49
<b>Figura 3:</b> Análise de Western blotting das folhas extraídas utilizando anti-GFP e anti-His.....	50

### CAPÍTULO 3

<b>Figura 1:</b> Estrutura genômica da espécie tipo do gênero <i>Tymovirus</i> , <i>Turnip yellow mosaic virus</i> (TYMV), mostrando as ORFs.....	59
<b>Figura 2:</b> Estrutura do capsídeo de TYMV com uma unidade assimétrica.....	60
<b>Figura 3:</b> Sequência de aminoácidos da capa proteica de ToBMV.....	63
<b>Figura 4:</b> Visualização dos sintomas da infecção com 9 dpi.....	65
<b>Figura 5:</b> Análise de Western blot da capa proteica.....	66

## CAPÍTULO 4

<b>Figura 1:</b> Efeitos citopáticos em células Tn5B e Western blotting das versões de CP modificadas.....	79
<b>Figura 2:</b> Imunofluorescência de vAc-ToBMV-CP e/ou vAc-ToBMV- $\Delta$ 2-24-CP....	80
<b>Figura 3:</b> Dot-blot e microscopia eletrônica de vAc-ToBMV-CP e/ou vAc-ToBMV- $\Delta$ 2-24-CP.....	81
<b>Figura 4:</b> Análises de vAc-ToBMV-E2- $\Delta$ 2-24-CP.....	83



## RESUMO

O uso de vetores virais vegetais para expressão transiente de proteínas heterólogas é uma ferramenta útil para produção em larga escala de biofármacos importantes como anticorpos e antígenos. Alguns grupos de vírus vegetais são amplamente utilizados para esta finalidade, como por exemplo tobamovirus, potexvirus, cucumovirus, entre outros. Neste estudo, foram desenvolvidos três vetores virais distintos. O tobamovirus *Pepper mild mottle virus* (PMMoV) foi utilizado para o desenvolvimento do primeiro vetor viral para a expressão de proteínas recombinantes, desse estudo. Inicialmente, o clone infeccioso de PMMoV foi construído no pequeno vetor binário pJL89, substituindo-se a parte central da capa proteica do vírus pelo gene repórter *Green fluorescent protein* (GFP), usando a técnica de *Gibson Assembly*. O vetor pJL\_PMMoV( $\Delta$ )GFP fusionado mostrou-se viável para expressão do gene de GFP. Posteriormente, o gene de GFP foi substituído pelo gene de antígenos virais de *Chikungunya virus* (CHIKV) e o gene foi expresso com sucesso. No segundo trabalho, o clone infeccioso do tymovirus *Tomato blistering mosaic virus* – ToBMV foi adaptado para futuramente ser usado como vetor de apresentação de peptídeos. A região N-terminal da capa proteica foi modificada deletando-se 24 aminoácidos (CP $\Delta$ 2-24) que mostraram-se não essenciais para a expressão do capsômero e infectividade. E, finalmente no terceiro estudo, um baculovírus recombinante foi construído para checar a montagem de *tymovirus-like particles* (tVLPs) após a expressão da CP do tipo selvagem ou uma versão contendo uma pequena deleção na região amino-terminal da CP (CP $\Delta$ 2-24). À essa região foi adicionada uma pequena sequência contendo um epítipo de CHIKV para testar o potencial uso de ToBMV como uma proteína carreadora de epítipos imunogênicos. Dessa maneira, foi observada a formação de tVLPs em todas as versões da CP quando o gene foi expresso em células de inseto utilizando baculovírus.

Palavras chave: Expressão de proteínas, vetor viral, PMMoV, GFP, ToBMV, baculovírus, VLP

## ABSTRACT

The use of plant viral vectors for transient expression of heterologous proteins is a useful tool for large-scale production of important biopharmaceuticals such as antibodies and antigens. Some groups of plant viruses are widely used for this purpose, for example tobamovirus, potexvirus, cucumovirus, and so on. In this study, three different viral vectors were developed. The tobamovirus *Pepper mild mottle virus* (PMMoV) was used for the development of the first viral vector in this study for the expression of recombinant proteins. Initially, the PMMoV infectious clone was constructed on the small binary vector pJL89, replacing a middle part of the viral coat protein gene by the *Green fluorescent protein* (GFP) reporter gene, using the *Gibson Assembly* technique. The fused pJL\_PMMoV( $\Delta$ )GFP vector proved to be viable for protein expression. The GFP gene was replaced by the viral antigen gene of *Chikungunya virus* (CHIKV) and successfully expressed. In the second work, the tymovirus infectious clone *Tomato blistering mosaic virus* – ToBMV was adapted to be used as display peptide vector, in the future. The N-terminal region of the protein coat was modified by deleting 24 amino acids (CP $\Delta$ 2-24), which were shown to be non-essential for expression of the capsomer and infectivity. And, finally in the third study, a recombinant baculovirus was constructed to check a set of tymovirus-like particles (tVLPs) following expression of the wild-type CP or a version containing a small deletion in the amino-terminal region of CP (CP $\Delta$ 2-24). To this region was added a small sequence containing CHIKV epitope to test the potential use of ToBMV as a protein carrier of immunogenic epitopes. Likewise, cell formation was observed in all versions of CP when the gene was expressed in insect cells by baculovirus.

Keywords: Protein expression, viral vectors, PMMoV, GFP, ToBMV, baculovirus, VLP

## OBJETIVOS

### Objetivo geral

O presente trabalho visou a construção e caracterização de diferentes vetores virais baseados no tobamovirus *Pepper mild mottle virus* e no tymovirus *Tomato blistering mosaic virus* para expressão de proteínas recombinantes via *Agrobacterium* em plantas *Nicotiana benthamiana* e via sistema de expressão em baculovírus (BEVS) em células de inseto.

### Objetivos específicos

A construção de três vetores virais com estratégias distintas:

- Vetor com gene repórter GFP ou multiepitopo da CHIKV inseridos “*in frame*” na região central da capa proteica do tobamovirus *Pepper mild mottle virus* para expressão transiente via *Agrobacterium tumefaciens* em plantas de *Nicotiana benthamiana*.
- Replicon baseado no tymovirus *Tomato blistering mosaic virus* contendo uma modificação na região N-terminal da CP, visando usar a CP como “*display*” para produção de peptídeos em plantas via agroinfiltração.
- Vetor baseado em baculovírus recombinante para produção de *tymovirus-like particles* (tVLPs) e seu potencial uso como proteína carreadora de pequenos epitopos.

## **CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO GERAL**

## 1. SISTEMAS DE EXPRESSÃO DE PROTEÍNA RECOMBINANTE

Com o aumento do uso comercial de proteínas recombinantes como drogas terapêuticas, fez-se a necessidade de sistemas de expressão eficientes, com baixo custo e fáceis de usar (Lindbo, 2007). Atualmente, várias técnicas de expressão são utilizadas para produção de proteínas heterólogas, ou seja, produzidas em organismos diferentes daqueles de sua origem, dentre os quais podemos citar os que utilizam células de bactérias, de leveduras, culturas de células de insetos e de mamíferos, além de plantas e animais transgênicos (Rybicki, 2014, 2009).

Idealmente, um atraente sistema de expressão deve: (i) ser capaz de produzir a proteína desejada com a conformação correta; (ii) apresentar boa produtividade; (iii) ser fácil de manusear e manter; (iv) ser seguro e econômico; e (v) oferecer facilmente os processamentos *downstream*. No entanto, cada sistema de expressão possui vantagens e desvantagens inerentes e não existe um sistema de expressão universalmente aplicável (Rai and Padh, 2001; Sørensen, 2010).

O sistema procariótico baseado em *Escherichia coli* vem sendo o mais utilizado por permitir que uma grande quantidade de proteínas seja expressa de maneira rápida a um custo mais baixo que os sistemas eucarióticos baseados em culturas de células, por exemplo, e por possuir a facilidade de manutenção de culturas. No entanto, observa-se que o processamento das proteínas de origem eucariótica em bactérias é simples e limitado aos que não necessitem da maquinaria de processamento pós-traducional, ou que estas não sejam necessárias para a atividade biológica. Por exemplo, a maioria das proteínas humanas glicosiladas usadas para fins terapêuticos requerem a glicosilação, processo que as bactérias não realizam (Sharma and Sharma, 2009).

Outra desvantagem que o sistema bacteriano apresenta é que as proteínas podem formar agregados insolúveis, chamados corpúsculos de inclusão, e para solubilizá-los, utilizam-se agentes desnaturantes que podem causar danos estruturais e dificultar a recuperação das cadeias polipeptídicas, além de aumentar o custo do processo (Ma et al., 2003). Há também a possibilidade dessas proteínas serem tóxicas para o organismo, o que poderia resultar em baixos níveis de produção (Benz and Schmidt, 2002).

Por sua vez, os sistemas que utilizam células eucarióticas, a cultura de leveduras, *Saccharomyces cerevisiae*, e mais recentemente *Pichia pastoris*, apresentam um custo relativamente baixo quando comparado à outros sistemas, porém, apresentam a desvantagem de frequentemente hiperglicosilarem as proteínas recombinantes e também o fato das mesmas serem instáveis e insolúveis quando produzidas em quantidade (Twyman et al., 2003).

O sistema que utiliza células de mamíferos já demonstrou ser um dos sistemas mais eficientes com relação às modificações pós-traducionais da proteína recombinante, principalmente se tratando de uma glicoproteína. No entanto, apresenta algumas desvantagens como, por exemplo, a manutenção das células com meios de cultura bastante complexos e uso de reatores sofisticados e a necessidade de mão de obra especializada, o que vem a onerar a produção. Além disso, apresenta muitas vezes, baixo rendimento, longo tempo para produção de proteína, alto custo de armazenamento e grande risco biológico de contaminação das amostras por vírus ou outros patógenos que poderão infectar humanos e outros animais (Hamilton et al., 2006).

Uma abordagem interessante para produção de proteínas recombinantes tem sido a secreção de proteínas no leite e urina de animais transgênicos (Houdebine, 2018). Bovinos, caprinos, suínos, ovinos, camundongos e coelhos, apresentam integrados aos seus genomas os genes de interesse controlados por promotores que restringem a expressão da proteína às glândulas mamárias (Bösze et al., 2008; Dyck et al., 2003; Echelard et al., 2009). Uma desvantagem dessa técnica, porém, é o tempo de espera razoavelmente grande para obtenção de proteínas recombinantes e, apesar de ter sido demonstrada a possibilidade de secreção de proteínas heterólogas na urina de animais transgênicos sob o controle de promotores tecido-específicos, o sistema continua com a grande desvantagem de ser um sistema muito caro, com o maior tempo de produção entre todos os sistemas vistos anteriormente e o que possui a menor capacidade de escalonamento de biossíntese de proteínas heterólogas, sem esquecer o risco de contaminação da amostra por vírus animais e príons (Larrick and Thomas, 2001; Twyman et al., 2003).

### **1.1 Plantas como biofábricas de proteínas**

Era o ano de 1989, quando uma pesquisa sobre anticorpos monoclonais produzidos em plantas pelo grupo de Andre Hiatt ilustrou a capa da revista *Nature*. Foi então, que a atenção do mundo voltou-se para as plantas como uma conveniente e versátil plataforma de produção de proteínas farmacêuticas recombinantes com menos risco biológico, rápido e de custo mais baixo (Hiatt et al., 1989). Estima-se que essas proteínas possam ser produzidas em plantas por 2-10% do custo do sistema de fermentação microbiana, por cerca de 0,1% dos de uma cultura de células de mamíferos e com uma redução de 10 – 50 vezes, pelo menos, em relação ao custo

final do sistema bacteriano. Plantas necessitam basicamente de: água, luz e solo (Paul and Ma, 2011; Twyman et al., 2003; Yao et al., 2015; Yusibov et al., 2011).

Além do baixo custo de produção citado acima, outros fatores a favor dos sistemas vegetais incluem o potencial para produção em larga escala, a eliminação de custos relativos à purificação e processamento para o caso de produtos administrados oralmente (vacinas comestíveis), a disponibilidade da tecnologia para colher e processar plantas e os seus produtos à escala industrial e são fáceis de modificar por engenharia genética. Além disso, proteínas terapêuticas produzidas em plantas, purificadas ou não, têm menos probabilidade de contaminação com micro-organismos patogênicos humanos do que as derivadas de células animais, pois as plantas não são hospedeiras para agentes infecciosos humanos ou animais, endotoxinas ou príons (Giddings et al., 2000).

A primeira proteína recombinante de interesse farmacêutico a ser produzida em planta foi o hormônio do crescimento humano via tabaco transgênico e calo de girassol (Barta et al., 1986), em seguida, um anticorpo monoclonal em tabaco transgênico em 1989 (Hiatt et al., 1989). Vários estudos foram publicados nos anos seguintes, em particular a expressão de hepatite B (HbsAg) em plantas de tabaco (Mason et al., 1992), seguida pela apresentação de um epítipo da malária na superfície de tobacco mosaic tobamovirus (TMV) (Turpen et al., 1995), no entanto, o avanço para o sucesso comercial veio somente após ser definida uma medida regulatória aceita para produtos biológicos derivados de plantas, culminando em 2012 com a aprovação de uma enzima utilizando a plataforma ProCellEx<sup>®</sup> (<http://protalix.com/technology/procellex-platform/>) expressa em cultura de células de cenoura, denominada ELELYSO<sup>™</sup> (alfataliglucerase), uma forma recombinante de



glucocerebrosidase humana desenvolvida pela Pfizer e Protalix BioTherapeutics (<https://www.elelyso.com>) para o tratamento da Doença de Gaucher Tipo 1 (Fox, 2012).

Retroagindo à 2009, em resposta a pandemia de Influenza H1N1 que matou mais de 150.000 pessoas somente na América do Norte, o governo dos EUA iniciou um programa de US\$ 1,6 bilhões para encontrar alternativas para produzir rapidamente um grande número de vacinas, e no ano seguinte firmou contrato com a Fraunhofer USA (<http://www.fhcmb.org>) que utiliza vetores virais vegetais para expressão de proteínas de antígeno da Influenza H1N1 em planta de tabaco, *Nicotiana benthamiana* (Jul-Larsen et al., 2012). Recentemente, uma droga experimental composta de três anticorpos monoclonais utilizada para o tratamento da doença causado por vírus Ebola durante o recente surto, chamada ZMapp™ (<http://mappbio.com/z-mapp/>), foi produzida em planta de tabaco pela Mapp Biopharmaceutical (Qiu et al., 2014).

Desde então, o grande potencial do uso de plantas para produção de biofármacos tem sido ilustrado por mais de 120 produtos que estão em fase de testes clínicos e pré-clínicos (Hefferon, 2012; Yao et al., 2015; Yusibov et al., 2015). Recentemente, foi instituída a Sociedade internacional de (PMF) “*plant molecular farming*” (<http://societyformolecularfarming.org>), sua primeira conferência aconteceu na Alemanha em junho de 2014 (Paul et al., 2015).

### 1.1.1. Plataformas de produção de PMFs

Essencialmente, existem dois processos para entrega e expressão de genes heterólogos: (i) expressão estável (plantas transgênicas e plantas transplastômicas); e (ii) expressão transiente mediada por vetores binários via *Agrobacterium* ou via vetores virais vegetais (Gleba et al., 2007, 2005; Lico et al., 2008).

i – Sistema de expressão por meio de transformação nuclear estável e transplastômica:

Na tecnologia de transformação estável, um cassete de expressão carregando um ou mais genes exógenos de interesse são integrados no genoma nuclear (transgênicos) ou plastidial (transplastômicos) da célula da planta, o que resulta em um caráter adquirido para ser herdado de forma estável para as próximas linhagens, que podem ser propagadas vegetativamente ou por sementes (Obembe et al., 2011). Essa integração pode ocorrer por diferentes métodos de transformação, seja via *Agrobacterium tumefaciens*, ou por meios diretos de transformação, como o bombardeamento de micropartículas revestidas de DNA (biobalística) e a transformação de protoplastos. As plantas transgênicas representam um potencial estável e fonte de propagação barata, no entanto, o desenvolvimento e a seleção de uma linhagem transgênica apropriada podem demorar muitos meses e a produção com alto rendimento nem sempre é possível e estável (Rybicki, 2009). Além disso, plantas cultivadas no campo, muitas vezes, podem apresentar variações no nível de expressão de proteínas recombinantes. Portanto, a produção sob as normas de boas práticas de fabricação (GMP) e o escalonamento podem dificultar o uso dessas plantas cultivadas no campo como fonte de antígenos para vacinas derivados de plantas (Tiwari et al., 2009). Outro viés da técnica é que a produtividade com alto rendimento nem sempre é

atingível e estável devido ao fenômeno do mecanismo de silenciamento gênico (Baulcombe, 2005).

Outra estratégia de expressão estável é a de planta transplastômica que baseia-se na expressão de proteínas em cloroplastos transformados. Este sistema apresenta vantagens como, por exemplo, a de integração do novo DNA dentro do genoma do cloroplasto via recombinação homóloga e o número elevado de cópias do transgene (o que leva este sistema a oferecer muitas vezes rendimentos elevados). Não somente o número de cópias do gene por célula, mas também a maquinaria de cloroplasto para produzir proteínas é muito mais eficiente do que dos genes do núcleo. Este sistema também evita vários problemas associados com a transformação nuclear devido a ausência do mecanismo de silenciamento gênico e a minimização de DNA cloroplasmático funcional em grãos de pólen, isto é, os genes de plastídeos são de herança uniparental, exclusivamente materna, fator que reduz o risco de contaminação de transgenes para outras plantas (Daniell, 2006). No entanto, uma desvantagem relevante é que as proteínas recombinantes expressas em cloroplastos são mais similares às proteínas expressas em bactérias em relação às modificações pós-traducionais e com isso, a técnica não é adequada para a produção de muitas proteínas complexas devido à incapacidade de realização de modificações pós-traducionais em cloroplastos, incluindo glicosilação (Daniell, 2006; Hefferon, 2013).

ii – Sistema de expressão transiente:

A expressão transiente se distingue da expressão estável pela não integração do DNA exógeno no genoma do hospedeiro. É considerado um mecanismo de expressão rápido, pois em poucos dias já se consegue obter uma quantidade considerável de proteínas (Obembe et al., 2011). Expressão transiente via

*Agrobacterium tumefaciens* é amplamente utilizada, no qual se aproveita da capacidade natural de *A. tumefaciens* para transferir DNA exógeno para células vegetais com parede celular intacta. A base molecular desta técnica é a transferência para a planta de uma região de um plasmídeo Ti (do inglês, *tumor inducing*). Essa região é denominada T-DNA (do inglês, *transferred-DNA*) e é delimitada por duas sequências repetidas, borda esquerda e borda direita, contendo 25 pb cada, onde atuam endonucleases produzidas pela região de virulência (*vir*) do plasmídeo Ti (Gelvin, 2003). O processamento do T-DNA e sua transferência da bactéria para o genoma da célula da planta hospedeira resultam em grande parte da atividade dos produtos dos genes da região *vir* contidos no plasmídeo Ti, os quais têm expressão ótima sob pH ácido (5,5 – 5,8) e na presença de indutores fenólicos, como acetoseringona, que são liberados por ferimentos dos tecidos vegetais. O T-DNA é manipulado para conter os genes de seleção e os genes de interesse, os oncogenes são removidos e então o plasmídeo Ti é inserido em *A. tumefaciens* e utilizado para transformação em plantas (Brasileiro and Lacorte, 2015). Esse mecanismo de expressão transiente foi desenvolvido baseado na característica geral da *A. tumefaciens* como explicado anteriormente, entretanto, infiltra-se uma suspensão de *A. tumefaciens* contendo um vetor binário e o gene alvo em folhas intactas com uma seringa ou na planta inteira, sob pressão negativa. Desta forma um grande número de células vegetais é transformada, atingindo altos níveis de expressão de proteínas por um curto período de tempo (3-7 dias), com vantagens de baixo custo operacional e simplicidade dos protocolos de transformação e seleção (Fischer et al., 2004; Lomonossoff and DAoust, 2016).

A perda da expressão de proteínas percebida após alguns dias é predominantemente causada pelo silenciamento gênico pós-transcricional (PTGS)

como sugerido por JOHANSEN & CARRINGTON e confirmado mais tarde por VOINNET e colaboradores (Johansen and Carrington, 2001; Voinnet et al., 2003). Contudo a observação do silenciamento gênico pós-transcricional na expressão transiente via *A. tumefaciens* permite avaliar como o gene exógeno é processado pela planta. Devido ao fato do silenciamento gênico pós-transcricional poder ser contornado com a coexpressão de proteínas supressoras de PTGS juntamente com o gene de interesse, esse fator pode ainda ser visto como uma vantagem desse sistema de expressão, pois devido à simplicidade da técnica, esse ensaio poderia funcionar como um antecessor de outros sistemas de produção heteróloga em plantas, permitindo prever o possível silenciamento gênico do transgene (Cazzonelli and Velten, 2006).

A expressão transiente via *Agrobacterium* tem sido usada com sucesso para expressar genes repórteres em tecidos de folhas de *N. benthamiana*, *N. tabacum*, *Phaseolus vulgaris*, *Phaseolus acutifolius*, *Lactuca sativa*, *Arabidopsis thaliana*, *Pisum sativum* e *Linum usitatissimum* (Van der Hoorn et al., 2000; Wroblewski et al., 2005). *Nicotiana benthamiana* é a planta modelo mais utilizada por virologistas de plantas, devido principalmente a diversidade de vírus de plantas que podem infectá-la com sucesso (Goodin et al., 2008). Esta planta possui uma mutação natural que ocorre no gene da RDR1 (RNA polimerase dependente de RNA tipo 1 – envolvida na defesa antiviral das plantas), o que explica o aumento da suscetibilidade à vírus (Yang et al., 2004).

### 1.1.2. Expressão transiente via vetor viral

Um vetor viral, essencialmente, é um clone de cDNA infeccioso modificado e clonado em um plasmídeo, podendo ser utilizado como ferramenta biotecnológica para expressão de proteínas heterólogas (Gleba et al., 2007; Lindbo, 2007b; Pogue et al., 2010). Vetores virais de plantas entregues via *Agrobacterium sp.* são um sistema eficiente para a expressão de proteínas recombinantes, além de oferecerem simplicidade da metodologia. De modo geral, a expressão transiente utilizando vetores virais oferece como principal vantagem altos níveis de replicação e consequentemente altos níveis de expressão de proteínas heterólogas em curto intervalo de tempo. Os genes alvos não são incorporados no genoma de células da planta, e com isso, existe baixo risco de propagação do transgene por pólen, sementes ou outras rotas. Além disso, as versões mais recentes de vetores virais perderam a capacidade de encapsidar ou mover-se de célula a célula, atenuando, desta maneira, problemas de biocontenção que estão associados ao uso de plantas transgênicas como plataforma de produção (Rybicki, 2010). Outra facilidade do uso de vetores virais é que as proteínas produzidas em plantas podem ser utilizadas sem purificação, usando poucas etapas ou em alguns casos, requerem somente uma purificação parcial (Boehm, 2007; Dawson, 2011; Paul and Ma, 2011).

Juntamente com outros vírus, tais como alfalfa mosaic virus (AMV), potato virus X (PVX), cucumber mosaic virus (CMV), cowpea mosaic virus (CPMV), tomato yellow leaf curl virus (TYLCV), tobacco mosaic virus (TMV) permanece sendo o vírus mais importante baseado em avaliações científicas e significância econômica (Gleba et al., 2007; Matsuo et al., 2007; Mortimer et al., 2015; Scholthof et al., 2011; Yusibov et al., 2006). A tecnologia baseada em vírus usada como

plataforma industrial, vem deixando de ser uma utopia para se tornar realidade. Empresas como a Fraunhofer-Gesellschaft (<https://www.fraunhofer.de>), a Mitsubishi Tanabe Pharme Corp (<https://www.mt-pharma.co.jp/e/index.php>), atual proprietária da canadense Medicago Inc., e a Kentucky BioProcessing Inc. (<https://www.kentuckybioprocessing.com>) têm feito grandes progressos técnicos nos últimos anos no processo de produção de proteínas recombinantes em planta e otimização dos hospedeiros para expressão através de vetores virais via *A. tumefaciens* (Gleba et al., 2005; Yusibov et al., 2015).

A expressão transiente de vetores virais via *A. tumefaciens* é bastante utilizada e novas plataformas para essa estratégia tem sido desenvolvida. Um desses protocolos conhecido como *magniffection*, desenvolvido pela empresa ICON Genetics GmbH (<https://www.icongenetics.com>), que em 2017 tornou-se uma subsidiária da DENKA Co. (<http://www.denka.co.jp/eng/>), utiliza as vantagens de três sistemas biológicos: a velocidade e nível de expressão dos vírus, a eficiência de transfecção da *A. tumefaciens* e a capacidade pós-traducional e baixo custo de produção das plantas. Neste protocolo, o espaço intercelular das folhas da parte aérea da planta é infiltrada com suspensões de *A. tumefaciens* transportando T-DNAs contendo os genes de interesse, utilizando pressão negativa (infiltração a vácuo) (Gleba et al., 2005, 2014; Klimyuk et al., 2012). A unidade piloto da Fraunhofer USA diz ser capaz de produzir até 300 kg de biomassa por mês, utilizando o protocolo de *magniffection*, o que corresponde a 2,5 milhões de unidades de vacinas contra Influenza H1N1 (Gleba et al., 2005; Hefferon, 2012). Recentemente, alguns vetores baseados em TMV tem apresentado muito sucesso na produção rápida e de alto rendimento de proteínas heterólogas utilizando a estratégia acima.

### 1.1.3. Vetores virais baseados em Tobamovirus

Na década de 80, acreditava-se que a alta frequência de erros que ocorrem durante a replicação do RNA viral fosse o maior obstáculo para a utilização de vírus de RNA vegetais como vetores, uma vez que a fidelidade de replicação de um vetor, e consequentemente seu inserto, devesse ser crucial para o sucesso dos genes transferidos (van Vloten-Doting et al., 1985). Mais de dez anos depois, soube-se que essa frequência de erros na replicação poderia ser um problema menor para a expressão do gene heterólogo do que imaginava-se anteriormente e, hoje, a principal causa da instabilidade e deleção desses genes por vetores virais tanto de RNA quanto de DNA parecem ser os rápidos eventos de recombinação sofridos no interior destes vírus (Scholthof et al., 1996).

Tobamovirus é um gênero da família *Virgaviridae*, exibindo vírions não-envelopados com formato de bastonetes rígidos de RNA fita simples senso positivo (+ssRNA), possuindo o *Tobacco mosaic virus* (TMV) como espécie tipo (Adams et al., 2009). TMV possui um genoma de 6395 nucleotídeos codificando pelo menos quatro ORFs. As proteínas 126-kDa e 183-kDa, denominadas subunidade pequena e grande de replicase, respectivamente, são traduzidas diretamente por RNA genômico e são necessárias para a replicação viral. As outras duas proteínas, a proteína de movimento 30 kDa (MP) que funciona na disseminação da infecção célula a célula, e a capa proteica 17,5 kDa (CP) que é essencial para a encapsidação viral e movimento sistêmico no sistema vascular, são traduzidas através de RNA subgenômico (Goelet et al., 1982).

O primeiro vetor viral foi desenvolvido por TAKAMATSU e colegas (Takamatsu et al., 1987), onde um transcrito de RNA *in vitro* de TMV recombinante



foi inoculado em lesões na folha de tabaco, expressando o gene cloranfenicol acetiltransferase (CAT). A substituição do gene da capa proteica (CP) por um gene da proteína heteróloga resultou no primeiro híbrido construído, porém a quantidade de proteína heteróloga produzida foi muito aquém do que os pesquisadores esperavam e a ausência de capa proteica limitou a localização do vírus somente aos tecidos infiltrados (Dawson et al., 1989; Takamatsu et al., 1987).

Em 1989, DAWSON e colegas criaram um vetor com uma ORF extra, clonando um gene sob o controle de um promotor subgenômico adicional da capa proteica, no genoma do TMV, localizado entre os genes da proteína de movimento e da capa proteica. Este híbrido replicou eficientemente e a atividade do gene heterólogo foi mantida, porém durante a infecção sistêmica das plantas, a sequência inserida foi deletada, provavelmente por consequência de recombinação homóloga das sequências dos promotores subgenômico repetidas (Dawson et al., 1989). Baseado nestas informações, DONSON e colegas (1991) desenvolveram um vetor viral baseado em TMV contendo o gene da CP e o promotor subgenômico de odontoglossom ringspot virus (ORSV) além do gene de interesse controlado pelo promotor subgenômico da CP do próprio TMV. Esta construção produziu a proteína de interesse e a sequência manteve-se estável durante a infecção sistêmica na planta, porém o gene de interesse foi pouco expresso, se comparado tanto ao gene da CP no TMV selvagem quanto ao gene da CP do ORSV no próprio vetor. Uma das hipóteses levantadas pelo grupo foi que a sequência do promotor subgenômico poderia estar incompleta (Donson et al., 1991).

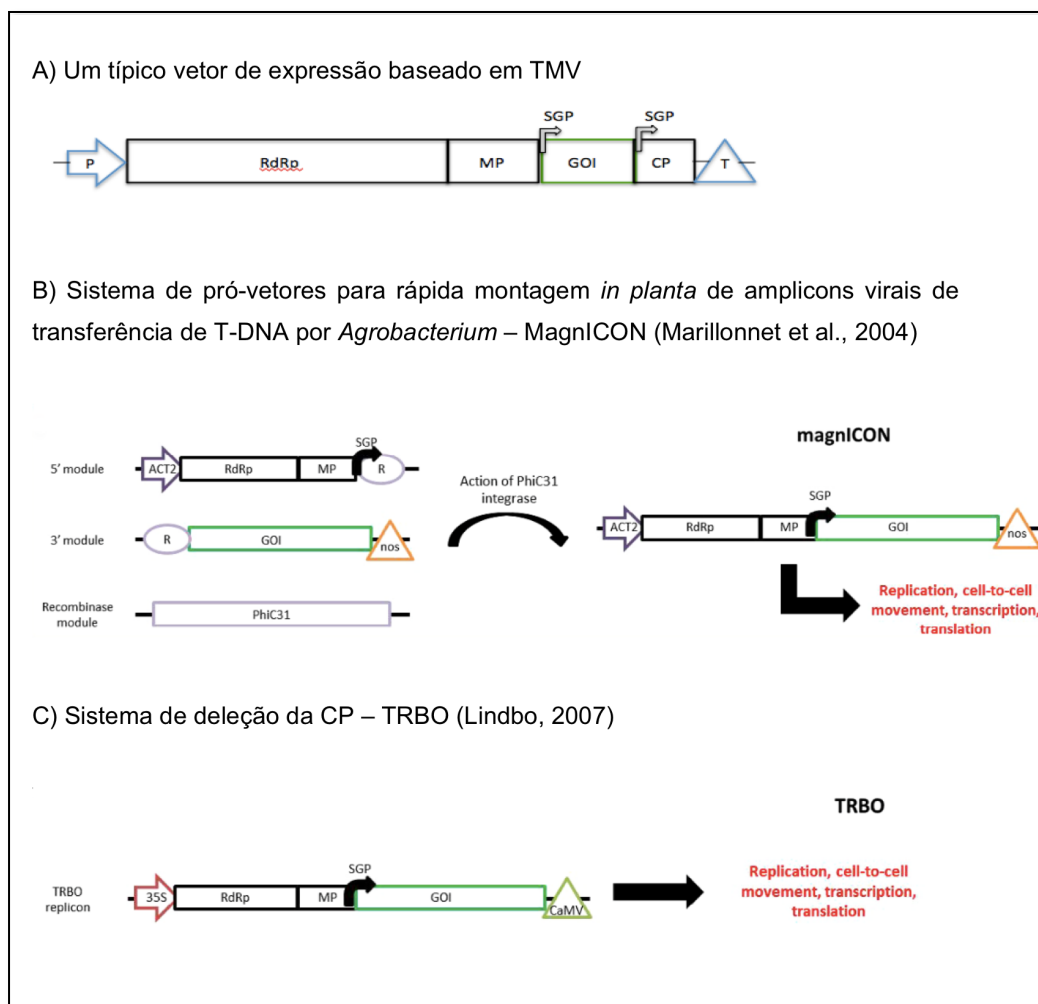
Em 1996, outro grupo utilizou uma estratégia similar com a de DAWSON em 1989, adicionando o gene da proteína verde fluorescente GFP (do inglês, *green*

*fluorescente protein*) entre a região da MP e da CP. No entanto, ao invés de repetirem o promotor subgenômico da CP homóloga, utilizaram a sequência do promotor subgenômico de tomato mild green mosaic virus (TMGMV) e este vetor expressou eficientemente o gene da GFP, sistemicamente através das plantas (Casper and Holt, 1996).

Porém, os pesquisadores ainda estavam desapontados com os níveis de expressão das proteínas expressas nesses diversos vetores, e em 1999, SHIVPRASAD e colegas decidiram testar o efeito de sequências heterólogas no modelo proposto por DONSON (1991). Construíram vários vetores essencialmente com o mesmo desenho, contendo diferentes sequências de CP, promotores subgenômicos heterólogos e 3'UTRs de tobamovírus, e apesar de alguns vetores replicarem de forma similar, as variações nos níveis de transcrição de GFP e CP produzidos pelos diversos vetores demonstraram que: “*construir um vetor viral eficaz não é um exercício trivial*” (Dawson, 2011). Baseados nesses testes, criaram o vetor 30B, contendo a replicase e proteína de movimento do TMV, GFP sob o comando do promotor subgenômico de TMV e promotor subgenômico, capa proteica e 3'UTR de TMGMV, o qual citaremos mais tarde (Shivprasad et al., 1999).

Pesquisas demonstraram que os vetores virais não deveriam ser apenas uma cópia do vírus selvagem (*full-length genome vector* – figura 1A) transportando uma sequência de codificação heteróloga e, com isso, novas estratégias reconhecem as limitações inerentes ao processo viral e tentam “reconstruir” o vírus (*deconstructed vector* – figuras 1B e 1C), seja eliminando funções que são limitantes ou indesejáveis e então reconstruindo essas funções necessárias perdidas e delegando-as ao hospedeiro (este geneticamente modificado para prover essas funções), seja

substituindo-as, ao invés de eliminá-las, por funções análogas que não derivadas do vírus (Gleba et al., 2005, 2004; Yusibov et al., 2013).



**Figura 1 – Representação esquemática simplificada da estratégia dos vetores virais.** P: promotor; MP: proteína de movimento; CP: capa proteica; T: terminador; ACT2: promotor da actina 2 de *Arabidopsis*; RdRp: RNA polimerase dependente de RNA de tobamovirus; SGP: promotor subgenômico direcionando a transcrição do gene de interesse (GOI); R: sítio de recombinação; R: ribozima; nos: terminador nos; PhiC31: integrase; 35S: promotor 35S; CaMV: terminador cauliflower mosaic virus; Figuras B e C adaptadas de Peyret & Lomonosoff, 2015.

Foi demonstrado em alguns estudos que híbridos de TMV com repetição do gene da CP frequentemente deletavam esta cópia extra no início da replicação, provavelmente, resultado da recombinação homóloga das sequências dos promotores subgenômico duplicados. Contudo, a deleção não ocorreu em uma construção onde foram utilizados simultaneamente os genes da CP de TMV e de outro tobamovirus, o

que justifica o uso de promotores subgenômicos heterólogos quando houver necessidade de repetição (Beck and Dawson, 1990; Yusibov et al., 1999).

Um dos vetores mais conhecidos e usados comercialmente é o MagnICON (ICON Genetics) baseado na montagem *in planta* de vetores virais funcionais pela recombinação de módulos separados (figura 1B). Uma quimera de crucifer-interfering TMV (cr-TMV) e turnip vein-clearing virus (TVCV) sob o comando do promotor da actina de *Arabidopsis thaliana* (ACT2) e a inserção de inúmeros íntrons para facilitar o processamento e exportação de pré-mRNA a partir do núcleo (Gleba et al., 2004; Marillonnet et al., 2004).

Outro sistema, denominado TRBO - TMV RNA-*based overexpression*, teve a sequência codificante do gene da CP retirado (Figura 1C), sob a hipótese de que sequências do promotor subgenômico e da ORF da CP de TMV poderiam ser potentes indutores de silenciamento gênico (mecanismo de defesa contra vírus de RNA e retrotransposons em células eucarióticas que degradam o mRNA do transgene) diminuindo o rendimento da proteína de interesse e criando um impacto negativo na eficiência da agroinfecção e para evitar a propagação sistêmica (Lindbo, 2007a, 2007b).

O vetor de substituição de genes baseado em TMV (pBID4), teve o gene da CP substituído pelo gene de interesse fusionado a uma molécula carreadora termoestável para facilitar a expressão, estabilidade e purificação da proteína de interesse (Musiychuk et al., 2007).

Para o sucesso da produção de proteínas farmacêuticas, um vetor de expressão baseado em um vírus vegetal deve manter a estabilidade genética da sequência não

viral codificando o produto final sob variáveis de condições ambientais e respostas de defesa do hospedeiro, o que, ao contrário, representa ser um problema para um vetor de produção (Klimyuk et al., 2012; Mortimer et al., 2015).

No estudo relatado no capítulo 2, um novo vetor baseado em tobamovírus, pepper mild mottle virus (PMMoV), foi desenvolvido para produzir proteínas heterólogas, tendo a parte central da capa proteica substituída pelo gene de interesse e montado em um vetor binário adequado para agroinfiltração em plantas.

#### **1.1.4. Tymovirus para expressão de proteínas heterólogas**

*Tymovirus* é um dos gêneros da família *Tymoviridae* e contém pelo menos 28 espécies de vírus conhecidas (“International Committee on Taxonomy of Viruses”, ICTV, 2018). São vírus de RNA de fita simples senso positivo, não-segmentados com um genoma de 6,3 kb contendo três ORFs, duas das quais são sobrepostas. Duas proteínas, proteína da replicase (206 kDa) e proteína de movimento (69 kDa), são traduzidas pelo RNA genômico, enquanto a CP (20 kDa), cuja ORF reside na extremidade 3’ do RNA genômico, é traduzida por um RNA subgenômico que é produzido durante a replicação (Dreher, 2004). *Turnip yellow mosaic virus* (TYMV) é a espécie tipo do gênero, apresentando partículas isométricas cheias e/ou vazias com simetria icosaédrica  $T=3$  com subunidades hexaméricas e pentaméricas, não-envelopados de aproximadamente 30 nm de diâmetro e induzem à formação de vesículas com membrana dupla na periferia dos cloroplastos (Canady et al., 1996).

Em 1997, Sastri e colaboradores demonstraram que a CP de physalis mottle virus (PhMV), um membro do gênero *Tymovirus*, forma partículas (*virus-like*

*particles*, VLPs) *in vivo* quando produzida em *E.coli* e que, além disso, a deleção ou adição de aminoácidos na região N-terminal da CP não dificulta a montagem das partículas indicando um potencial de manipulação dessa região (Sastri et al., 1999, 1997). Alguns trabalhos já demonstraram a flexibilidade da região N-terminal da CP de outros tymovirus (Hayden et al., 1998; Powell et al., 2012; Saunders and Lomonossoff, 2015; Shin et al., 2013). Em 2007, Hema e colegas utilizaram a superfície da CP de PhMV como “*display*” para apresentação de epitopos de foot-and-mouth disease virus (FMDV) produzida em *E.coli* (Hema et al., 2007).

Em 2008, um grupo utilizou TYMV para produzir um vetor capaz de induzir VIGS em *A. thaliana* (Pflieger et al., 2008). Neste mesmo ano, outro trabalho testou o potencial uso de TYMV como vetor de entrega de RNA inserindo eGFP e GUS no genoma do vírus. Os genes heterólogos foram expressos como um RNA subgenômico de TYMV (Shin et al., 2008).

Kim e colaboradores, em 2014, conseguiram inserir uma sequência de RNA1 de flock house virus no genoma de TYMV, demonstrando que o tymovirus pode acomodar e expressar uma grande sequência viral heteróloga, possibilitando o desenvolvimento de um vetor de entrega de genes baseado em TYMV (Kim et al., 2014).

Uma das estratégias utilizadas para expressão de proteínas, um peptídeo é fusionado à CP do vetor viral, resultando na montagem de partículas de vírus quiméricas (*chimeric virus particles*) CVP, exibindo múltiplas cópias do peptídeo na sua superfície (Lico et al., 2008), aumentando a expressão, estabilidade e/ou imunogenicidade (Smith et al., 2006). Além disso, a fusão de peptídeos a proteínas

virais estruturais também pode auxiliar na purificação durante o processo de manufatura (Turpen et al., 1995).

No capítulo 3, um replicon baseado em um tymovirus, tomato blistering mosaic virus (ToBMV), foi desenvolvido tendo uma pequena parte da região gênica de N-terminal da CP deletada para testar se, assim como outros tymovirus, essa região seria dispensável para a expressão do capsômero e infectividade e se, com isso, a superfície da CP teria potencial para ser usada, futuramente, como um vetor viral para expressão de epítopos como “display” na superfície da capa proteica.

## **1.2 Sistema de expressão em células de inseto via baculovírus**

A família *Baculoviridae* compreende vírus de DNA dupla-fita circular, com tamanhos variando de 80 a mais de 180 kb, capazes de infectar oralmente a fase larval de diversas espécies de insetos. Atualmente, essa família é dividida filogeneticamente em quatro gêneros: *Alphabaculovirus* e *Betabaculovirus* infectam insetos da ordem Lepidoptera; e *Gammabaculovirus* e *Deltabaculovirus* são infectivos a Hymenopteros e Dipteros, respectivamente (Jehle et al., 2006; Rohrmann, 2013).

O primeiro baculovírus recombinante foi publicado em 1983, onde Smith e colegas utilizaram *Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus* (AcMNPV) para expressar IFN- $\beta$  humana (Smith et al., 1983). Poucos meses depois, outro artigo relatando a expressão de  $\beta$ -galactosidase de *E. coli* utilizando o mesmo sistema foi publicado por outro grupo (Pennock et al., 1984). Surgia, a partir desses trabalhos, o sistema de vetor de expressão de baculovírus – BEVS (do inglês, *baculovirus expression vector system*).

Desde sua criação há mais de 30 anos, o sistema de BEV tem sido intensamente utilizado para produção de proteínas heterólogas em pesquisa básica e aplicada, desde a biologia estrutural à vacinologia (Berger and Poterszman, 2015). A chave para isso, foi a simplificação na geração dos baculovírus recombinantes por transposição sítio-específica *in vivo* em *Escherichia coli*, comercialmente conhecido como sistema Bac-to-Bac® (Thermo Fisher Scientific) (Luckow et al., 1993). Além disso, a facilidade de cultivar e infectar células de inseto também é um fator determinante para o sucesso desta técnica (van Oers et al., 2015).

Outra vantagem do sistema, é a capacidade que as células de inseto possuem de reconhecer e processar peptídeos sinais e realizar modificações pós-translacionais, como glicosilação, fosforilação e formação de pontes dissulfeto, possibilitando a formação correta de proteínas eucarióticas, em contraste com o sistema de expressão procariótico (O'Reilly et al., 1992).

Várias proteínas terapêuticas, enzimas e proteínas virais e parasitárias têm sido produzidas em células de insetos (Ardisson-Araújo et al., 2013; Gheysen et al., 1989; Metz and Pijlman, 2011; Morais et al., 2001; van Oers et al., 2015). A primeira vacina humana produzida em células de inseto, Cervarix® (GlaxoSmithKline - <https://www.gsk.com>), utilizada para prevenção de câncer cervical, foi aprovada pela U.S. Food and Drug Administration (FDA) em 2009 (Harper, 2009). Outros dois produtos farmacêuticos humanos encontram-se em comercialização: Provenge® (<https://www.provenge.com>) produzida pela *Dendreon Pharmaceuticals* e licenciada pela FDA em 2010, é indicada para o tratamento de câncer de próstata; FluBlok® (<http://www.flublok.com>), uma vacina da gripe causada pelo vírus da influenza



subtipo A e tipo B, produzida pela *Protein Sciences Corporation* e aprovada pela FDA em 2013 (Cox, 2012; Cox and Hashimoto, 2011; Kantoff et al., 2010).

*Virus-like particles* (VLP) são nanopartículas compostas de proteínas estruturais com capacidade inerente de auto-montagem, livres de material genético e portanto não-infecciosas e não-replicativas. Apesar de não conseguirem se replicar, essas partículas estimulam o sistema imunológico através do reconhecimento de subunidades repetitivas, produzindo uma alta resposta imune e humoral. A produção de *virus-like particles* (VLP) e proteínas estruturais de vírus usando o sistema de expressão em baculovírus foi relatado para uso por membros de diferentes famílias de vírus vegetais (Balke and Zeltins, 2018), tais como: *Comoviridae*: arabis mosaic virus (Bertioli et al., 1991), tobacco ringspot virus (Singh et al., 1995) e cowpea mosaic virus (Shanks and Lomonosoff, 2000); *Luteoviridae*: beet western yellows virus (Tian et al., 1995) e potato leaf roll virus (Gildow et al., 2000) e *Reoviridae*: pea enation mosaic virus (Sivakumar et al., 2009) e rice dwarf virus (Hagiwara et al., 2003).

Muitos tipos de VLPs de uso farmacêutico têm sido produzidos em BEVs, incluindo herpes simplex virus, ebola virus, norovírus, Chikungunya virus, HIV, HPV (Buonaguro et al., 2006; Deschuyteneer et al., 2010; Jiang et al., 1992; Metz et al., 2013; Sun et al., 2009; Tatman et al., 1994).

No estudo apresentado no capítulo 4, o DNA que codifica a CP de ToBMV foi inserido no genoma de AcMNPV sob o controle do promotor da poliedrina, utilizando o sistema comercial Bac-to-Bac® (Thermo Fisher Scientific) com o objetivo de desenvolver tVLPs (*tymovirus-like particles*). O gene da capa proteica de ToBMV foi modificado para que a montagem das partículas em células de inseto pudesse ser

avaliada e então, nos perguntamos se a adição de um pequeno epitopo na região da CP modificada iria interferir na montagem das tVLPs e poderia ser usada como proteína carreadora de pequenos epitopos.

## **CAPÍTULO 2 – DEVELOPMENT OF A NEW TOBAMOVIRUS - BASED VIRAL VECTOR FOR PROTEIN EXPRESSION IN PLANTS**

Coorientador: Dr. Cristiano Lacorte

Este capítulo foi publicado de forma modificada na revista *Molecular Biology Reports*. Vasques, R.M., Lacorte, C., da Luz, L.L., Aranda, M. & Nagata, T.: **Development of a new tobamovirus-based vector for protein expression in plants.** <https://doi.org/10.1007/s11033-018-4449-4>

## 2. DEVELOPMENT OF A NEW TOBAMOVIRUS-BASED VIRAL VECTOR FOR PROTEIN EXPRESSION IN PLANTS

Raquel Medeiros Vasques<sup>a</sup>, Cristiano Lacorte<sup>b</sup>, Leonardo Lopes da Luz<sup>a</sup>, Miguel A. Aranda<sup>c</sup>, Tatsuya Nagata<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Campus Darcy Ribeiro, Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília, Brasília-DF, 70910-900, Brazil

<sup>b</sup>Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 70297-400, Brasília, DF, Brazil

<sup>c</sup>Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura (CEBAS), Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), 30100, Murcia, Spain

Corresponding author: Tatsuya Nagata

E-mail: tatsuya@unb.br

### 2.1 ABSTRACT

Plants are becoming an interesting alternative system for the heterologous production of pharmaceutical proteins, providing a more scalable, cost-effective, and biologically safer option than the current expression systems. The development of plant virus expression vectors has allowed rapid and high-level transient expression of recombinant genes, and, in turn, provided an attractive plant-based production platform. Here we report the development of vectors based on the tobamovirus *Pepper mild mottle virus* (PMMoV) to be used in transient expression of foreign genes. In this PMMoV vector, a middle part of the viral coat protein gene was replaced by the green fluorescent protein (GFP) gene, and this recombinant genome was assembled in a binary vector suitable for plant agroinoculation. The accumulation of GFP was evaluated by observation of green fluorescent signals under UV light and by western blotting. Furthermore, by using this vector, the multiepitope gene for chikungunya virus was successfully expressed and confirmed by western blotting.

This PMMoV-based vector represents an alternative system for a high-level production of heterologous protein in plants.

Keywords: Plant viral vector - Protein expression in plants - Transient expression - Agroinfiltration - Tobamovirus.

## **2.2 INTRODUCTION**

The use of plants as a platform to produce therapeutic proteins, referred to as plant molecular farming, has attracted many researchers due to some advantages. First, expressing recombinant proteins in plants provides the eukaryotic type of posttranslational modifications, and enables high scalability, lower production cost and minimal risks for contamination of workers by human pathogens (Paul and Ma, 2011; Yusibov et al., 2011). Among different strategies for plant-based expression systems, plant viral vectors, working as replicons, are widely used for transient expression. Viral vectors are also used as a tool for virus-induced gene silencing (VIGS) and is particularly useful for reverse genetics to study the molecular basis of plant-virus interactions (Baulcombe et al., 1995; Burch-Smith et al., 2004; Escobar et al., 2003; Liu et al., 2002). These vectors are usually constructed for gene replacement, gene insertion, peptide display, and modular or deconstructions (Lico et al., 2008). A usual approach for the construction of an RNA viral vector is the insertion of an additional subgenomic promoter to drive the heterologous expression of the gene of interest (Dawson et al., 1989; Donson et al., 1991). Alternatively, the entire coat protein (CP) gene can be removed, thereby reducing the size of the genome and the cellular burden involved in viral CP production. However, for most

RNA viruses, such as *Potato virus X* (PVX) and *Cucumber mosaic virus* (CMV), the absence of the CP limits the cell-to-cell and systemic movement of the virus. This limitation may result in the production of low quantities of the target protein since only a restricted number of cells is infected (Azhakanandam et al., 2007; Lico et al., 2008). Some advantages, though, are observed in viral vectors missing the CP that are not able to systemically infect plants. For example, the CP-deficient viral vectors have low risks of escape to the environment due to its inability to be transmitted by insects or other types of natural vectors. Moreover, such viral vectors can maximize the target protein production efficiency since there is no need to direct the metabolic energy towards the CP expression, which is abundant in the wild-type virus infected-cells (Lindbo, 2007a).

Another advantage of plant viral vector is the convenience in delivering the constructs by *Agrobacterium* inoculation to host plant. This method is simple and efficient, though expression levels usually decrease after 5-6 days post-infiltration (Voinnet et al., 2003). To circumvent it, some studies suggest the co-inoculation of a construct containing a post-transcriptional gene silencing suppressor derived from plant viruses (such as P19 from *Tomato bushy stunt virus* or HC-Pro from potyviruses), resulting in enhancement of heterologous protein accumulation in plants (Lindbo, 2007b; Liu and Kearney, 2010; Mlotshwa et al., 2002; Rhee et al., 2016; Voinnet et al., 2003).

Since their inception, positive-sense RNA virus such as tobacco mosaic virus (TMV), PVX, alfalfa mosaic virus (AMV), CMV and cowpea mosaic virus (CPMV) (Gleba et al., 2007; Mallory et al., 2002; Pogue et al., 2002) were the preferred choices as protein expression vectors. In present study, pepper mild mottle virus (PMMoV), a member of the genus *Tobamovirus*, was used for the development of new viral vector.

PMMoV has a single-stranded, positive-sense RNA genome of 6.3 kb encapsidated by subunits of a single CP, forming rigid rod-shaped particles. The PMMoV genome comprises four open read frames (ORFs) flanked by 5' and 3' untranslated regions (UTRs) with a 5' cap and a 3' tRNA-like secondary structure in each termini (Alonso et al., 1991; Eiras et al., 2004). The genome encodes two replication-associated proteins (126 kDa and 183 kDa), the 30 kDa movement protein and the 17 kDa CP from the 3' co-terminal subgenomic RNAs (Dawson and Lehto, 1990). As other tobamoviruses, PMMoV is a potential candidate virus for construction of an expression vector for plants due to the high CP production capacity in plant hosts. Furthermore, PMMoV induces mild symptoms in *Nicotiana benthamiana* plant - a model plant for heterologous protein production in plants (Junqueira et al., 2014). This milder host response when compared to that caused by TMV is expected to be advantageous for protein production.

So far, no attempt has been made to use PMMoV for foreign gene expression in plants. In this study, the modified PMMoV genome harboring a truncated CP gene was delivered by *Agrobacterium* inoculation to the host plant, thereby preventing the formation of virus particle during its infection/replication cycle to reduce biosafety risks. The GFP gene was inserted as a reporter in this vector, and its expression was confirmed by fluorescence observation under UV light. To test its usefulness as an expression vector, the expression of a chikungunya virus (CHIKV) multi-epitopes gene was evaluated for its potential use as an antigen source for diagnostic procedures.

## 2.3 MATERIAL AND METHODS

### 2.3.1 Modification of PMMoV-based Vector

The infectious clone of PMMoV isolate BR-DF01 (AB550911) was previously constructed by cloning the complete genome in the binary plasmid vector pCAMBIA 0390 using overlap-extension PCR (Junqueira et al., 2014). However, manipulation of large plasmids, such as pCAMBIA vectors, is complex, hence, the first step for vector construction started by subcloning the PMMoV genomic cDNA to the smaller binary vector pJL89 (Lindbo, 2007a). For this purpose, the full-length genomic cDNA was amplified by PCR using Q5 high fidelity DNA polymerase (New England Biolabs, Ipswich, USA) with PMMoV\_pJL\_forward (5'-AGT TCA TTT CAT TTG GAG AGG GTA AAT TTT TCA CAA TTT AAC AAC AAC AAC ACA AAC-3') and PMMoV\_pJL\_reverse (5'-TGG AGA TGC CAT GCC GAC CCT GGG CCG CTA CCC GC-3') primers. Underlined sequences (here and elsewhere in the text) in the primers represent the overlap regions within the DNA fragments to be ligated. The vector fragments of pJL89 were also prepared by PCR using the specific pJL\_forward (5'-GGG TCG GCA TGG CAT CTC-3') and pJL\_reverse (5'-CCT CTC CAA ATG AAA TGA ACT TCC-3') primers. The PCR products were gel-purified using Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare Life Sciences, Pittsburgh, USA). Next, these two fragments (genomic cDNA and pJL89 vector) were assembled in an isothermal Gibson Assembly (GA) reaction (New England Biolabs) following a standard protocol (Gibson et al., 2009).

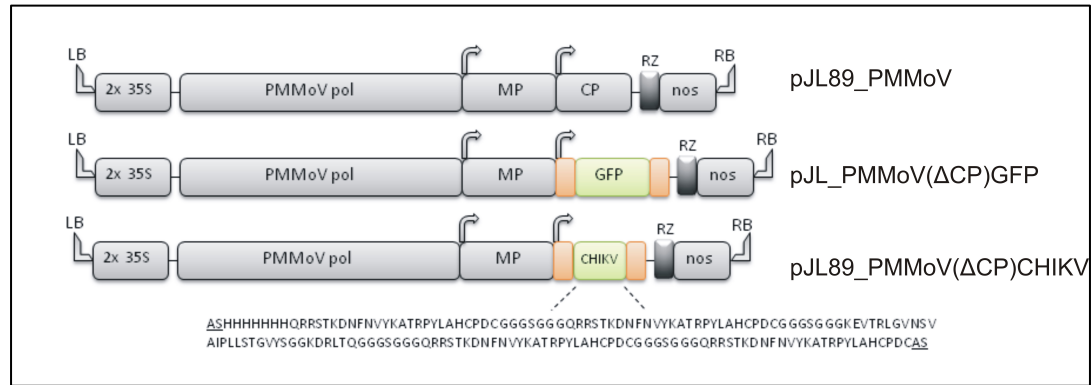
This pJL\_PMMoV infectious clone was further modified by replacing the middle part of the CP gene (nucleotides 5787 to 6055) by the complete GFP gene (GenBank access number: U87973) in order to avail the machinery of high production capacity of the viral CP. Tobamoviruses produce CP through subgenomic RNAs, and the



subgenomic promoter, as well as the 5' and 3' coding regions of the CP, are thought to be important regulatory sequences for the efficient transcription and translation (Man and Epel, 2004). Therefore, the initial 102 nts and the last 102 nts of the CP gene were maintained in frame adjacent to the GFP gene in a try to preserve the RNA secondary structure, believed to be important for the high level of subgenomic RNA production and translation efficiency (Fig. 1). For this construction, the PMMoV genomic backbone was prepared by PCR using the primers PMMoV\_CP6057\_forward (5'-AGT ATA AGT AAC CTC ATG AAT GAG TTA GTT C-3'), PMMoV\_CP102\_reverse (5'-ATT GCC TAA CGC CGA AGT ACA-3') primers using pJL\_PMMoV plasmid as template. The GFP gene was also prepared by PCR using mgfp\_CP6057\_reverse (5'- ATG AGG TTA CTT ATA CTT TAT TTG TAT AGT TCA TCC ATG CCA TG-3') and mgfp\_CP102\_forward (5'-CTT CGG CGT TAG GCA ATA TGA GTA AAG GAG AAG AAC TTT TCA C-3') primers and the synthesized template of mGFP gene (accession number U87624 in Genbank). Amplified replicons were purified and assembled by GA reaction as described above.

To express the CHIKV multiepitope peptide, a synthesized gene (Epoch Life Science, Sugar Land, USA), corresponding to the epitopes based on E2 glycoprotein and nsP3 protein (Fig. 1) (Kam et al., 2012), was amplified by PCR using the following primers: CHIKV\_CP102\_forward (5'-CTT CGG CGT TAG GCA ATG CTA GCC ACC ACC ATC ATC ATC ACC AC-3') and CHIKV\_CP6057\_reverse (5'-ATG AGG TTA CTT ATA CTG CTA GCG CAG TCA GGG CAA TGG GCC-3'). The PMMoV genome-vector backbone was amplified as described above. The GFP was replaced with this multiepitope gene in the pJL\_PMMoV vector using GA. To allow detection of the expressed peptide, a hexa-histidine (6xHis) tag gene was added at the

5' end of the multiepitope gene. All constructs were confirmed by Sanger sequencing at Macrogen Inc. (Seoul, South Korea).



**Fig. 1 Schematic representation of the PMMoV based-vectors.** All plasmids have the binary vector pJL-89 backbone. RB and LB, right and left borders. 2x 35S, CaMV duplicated 35S promoter. PMMoV pol, RNA-dependent RNA polymerase. Bent arrows, subgenomic promoters. MP, movement protein. CP, coat protein. GFP, green fluorescent protein. CHIKV, chikungunya virus multiepitope gene (see primary amino acid sequence below the box, with the NheI sequence underlined). Dark box, ribozyme (RZ). nos, terminator of the *Agrobacterium* nopaline synthase gene. Orange box, 5' and 3' ends of the CP gene.

### 2.3.2 Bacterial Strains and Agroinfiltration

Routine cloning and Gibson assembly constructs were carried out with *Escherichia coli* DH10B strain (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) by electroporation (Blawid and Nagata, 2015). Selected clones were transfected to *Agrobacterium tumefaciens* strain GV3101(pMP90) by electroporation. Transformed *Agrobacterium* was maintained on Luria-Bertani (LB) medium with 50 µg/mL kanamycin, 25 µg/mL gentamycin and 50 µg/mL rifampicin. *N. benthamiana* plants of 5-week-old were infiltrated at the abaxial surface of the leaves with agrobacterial suspension using a 1 mL syringe without a needle. For infiltration, *A. tumefaciens* cells were grown (12-14 h) at 28 °C, 180 rpm in LB medium with antibiotics. Overnight cultures were

centrifuged and resuspended to a final concentration with OD<sub>600</sub> of 1.0 with the inoculation medium [1 × Murashige-Skoog medium, 150 μM acetosyringone]. To improve the protein production efficiency, the *Agrobacterium* containing RNA-silencing suppressor HC-Pro gene in binary vector pBIN19 from *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (Mlotshwa et al., 2002) was co-infiltrated with the concentration in a 1:1 ratio (PMMoV vector: HC-Pro) to *N. benthamiana* plants. After agroinfiltration, plants were maintained in a greenhouse for up to 30 days.

### **2.3.3 Plants and GFP Imaging**

GFP signals from the infiltrated plants were observed 4 -10 dpi under ultraviolet irradiation (365 nm) using a handheld lamp (Blak-Ray<sup>®</sup> - UVP, Upland, USA) and photographed with a Cannon EOS digital camera. Leaf samples (approximately 1.0 cm<sup>2</sup>) were cut from agroinfiltrated areas, placed on slides, mounted on water and analyzed by epifluorescence on a Zeiss Axiophot microscope with UV light (470/525 nm excitation/emission filter) (Zeiss, Jena, Germany). Images were recorded using a Zeiss AxioCam MRc camera.

### **2.3.4 Protein Extraction and Analysis**

The infiltrated leaf tissue from *N. benthamiana* (100 mg) was ground in 200 μL protein extraction buffer [0.1 M Tris (pH 8.0), 0.125 mM 2-mercaptoethanol, 200 mM PMSF, 10 % glycerol]. Proteins in the crude plant sap were analyzed by SDS-PAGE using Mini-PROTEAN system (Bio-Rad, Hercules, USA) and stained with Coomassie Brilliant Blue or transferred to PVDF membrane (Sigma-Aldrich). Target

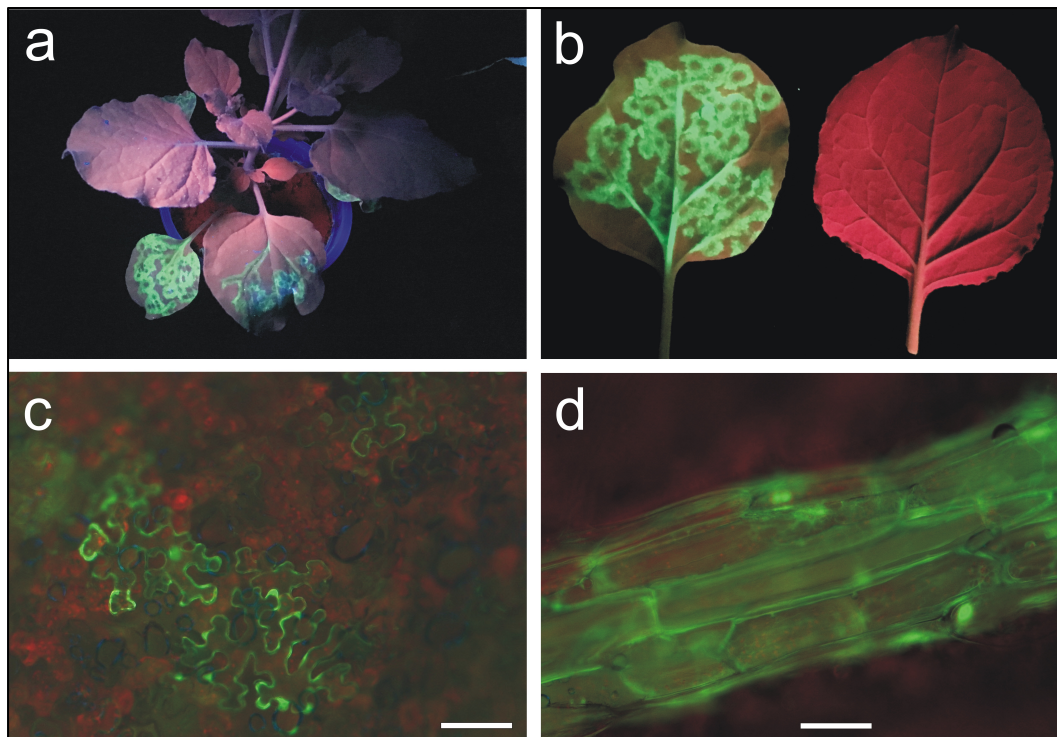
protein production was assessed by western blotting using a GFP antibody (1:2000 dilutions) (Sigma-Aldrich) or a HIS-tag antibody (1:2000, Sigma-Aldrich) and anti-mouse IgG secondary antibody conjugated with alkaline phosphatase (1:5000 dilution) (Sigma-Aldrich). The treated membrane was incubated with BCIP/NBT substrate (Sigma-Aldrich) to visualize the reaction.

## **2.4 RESULTS AND DISCUSSION**

### **2.4.1 GFP expression using the PMMoV-based vector**

In this study, the infectious clone of PMMoV BR-DF01 previously developed by our group was modified to function as an expression vector. GFP was inserted as a reporter gene, replacing the middle part of the CP gene, and denominated pJL\_PMMoV( $\Delta$ CP)GFP (Fig. 1). *N. benthamiana* leaves infiltrated with *A. tumefaciens* carrying pJL\_PMMoV( $\Delta$ CP)GFP [A.t./ pJL\_PMMoV( $\Delta$ CP)GFP] were monitored under UV light for GFP expression. About 9 days post infiltration (dpi), no GFP-positive spots could be observed with UV irradiation (data not shown). In contrast, when A.t./ pJL\_PMMoV( $\Delta$ CP)GFP was co-infiltrated with a *A. tumefaciens* suspension containing the pBIN19\_HC-Pro, GFP fluorescence was greatly enhanced throughout the infiltrated area, and many ringspots of green fluorescence could be seen under UV light (Fig. 2a, b). Therefore, the expression of the RNA-silencing suppressor boosted the number of fluorescent foci and the overall fluorescence intensity of GFP in the infiltrated areas. The GFP signal was never observed in the upper leaves (not agroinfiltrated), showing no systemic movement of the viral replicons. This local response was expected because the complete CP is required for systemic movement for tobamovirus. The cell-to-cell and/or the middle-distance

movement could be expected to happen. GFP signals observed as ringspots were most possibly caused by cell-to-cell movement of the replicons, starting from the center of each ringspot. Fluorescent signals, though, were observed along non-infiltrated leaf veins and petioles, indicating the likely middle-distance movement of the replicons (Fig. 2a, b). Prominent green fluorescent signals were observed emanating through the cytoplasm (not in vacuoles), as observed by the fluorescence microscopy at 9 dpi (Fig. 2c, d). No rod-shaped virions, typical of tobamovirus particles, were observed in extracts from pJL\_PMMoV( $\Delta$ CP)GFP infiltrated leaves by transmission electron microscopy using the leaf-dip method (data not shown).

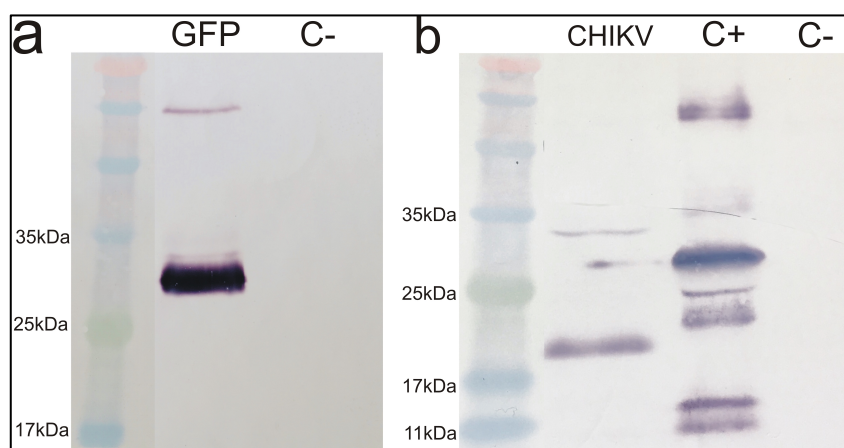


**Fig. 2** Agrobacterium-mediated transient expression of GFP in *Nicotiana benthamiana* leaves. (a-d) Co-inoculation of *A.t.*/ pJL\_PMMoV( $\Delta$ CP)GFP and *A.t.*/ pBin HC-Pro. The fluorescence is observed in inoculated leaves as circular signals. Images were taken under UV illumination 9 dpi (a-b) and by the fluorescence microscopy 9 dpi (c-d). Bar: 50  $\mu$ m

## 2.4.2 Western blotting Analysis

For the detection of GFP, a monoclonal antibody against GFP was used as primary antibody. Production of GFP was confirmed by the presence of a protein of the expected size of approximately 30 kDa (Fig. 3a), indicating the successful expression of the complete GFP. The upper faint signal detected by western blotting was considered as dimers of the produced proteins.

The GFP gene was further replaced by the CHIKV multiepitope gene to obtain the pJL\_PMMoV( $\Delta$ CP)CHIKV construct (Fig. 1) to confirm the expression ability of this PMMoV vector. *Agrobacterium* with the construct was co-agroinfiltrated in *N. benthamiana* plants with the HC-Pro construct. The production of the multiepitope in agroinfiltrated leaves was confirmed by western blotting using anti-HIS primary antibody, detecting a protein of approximately 20 kDa (Fig. 3b). Similar to GFP detection, the upper faint signal was considered as dimers of the produced proteins. It confirmed the successful expression of the CHIKV multiepitope gene.



**Fig. 3 Western blotting analysis of leaf extracts using anti-GFP (a) and anti-His (b).** *N. benthamiana* leaves were co-infiltrated with *A.t./ pJL\_PMMoV( $\Delta$ CP)GFP* (GFP lane) or *pJL\_PMMoV( $\Delta$ CP)CHIKV* (CHIKV lane) and *A.t./pBin HC-Pro*. Total soluble protein extracts were prepared from infiltrated leaves approximately 9 dpi. C+, positive control (His-tag purified GFP). C-, negative control (non-infiltrated leaf extract).

Plant viral vectors, for heterologous protein production, are important tools for a large-scale production of biopharmaceutical proteins, such as antibodies and antigens. High-level expression of heterologous genes has been obtained using for example the TMV vector, allowing the development of commercial plant-based platforms (Kumagai et al., 2000; Marillonnet et al., 2004; Musiyuchuk et al., 2007). Removing the CP gene of TMV had attractive advantages, e.g., increasing the size-limit capacity of the target gene, reducing the risks of viral vector escape to the environment, and desirably shifting the cell energy from CP to the target-protein production [11]. However, it is also known that sometimes modifications in the CP gene can damage the subgenomic promoter region and may reduce the subgenomic RNA production, resulting in lower production of the heterologous protein (Lindbo, 2007a). It means that careful analyzes must be conducted to evaluate the expression efficiency of each new vector.

The first PMMoV-based expression vector was constructed by insertion of the GFP gene replacing the entire CP gene. However, no GFP signal could be detected in the agroinfiltrated *N. benthamiana* plants (data not shown). Most possibly, the CP gene contained part of the subgenomic promoter. Previous studies on TMV showed that the 5' and the 3' ends of the CP gene may work as regulatory regions and enhanced or inhibited subgenomic RNA transcription and GFP heterologous production (Man and Epel, 2004). Therefore, to preserve these possible secondary structures of the 5' and the 3' flanking regions of the CP gene, we maintained the initial and final 102 nts at the 5' and 3' ends. This strategy proved to be useful to enable protein expression.

It has been shown that co-expression of proteins with an RNA silencing suppressor can boost the efficiency of heterologous protein expression of viral vectors (Lindbo,

2007b; Rhee et al., 2016). In this study, the expression of GFP and CHIKV antigens from the PMMoV vector was also benefitted upon co-inoculation with the potyviral HC-Pro construct, and GFP signals could be seen for almost two weeks without any apparent sign of GFP gene silencing. Tobamoviruses, including PMMoV, encode a 126-kDa protein (or small replicase subunit protein), which is a relatively strong RNA silencing suppressor protein (Kubota et al., 2003; Vogler et al., 2007; Souza et al., 2013). This RNA silencing suppressor inhibits the function of small interfering RNAs (siRNA), but not the generation of these small RNAs. In contrast, the potyviral HC-Pro inhibits the generation of siRNAs (Mallory et al., 2001). We believe that the use of two different types of RNA silencing suppressors may have resulted in a stronger suppression effect (i.e. prolonged GFP accumulation) observed in this study.

This is the first report of an efficient expression vector of PMMoV. This CP-truncated viral vector, pJL\_PMMoV( $\Delta$ CP), will be useful in a plant farm platform, and especially attractive due to the low risk of escaping to the environment.

**Funding:** This study was funded by the Brazilian National Council for Scientific and Technological Development, CNPq (grant number 401755/2013-4).

**Conflict of Interest:** The authors declare that they have no conflict of interest.



## 2.5 REFERENCES

- Alonso, E., García-Luque, I., de la Cruz, a, Wicke, B., Avila-Rincón, M.J., Serra, M.T., Castresana, C., Díaz-Ruiz, J.R., 1991. Nucleotide sequence of the genomic RNA of pepper mild mottle virus, a resistance-breaking tobamovirus in pepper. *J. Gen. Virol.* 72 ( Pt 12, 2875–84.
- Azhakanandam, K., Weissinger, S.M., Nicholson, J.S., Qu, R., Weissinger, A.K., 2007. Amplicon-plus targeting technology (APTT) for rapid production of a highly unstable vaccine protein in tobacco plants. *Plant Mol. Biol.* 63, 393–404. <https://doi.org/10.1007/s11103-006-9096-9>
- Baulcombe, D.C., Chapman, S., Santa Cruz, S., 1995. Jellyfish green fluorescent protein as a reporter for virus infections. *Plant J.* <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1995.07061045.x>
- Blawid, R., Nagata, T., 2015. Construction of an infectious clone of a plant RNA virus in a binary vector using one-step Gibson Assembly. *J. Virol. Methods* 222, 11–15.
- Burch-Smith, T.M., Anderson, J.C., Martin, G.B., Dinesh-Kumar, S.P., 2004. Applications and advantages of virus-induced gene silencing for gene function studies in plants. *Plant J.* 39, 734–746. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2004.02158.x>
- Dawson, W., Lehto, K.M., 1990. Tobamovirus gene expression 38.
- Dawson, W.O., Lewandowski, D.J., Hilf, M.E., Bubrick, P., Raffo, A.J., Shaw, J.J., Grantham, G.L., Desjardins, P.R., 1989. A tobacco mosaic virus-hybrid expresses and loses an added gene. *Virology* 172, 285–92.
- Donson, J., Kearney, C.M., Hilf, M.E., Dawson, W.O., 1991. Systemic expression of a bacterial gene by a tobacco mosaic virus-based vector. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88, 7204–8.

- Eiras, M., Chaves, A.L.R., Moreira, S.R., Araujo, J. De, Colariccio, A., 2004. Caracterização de um Isolado do Pepper mild mottle virus que não Quebra a Resistência do Gene L3 em *Capsicum* sp . *Fitopatol. Bras.* 29, 670–675. <https://doi.org/10.1590/S0100-41582004000600014>
- Escobar, N.M., Haupt, S., Thow, G., Boevink, P., Chapman, S., Oparka, K., 2003. High-throughput viral expression of cDNA-green fluorescent protein fusions reveals novel subcellular addresses and identifies unique proteins that interact with plasmodesmata. *Plant Cell* 15, 1507–23.
- Gibson, D.G., Young, L., Chuang, R.-Y., Venter, J.C., Hutchison, C.A., Smith, H.O., 2009. Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nat. Methods* 6, 343–5. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1318>
- Gleba, Y., Klimyuk, V., Marillonnet, S., 2007. Viral vectors for the expression of proteins in plants. *Curr. Opin. Biotechnol.* 18, 134–141. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2007.03.002>
- Junqueira, B.R.T., Nicolini, C., Lucinda, N., Orílio, A.F., Nagata, T., 2014. A simplified approach to construct infectious cDNA clones of a tobamovirus in a binary vector. *J. Virol. Methods* 198, 32–6. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2013.12.024>
- Kam, Y.-W., Lum, F.-M., Teo, T.-H., Lee, W.W.L., Simarmata, D., Harjanto, S., Chua, C.-L., Chan, Y.-F., Wee, J.-K., Chow, A., Lin, R.T.P., Leo, Y.-S., Le Grand, R., Sam, I.-C., Tong, J.-C., Roques, P., Wiesmüller, K.-H., Rénia, L., Röttschke, O., Ng, L.F.P., 2012. Early neutralizing IgG response to Chikungunya virus in infected patients targets a dominant linear epitope on the E2 glycoprotein. *EMBO Mol. Med.* 4, 330–43. <https://doi.org/10.1002/emmm.201200213>
- Kubota, K., Tsuda, S., Tamai, A., & Meshi, T. 2003. Tomato mosaic virus replication protein suppresses virus-targetted posttranscriptional gene silencing. *J. Virol.* 77, 11016-11026.

- Kumagai, M.H., Donson, J., della-Cioppa, G., Grill, L.K., 2000. Rapid, high-level expression of glycosylated rice alpha-amylase in transfected plants by an RNA viral vector. *Gene* 245, 169–74.
- Lico, C., Chen, Q., Santi, L., 2008. Viral vectors for production of recombinant proteins in plants. *J. Cell. Physiol.* 216, 366–377. <https://doi.org/10.1002/jcp.21423>
- Lindbo, J.A., 2007a. TRBO: A High-Efficiency Tobacco Mosaic Virus RNA-Based Overexpression Vector. *Plant Physiol.* 145, 1232–1240. <https://doi.org/10.1104/pp.107.106377>
- Lindbo, J.A., 2007b. High-efficiency protein expression in plants from agroinfection-compatible Tobacco mosaic virus expression vectors. *BMC Biotechnol.* 7, 52. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-7-52>
- Liu, Y., Schiff, M., Dinesh-Kumar, S.P., 2002. Virus-induced gene silencing in tomato. *Plant J.* 31, 777–86.
- Liu, Z., Kearney, C.M., 2010. A tobamovirus expression vector for agroinfection of legumes and Nicotiana. *J. Biotechnol.* 147, 151–9. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2010.03.021>
- Mallory, A.C., Ely, L., Smith, T.H., Marathe, R., Anandalakshmi, R., Fagard, M., Vaucheret, H., Pruss, G., Bowman, L., & Vance, B.V. 2001. HC-Pro suppression of transgene silencing eliminates the small RNAs but not transgene methylation or the mobile signal. *Plant Cell* 13, 571-583.
- Mallory, A.C., Parks, G., Endres, M.W., Baulcombe, D., Bowman, L.H., Pruss, G.J., Vance, V.B., 2002. The amplicon-plus system for high-level expression of transgenes in plants. *Nat. Biotechnol.* 20, 622–5. <https://doi.org/10.1038/nbt0602-622>
- Man, M., Epel, B.L., 2004. Characterization of regulatory elements within the coat protein (CP) coding region of Tobacco mosaic virus affecting subgenomic transcription and

- green fluorescent protein expression from the CP subgenomic RNA promoter. *J. Gen. Virol.* 85, 1727–1738. <https://doi.org/10.1099/vir.0.79838-0>
- Marillonnet, S., Giritch, A., Gils, M., Kandzia, R., Klimyuk, V., Gleba, Y., 2004. In planta engineering of viral RNA replicons: efficient assembly by recombination of DNA modules delivered by *Agrobacterium*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 6852–7. <https://doi.org/10.1073/pnas.0400149101>
- Mlotshwa, S., Verver, J., Sithole-Niang, I., Prins, M., Van Kammen, A.B., Wellink, J., 2002. Transgenic plants expressing HC-Pro show enhanced virus sensitivity while silencing of the transgene results in resistance. *Virus Genes* 25, 45–57.
- Musiychuk, K., Stephenson, N., Bi, H., Farrance, C.E., Orozovic, G., Brodelius, M., Brodelius, P., Horsey, A., Ugulava, N., Shamloul, A.-M., Mett, V., Rabindran, S., Streatfield, S.J., Yusibov, V., 2007. A launch vector for the production of vaccine antigens in plants. *Influenza Other Respi. Viruses* 1, 19–25. <https://doi.org/10.1111/j.1750-2659.2006.00005.x>
- Paul, M., Ma, J.K.-C., 2011. Plant-made pharmaceuticals: leading products and production platforms. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 58, 58–67. <https://doi.org/10.1002/bab.6>
- Pogue, G.P., Lindbo, J.A., Garger, S.J., Fitzmaurice, W.P., 2002. Making an Ally from an Enemy: Plant Virology and the New Agriculture. *Annu. Rev. Phytopathol.* 40, 45–74. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.40.021102.150133>
- Rhee, S.J., Jang, Y.J., Lee, G.P., 2016. Identification of the subgenomic promoter of the coat protein gene of cucumber fruit mottle mosaic virus and development of a heterologous expression vector. *Arch. Virol.* 161, 1527–1538. <https://doi.org/10.1007/s00705-016-2808-9>
- Souza, A.C., Vasques, R.M., Inoue-Nagata, A.K., Lacorte, C., Maldaner, F.R., Noronha, E.F,

- & Nagata, T. 2013. Expression and assembly of Norwalk virus-like particles in plants using a viral RNA silencing suppressor gene. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97, 9021-9027.
- Vogler, H., Akbergenov, R., Shivaprasad, P.V., Dang, V., Fasler, M., Kwon, M-O., Zhanybekova, S., Hohn, T., & Heinlein, M. 2007. Modification of small RNAs associated with suppression of RNA silencing by tobamovirus replicase protein. *J. Virol.* 81, 10379-10388.
- Voinnet, O., Rivas, S., Mestre, P., Baulcombe, D., 2003. An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus. *Plant J.* 33, 949–56.
- Yusibov, V., Streatfield, S.J., Kushnir, N., 2011. Clinical development of plant-produced recombinant pharmaceuticals: Vaccines, antibodies, and beyond. *Hum. Vaccin.* 7, 313–321. <https://doi.org/10.4161/hv.7.3.14207>

**CAPÍTULO 3 – REPLICON BASEADO NO TYMOVIRUS *TOMATO*  
*BLISTERING MOSAIC VIRUS* COM POTENCIAL PARA APRESENTAÇÃO  
DE PEPTÍDEOS**

Coorientadora: Dra Rosana Blawid

### 3. REPLICON BASEADO NO TYMOVIRUS *TOMATO BLISTERING MOSAIC VIRUS* COM POTENCIAL PARA APRESENTAÇÃO DE PEPTÍDEOS

Raquel Medeiros Vasques<sup>1</sup>, Cristiano Lacorte<sup>2</sup>, Daniel Ardisson-Araújo<sup>3</sup>, Rosana Blawid<sup>4</sup> & Tatsuya Nagata<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Microscopia e Virologia, Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília, Brasília, DF, Brasil

<sup>2</sup>Laboratório de Biologia Sintética, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF, Brasil

<sup>3</sup>Laboratório de Virologia de Insetos, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil.

<sup>4</sup>Laboratório de Fitovirologia, Departamento de Agronomia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil.

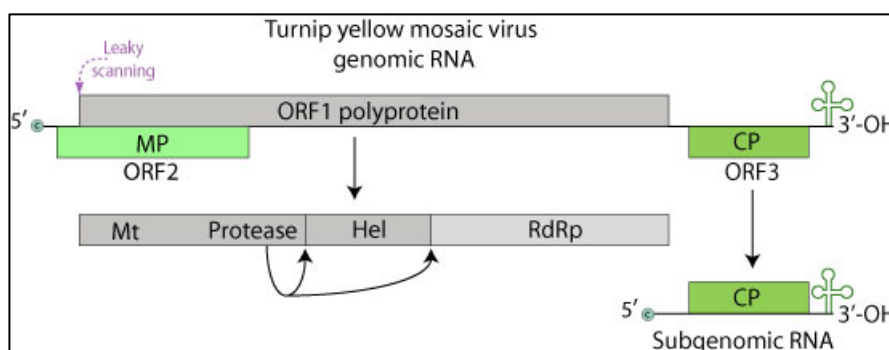
#### 3.1 RESUMO

*Tomato blistering mosaic virus* (ToBMV) é um vírus de RNA senso positivo. Com objetivo de usar o clone infeccioso do ToBMV como vetor de expressão de peptídeos, modificamos o gene da capa proteica (CP) deletando a região gênica correspondente a 23 aminoácidos da região N-terminal ( $\Delta$ 2-24), e examinamos seu efeito na montagem de partícula e infectividade do vírus modificado. O mutante ToBMV<sub>CP</sub> $\Delta$ 2-24 foi introduzido em folhas de *Nicotiana benthamiana* através de agroinfiltração e produziu sintomas semelhantes ao tipo selvagem. Em geral, esses resultados sugerem que, assim como em outros tymovirus, a região N-terminal da CP de ToBMV não é essencial para replicação e infectividade do vírus e nos permite pensar num potencial uso desse vetor viral baseado em ToBMV para expressão de epitopos como “display” na superfície da CP.

Palavras chave: tomato blistering mosaic virus; tymovirus, expressão de capa proteica mutante, vetor viral, display

### 3.2 INTRODUÇÃO

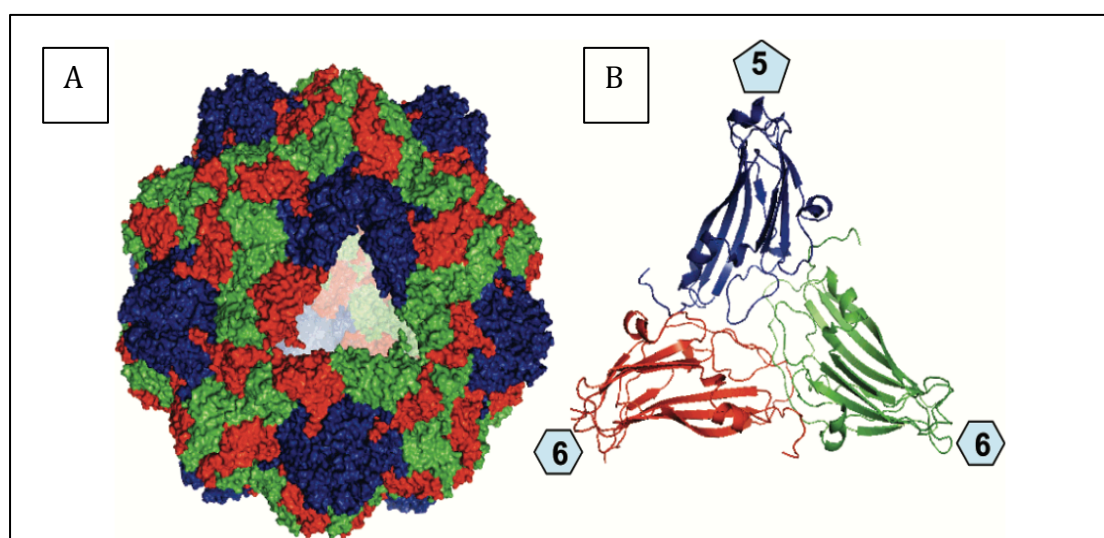
*Tomato blistering mosaic virus* (ToBMV) pertence ao gênero *Tymovirus* que possui *Turnip yellow mosaic virus* (TYMV) como espécie tipo (Martelli et al., 2002). Assim como outras espécies do gênero, possui RNA genômico de fita simples, senso positivo de tamanho entre 6,0 kb e 6,7 kb contendo pelo menos três fases de leitura aberta (ORF do inglês, *open-reading frame*) e regiões não traduzidas no terminal 5' com “cap” (m<sup>7</sup>GpppG) e uma estrutura secundária no terminal 3' similar a um RNA transportador (tRNA-like) com um anticódon do aminoácido valina (com isso, possivelmente o vírus possui valina na extremidade 3'). A ORF1 codifica uma proteína de 206 kDa com motivos conservados de metiltransferase/ protease (Met/Pro), helicase (Hel) e RNA polimerase dependente de RNA (RdRp). ORF2 codifica uma proteína de movimento de 69 kDa rica em prolina, necessária para o movimento célula-célula e também envolvida na supressão de silenciamento de RNA. ORF3 codifica para a capa proteica (CP) de aproximadamente 20 kDa, a qual é expressa via um RNA subgenômico. No RNA genômico destes vírus há uma região altamente conservada de 16 nucleotídeos, denominada “tymobox”, que funciona como promotor subgenômico de RNA para ORF3 (Haenni and Dreher, 2008) (Fig. 1).



**Fig. 1:** Estrutura genômica da espécie tipo do gênero *Tymovirus*, *Turnip yellow mosaic virus* (TYMV), mostrando as ORFs. MP: proteína de movimento; CP: capa proteica; Mt: metiltransferase; Hel: helicase; RdRp: RNA polimerase dependente de RNA. Fonte: ViralZone



O vírion é isométrico, não-envelopado, com diâmetro aproximado de 30 nm e simetria icosaédrica  $T=3$ , composto de 180 unidades de sequências idênticas do capsídeo dispostas em 20 hexâmeros e 12 pentâmeros. A predição da estrutura secundária do vírion de tymovirus mostra que são organizadas em oito fitas  $\beta$ -barril antiparalelas com duas regiões  $\alpha$ -hélices (Canady et al., 1996, 1995; Hayden et al., 1998) (Fig. 2).



**Fig. 2: Estrutura do capsídeo de TYMV com uma unidade assimétrica.** (A): as subunidades estão destacadas com as cores azul (cadeia A), vermelho (cadeia B) e verde (cadeia C). (B): Diagrama das fitas ampliado, mostrando as três subunidades (A, B e C): duas hexâmeras (B e C) e uma pentâmera (A). Fonte: Barnhill et al., 2007.

Uma das principais vantagens da estrutura do capsídeo é sua estabilidade a 4 °C por meses e 60 °C por horas, além disso, ele pode resistir a uma ampla faixa de pH (4 – 10), solventes orgânicos e uma variedade de condições de reações (Barnhill et al., 2007). Além disso, superfície da CP mostrou-se apta a ser modificada por engenharia genética, e as regiões N- e C-terminal têm sido o principal alvo dessas modificações.

Em um dos estudos que exploram a capacidade de modificações nessas regiões, CPs recombinantes de TYMV foram construídos com regiões homólogas de belladonna mottle tymovirus e mostraram-se viáveis e apresentaram sintomas em couve chinesa (*Brassica rapa var. pekinensis*) e plantas de arabdopsis (Hayden et al., 1998). Outro grupo mostrou num primeiro trabalho, que deleções na região gênica de até 26 aminoácidos no terminal N da CP de physallis mottle virus (PhMV) não afetou a montagem do capsídeo, sugerindo que esses aminoácidos iniciais não são essenciais para a montagem do capsídeo  $T=3$  (Sastri et al., 1997). Num segundo trabalho do mesmo grupo, a região do terminal N da CP de PhMV foi estendida em 41 aminoácidos e a montagem da partícula também não foi afetada quando o mutante foi expresso em *E. coli* (Sastri et al., 1999). Powell e colegas também observaram que permaneceram infectivos e formando suas partículas mesmo após deleções de até 25 aminoácidos na região N-terminal da CP (Powell et al., 2012). Esses resultados demonstraram que a região N-terminal da CP é flexível e que algumas deleções e/ou adições nessa região não afetam a montagem do capsídeo  $T=3$ .

Vetores virais de plantas para “display” têm sido amplamente utilizados para proporcionar uma estrutura molecular para diferentes tipos de peptídeos fusionados à CP e dessa maneira exibidos na superfície de partículas de vírus quiméricas (*chimeric virus particles* - CVP) (revisado em Plchova et al., 2017). Vírus vegetais podem ser consideradas plataformas potencialmente seguras para produção de produtos terapêuticos para uso animal e humano, e uma das principais razões para isso é o fato de não serem tóxicos nem infectivos para as células animais e humanas (Lico et al., 2012).

Neste trabalho, a CP de ToBMV foi modificada deletando a região gênica de 23 aminoácidos do N-terminal ( $\Delta_{2-24}$ ), resultando no mutante ToBMV\_CP $\Delta_{2-24}$ , e essa construção foi agroinfiltrada em *Nicotiana benthamiana* onde pode-se observar sintomas idênticos ao das plantas agroinfiltradas com o tipo selvagem. O alvo desse estudo foi testar a eficiência do mutante ToBMV\_CP $\Delta_{2-24}$  em relação a eficiência da infectividade viral, como um primeiro passo para o desenvolvimento de um vetor para expressão de epítopos que poderão ser usados subsequentemente para o diagnóstico sorológico.

### 3.3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.3.1 Construção do mutante com deleção na N-terminal CP

A mutação (deleção) foi introduzida como descrito abaixo, utilizando um vetor binário compacto (pJL89) codificando o genoma de ToBMV (KT834406) (Blawid and Nagata, 2015). Para realizar a construção do mutante, os *primers forward* ToBMV\_pJL\_Del\_For (ACCCCCACCACTGAACTCTCCGGAGCCATT) e *reverse* ToBMV\_pJL\_Rev (CATCGTGTCAATTGTAATTGGGAAGCAATT) foram usados para promover a deleção de 5'-end da ORF da CP através de amplificação por reação de cadeia de polimerase (PCR) utilizando a enzima Q5 High-Fidelity DNA polymerase (New England Biolabs, Ipswich, EUA). Os fragmentos amplificados foram purificados e ligados utilizando T4 DNA ligase (New England Biolabs) depois de fosforilação com T4 polynucleotide kinase (New England Biolabs). A construção resultante foi denominada CP $\Delta_{2-24}$  (Fig. 3B).

<b>A</b>						
1	MDPLTTNTIS	SKQPSIQAPG	YHLPTPSTEI	SGAIELPFQF	MATTFGSAET	LAQITLASAA
61	PLTKMMSSYR	HCKLTQCSAE	LTPNAGAI SN	PLTVNLVWVP	ANSTASPPDI	LNVEGGSSFV
121	LGGAITAAKT	ISVPLPQNSV	NLMLKDSVLY	SDTPKLLAYS	PAPTTPSKTP	TATLQIRGRI
181	LLSSPLLQSS					
<b>B</b>						
ToBMV-Wt	MDPLTTNTISSKQPSIQAPGYHLPTPSTEISGAIE					
$\Delta 2-24$	M-----TPSTEISGAIE					

**Fig. 3: Sequência de aminoácidos da capa proteica de ToBMV.** A: sequência completa de aminoácidos da capa proteica de ToBMV; B: sequência parcial da região N-terminal da capa proteica do Wt e do mutante  $CP\Delta_{2-24}$  mostrando a região deletada.

### 3.3.2 Transformação de bactérias e Agroinfiltração em *Nicotiana benthamiana*

Após a construção, células de *E. coli* cepa DH10-B (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EUA) competentes para eletroporação foram transformadas com o plasmídeo, utilizando o equipamento Gene Pulser II (Bio-Rad, Hercules, EUA) e foram incubadas a 28 °C para minimizar a possibilidade de deleção da região do plasmídeo. Após a extração de DNA plasmidial de cada construção e confirmação utilizando PCR com *primers* específicos para cada caso e sequenciamento de nucleotídeos pelo método Sanger (Macrogen, Seoul, Coreia do Sul), células de *Agrobacterium tumefaciens* cepa GV3101::pMP90, foram transformadas por eletroporação com as construções selecionadas de ToBMV. *A. tumefaciens* transformadas foram mantidas em meio Luria-Bertani (LB) contendo canamicina (50 µg/ml), rifampicina (50 µg/ml) e gentamicina (25 µg/ml). Para inoculação da planta, 2 ml de cultura líquida crescida *overnight* foi centrifugada a 1200 x g por 10 min e ressuspendida em 5 ml de meio MS (pH 5,5) suplementado com 150 µM de acetosiringona (Bucher et al., 2003). O volume final foi ajustado para concentração bacteriana de 0,5 em OD  $A_{600}$ . Plantas de *N. benthamiana* com 5 semanas de vida

foram agroinfiltradas, no lado abaxial, com o uso de seringas sem agulha. Após as infiltrações, as plantas foram mantidas em casa de vegetação a 25 °C com fotoperíodo de 16 horas.

### 3.3.3 Infectividade e Extração de Proteínas

As plantas foram observadas por um período de até 14 dias e a infecção viral foi confirmada para todas as plantas de *N. benthamiana* por ensaios de *Western blot*. O tecido foliar infiltrado de *N. benthamiana* (100 mg) foi macerado separadamente para cada construção, em 200 µL de PBS 1x [137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, (pH 7.4)]. Os extratos brutos foram misturados com tampão Laemmli [4% SDS, 20% glycerol, 10% 2-mercaptoethanol, 0,004% bromphenol blue e 0,125 M Tris HCl, (pH 6.8)] (1:1) e separados por SDS-PAGE, seguidos de coloração com Coomassie Brilliant Blue R-250 (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA). A eletroforese e transferência das proteínas desnaturadas foram realizadas de acordo com as especificações do fabricante, utilizando o sistema Mini-PROTEAN (Bio-Rad) e transferidas para membrana de nitrocelulose. A expressão da proteína de interesse foi avaliada por *Western blot* usando um anticorpo monoclonal produzido em coelho contra ToBMV purificado (diluições 1:2000) (gentilmente cedida pela Dra. Alice K. Inoue-Nagata, Embrapa-Hortaliças, Brasília, Brasil) seguido pela detecção com o anticorpo secundário IgG anti-coelho conjugado com fosfatase alcalina [AP] (diluições 1:5000) (Sigma-Aldrich). A coloração foi realizada por um ensaio colorimétrico usando o sistema NBT/ BCIP (Sigma-Aldrich).

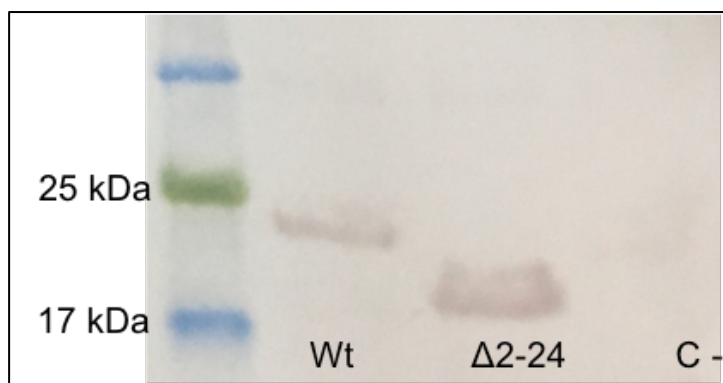
### 3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.4.1 Construção, Infectividade e Expressão do mutante CP em plantas

O mutante CP $\Delta_{2-24}$  (Fig. 3B), contendo 23 aminoácidos deletados na região N-terminal da CP, foi construído a partir do clone infeccioso no vetor binário pJL89. ToBMV\_CP $\Delta_{2-24}$  foi sistemicamente infeccioso em plantas de *N. benthamiana* e apresentou sintomas de mosaico e lesões cloróticas similares ao tipo selvagem ToBMV usando sistema de transferência de T-DNA mediado por *Agrobacterium* (Cho and Dreher, 2006) (Fig. 4) e, como aparenta a análise de SDS/PAGE (dados não mostrados) e *Western blot* do extrato total de planta, a CP modificada apresentou altos níveis de expressão e foi detectada pelo anticorpo anti-CP de ToBMV (Fig. 5). Os resultados apresentados aqui nos mostram claramente que, assim como em estudos prévios (Powell et al., 2012; Sastri et al., 1997), os 23 resíduos de aminoácidos retirados da região N-terminal da capa proteica de ToBMV não são essenciais para a expressão do capsômero e infectividade em ToBMV.



**Fig. 4: Visualização dos sintomas de infecção com 9 dpi.** (A): Wt; (B): CP $\Delta_{2-24}$ , apresentando sintomas similares aos do tipo selvagem.



**Fig. 5: Análise de *Western blot* da capa proteica.** CP foi detectada usando anticorpo anti-ToBMV\_CP após SDS-PAGE e transferida para uma membrana de nitrocelulose. Wt, wild type *Tomato blistering mosaic virus* (19.8 kDa).  $\Delta$ 2-24, mutante com a capa proteica parcialmente deletada (17.4 kDa). C-, controle negativo (planta sadia de *N.benthamiana*).

Estudos de cristalografia de TYMV, o membro tipo do gênero tymovirus, do qual ToBMV também pertence, mostrou que dentro de cada unidade assimétrica do capsídeo  $T=3$ , existem três cadeias de subunidades diferentes denominadas A, B e C. Enquanto as cadeias B e C formam capsômeros hexaméricos no vírus, a cadeia A forma estruturas pentâmeras. Também foi observado que os primeiros 26 aminoácidos da região N-terminal da subunidade A são mal ordenados no mapa de densidade de elétrons, enquanto o restante dos aminoácidos da capa proteica são altamente estruturados, sugerindo que a cadeia A é muito mais flexível comparada com as cadeias B e C (Canady et al., 1996; Dreher, 2004).

Essas características permitem que adições e/ou deleções de aminoácidos nessa região possam ser explorados nos tymovirus, como foi demonstrado no trabalho de Hema e colaboradores, onde deleções e adições de epitopos com até 66 aminoácidos de *foot-and-mouth disease* foram fusionados “*in frame*” na região N-terminal da CP de PhMV, e pode-se observar a formação de *tymovirus-like particles* quando produzidos em *E.coli* (Hema et al., 2007).

Concluindo, o mutante CPA $\Delta_{2-24}$  foi capaz de infectar sistemicamente plantas de *N. benthamiana* e produzir sintomas idênticos aos produzidos pelo tipo selvagem. A motivação inicial para utilizar ToBMV como uma plataforma para expressar peptídeos, foi a observação de que a apresentação de múltiplas cópias de epitopos na superfície de uma proteína transportadora macromolecular aumenta frequentemente a imunogenicidade de tais peptídeos (Lomonossoff and Johnson, 1996); além disso, a capacidade de ToBMV acumular em grandes quantidades em plantas, a robustez das partículas e o fato de não ser infectivo em células de mamíferos, faz desse vírus um atraente candidato para uso como um vetor para apresentação de peptídeos.



### 3.5 REFERÊNCIAS

International Committee on Taxonomy of Viruses database (ICTVdb), Tymoviridae: taxonomic structure of the family (2017), <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/> Accessed 19 Mar 2018

Barnhill, H.N., Reuther, R., Ferguson, P.L., Dreher, T., Wang, Q., 2007. Turnip Yellow Mosaic Virus as a Chemoadressable Bionanoparticle. *Bioconjug. Chem.* 18, 852–859. <https://doi.org/10.1021/bc060391s>

Blawid, R., Nagata, T., 2015. Construction of an infectious clone of a plant RNA virus in a binary vector using one-step Gibson Assembly. *J. Virol. Methods* 222, 11–15.

Canady, M.A., Day, J., McPherson, A., 1995. Preliminary X-ray diffraction analysis of crystals of turnip yellow mosaic virus (TYMV). *Proteins* 21, 78–81. <https://doi.org/10.1002/prot.340210111>

Canady, M.A., Larson, S.B., Day, J., McPherson, A., 1996. Crystal structure of turnip yellow mosaic virus. *Nat. Struct. Biol.* 3, 771–81.

Cho, T.-J., Dreher, T.W., 2006. Encapsidation of genomic but not subgenomic Turnip yellow mosaic virus RNA by coat protein provided in trans. *Virology* 356, 126–135. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2006.06.038>

Dreher, T.W., 2004. Turnip yellow mosaic virus: transfer RNA mimicry, chloroplasts and a C-rich genome. *Mol. Plant Pathol.* 5, 367–75. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2004.00236.x>

Haenni, A.L., Dreher, T.W., 2008. *Tymoviruses*. San Diego, CA.

Hayden, C.M., Mackenzie, A.M., Skotnicki, M.L., Gibbs, A., 1998. Turnip yellow mosaic virus isolates with experimentally produced recombinant virion proteins. *J. Gen. Virol.* 79, 395–403. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-79-2-395>

Hema, M., Nagendrakumar, S.B., Yamini, R., Chandran, D., Rajendra, L., Thiagarajan, D., Parida, S., Paton, D.J., Srinivasan, V.A., 2007. Chimeric tymovirus-like particles displaying foot-and-mouth disease virus non-structural protein epitopes and its use for detection of FMDV-NSP antibodies. *Vaccine* 25, 4784–94. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2007.04.023>

Lico, C., Santi, L., Twyman, R.M., Pezzotti, M., Avesani, L., 2012. The use of plants for the production of therapeutic human peptides. *Plant Cell Rep.* 31, 439–451.

<https://doi.org/10.1007/s00299-011-1215-7>

- Lomonosoff, G.P., Johnson, J.E., 1996. Use of macromolecular assemblies as expression systems for peptides and synthetic vaccines. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 6, 176–82.
- Martelli, G.P., Sabanadzovic, S., Sabanadzovic, N.A.G., Edwards, M.C., Dreher, T., 2002. The family Tymoviridae. *Arch. Virol.* 147, 1837–1846. <https://doi.org/10.1007/s007050200045>
- Plchova, H., Cerovska, N., Vaculik, P., Moravec, T., 2017. Plant viruses as scaffolds for the presentation of vaccine epitopes. *Biol. Plant.* 61, 1–12. <https://doi.org/10.1007/s10535-016-0690-7>
- Powell, J.D., Barbar, E., Dreher, T.W., 2012. Turnip yellow mosaic virus forms infectious particles without the native beta-annulus structure and flexible coat protein N-terminus. *Virology* 422, 165–173. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2011.10.019>
- Sastri, M., Kekuda, R., Gopinath, K., Kumar, C.T., Jagath, J.R., Savithri, H.S., 1997. Assembly of physalis mottle virus capsid protein in *Escherichia coli* and the role of amino and carboxy termini in the formation of the icosahedral particles. *J. Mol. Biol.* 272, 541–52. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1997.1258>
- Sastri, M., Reddy, D.S., Krishna, S.S., Murthy, M.R., Savithri, H.S., 1999. Identification of a discrete intermediate in the assembly/disassembly of physalis mottle tymovirus through mutational analysis. *J. Mol. Biol.* 289, 905–18. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1999.2786>

**CAPÍTULO 4 – TYMOVIRUS-LIKE PARTICLE FORMATION IN BINARY SYSTEM BACULOVIRUS/ INSECT CELL AND ITS POTENTIAL AS A CARRIER STRUCTURE FOR SMALL EPITOPES**

Coorientador: Dr. Daniel Ardisson-Araújo

Este capítulo será submetido para publicação de forma modificada na revista *Archives of virology*. Vasques, R.M., Correa, R.F., Blawid, R., Nagata, T., Ribeiro, B.M & Ardisson-Araújo, D. M. P.: **Tymovirus-like particle formation in binary system baculovirus/insect cell and its potencial use as a carrier structure for small epitopes.**

#### **4. TYMOVIRUS-LIKE PARTICLE ASSEMBLY FROM BACULOVIRUS/INSECT CELL BINARY SYSTEM AND ITS POTENTIAL USE AS A CARRIER STRUCTURE FOR SMALL EPITOPE DISPLAY**

Raquel Medeiros Vasques<sup>1,2</sup>, Leonardo Assis da Silva<sup>2</sup>, Roberto Franco Teixeira Correa<sup>2</sup>, Rosana Blawid<sup>3</sup>, Tatsuya Nagata<sup>1</sup>, Bergmann Morais Ribeiro<sup>2</sup>, Daniel M. P. Ardisson-Araújo<sup>4\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Microscopy and Virology, Cell Biology Department, University of Brasilia, Brasília, DF, Brazil.

<sup>2</sup>Laboratory of Baculovirus, Cell Biology Department, University of Brasilia, Brasília, DF, Brazil.

<sup>3</sup>Laboratory of Phytovirology, Department of Agronomy, Rural Federal University of Pernambuco, Recife, PE, Brazil.

<sup>4</sup>Laboratory of Insect Virology, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil.

\*Corresponding author: Daniel M. P. Ardisson-Araújo

Email: [daniel.araujo@ufsm.br](mailto:daniel.araujo@ufsm.br)

#### **4.1 ABSTRACT**

Tomato blistering mosaic virus (ToBMV) is an icosahedral plant tymovirus that has a single 6.3 kb positive strand RNA genome. We have employed the baculovirus expression vector system (BEVS) to check for the formation of tymovirus-like particles (tVLPs) by the expression of the ToBMV wild-type coat protein (CP) or a modified short amino-terminal deletion ( $\Delta_{2-24}$ CP) version. We found that the

expression of ToBMV CP in BEVS enabled tVLP self-assemble during insect cell infection resembling tymovirus particles. The N-terminal residues 2-24 of the native ToBMV CP are not essential for self-assemble into tVLPs. Moreover, we took advantage com the  $\Delta_{2-24}$ CP version to check the potential of utilizing ToBMV CP as an epitope carrier structure. To carry out so, we inserted a small sequence containing the major envelope protein 2 (E2)-based *Chikungunya virus* epitope replacing the native CP N-terminal 2-24 amino acids. tVLPs resembling tymovirus particles was formed from the E2- $\Delta_{2-24}$ CP version. Overall, the modified tymovirus CP might be used as a protein carrier without affecting self-assembling properties of the CP and as a consequence, its production and purification.

Keywords: Tymovirus, virus-like particle, baculovirus expression vector system, display

## 4.2 INTRODUCTION

Tomato blistering mosaic virus (ToBMV) is a tentative new plant virus species into the genus *Tymovirus* and the family *Tymoviridae*, which presents a monopartite positive-sense ssRNA genome (Martelli et al., 2002). ToBMV causes a severe disease in subjects from the genus *Solanum* L. worldwide with signs that include leaf mosaic and blistering (Blawid et al., 2016). The tymovirus virions are isometric, non-enveloped, approximately 30 nm in diameter arranged in a T=3 icosahedron structure with clustering of coat protein subunits in pentamers and hexamers protruding from the underlying surface (Canady et al., 1996). A subgenomic promoter composed of a 16 conserved nucleotides, called by tymobox, expresses the CP (Ding et al., 1990).

Viral replication takes place in the cytoplasm in association with the double membrane-bounded vesicles that line the periphery of the chloroplasts and/or mitochondria (Canady et al., 1996; Tanaka et al., 2000). Interestingly, some studies have shown that the CP of *Physalis mottle virus* (PhMV) and *Turnip yellow mosaic virus* (TYMV) are able to self-assemble into virus-like particles (VLPs) when the genes are expressed in *Escherichia coli* (Powell et al., 2012; Sastri et al., 1997).

VLPs might be obtained by the expression of structural proteins in several heterologous systems including bacterial and eukaryotic. Many structural proteins are capable of self-assembly within the heterologous-expressing cell (Liu et al., 2013). They are almost totally identical in structure and morphology to virus particles but lack their natural genome and are noninfectious (Noad and Roy, 2003). VLPs are highly immunogenic and a safe alternative to inactivated infectious viruses and have been used as vaccines to counteract several human viruses such as papilloma virus (HPV) (Harper, 2009), hepatitis B virus (HBV) (Fagan et al., 1987) and influenza (Cox and Hashimoto, 2011). Importantly, the baculovirus expression vector system (BEVS) arises as a well-established eukaryotic expression system-based technology that is chosen for the production of a large number of recombinant proteins and is becoming one of the most powerful, robust and economical systems for protein expression (Felberbaum, 2015). BEVS can be used for the production of VLPs, including those from plant viruses (Lamb et al., 1996). However, despite being a versatile and powerful tool to express different foreign proteins, there is a challenge on the purification step (Fuenmayor et al., 2017). To overcome this problem, several strategies focus on the attempt to tag the recombinant proteins with carrier proteins or peptides to facilitate protein purification (D. M. Ardisson-Araújo et al., 2013).

Therefore, in this work we constructed a recombinant baculovirus to express the ToBMV CP and check whether BEVS is a suitable environment for ToBMV VLPs (tVLPs) assembly. We also evaluated the impact of a short amino-terminal deletion on the CP protein for tVLPs assembly. After confirming that the defective CP assembled into tVLPs, we added a small sequence containing the major E2-based *Chikungunya virus* epitope (Kam et al., 2012) to test whether that defective tVLP could be used as a protein carrier structure for the incorporation of an immunogenic epitope, without affecting the self-assembling properties of the CP. To our knowledge, this is the first attempt that evaluates tymovirus-like particle assembly using BEVS and its potential as a carrier structure for short epitopes with medical interest to facilitate production and purification.

## **4.3 MATERIALS AND METHODS**

### **4.3.1 Construction of recombinant bacmids harboring the ToBMV *cp* gene and versions**

Three different CP versions were generated to produce the recombinant baculoviruses: (i) the complete *cp* of ToBMV (CP version); (ii) a mutant of the ToBMV *cp* (23 amino acid deletion to the amino-terminal region of the predicted CP protein) ( $\Delta_{2-24}$ CP version); and (iii) the mutant in fusion with the E2 epitope of CHIKV (QRRSTKDNFNVYKATRPYLAHCPDC) (E2- $\Delta$ CP version). As DNA template for the PCR reaction, we used a previously established cDNA clone, pToBMV (accession number KT834406) (Blawid and Nagata, 2015). For CP amplification, we used the primers ToBMV-CP F (AAG CTT GAA TTC ATG GAT CCC AGT ACT TCA AAC ACC ATC) and ToBMV-CP R (CCA TGG CTG CAG

CTA GGA GGA TTG AAG AAG AGG AGA GGA). For  $\Delta_{2-24}$ CP, we used ToBMV-CP Del-F (AAG CTT GAA TTC ATG ACC CCC ACC ACT GAA CTC TCC GGA GC) together with ToBMV-CP R. For E2- $\Delta_{2-24}$ CP amplification, we performed a two-step PCR for sequentially adding the E2 epitope nucleotide sequence to the  $\Delta_{2-24}$ CP version. For the first step, we used the primer F2 (TTT ACA AGG CCA CTA GAC CAT ACT TGG CCC ACT GCC CAG ATT GTA CCC CCA CCA CTG AAC TCT CCG GAG CCA TTG) together with ToBMV-CP R and as a template the pToBMV. F2 binds to the  $\Delta_{2-24}$ CP version of the CP gene adding a partial E2 epitope sequence. The resulting fragment was used as a template in a second reaction with the primer F2 (AAGCTTGAATTCATGCAACGT CGTTCAACAAAAGACAATTTT AATGTTT ACAAGG CCACTAGACCA TACTTGGCC) together with ToBMV-CP R. The purified fragments were individually digested with EcoRI/PstI and separately cloned into pFastBac<sup>TM</sup>1 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) vector digested with the same enzymes to generate three shuttle vectors. The shuttle vectors were individually transformed into DH10-Bac cells (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) by heat shock. Recombinant bacmids were selected and confirmed by PCR following the manufacturer's instructions (Bac-to-Bac<sup>®</sup>, Baculovirus expression systems, Invitrogen). One  $\mu$ g of each recombinant bacmid was transfected into *Trichoplusia ni* (BTI-Tn5B1-4, called herein Tn5B) cells ( $10^6$ ) (Granados et al., 1994) using liposome (Cellfectin<sup>®</sup>) according to manufacture's instructions (Invitrogen). Tn5B cells were cultured at 27°C in TC-100 medium (HIMEDIA) supplemented with 10% fetal bovine serum (Thermo Fisher). The supernatant of seven days post-transfection cells containing the recombinant viruses were collected, amplified in Tn5B cells, and tittered as previously described elsewhere (O'Reilly et al., 1992).



### 4.3.2 Protein expression analyses in Tn5B cell

For the infection of Tn5B cells with baculovirus, the viral stock was added to the cells ( $1-2 \times 10^6$  cells/mL) at an MOI of 5. At four days post-infection (d p.i.), the infected cells and the culture supernatant were separated by centrifugation at  $5,000 \times g$  for 5 min. The cells were washed with phosphate buffered saline (PBS, 3 mL; 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 2 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; pH 7.4) and pelleted by centrifugation at  $5,000 \times g$  for 5 min. Western and dot blot analyses were used to evaluate the specificity of ToBMV CP versions using ToBMV CP specific polyclonal antibody (kindly provided by Alice K Inoue-Nagata, Embrapa Hortaliças, Brasília, Brazil). For Western blot, the pellet was resuspended in PBS and the total protein was quantified by the Bradford method (Biorad) according to the manufacture's protocol. Cell extract samples were mixed with equal volumes of 2x protein loading buffer (0.25 M Tris-Cl, pH 6.8, 4% SDS, 20% glycerol, 10% 2-mercaptoethanol, and 0.02% bromophenol blue) and incubated at  $100^\circ\text{C}$  for 5 min. Samples were resolved by 12% SDS-PAGE (Sambrook and Russel, 2001), transferred onto polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane (Millipore), and probed with a rabbit anti-ToBMV-CP polyclonal antibody. The probing was followed by incubation with phosphatase alkaline-conjugated anti-rabbit secondary antibody (Sigma-Aldrich). Blots were developed using alkaline phosphatase buffer (100 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 5 mM  $\text{MgCl}_2$ ; pH 9.5) containing 3.5 mM 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (BCIP) and 3.7 mM nitro blue tetrazolium (NBT). Leaf extracts of ToBMV-infected *Nicotiana benthamiana* with signs of infection was used as positive control, while control virus vAc-occ- (negative occlusion AcMNPV baculovirus (D. M. P. Ardisson-Araújo et al., 2013)) and mock-infected Tn5B cells were used as a negative control. For dot blot

analysis, the crude cell extracts, lysate and purified were manually dotted on a nitrocellulose membrane and probed using the same protocol above.

### **4.3.3 Light and Immunofluorescence microscopy**

Monolayers of Tn5B ( $5.0 \times 10^6$ ) cells were infected at an MOI of 5 with recombinant vAc-ToBMV-CP, vAc-ToBMV- $\Delta_{2-24}$ CP, or vAc-ToBMV-E2- $\Delta_{2-24}$ CP. After 72 h p.i., cells were fixed with 3.7% formalin and incubated for 1 h with a 1:200 dilution of polyclonal rabbit anti-ToBMV-CP in PBS. After the washing, cells were incubated with the fluorescent Alexa Fluor 488 anti-rabbit IgG (Thermo Fischer) secondary antibody. Images were taken with a Zeiss Apotome Axiovert 200 (Munich, Germany) and processed with AxioVision 4.8.

### **4.3.4 tVLPs purification and negative-stained transmission electron microscopy**

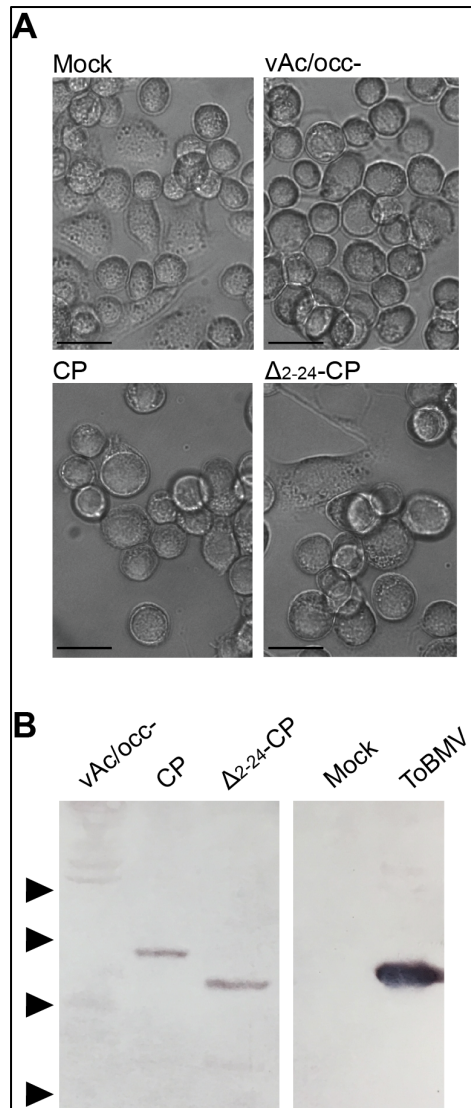
Infected cells were harvest from an 80% cell confluence T75 culture flask and centrifuged at  $5,000 \times g$  for 5 min. After, the pellets containing the infected cells were washed with PBS twice by centrifugation at  $5,000 \times g$  for 5 min each. The cells were resuspended in 500  $\mu$ L PBS and lysed by sonication on ice for one round of 15 s (Sonics Vibracell, output 2 W). The lysate were clarified by centrifugation at  $5,000 \times g$  for 5 min, and the supernatant were subjected to ultracentrifugation using a Beckman SW50-1 Ti rotor for 3 h at  $100,000 \times g$  onto a sucrose cushion. The pellet were resuspended in 500  $\mu$ L PBS and a small drop was spotted onto carbon-coated cooper grids and negatively stained with 2% (w/v) uranyl acetate. The grids were

examined using a transmission electron microscope (JEOL JEM 1011, JEOL, MA, USA).

## 4.4 RESULTS

### 4.4.1 Virus construction and protein expression

The ToBMV *coat protein* (*cp*) gene was amplified by PCR using a genomic cDNA clone of ToBMV as a template. In order to express and assess the assembly into VLPs by the ToBMV CP in baculovirus expression system, two versions of the *cp* gene were constructed: a full-length version (CP) and an amino-terminal mutant lacking the amino acids 2 to 24 of the predicted protein ( $\Delta_{2-24}$ CP). Two shuttle vectors containing the *cp* versions were used to construct the recombinant baculoviruses vAc-ToBMV-CP and vAc-ToBMV- $\Delta_{2-24}$ CP. We observed baculovirus cytopathic effects when Tn5B cells were infected with either vAc-ToBMV-CP or vAc-ToBMV- $\Delta_{2-24}$ CP similar to those observed for the control virus infection, vAc/ooc-. The cytopathic effects included nucleus hypertrophy and cell rounding (Figure 1A). The infected cells were harvested and used to check for protein expression by immunoblot analyses (Figure 1B). Virus-infected Tn5B extracts were separated by 12% SDS-PAGE (not shown) and the proteins transferred to a PVDF membrane. The proteins were detected using anti-ToBMV-CP antibody (anti-CP). The predicted molecular mass of the CP protein (19.8 kDa) and  $\Delta_{2-24}$ CP (17.4 kDa) corresponded with the immunoreactive band observed in the immunoblot blot. No bands were detected in mock-infected cell extracts.

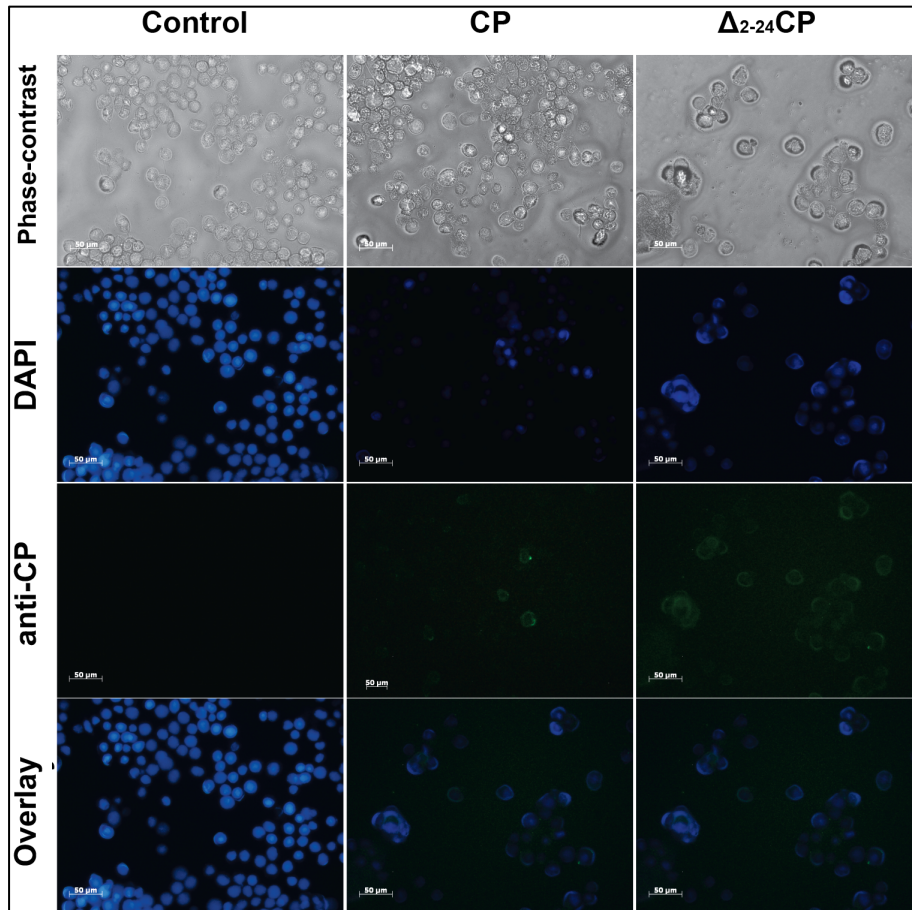


**Figure 1.** (A) Cytopathic effect in Tn5B cells mock-infected or infected with vAc/occ-, vAc-ToBMV-CP, or vAc-ToBMV- $\Delta_{2-24}$ -CP. The infected cells present nucleus hypertrophy, cell rounding, and loss of fusiform cell shape observed in mock. Scale bar = 50 $\mu$ m. (B) Tn5B cells infected with the recombinant CP baculovirus were subjected to 12% SDS-PAGE and transferred onto a PVDF membrane for Western-blotting and incubated with rabbit polyclonal antibodies raised against the ToBMV CP protein followed incubation with conjugated anti-rabbit IgG secondary antibody. Both vAc/occ- and mock-infected Tn5B cell extracts were included as controls.

#### 4.4.2 Immunofluorescence analysis of infected cells

In order to understand the cytolocalization of the expressed CP versions in the insect cell during baculovirus infection, we performed immunofluorescence (IF) assay of infected Tn5B cells using anti-ToBMV-CP antibody. Cells were separately infected for 72 h with the control virus vAc/occ-, vAc-ToBMV-CP, or vAc-ToBMV- $\Delta_{2-24}$ -CP. Uninfected Tn5B cells exhibited a very small background fluorescence (Figure 2, mock), while infected cells expressing the CP versions were labeled at 72 h p.i. (Figure 2). IF analyses showed that both CP and  $\Delta_{2-24}$ -CP versions accumulated in the

cytosol during virus infection as expected, based on the fact that tymovirus infection takes place in the plant cell cytoplasm.

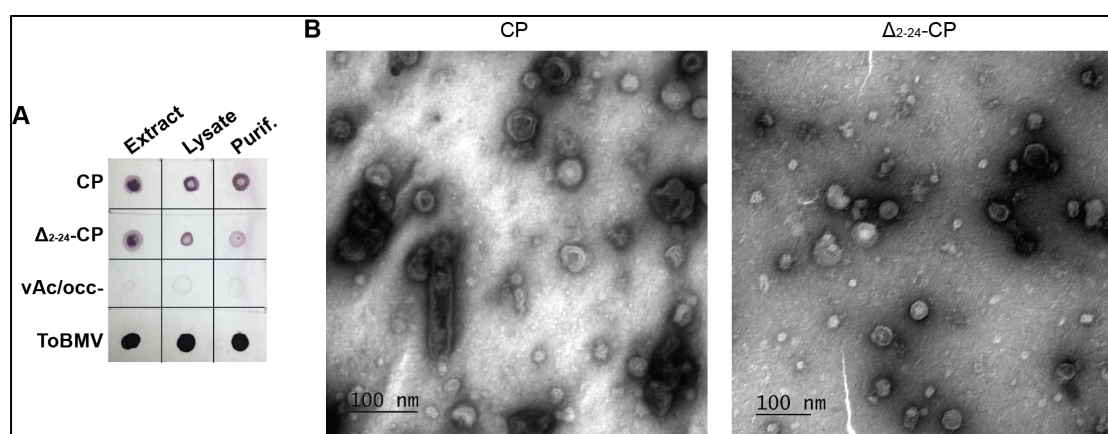


**Figure 2.** Immunofluorescence analyses of Tn5B cells infected with the recombinant CP versions-expressing baculoviruses. The figure shows Tn5B cells infected with either vAc-ToBMV-CP or vAc-ToBMV- $\Delta_{2-24}$ -CP at 72 h post-infection and incubated with rabbit polyclonal antibodies raised against the ToBMV CP protein, after DAPI staining for nucleus localization.

#### 4.4.3 Tymovirus-like particle (tVLP) formation during baculovirus infection

In order to analyze the tVLP formation of ToBMV CP versions expressed during baculovirus infection, Tn5B cells infected with either vAc-ToBMV-CP or vAc-ToBMV- $\Delta_{2-24}$ -CP were lysed. The cell contents were clarified and loaded onto a sucrose cushion to purify putative tVLPs released. In a dot blot analysis, we probed both the crude extract and the ultracentrifugation resulting pellet using a ToBMV-CP antibody (Figure 3A). Reactive dots were found in crude extract and purified putative

tVLPs from the two versions. We found no colored signals with the extract from mock-infected cells. For tVLP assembly analyses, we performed a negative stain of the generated pellets using transmission electron microscopy (Figure 3B). Both versions, CP and  $\Delta_{2-24}$ -CP, formed icosahedral virus-like particles that are nearly identical to the typical capsids of tymovirus, confirming that the recombinant proteins expressed in baculovirus were able of self-assembling into VLPs (Figure 3B). The negative stain revealed rod-shaped nucleocapsids from baculovirus as expected (Figure 3B, CP field).



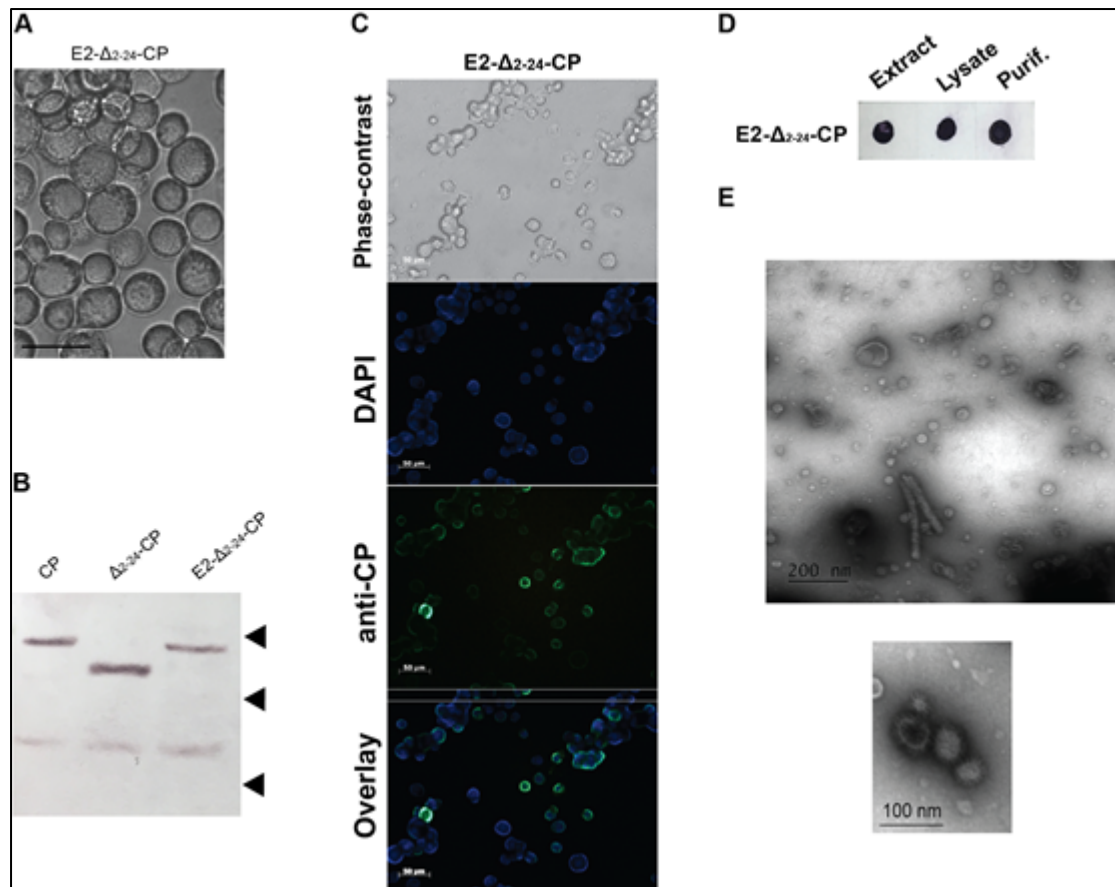
**Figure 3.** (A) Dot blot analysis of the crude, lysate and purified extracts from infected cells using both vAc-ToBMV-CP or vAc-ToBMV- $\Delta_{2-24}$ -CP recombinant viruses and anti-ToBMV-CP antibody. (B) Electron micrographs of virus-like particles (VLPs) assembled from vAc-ToBMV-CP or vAc-ToBMV- $\Delta_{2-24}$ -CP infection. The VLPs were deposited on Formvar-coated grids and stained with 2% (w/v) uranyl acetate.

#### 4.4.4 ToBMV coat protein carrying the CHIKV epitope

To check the ability of tVLP in carrying small peptides with medical interest, we evaluated the tVLP assembly containing the E2 epitope of CHIKV in fusion with the  $\Delta_{2-24}$ -CP version of the ToBMV CP. The shuttle vector was verified by DNA sequencing and used to construct the recombinant virus, vAc-ToBMV-E2- $\Delta_{2-24}$ -CP.

Typical cytopathic effects of baculovirus infection were observed in Tn5B cells after infection (Figure 4A). The recombinant protein E2- $\Delta_{2-24}$ -CP was detected using anti-ToBMV-CP antibody (anti-CP). The calculated molecular mass of the E2- $\Delta_{2-24}$ -CP with an additional 25 amino acid residues at its N-terminal (20.3 kDa) corresponded with the immunoreactive band observed in the Western blotting (Figure 4B). No band was detected in both vAc/occ- and mock-infected cell extracts (not shown). We also performed an IF analysis of vAc-ToBMV-E2- $\Delta_{2-24}$ -CP infected Tn5B cells at 72 h p.i.. We found that E2- $\Delta_{2-24}$ -CP protein of ToBMV accumulated in the cytosol of Tn5B cells as observed for CP and  $\Delta_{2-24}$ -CP (Figure 4C). The results of dot blot analysis showed that the ToBMV CP antibody reacted strongly with the crude, lysate and purified extracts cells infected with the vAc-ToBMV-E2- $\Delta_{2-24}$ -CP, after ultracentrifugation of the infected cell lysate onto a sucrose cushion (Figure 4D). Importantly, TEM of purified extracts of Tn5B cells infected with vAc-ToBMV-E2- $\Delta_{2-24}$ -CP revealed icosahedral virus-like particles resembling typical tymovirus particles, showing that the recombinant protein E2- $\Delta_{2-24}$ -CP, even carrying a heterologous small peptide sequence, were able of self-assembly into a VLP (Figure 4E).





**Figure 4.** (A) Cytopathic effect in Tn5B cells infected with recombinant E2- $\Delta_{2-24}$ -CP baculovirus. (B) Tn5B cells infected with the recombinants baculovirus (CP,  $\Delta_{2-24}$ -CP and E2- $\Delta_{2-24}$ -CP) were electrophoresed in a 12% SDS-PAGE and transferred onto a PVDF membrane for Western-blotting. Transferred proteins were incubated with rabbit polyclonal antibodies raised against the ToBMV CP protein followed incubation with conjugated anti-rabbit IgG secondary antibody; (C) Immunofluorescence analyses of Tn5B cells infected with vAc-ToBMV-E2- $\Delta_{2-24}$ -CP baculovirus. The figure shows Tn5B cells infected at 72 h p.i. and incubated with rabbit polyclonal antibodies raised against the ToBMV CP protein and DAPI staining for nucleus localization. (D) Dot blot analysis of the crude, lysate and purified extracts from infected cells using vAc-ToBMV-E2- $\Delta_{2-24}$ -CP recombinant virus and anti-ToBMV-CP antibody. (E) Electron micrographs of virus-like particles (VLPs) assembled from vAc-ToBMV-E2- $\Delta_{2-24}$ -CP infection. The VLPs were deposited on Formvar-coated grids and stained with 2% (w/v) uranyl acetate.



## 4.5 DISCUSSION

The last decades have witnessed the growing use of the binary eukaryotic system baculovirus/insect cell to produce and obtain a range of recombinant proteins. In this study, we expressed the ToBMV coat protein (CP) using this binary system to check for tymovirus-like particle (tVLP) self-assembly. The expression system enabled the formation of tVLPs from two different CP versions, a full-length version (CP) and an amino-terminal deletion mutant that lacks 23 amino acids ( $\Delta_{2-24}$ -CP) of the predicted native CP. We also found that the fusion of a small peptide based on the envelope protein of *Chikungunya virus* did not change either the self-assembly property of the deletion ToBMV CP version.

Plant virus-like particles as a carrier protein is a very promising approach to display epitopes and facilitate its purification due to the nature property of high-density (Roldão et al., 2010) and reduces the risk of cross-reaction for medical diagnosis. Different families of plant viruses had been used to produce VLPs using the baculovirus expression vector system (BEVS) including members of the species *Arabis mosaic virus* (Bertioli et al., 1991), *Tobacco ringspot virus* (Singh et al., 1995), *Cowpea mosaic virus* (Shanks and Lomonossoff, 2000); *Beet western yellows virus* (Tian et al., 1995), *Potato leaf roll virus* (Gildow et al., 2000; Lamb et al., 1996), *Pea enation mosaic virus* (Sivakumar et al., 2009) and *Rice dwarf virus* (Hagiwara et al., 2003). None of those were members of the *Tymovirus*. The ability of self-assembly CP tymovirus in heterologous expressions system was previously assessed for *Physalis mottle virus* (PhMV) and *Turnip yellow mosaic virus* (TYMV) CPs. The tVLPs were able to assemble upon CP expression in *E.coli* even undergoing deletions, substitution and extension mutations at the amino-terminal region of the

protein (Powell et al., 2012; Sastri et al., 1999, 1997; Shahana et al., 2015). Interestingly, the flexible CP N-terminus of both PhMV and TYMV is not essential for tVLP formation (Hayden et al., 1998; Shin et al., 2013). Besides all those viruses being non-enveloped viruses, this work shows the first attempt of using a tymovirus CP to check for tVLP formation and its carrier property in BEVS. We have chosen this linear epitope to take advantage of it in future works and in attempt to helping with virus diagnosis in Brazil. *Chikungunya virus* (CHIKV) is a mosquito-borne virus that causes severe diseases with headache, fever, and intense joint pain symptoms, similar to both Dengue and Zika. Since 2004, this virus is affecting thousands of people around the world (Leparc-Goffart et al., 2014) and as an important outbreak in Brazil since 2014 (Nunes et al., 2015). In 2015-2016 in the Recife Metropolitan Region, the tail end of a Zika epidemic was detected, which was displaced by a Chikungunya epidemic (Magalhaes et al., 2017). The molecular techniques used for CHIKV infection diagnosis is based on molecular approaches such as RT-PCR and qRT-PCR and immunodetection based on ELISA. The most restrictive step for ELISA is a suitable antigen for diagnosis. Precise and differential diagnostics of Dengue, Zika, and Chikungunya is rather needed to evaluate the extent of each of these diseases. Although Dengue infection may be lethal in several cases and Zika infection can lead to newborns with microcephaly or an array of neurodegenerative manifestations, the Chikungunya infection leaves chronic sequels, which debilities the patient and has received less attention (Zanotto and Leite, 2018).

BEVS is highly versatile and efficiently produces structurally and immunologically functional VLPs and protein displays (Balke and Zeltins, 2018). There are a variety of strategies to incorporate or display target proteins on the surface of infected insect cells as well as on budded virions. Native baculovirus proteins such as the major

envelope protein, the capsid protein and the major occlusion body protein, but also foreign scaffolds such as the vesicular stomatitis virus G protein or the influenza hemagglutinin serve as fusion partners for surface presentation of target proteins. The BEVS can produce amounts of protein comparable with those achieved with bacteria or yeast, but its ability to perform complex post-translational modifications is greater including glycosylation and are better systems for expressing complex VLPs (Roldão et al., 2010). In fact, the major limitation of insect cell system is the purification step due to the coproduction of baculovirus particles, contaminants that must be biophysically or biochemically separated from VLPs, as they can impact significantly in product efficiency (Liu et al., 2013). This issue could be easily overcome by blocking the formation of baculovirus particles, as previously performed for HIV VLPs production and purification (Chaves et al., 2018) .

In conclusion, the expression of ToBMV CP gene in BEVS enabled VLP self-assembly in insect cells. The N-terminal residues 2-24 of the native ToBMV CP are not essential for self-assembly into VLPs in BEVS and could be replaced by an alternative sequence with medical purposes such as a human pathogen epitope. The modified tymovirus CP could be used as a protein carrier without affecting the self-assembling properties of the CP and as a consequence, epitope purification and display. Therefore, tVLPs carrying small peptides facilitate antigen purification and display to be efficiently used in diagnosis.

#### 4.6 REFERENCES

- Ardisson-Araújo, D.M., Rocha, J., da Costa, M.H., Bocca, A., Dusi, A., de Oliveira Resende, R., Ribeiro, B., 2013. A baculovirus-mediated strategy for full-length plant virus coat protein expression and purification. *Viol. J.* 10, 262. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-10-262>
- Ardisson-Araújo, D.M.P., Morgado, F.D.S., Schwartz, E.F., Corzo, G., Ribeiro, B.M., 2013. A New theraphosid Spider Toxin Causes Early Insect Cell Death by Necrosis When Expressed In Vitro during Recombinant Baculovirus Infection. *PLoS One* 8, e84404. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0084404>
- Balke, I., Zeltins, A., 2018. Use of plant viruses and virus-like particles for the creation of novel vaccines. *Adv. Drug Deliv. Rev.* <https://doi.org/10.1016/J.ADDR.2018.08.007>
- Bertioli, D.J., Harris, R.D., Edwards, M.L., Cooper, J.I., Hawes, W.S., 1991. Transgenic plants and insect cells expressing the coat protein of arabis mosaic virus produce empty virus-like particles. *J. Gen. Virol.* 72 ( Pt 8), 1801–9. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-72-8-1801>
- Blawid, R., Hayashi, E.A.I., Rezende, J.A.M., Kitajima, E.W., Nagata, T., 2016. A highly divergent isolate of tomato blistering mosaic virus from *Solanum violaefolium*. *Virus Genes* 52, 294–298. <https://doi.org/10.1007/s11262-016-1288-z>
- Blawid, R., Nagata, T., 2015. Construction of an infectious clone of a plant RNA virus in a binary vector using one-step Gibson Assembly. *J. Virol. Methods* 222, 11–15.
- Canady, M.A., Larson, S.B., Day, J., McPherson, A., 1996. Crystal structure of turnip yellow mosaic virus. *Nat. Struct. Biol.* 3, 771–81.
- Chaves, L.C.S., Ribeiro, B.M., Blissard, G.W., 2018. Production of GP64-free virus-like particles from baculovirus-infected insect cells. *J. Gen. Virol.* 99, 265–274. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001002>

- Cox, M.M.J., Hashimoto, Y., 2011. A fast track influenza virus vaccine produced in insect cells. *J. Invertebr. Pathol.* 107 Suppl, S31-41. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2011.05.003>
- Ding, S.W., Howe, J., Keese, P., Mackenzie, A., Meek, D., Osorio-Keese, M., Skotnicki, M., Srifah, P., Torronen, M., Gibbs, A., 1990. The tymobox, a sequence shared by most tymoviruses: its use in molecular studies of tymoviruses. *Nucleic Acids Res.* 18, 1181–7.
- Fagan, E.A., Tolley, P., Smith, H.M., Peters, M.P., Coleman, J., Elliott, P., Williams, R., Eddleston, A.L., 1987. Hepatitis B vaccine: immunogenicity and follow-up including two year booster doses in high-risk health care personnel in a London teaching hospital. *J. Med. Virol.* 21, 49–56.
- Felberbaum, R.S., 2015. The baculovirus expression vector system: A commercial manufacturing platform for viral vaccines and gene therapy vectors. *Biotechnol. J.* 10, 702–714. <https://doi.org/10.1002/biot.201400438>
- Fuenmayor, J., Gòdia, F., Cervera, L., 2017. Production of virus-like particles for vaccines. *N. Biotechnol.* 39, 174–180. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2017.07.010>
- Gildow, F.E., Reavy, B., Mayo, M.A., Duncan, G.H., Woodford, J.A., Lamb, J.W., Hay, R.T., 2000. Aphid Acquisition and Cellular Transport of Potato leafroll virus-like Particles Lacking P5 Readthrough Protein. *Phytopathology* 90, 1153–61. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2000.90.10.1153>
- Granados, R.R., Guoxun, L., Derksen, A.C.G., McKenna, K.A., 1994. A new insect cell line from *Trichoplusia ni* (BTI-Tn-5B1-4) susceptible to *Trichoplusia ni* single enveloped nuclear polyhedrosis virus. *J. Invertebr. Pathol.* 64, 260–266. [https://doi.org/10.1016/S0022-2011\(94\)90400-6](https://doi.org/10.1016/S0022-2011(94)90400-6)
- Hagiwara, K., Higashi, T., Namba, K., Uehara-Ichiki, T., Omura, T., 2003. Assembly of single-shelled cores and double-shelled virus-like particles after baculovirus expression of major structural proteins P3, P7 and P8 of Rice dwarf virus. *J. Gen. Virol.* 84, 981–984. <https://doi.org/10.1099/vir.0.18904-0>
- Harper, D.M., 2009. Currently approved prophylactic HPV vaccines. *Expert Rev.*

Vaccines 8, 1663–1679. <https://doi.org/10.1586/erv.09.123>

Hayden, C.M., Mackenzie, A.M., Skotnicki, M.L., Gibbs, A., 1998. Turnip yellow mosaic virus isolates with experimentally produced recombinant virion proteins. *J. Gen. Virol.* 79, 395–403. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-79-2-395>

Kam, Y.-W., Lee, W.W.L., Simarmata, D., Harjanto, S., Teng, T.-S., Tolou, H., Chow, A., Lin, R.T.P., Leo, Y.-S., Rénia, L., Ng, L.F.P., 2012. Longitudinal analysis of the human antibody response to Chikungunya virus infection: implications for serodiagnosis and vaccine development. *J. Virol.* 86, 13005–15. <https://doi.org/10.1128/JVI.01780-12>

Lamb, J.W., Duncan, G.H., Reavy, B., Gildow, F.E., Mayo, M.A., Hay, R.T., 1996. Assembly of virus-like particles in insect cells infected with a baculovirus containing a modified coat protein gene of potato leafroll luteovirus. *J. Gen. Virol.* 77, 1349–1358. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-77-7-1349>

Leparc-Goffart, I., Nougairede, A., Cassadou, S., Prat, C., de Lamballerie, X., 2014. Chikungunya in the Americas. *Lancet* 383, 514. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)60185-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)60185-9)

Liu, F., Wu, X., Li, L., Liu, Z., Wang, Z., 2013. Use of baculovirus expression system for generation of virus-like particles: Successes and challenges. *Protein Expr. Purif.* 90, 104–116. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2013.05.009>

Magalhaes, T., Braga, C., Cordeiro, M.T., Oliveira, A.L.S., Castanha, P.M.S., Maciel, A.P.R., Amancio, N.M.L., Gouveia, P.N., Peixoto-da-Silva, V.J., Peixoto, T.F.L., Britto, H., Lima, P. V., Lima, A.R.S., Rosenberger, K.D., Jaenisch, T., Marques, E.T.A., 2017. Zika virus displacement by a chikungunya outbreak in Recife, Brazil. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 11, e0006055. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006055>

Martelli, G.P., Sabanadzovic, S., Sabanadzovic, N.A., Edwards, M.C., Dreher, T., 2002. The family Tymoviridae 9.

Noad, R., Roy, P., 2003. Virus-like particles as immunogens. *Trends Microbiol.* 11, 438–44.

- Nunes, M.R.T., Faria, N.R., de Vasconcelos, J.M., Golding, N., Kraemer, M.U., de Oliveira, L.F., Azevedo, R. do S. da S., da Silva, D.E.A., da Silva, E.V.P., da Silva, S.P., Carvalho, V.L., Coelho, G.E., Cruz, A.C.R., Rodrigues, S.G., da Silva Gonçalves Vianez, J.L., Nunes, B.T.D., Cardoso, J.F., Tesh, R.B., Hay, S.I., Pybus, O.G., da Costa Vasconcelos, P.F., 2015. Emergence and potential for spread of Chikungunya virus in Brazil. *BMC Med.* 13, 102. <https://doi.org/10.1186/s12916-015-0348-x>
- O'Reilly, D.R., Miller, L.K., Luckow, V.A., 1992. Baculovirus expression vectors. A laboratory manual, *Baculovirus expression vectors: a laboratory manual*. Freeman and Company, New York.
- Powell, J.D., Barbar, E., Dreher, T.W., 2012. Turnip yellow mosaic virus forms infectious particles without the native beta-annulus structure and flexible coat protein N-terminus. *Virology* 422, 165–173. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2011.10.019>
- Roldão, A., Mellado, M.C.M., Castilho, L.R., Carrondo, M.J.T., Alves, P.M., 2010. Virus-like particles in vaccine development. *Expert Rev. Vaccines* 9, 1149–76. <https://doi.org/10.1586/erv.10.115>
- Sambrook, J., Russel, D., 2001. *Molecular Cloning: a laboratory manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sastri, M., Kekuda, R., Gopinath, K., Kumar, C.T., Jagath, J.R., Savithri, H.S., 1997. Assembly of physalis mottle virus capsid protein in *Escherichia coli* and the role of amino and carboxy termini in the formation of the icosahedral particles. *J. Mol. Biol.* 272, 541–52. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1997.1258>
- Sastri, M., Reddy, D.S., Krishna, S.S., Murthy, M.R., Savithri, H.S., 1999. Identification of a discrete intermediate in the assembly/disassembly of physalis mottle tymovirus through mutational analysis. *J. Mol. Biol.* 289, 905–18. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1999.2786>
- Shahana, P.V., Das, D., Gontu, A., Chandran, D., Maithal, K., 2015. Efficient production of Tymovirus like particles displaying immunodominant epitopes of

- Japanese Encephalitis Virus envelope protein. *Protein Expr. Purif.* 113, 35–43.  
<https://doi.org/10.1016/j.pep.2015.03.017>
- Shanks, M., Lomonossoff, G.P., 2000. Co-expression of the capsid proteins of Cowpea mosaic virus in insect cells leads to the formation of virus-like particles. *J. Gen. Virol.* 81, 3093–3097. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-81-12-3093>
- Shin, H.-I., Chae, K.-H., Cho, T.-J., 2013. Modification of Turnip yellow mosaic virus coat protein and its effect on virion assembly. *BMB Rep.* 46, 495–500.  
<https://doi.org/10.5483/BMBREP.2013.46.10.046>
- Singh, S., Rothnagel, R., Prasad, B.V.V., Buckley, B., 1995. Expression of Tobacco Ringspot Virus Capsid Protein and Satellite RNA in Insect Cells and Three-Dimensional Structure of Tobacco Ringspot Virus-like Particles. *Virology* 213, 472–481. <https://doi.org/10.1006/viro.1995.0020>
- Sivakumar, S., Wang, Z., Harrison, R.L., Liu, S., Miller, W.A., Bonning, B.C., 2009. Baculovirus-expressed virus-like particles of Pea enation mosaic virus vary in size and encapsidate baculovirus mRNAs. *Virus Res.* 139, 54–63.  
<https://doi.org/10.1016/j.virusres.2008.10.002>
- Tanaka, F.A.O., Machado, S.R., Barradas, M.M., 2000. Análise ultra-estrutural de folhas de três espécies de Solanaceae após inoculação com o vírus da necrose branca do tomateiro (VNBT -Tymovirus). *Revta Bras. Bot.* 23, 161–167.
- Tian, T., Medina, V., Mayhew, D.E., Maeda, S., Falk, B.W., 1995. Beet western yellows luteovirus capsid proteins produced by recombinant baculoviruses assemble into virion-like particles in cells and larvae of *Bombyx mori*. *Virology* 213, 204–12. <https://doi.org/10.1006/viro.1995.1560>
- Zanotto, P.M. de A., Leite, L.C. de C., 2018. The Challenges Imposed by Dengue, Zika, and Chikungunya to Brazil. *Front. Immunol.* 9, 1964.  
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01964>



## **CAPÍTULO 5 - CONCLUSÃO GERAL**

## 5. CONCLUSÃO GERAL

A produção comercial de proteínas recombinantes farmacêuticas possui um mercado em constante e crescente expansão. Nesse meio, destacam-se os vírus de plantas com genoma de RNA de fita simples, que oferecem uma oportunidade única para gerar ferramentas para produção de biofármacos em diferentes plataformas bionanotecnológicas. Cerca de 55 diferentes espécies de 29 gêneros de vírus vegetais mostraram-se úteis para esses fins, levando em conta os vírus infecciosos recombinantes e os seus análogos não infecciosos - VLPs.

O sistema de expressão em plantas utilizando vetores virais via *Agrobacterium tumefaciens* é um sistema seguro, rápido e barato, e tem sido a base de muitos processos de manufatura que são utilizados atualmente para produzir uma gama de proteínas para múltiplas aplicações, tais como antígenos vacinais, anticorpos e VLPs, tendo a capacidade de, simultaneamente, diminuir o tempo de produção e aumentar o rendimento dos produtos em relação às plantas transgênicas, além de minimizar as preocupações relacionadas aos organismos geneticamente modificados (GMOs).

Para garantir o sucesso da produção das proteínas farmacêuticas e manter as boas práticas de fabricação (BPF), o vetor de expressão baseado em vírus de planta, preferencialmente deve ser capaz de manter a estabilidade genética das sequências não-virais que codificam o produto pretendido sob variadas condições ambientais e respostas de defesa do hospedeiro. A deriva genética das sequências não-virais representa um grande problema para qualquer vetor de produção e altas taxas de mutação associadas à vetores virais podem causar preocupações para esse tipo de deriva. Uma maneira de garantir a diminuição de gargalos genéticos e a baixa pressão

seletiva é a limitação do movimento celular da proteína de interesse e a introdução em massa de construções homogêneas de T-DNA para entrega dos replicons de RNA. A ausência total ou parcial do gene da CP na construção de alguns vetores virais se encarrega de limitar a movimentação celular sistêmica, tornando o sistema vantajoso e seguro.

Os vetores de baculovírus são um dos sistemas de entrega de genes mais utilizados atualmente, e se tornaram uma poderosa e versátil plataforma para expressão de proteínas eucarióticas, principalmente devido às vantagens desse sistema, incluindo altos níveis de expressão proteica, segurança, escalabilidade e modificações pós-traducionais eucarióticas.

Muitas proteínas estruturais virais possuem a habilidade intrínseca de se montarem dentro de nanoestruturas denominadas *virus-like particles* (VLPs) quando expressas em diferentes sistemas de expressão heterólogos, tais como *Escherichia coli*, leveduras, células de mamíferos e de insetos ou plantas. VLPs se assemelham a estrutura do vírus, porém sem material genético, provocando com isso uma alta resposta imune humoral e celular com segurança. O capsídeo da maioria dos vírus de plantas é uma estrutura simples e robusta, podendo ser produzido em grandes quantidades, além disso, geralmente são bastante estáveis, permitindo a manipulação das sequências genéticas criando deleções e/ou inserções de sequências heterólogas.

Em vista da simplicidade, estabilidade e facilidade de produção, VLPs de vírus de plantas representam um passo à frente no desenvolvimento de sistemas de entrega de epitopos e/ou proteínas, combinando bons critérios de segurança com forte imunogenicidade, contribuindo para uma nova abordagem em nanotecnologia.

Os vetores virais desenvolvidos nesse trabalho apresentaram-se como potenciais ferramentas biotecnológicas para a expressão de epitopos em dois sistemas de expressão distintos, em plantas, por meio de vetores virais via *Agrobacterium*, e em células de insetos via baculovírus. O vetor inédito, baseado em pepper mild mottle tobamovirus - pJL\_PMMoV( $\Delta$ CP), apresentado no capítulo 2, já vem sendo utilizado para testar a expressão de epitopos de chikungunya virus, zika virus e dengue virus.

O replicon construído no capítulo 3, baseado em tomato blistering mosaic tymovirus -ToBMV-CP $\Delta_{2-24}$ , ainda deverá ter sua viabilidade checada após a inserção de pequenos peptídeos de interesse médico (CHIKV, ZIKV e DENV), para ser caracterizado como um vetor viral para apresentação de epitopos. Esta foi a primeira vez em que foi demonstrado que deleções de aminoácidos na região N-terminal da CP em ToBMV não afetam a expressão do capsômero e a viabilidade da infectividade.

E, finalmente, no capítulo 4, o sistema de expressão em células de insetos via baculovírus foi utilizado para demonstrar, pela primeira vez, que a expressão das diferentes versões de CP de ToBMV é capaz de formar tVLPs para expressão de epitopos.

## REFERÊNCIAS

- Adams, M.J., Antoniw, J.F., Kreuze, J., 2009. Virgaviridae: a new family of rod-shaped plant viruses. *Arch. Virol.* 154, 1967–1972. <https://doi.org/10.1007/s00705-009-0506-6>
- Ardisson-Araújo, D.M., Rocha, J., da Costa, M.H., Bocca, A., Dusi, A., de Oliveira Resende, R., Ribeiro, B., 2013. A baculovirus-mediated strategy for full-length plant virus coat protein expression and purification. *Virol. J.* 10, 262. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-10-262>
- Balke, I., Zeltins, A., 2018. Use of plant viruses and virus-like particles for the creation of novel vaccines. *Adv. Drug Deliv. Rev.* <https://doi.org/10.1016/J.ADDR.2018.08.007>
- Barta, A., Sommergruber, K., Thompson, D., Hartmuth, K., Matzke, M.A., Matzke, A.J.M., 1986. The expression of a nopaline synthase - human growth hormone chimaeric gene in transformed tobacco and sunflower callus tissue. *Plant Mol. Biol.* 6, 347–357. <https://doi.org/10.1007/BF00034942>
- Baulcombe, D., 2005. RNA silencing. *Trends Biochem. Sci.* 30, 290–3. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2005.04.012>
- Beck, D.L., Dawson, W.O., 1990. Deletion of repeated sequences from tobacco mosaic virus mutants with two coat protein genes. *Virology* 177, 462–9.
- Benz, I., Schmidt, M.A., 2002. Never say never again: protein glycosylation in pathogenic bacteria. *Mol. Microbiol.* 45, 267–76.
- Berger, I., Poterszman, A., 2015. Baculovirus expression: old dog, new tricks 6, 316–322. <https://doi.org/10.1080/21655979.2015.1104433>
- Bertioli, D.J., Harris, R.D., Edwards, M.L., Cooper, J.I., Hawes, W.S., 1991. Transgenic plants and insect cells expressing the coat protein of arabis mosaic virus produce empty virus-like particles. *J. Gen. Virol.* 72 ( Pt 8), 1801–9. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-72-8-1801>

- Boehm, R., 2007. Bioproduction of therapeutic proteins in the 21st century and the role of plants and plant cells as production platforms. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1102, 121–34. <https://doi.org/10.1196/annals.1408.009>
- Bösze, Z., Baranyi, M., Whitelaw, C.B.A., 2008. Producing recombinant human milk proteins in the milk of livestock species. *Adv. Exp. Med. Biol.* 606, 357–93.
- Brasileiro, A.C.M., Lacorte, C., 2015. Interação *Agrobacterium*-hospedeiro, in: Brasileiro, A.C.M., Carneiro, V.T.C. (Eds.), *Manual de Transformação Genética de Plantas*. Brasília- Brazil, p. 453.
- Buonaguro, L., Tornesello, M.L., Tagliamonte, M., Gallo, R.C., Wang, L.X., Kamin-Lewis, R., Abdelwahab, S., Lewis, G.K., Buonaguro, F.M., 2006. Baculovirus-derived human immunodeficiency virus type 1 virus-like particles activate dendritic cells and induce ex vivo T-cell responses. *J. Virol.* 80, 9134–43. <https://doi.org/10.1128/JVI.00050-06>
- Canady, M.A., Larson, S.B., Day, J., McPherson, A., 1996. Crystal structure of turnip yellow mosaic virus. *Nat. Struct. Biol.* 3, 771–81.
- Casper, S.J., Holt, C.A., 1996. Expression of the green fluorescent protein-encoding gene from a tobacco mosaic virus-based vector. *Gene* 173, 69–73.
- Cazzonelli, C.I., Velten, J., 2006. An in vivo , luciferase-based , *Agrobacterium*-infiltration assay system: implications for post-transcriptional gene silencing. *Planta* 582–597. <https://doi.org/10.1007/s00425-006-0250-z>
- Cox, M.M.J., 2012. Recombinant protein vaccines produced in insect cells. *Vaccine* 30, 1759–1766. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.01.016>
- Cox, M.M.J., Hashimoto, Y., 2011. A fast track influenza virus vaccine produced in insect cells. *J. Invertebr. Pathol.* 107 Suppl, S31-41. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2011.05.003>
- Daniell, H., 2006. Production of biopharmaceuticals and vaccines in plants via the chloroplast genome. *Biotechnol. J.* 1, 1071–9. <https://doi.org/10.1002/biot.200600145>

- Dawson, W.O., 2011. A personal history of virus-based vector construction. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 375, 1–18. [https://doi.org/10.1007/82\\_2011\\_182](https://doi.org/10.1007/82_2011_182)
- Dawson, W.O., Lewandowski, D.J., Hilf, M.E., Bubrick, P., Raffo, A.J., Shaw, J.J., Grantham, G.L., Desjardins, P.R., 1989. A tobacco mosaic virus-hybrid expresses and loses an added gene. *Virology* 172, 285–92.
- Deschuyteneer, M., Elouahabi, A., Plainchamp, D., Plisnier, M., Soete, D., Corazza, Y., Lockman, L., Giannini, S., Deschamps, M., 2010. Molecular and structural characterization of the L1 virus-like particles that are used as vaccine antigens in Cervarix™, the AS04-adjuvanted HPV-16 and -18 cervical cancer vaccine. *Hum. Vaccin.* 6, 407–19.
- Donson, J., Kearney, C.M., Hilf, M.E., Dawson, W.O., 1991. Systemic expression of a bacterial gene by a tobacco mosaic virus-based vector. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88, 7204–8.
- Dreher, T.W., 2004. Turnip yellow mosaic virus: transfer RNA mimicry, chloroplasts and a C-rich genome. *Mol. Plant Pathol.* 5, 367–75. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2004.00236.x>
- Dyck, M.K., Lacroix, D., Pothier, F., Sirard, M.-A., 2003. Making recombinant proteins in animals – different systems, different applications. *Trends Biotechnol.* 21, 394–399. [https://doi.org/10.1016/S0167-7799\(03\)00190-2](https://doi.org/10.1016/S0167-7799(03)00190-2)
- Echelard, Y., Williams, J.L., Destrempe, M.M., Koster, J.A., Overton, S.A., Pollock, D.P., Rapiejko, K.T., Behboodi, E., Masiello, N.C., Gavin, W.G., Pommer, J., Van Patten, S.M., Faber, D.C., Cibelli, J.B., Meade, H.M., 2009. Production of recombinant albumin by a herd of cloned transgenic cattle. *Transgenic Res.* 18, 361–376. <https://doi.org/10.1007/s11248-008-9229-9>
- Fischer, R., Stoger, E., Schillberg, S., Christou, P., Twyman, R.M., 2004. Plant-based production of biopharmaceuticals. *Curr. Opin. Plant Biol.* 7, 152–8. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2004.01.007>
- Fox, J.L., 2012. First plant-made biologic approved. *Nat. Biotechnol.* 30, 472–472. <https://doi.org/10.1038/nbt0612-472>

- Gelvin, S.B., 2003. Agrobacterium-mediated plant transformation: the biology behind the “gene-jockeying” tool. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 67, 16–37, table of contents.
- Gheysen, D., Jacobs, E., de Foresta, F., Thiriart, C., Francotte, M., Thines, D., De Wilde, M., 1989. Assembly and release of HIV-1 precursor Pr55gag virus-like particles from recombinant baculovirus-infected insect cells. *Cell* 59, 103–12.
- Giddings, G., Allison, G., Brooks, D., Carter, A., 2000. Transgenic plants as factories for biopharmaceuticals. *Nat. Biotechnol.* 18, 1151–5. <https://doi.org/10.1038/81132>
- Gildow, F.E., Reavy, B., Mayo, M.A., Duncan, G.H., Woodford, J.A., Lamb, J.W., Hay, R.T., 2000. Aphid Acquisition and Cellular Transport of Potato leafroll virus-like Particles Lacking P5 Readthrough Protein. *Phytopathology* 90, 1153–61. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2000.90.10.1153>
- Gleba, Y., Klimyuk, V., Marillonnet, S., 2007. Viral vectors for the expression of proteins in plants. *Curr. Opin. Biotechnol.* 18, 134–141. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2007.03.002>
- Gleba, Y., Klimyuk, V., Marillonnet, S., 2005. Magniffection--a new platform for expressing recombinant vaccines in plants. *Vaccine* 23, 2042–8. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2005.01.006>
- Gleba, Y., Marillonnet, S., Klimyuk, V., 2004. Engineering viral expression vectors for plants: The “full virus” and the “deconstructed virus” strategies. *Curr. Opin. Plant Biol.* 7, 182–188. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2004.01.003>
- Gleba, Y.Y., Tusé, D., Giritch, A., 2014. Plant Viral Vectors for Delivery by Agrobacterium, in: *Current Topics in Microbiology and Immunology*. pp. 155–192. [https://doi.org/10.1007/82\\_2013\\_352](https://doi.org/10.1007/82_2013_352)
- Goelet, P., Lomonosoff, G.P., Butler, P.J., Akam, M.E., Gait, M.J., Karn, J., 1982. Nucleotide sequence of tobacco mosaic virus RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 79, 5818–5822.



- Goodin, M.M., Zaitlin, D., Naidu, R.A., Lommel, S.A., 2008. *Nicotiana benthamiana*: its history and future as a model for plant-pathogen interactions. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* 21, 1015–26. <https://doi.org/10.1094/MPMI-21-8-1015>
- Hagiwara, K., Higashi, T., Namba, K., Uehara-Ichiki, T., Omura, T., 2003. Assembly of single-shelled cores and double-shelled virus-like particles after baculovirus expression of major structural proteins P3, P7 and P8 of Rice dwarf virus. *J. Gen. Virol.* 84, 981–984. <https://doi.org/10.1099/vir.0.18904-0>
- Hamilton, S.R., Davidson, R.C., Sethuraman, N., Nett, J.H., Jiang, Y., Rios, S., Bobrowicz, P., Stadheim, T.A., Li, H., Choi, B.-K., Hopkins, D., Wischnewski, H., Roser, J., Mitchell, T., Strawbridge, R.R., Hoopes, J., Wildt, S., Gerngross, T.U., 2006. Humanization of yeast to produce complex terminally sialylated glycoproteins. *Science* 313, 1441–3. <https://doi.org/10.1126/science.1130256>
- Harper, D.M., 2009. Currently approved prophylactic HPV vaccines. *Expert Rev. Vaccines* 8, 1663–1679. <https://doi.org/10.1586/erv.09.123>
- Hayden, C.M., Mackenzie, A.M., Skotnicki, M.L., Gibbs, A., 1998. Turnip yellow mosaic virus isolates with experimentally produced recombinant virion proteins. *J. Gen. Virol.* 79, 395–403. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-79-2-395>
- Hefferon, K., 2013. Plant-derived pharmaceuticals for the developing world. *Biotechnol. J.* 8, 1193–202. <https://doi.org/10.1002/biot.201300162>
- Hefferon, K.L., 2012. Plant virus expression vectors set the stage as production platforms for biopharmaceutical proteins. *Virology* 433, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2012.06.012>
- Hema, M., Nagendrakumar, S.B., Yamini, R., Chandran, D., Rajendra, L., Thiagarajan, D., Parida, S., Paton, D.J., Srinivasan, V.A., 2007. Chimeric tymovirus-like particles displaying foot-and-mouth disease virus non-structural protein epitopes and its use for detection of FMDV-NSP antibodies. *Vaccine* 25, 4784–94. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2007.04.023>
- Hiatt, A., Cafferkey, R., Bowdish, K., 1989. Production of antibodies in transgenic plants. *Nature* 342, 76–8. <https://doi.org/10.1038/342076a0>

- Houdebine, L.-M., 2018. Production of pharmaceutical proteins by transgenic animals. *Rev. Sci. Tech. l'OIE* 37, 131–139. <https://doi.org/10.20506/rst.37.1.2746>
- International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) [WWW Document], 2018. URL <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/> (accessed 9.1.18).
- Jehle, J.A., Blissard, G.W., Bonning, B.C., Cory, J.S., Herniou, E.A., Rohrmann, G.F., Theilmann, D.A., Thiem, S.M., Vlak, J.M., 2006. On the classification and nomenclature of baculoviruses: A proposal for revision. *Arch. Virol.* 151, 1257–1266. <https://doi.org/10.1007/s00705-006-0763-6>
- Jiang, X., Wang, M., Graham, D.Y., Estes, M.K., 1992. Expression, self-assembly, and antigenicity of the Norwalk virus capsid protein. *J. Virol.* 66, 6527–32.
- Johansen, L.K., Carrington, J.C., 2001. Silencing on the spot. Induction and suppression of RNA silencing in the *Agrobacterium*-mediated transient expression system. *Plant Physiol.* 126, 930–8.
- Jul-Larsen, A., Madhun, A.S., Brokstad, K.A., Montomoli, E., Yusibov, V., Cox, R.J., 2012. influenza vaccine produced in tobacco plants. *Hum. Vaccin. Immunother.* 653–661.
- Kantoff, P.W., Higano, C.S., Shore, N.D., Berger, E.R., Small, E.J., Penson, D.F., Redfern, C.H., Ferrari, A.C., Dreicer, R., Sims, R.B., Xu, Y., Frohlich, M.W., Schellhammer, P.F., IMPACT Study Investigators, 2010. Sipuleucel-T Immunotherapy for Castration-Resistant Prostate Cancer. *N. Engl. J. Med.* 363, 411–422. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1001294>
- Kim, H.-B., Kim, D.-Y., Cho, T.-J., 2014. Replication and packaging of Turnip yellow mosaic virus RNA containing Flock house virus RNA1 sequence. *BMB Rep.* 47, 330–5.
- Klimyuk, V., Pogue, G., Herz, S., Butler, J., Haydon, H., 2012. Production of Recombinant Antigens and Antibodies in *Nicotiana benthamiana* Using ‘Magniffection’ Technology: GMP-Compliant Facilities for Small- and Large-Scale Manufacturing. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 375, 127–154.

[https://doi.org/10.1007/82\\_2012\\_212](https://doi.org/10.1007/82_2012_212)

- Larrick, J.W., Thomas, D.W., 2001. Producing proteins in transgenic plants and animals. *Curr. Opin. Biotechnol.* 12, 411–8.
- Lico, C., Chen, Q., Santi, L., 2008. Viral vectors for production of recombinant proteins in plants. *J. Cell. Physiol.* 216, 366–377. <https://doi.org/10.1002/jcp.21423>
- Lindbo, J.A., 2007a. TRBO: A High-Efficiency Tobacco Mosaic Virus RNA-Based Overexpression Vector. *Plant Physiol.* 145, 1232–1240. <https://doi.org/10.1104/pp.107.106377>
- Lindbo, J.A., 2007b. High-efficiency protein expression in plants from agroinfection-compatible Tobacco mosaic virus expression vectors. *BMC Biotechnol.* 7, 52. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-7-52>
- Lomonosoff, G.P., DAoust, M.-A., 2016. Plant-produced biopharmaceuticals: A case of technical developments driving clinical deployment. *Science (80-. )*. 353, 1237–1240. <https://doi.org/10.1126/science.aaf6638>
- Luckow, V.A., Lee, S.C., Barry, G.F., Olins, P.O., 1993. Efficient generation of infectious recombinant baculoviruses by site-specific transposon-mediated insertion of foreign genes into a baculovirus genome propagated in *Escherichia coli*. *J. Virol.* 67, 4566–79.
- Ma, J.K.-C., Drake, P.M.W., Christou, P., 2003. The production of recombinant pharmaceutical proteins in plants. *Nat. Rev. Genet.* 4, 794–805. <https://doi.org/10.1038/nrg1177>
- Marillonnet, S., Giritch, A., Gils, M., Kandzia, R., Klimyuk, V., Gleba, Y., 2004. In planta engineering of viral RNA replicons: efficient assembly by recombination of DNA modules delivered by *Agrobacterium*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 6852–7. <https://doi.org/10.1073/pnas.0400149101>
- Mason, H.S., Lam, D.M., Arntzen, C.J., 1992. Expression of hepatitis B surface antigen in transgenic plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 11745–9.

- Matsuo, K., Hong, J.-S., Tabayashi, N., Ito, A., Masuta, C., Matsumura, T., 2007. Development of Cucumber mosaic virus as a vector modifiable for different host species to produce therapeutic proteins. *Planta* 225, 277–86. <https://doi.org/10.1007/s00425-006-0346-5>
- Metz, S.W., Gardner, J., Geertsema, C., Le, T.T., Goh, L., Vlak, J.M., Suhrbier, A., Pijlman, G.P., 2013. Effective Chikungunya Virus-like Particle Vaccine Produced in Insect Cells. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 7, e2124. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002124>
- Metz, S.W., Pijlman, G.P., 2011. Arbovirus vaccines; opportunities for the baculovirus-insect cell expression system. *J. Invertebr. Pathol.* 107 Suppl, S16–30. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2011.05.002>
- Morais, V.A., Serpa, J., Palma, A.S., Costa, T., Maranga, L., Costa, J., 2001. Expression and characterization of recombinant human alpha-3/4-fucosyltransferase III from *Spodoptera frugiperda* (Sf9) and *Trichoplusia ni* (Tn) cells using the baculovirus expression system. *Biochem. J.* 353, 719–25.
- Mortimer, C.L., Dugdale, B., Dale, J.L., 2015. Updates in inducible transgene expression using viral vectors: from transient to stable expression. *Curr. Opin. Biotechnol.* 32, 85–92. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2014.11.009>
- Musiychuk, K., Stephenson, N., Bi, H., Farrance, C.E., Orozovic, G., Brodelius, M., Brodelius, P., Horsey, A., Ugulava, N., Shamloul, A.-M., Mett, V., Rabindran, S., Streatfield, S.J., Yusibov, V., 2007. A launch vector for the production of vaccine antigens in plants. *Influenza Other Respi. Viruses* 1, 19–25. <https://doi.org/10.1111/j.1750-2659.2006.00005.x>
- O'Reilly, D.R., Miller, L.K., Luckow, V.A., 1992. Baculovirus expression vectors. A laboratory manual, *Baculovirus expression vectors: a laboratory manual*. Freeman and Company, New York.
- Obembe, O.O., Popoola, J.O., Leelavathi, S., Reddy, S. V., 2011. Advances in plant molecular farming. *Biotechnol. Adv.* 29, 210–222. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.11.004>

- Paul, M., Ma, J.K.-C., 2011. Plant-made pharmaceuticals: leading products and production platforms. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 58, 58–67. <https://doi.org/10.1002/bab.6>
- Paul, M., Thangaraj, H., Ma, J., 2015. Commercialization of new biotechnology: a systematic review of 16 commercial case studies in a novel manufacturing sector. - PubMed - NCBI [WWW Document]. *Plant Biotechnol.* <https://doi.org/10.1111/pbi.12426>
- Pennock, G.D., Shoemaker, C., Miller, L.K., 1984. Strong and regulated expression of *Escherichia coli* beta-galactosidase in insect cells with a baculovirus vector. *Mol. Cell. Biol.* 4, 399–406.
- Pflieger, S., Blanchet, S., Camborde, L., Drugeon, G., Rousseau, A., Noizet, M., Planchais, S., Jupin, I., 2008. Efficient virus-induced gene silencing in *Arabidopsis* using a one-step TYMV-derived vector. *Plant J.* 56, 678–690. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03620.x>
- Pogue, G.P., Vojdani, F., Palmer, K.E., Hiatt, E., Hume, S., Phelps, J., Long, L., Bohorova, N., Kim, D., Pauly, M., Velasco, J., Whaley, K., Zeitlin, L., Garger, S.J., White, E., Bai, Y., Haydon, H., Bratcher, B., 2010. Production of pharmaceutical-grade recombinant aprotinin and a monoclonal antibody product using plant-based transient expression systems. *Plant Biotechnol. J.* 8, 638–654. <https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2009.00495.x>
- Powell, J.D., Barbar, E., Dreher, T.W., 2012. Turnip yellow mosaic virus forms infectious particles without the native beta-annulus structure and flexible coat protein N-terminus. *Virology* 422, 165–173. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2011.10.019>
- Qiu, X., Wong, G., Audet, J., Bello, A., Fernando, L., Alimonti, J.B., Fausther-Bovendo, H., Wei, H., Aviles, J., Hiatt, E., Johnson, A., Morton, J., Swope, K., Bohorov, O., Bohorova, N., Goodman, C., Kim, D., Pauly, M.H., Velasco, J., Pettitt, J., Olinger, G.G., Whaley, K., Xu, B., Strong, J.E., Zeitlin, L., Kobinger, G.P., 2014. Reversion of advanced Ebola virus disease in nonhuman primates with ZMapp. *Nature* 514, 47–53. <https://doi.org/10.1038/nature13777>

- Rai, M., Padh, H., 2001. Expression systems for production of heterologous proteins. *Curr. Sci.* 80, 1121–1128.
- Rohrmann, G., 2013. *Baculovirus Molecular Biology*, Third. ed. National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD.
- Rybicki, E.P., 2014. Plant-based vaccines against viruses. *Viol. J.* 11, 205. <https://doi.org/10.1186/s12985-014-0205-0>
- Rybicki, E.P., 2010. Plant-made vaccines for humans and animals. *Plant Biotechnol. J.* 8, 620–637. <https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2010.00507.x>
- Rybicki, E.P., 2009. Plant-produced vaccines: promise and reality. *Drug Discov. Today* 14, 16–24. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2008.10.002>
- Sastri, M., Kekuda, R., Gopinath, K., Kumar, C.T., Jagath, J.R., Savithri, H.S., 1997. Assembly of physalis mottle virus capsid protein in *Escherichia coli* and the role of amino and carboxy termini in the formation of the icosahedral particles. *J. Mol. Biol.* 272, 541–52. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1997.1258>
- Sastri, M., Reddy, D.S., Krishna, S.S., Murthy, M.R., Savithri, H.S., 1999. Identification of a discrete intermediate in the assembly/disassembly of physalis mottle tymovirus through mutational analysis. *J. Mol. Biol.* 289, 905–18. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1999.2786>
- Saunders, K., Lomonosoff, G.P., 2015. The Generation of Turnip Crinkle Virus-Like Particles in Plants by the Transient Expression of Wild-Type and Modified Forms of Its Coat Protein. *Front. Plant Sci.* 6, 1138. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.01138>
- Scholthof, H.B., Scholthof, K.B., Jackson, A.O., 1996. Plant virus gene vectors for transient expression of foreign proteins in plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* 34, 299–323. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.34.1.299>
- Scholthof, K.B.G., Adkins, S., Czosnek, H., Palukaitis, P., Jacquot, E., Hohn, T., Hohn, B., Saunders, K., Candresse, T., Ahlquist, P., Hemenway, C., Foster, G.D., 2011. Top 10 plant viruses in molecular plant pathology. *Mol. Plant*

Pathol. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2011.00752.x>

Shanks, M., Lomonosoff, G.P., 2000. Co-expression of the capsid proteins of Cowpea mosaic virus in insect cells leads to the formation of virus-like particles. *J. Gen. Virol.* 81, 3093–3097. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-81-12-3093>

Sharma, A.K., Sharma, M.K., 2009. Plants as bioreactors: Recent developments and emerging opportunities. *Biotechnol. Adv.* 27, 811–32. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2009.06.004>

Shin, H.-I., Chae, K.-H., Cho, T.-J., 2013. Modification of Turnip yellow mosaic virus coat protein and its effect on virion assembly. *BMB Rep.* 46, 495–500. <https://doi.org/10.5483/BMBREP.2013.46.10.046>

Shin, H.-I., Kim, I.-C., Cho, T.-J., 2008. Replication and encapsidation of recombinant Turnip yellow mosaic virus RNA. *BMB Rep.* 41, 739–44.

Shivprasad, S., Pogue, G.P., Lewandowski, D.J., Hidalgo, J., Donson, J., Grill, L.K., Dawson, W.O., 1999. Heterologous sequences greatly affect foreign gene expression in tobacco mosaic virus-based vectors. *Virology* 255, 312–23. <https://doi.org/10.1006/viro.1998.9579>

Singh, S., Rothnagel, R., Prasad, B.V.V., Buckley, B., 1995. Expression of Tobacco Ringspot Virus Capsid Protein and Satellite RNA in Insect Cells and Three-Dimensional Structure of Tobacco Ringspot Virus-like Particles. *Virology* 213, 472–481. <https://doi.org/10.1006/viro.1995.0020>

Sivakumar, S., Wang, Z., Harrison, R.L., Liu, S., Miller, W.A., Bonning, B.C., 2009. Baculovirus-expressed virus-like particles of Pea enation mosaic virus vary in size and encapsidate baculovirus mRNAs. *Virus Res.* 139, 54–63. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2008.10.002>

Smith, G.E., Summers, M.D., Fraser, M.J., 1983. Production of human beta interferon in insect cells infected with a baculovirus expression vector. *Mol. Cell. Biol.* 3, 2156–65.

Smith, M.L., Lindbo, J.A., Dillard-Telm, S., Brosio, P.M., Lasnik, A.B., McCormick,

- A.A., Nguyen, L. V., Palmer, K.E., 2006. Modified Tobacco mosaic virus particles as scaffolds for display of protein antigens for vaccine applications. *Virology* 348, 475–488. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2005.12.039>
- Sørensen, H., 2010. Towards universal systems for recombinant gene expression. *Microb. Cell Fact.* 9, 27. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-9-27>
- Sun, Y., Carrion, R., Ye, L., Wen, Z., Ro, Y.-T., Brasky, K., Ticer, A.E., Schwegler, E.E., Patterson, J.L., Compans, R.W., Yang, C., 2009. Protection against lethal challenge by Ebola virus-like particles produced in insect cells. *Virology* 383, 12–21. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2008.09.020>
- Takamatsu, N., Ishikawa, M., Meshi, T., Okada, Y., 1987. Expression of bacterial chloramphenicol acetyltransferase gene in tobacco plants mediated by TMV-RNA. *EMBO J.* 6, 307–11.
- Tatman, J.D., Preston, V.G., Nicholson, P., Elliott, R.M., Rixon, F.J., 1994. Assembly of herpes simplex virus type 1 capsids using a panel of recombinant baculoviruses. *J. Gen. Virol.* 75 ( Pt 5), 1101–13. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-75-5-1101>
- Tian, T., Medina, V., Mayhew, D.E., Maeda, S., Falk, B.W., 1995. Beet western yellows luteovirus capsid proteins produced by recombinant baculoviruses assemble into virion-like particles in cells and larvae of *Bombyx mori*. *Virology* 213, 204–12. <https://doi.org/10.1006/viro.1995.1560>
- Tiwari, S., Verma, P.C., Singh, P.K., Tuli, R., 2009. Plants as bioreactors for the production of vaccine antigens. *Biotechnol. Adv.* 27, 449–67. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2009.03.006>
- Turpen, T.H., Reinl, S.J., Charoenvit, Y., Hoffman, S.L., Fallarme, V., Grill, L.K., 1995. Malarial epitopes expressed on the surface of recombinant tobacco mosaic virus. *Biotechnology.* (N. Y). 13, 53–7.
- Twyman, R.M., Stoger, E., Schillberg, S., Christou, P., Fischer, R., 2003. Molecular farming in plants: host systems and expression technology. *Trends Biotechnol.* 21, 570–8. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2003.10.002>



- Van der Hoorn, R.A., Laurent, F., Roth, R., De Wit, P.J., 2000. Agroinfiltration is a versatile tool that facilitates comparative analyses of Avr9/Cf-9-induced and Avr4/Cf-4-induced necrosis. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* 13, 439–46. <https://doi.org/10.1094/MPMI.2000.13.4.439>
- van Oers, M.M., Pijlman, G.P., Vlak, J.M., 2015. Thirty years of baculovirus-insect cell protein expression: from dark horse to mainstream technology. *J. Gen. Virol.* 96, 6–23. <https://doi.org/10.1099/vir.0.067108-0>
- van Vloten-Doting, L., Bol, J.F., Cornelissen, B., 1985. Plant-virus-based vectors for gene transfer will be of limited use because of the high error frequency during viral RNA synthesis. *Plant Mol. Biol.* 4, 323–6. <https://doi.org/10.1007/BF02418253>
- Voinnet, O., Rivas, S., Mestre, P., Baulcombe, D., 2003. An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus. *Plant J.* 33, 949–56.
- Wroblewski, T., Tomczak, A., Michelmore, R., 2005. Optimization of *Agrobacterium*-mediated transient assays of gene expression in lettuce, tomato and *Arabidopsis*. *Plant Biotechnol. J.* 3, 259–73. <https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2005.00123.x>
- Yang, S.-J., Carter, S.A., Cole, A.B., Cheng, N.-H., Nelson, R.S., 2004. A natural variant of a host RNA-dependent RNA polymerase is associated with increased susceptibility to viruses by *Nicotiana benthamiana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 6297–302. <https://doi.org/10.1073/pnas.0304346101>
- Yao, J., Weng, Y., Dickey, A., Wang, K.Y., 2015. Plants as factories for human pharmaceuticals: Applications and challenges. *Int. J. Mol. Sci.* 16, 28549–28565. <https://doi.org/10.3390/ijms161226122>
- Yusibov, V., Kushnir, N., Streatfield, S.J., 2015. Advances and challenges in the development and production of effective plant-based influenza vaccines. *Expert Rev. Vaccines* 14, 519–35. <https://doi.org/10.1586/14760584.2015.989988>
- Yusibov, V., Rabindran, S., Commandeur, U., Twyman, R., Fischer, R., 2006. The

potential of plant virus vectors for vaccine production. *Drugs R D* 7, 203–217.  
<https://doi.org/10.2165/00126839-200607040-00001>

Yusibov, V., Shivprasad, S., Turpen, T.H., Dawson, W., Koprowski, H., 1999. Plant viral vectors based on tobamoviruses. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 240, 81–94.

Yusibov, V., Streatfield, S.J., Kushnir, N., 2011. Clinical development of plant-produced recombinant pharmaceuticals: Vaccines, antibodies, and beyond. *Hum. Vaccin.* 7, 313–321. <https://doi.org/10.4161/hv.7.3.14207>

Yusibov, V., Streatfield, S.J., Kushnir, N., Roy, G., Padmanaban, A., 2013. Hybrid viral vectors for vaccine and antibody production in plants. *Curr Pharm Des* 19, 5574–5586. <https://doi.org/10.2174/13816128113199990335>