

GABRIELA COMENALE

**Expressão e purificação da proteína recombinante L2 do Papilomavírus bovino
tipo -2 em sistema bacteriano**

São Paulo

2012

GABRIELA COMENALE

Expressão e purificação da proteína recombinante L2 do Papilomavírus bovino tipo -2 em sistema bacteriano

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências

Departamento:

Cirurgia

Área de Concentração:

Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientador:

Prof. Dr. José Roberto Kfoury Júnior

São Paulo

2012

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo)

T.2690
FMVZ

Comenale, Gabriela
Expressão e purificação da proteína recombinante L2 do Papilomavírus bovino tipo -2 em sistema bacteriano / Gabriela Comenale. -- 2012.
67 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2012.

Programa de Pós-Graduação: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Orientador: Prof. Dr. José Roberto Kfoury Júnior.

1. Papilomavírus bovino. 2. Proteína recombinante. I. Título.



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO



FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Expressão e purificação da proteína recombinante L2m do papilomavirus bovino tipo 2 em sistema bacteriano", protocolado sob o nº 2477/2011, não utilizando animais, sob a responsabilidade do(a) Prof. Dr. José Roberto Kfoury Junior, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 14/3/2012.

We certify that the Research "Expression and purification of recombinant L2 protein of bovine papillomavirus type 2 in a bacterial system", protocol number 2477/2011, under the responsibility Prof. Dr. José Roberto Kfoury Junior, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 3/14/2012.

São Paulo, 13 de novembro de 2012.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

Nome: COMENALE, Gabriela

Título: Expressão e purificação da proteína recombinante L2 do Papilomavírus bovino tipo -2 em sistema bacteriano

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ **Julgamento:** _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ **Julgamento:** _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ **Julgamento:** _____

Dedico esta dissertação a todos que acreditaram verdadeiramente que eu conseguiria chegar ao fim!

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus, pois sem a ajuda d'Ele nada disso teria sido possível.

Agradeço também a minha filha Helena – minha Vida – que mesmo sem saber me deu muita força para continuar, me animando e me renovando a cada dia.

Ao meu marido Dalton – meu Amor – que me ajudou nas horas que eu mais precisei, sempre me escutando, me dando carinho e me apoiando independente das minhas decisões.

Aos meus pais Rafael e Regina que me ensinaram a levar a vida com dignidade e respeito me tornando a pessoa que sou hoje.

A minha vó Preta, minha tia Cida, minha cunhada Carla e minha sogra Inara que sempre que precisei oraram muitíssimo por mim.

Aos meus amigos Ana Carolina e Sérgio que sempre me ouviram e me colocaram para cima não deixando que eu desistisse do Mestrado.

À Prof^a. Dr^a. Rita de Cássia que, além da amizade, me ofereceu também todo apoio científico e suporte financeiro, permitindo a finalização dessa dissertação.

Ao Prof. Dr. José Roberto Kfoury Jr. – meu orientador – que me apoiou de diversas maneiras.

Ao Prof. Dr. Willy Beçak pelo apoio científico.

Aos amigos do laboratório: *Carol* uma pessoa maravilhosa, super amiga, que resolve todos os problemas burocráticos sem perder a doçura, *Rodrigo* que me ajudou muito na parte experimental sempre deixando claro que na ciência a exceção é quando se acerta e não quando erra, *Thati* sempre disposta a ajudar no que for preciso, *Jack* com seu caderno de laboratório sempre impecável me ajudou muito nos protocolos, *Rodrigo Araldi* sempre pronto para discutir ciência, *Dra. Suely* que com muita sensatez dá o seu ponto de vista sobre os diversos assuntos, *Carla* que me ajudou bastante nas contas para preparação de soluções, *Dilce, Olga, Rose e Ivone* sempre cuidando da organização do laboratório e prontas para ajudar.

E não poderia deixar de agradecer ao Biscoito – meu cachorro – que estava sempre do meu lado enquanto eu trabalhava.

A ciência se compõe de erros que, por sua vez, são os passos até a verdade”

(Júlio Verne)

“Pode-se comparar a expressão e purificação de uma proteína com uma viagem em um bote sobre a correnteza. Se tudo correr bem, você chega ao destino final em tempo. Entretanto, encobertas pelo nível de água há milhares de pedras, que após colidir com o bote, podem causar danos ou mesmo afundá-lo”

(David Drechsel et al., 2005)

RESUMO

COMENALE, G. **Expressão e purificação da proteína recombinante L2 do Papilomavírus bovino tipo-2 em sistema bacteriano.** [Expression and purification of recombinant protein L2 of Bovine papillomavirus type-2 in bacterial system]. 2012. 67 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

A papilomatose bovina é uma doença infectocontagiosa de ocorrência mundial, que assola o rebanho brasileiro, sem qualquer atitude efetiva de controle, e que tem como enfermidades associadas a tumores de bexiga “hematúria enzoótica” e tumores de trato digestório superior “caraguatá”, responsáveis por sensíveis perdas para a pecuária. Várias tentativas vacinais têm sido empreendidas com finalidades profiláticas ou terapêuticas, porém sem resultados eficazes. Esta situação se deve a aspectos relacionados à estrutura viral que dificultam uma manipulação eficiente para produção de produtos vacinais. Para que tais dados possam ser obtidos, faz-se necessário uma melhor compreensão da ação das proteínas recombinantes. A clonagem em vetores bacterianos para a expressão e purificação dessas proteínas serve a diferentes propósitos. Entre eles, a produção de insumos imunológicos, como testes diagnósticos ou mesmo vacinas. O presente projeto visou à expressão e purificação da proteína de capsídeo recombinante L2 de BPV-2. A proteína foi expressa em bactéria e tentou-se a purificação por coluna de afinidade; entretanto, problemas na purificação não possibilitaram a conclusão deste objetivo. Todas as abordagens e protocolos utilizados nesse trabalho são discutidos para contribuição ao conhecimento do processo.

Palavras-chave: Papilomavírus bovino. Proteína recombinante.

ABSTRACT

COMENALE, G. **Expression and purification of recombinant protein L2 of Bovine papillomavirus type-2 in bacterial system.** [Expressão e purificação da proteína recombinante L2 do Papilomavírus bovino tipo-2 em sistema bacteriano]. 2012. 67 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012

The bovine papillomatosis is an infectious disease of worldwide occurrence, plaguing the Brazilian herd, without any effective attitude control, and whose illnesses associated with bladder tumors "enzootic hematuria" and upper digestive tract tumors "caraguatá" sensitive responsible for losses to livestock. Several attempts have been undertaken vaccine with prophylactic or therapeutic purposes, but without effective results. This is due to issues related to viral structure that hinder efficient manipulation for production of vaccine products. In order to obtain such information, it is necessary better understanding of the action of recombinant proteins. The bacterial cloning vectors for the expression and purification of such proteins serve different purposes. Among them, the production of immune inputs, such as diagnostic tests or vaccines. This project aimed the expression and purification of recombinant L2 capsid protein of BPV-2. The protein was expressed in bacteria and purification was carried out by affinity column. However, difficulties in the purification process, impaired the full completion of this objective. All the attempted approaches and protocols were discussed and potential solutions proposed.

Keywords: Bovine papilomavírus. Recombinant protein.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Bovino com papilomatose cutânea.....	11
Figura 2 - Esquema estrutural do Papilomavírus, no detalhe em vermelho L1 e em verde L2.	17
Figura 3 – Árvore filogenética do papilomavírus bovino	19
Figura 4 – Mapa do vetor pGEX-2T (GE Healthcare).....	29
Figura 5 - Representação dos ciclos de PCR para o gene L2 de BPV-2.....	30
Figura 6 – Gel de Agarose 1% demonstrando o plasmídeo íntegro com a sequência de interesse.	39
Figura 7 - Gel de agarose 1 % corado por GelRed para visualização da amplificação do DNA de interesse por PCR.	40
Figura 8 - Gel de agarose 1% para visualização da separação dos plasmídeos digeridos...	41
Figura 9 - Bases sequenciadas do plasmídeo L2.2/pGEX-2T extraído do clone 1.....	42
Figura 10 – Gel de Poliacrilamida 12%.....	43
Figura 11 - Purificação da proteína por coluna de afinidade, utilizando Tampão A.	45
Figura 12 – Purificação da proteína por coluna de afinidade, utilizando Tampão A.	45
Figura 13 - Purificação da proteína por coluna de afinidade, utilizando Tampão B.	46
Figura 14 - Comparação de células não induzidas e induzidas.	47
Figura 15 - Diagrama de Hidrofobicidade de Kyte e Doolittle da porção N-Terminal da proteína L2 de BPV-2.	48
Figura 16 - Gráfico de antigeneicidade.....	49
Figura 17 - Classificação de cristalização da proteína.....	50

SUMÁRIO

1	REVISÃO DE LITERATURA.....	11
1.1	Papilomavírus e Papilomavírus bovino	11
1.2	Aspectos econômicos da papilomatose no Brasil	13
1.3	Classificação e Estrutura viral	14
1.3.1	Tipos Virais.....	17
1.4	Aspectos clínicos.....	21
1.5	Expressão de proteínas recombinantes	23
1.5.1	Sistema de expressão pGEX	25
2	OBJETIVOS.....	27
2.1	Objetivo Geral.....	27
2.2	Objetivos Específicos.....	27
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	28
3.1	Linhagem celular e sequência de interesse	28
3.2	Vetor pGEX-2T.....	28
3.3	Desenho e Análise da Sequência de interesse	29
3.3.1	Triagem por PCR	30
3.3.2	Ensaio de restrição enzimática (Análise dos Transformantes).....	30
3.3.3	Sequenciamento dos clones (Análise dos Transformantes).....	31
3.4	Indução da Expressão Proteica	31
3.4.1	Lise bacteriana e avaliação da solubilidade da proteína recombinante.....	32
3.4.2	Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio	33
3.5	Purificação Proteica	33
3.6	Deteção e análise da purificação da proteína por “Western-Blotting”	34
3.7	Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	34
3.8	Caracterização da proteína por bioinformática.....	35
3.8.1	Características físico-químicas	35
3.8.2	JaMBW (Gráfico de antigenicidade).....	35
3.8.3	Predição de dificuldade para cristalização (XtalPred).....	36
4	RESULTADOS	37
4.1	Desenho e Análise da Sequência	37
4.1.1	Triagem por PCR	39
4.1.2	Ensaio de Restrição Enzimática	40

4.1.3 Sequenciamento.....	41
4.2 Expressão da Proteína de interesse.....	43
4.3 Análise da purificação proteica por “Western-Blotting”	44
4.4 Microscopia Eletrônica.....	46
4.5 Bioinformática	47
4.5.1 Características físico-químicas	47
4.5.2 Determinação da região de atividade antigênica	48
4.5.3 Probabilidade de cristalização da proteína	49
5 DISCUSSÃO	51
6 CONCLUSÕES.....	55
REFERÊNCIAS.....	56
ANEXOS.....	65

1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Papilomavírus e Papilomavírus bovino

Papilomatose é a denominação de enfermidade de etiologia viral, infectocontagiosa, caracterizada por lesões verrucosas, localizadas na pele (Figura 1) ou mucosas e que tem sido descrita em várias espécies de mamíferos, incluindo o homem (Antonsson e Mcmillan, 2006).

Figura 1 - Bovino com papilomatose cutânea



Fonte: Campos, S.R.C. 2011.

Constituído por um grupo de oncovírus de DNA não-envelopados, o papiloma se caracteriza por infectar células basais dos epitélios, induzindo uma elevação anormal da superfície celular por hiperplasia, formação de papilas dermais ou mesmo lesões verrucosas e escamosas do epitélio (Chang, 1990). Estas lesões são

em geral benignas podendo regredir naturalmente, mas em alguns casos podem se transformar em tumores malignos (Jackson, Campo e Gaukroger, 1993; Castellsagué e Muñoz, 2003).

Infecções por Papilomavírus (PV) geralmente desencadeiam uma resposta imune do hospedeiro, podendo levar à regressão da doença (O'brien e Campo, 2003). No entanto, os PVs também são responsáveis por diferentes tipos de processos carcinogênicos (Stocco Dos Santos, Lindsey, Ferraz *et al.*, 1998). Nestes casos, os vírus estariam associados a diversos fatores, incluindo a genética, cofatores ambientais e à capacidade do vírus de escapar do sistema imune do hospedeiro (O'brien e Campo, 2003). Sendo um dos poucos vírus conhecidos que está diretamente associado a neoplasias, muitos estudos se focam na sua prevenção e estratégias de vacinação, principalmente nos países em desenvolvimento que não podem oferecer de uma forma acessível economicamente os testes clínicos de detecção (Kling e Zeichner, 2010).

Os papilomavírus são tipos virais geralmente espécie-específicos e podem ser encontrados em vários vertebrados, mamíferos e em alguns pássaros e répteis (Bernard, Burk, Chen *et al.*, 2010). Em cachorros, o COPV (“Canine Oral Papillomavirus”) ataca a cavidade orofaríngea dos animais, se espalhando rapidamente e sendo bastante danoso, podendo levar a carcinomas de células escamosas e muitas vezes necessitando eutanasiar animais acometidos (Nicholls, Klaunberg, Moore *et al.*, 1999). Em felinos, os papilomas são mais raros e acontecem na face e cavidade bucal de animais mais velhos ou com imunodeficiências (Munday e Kiupel, 2010) e vêm sendo observados tipos variantes do FdPV (“*Felis domesticus* Papillomavirus”) em leões, leopardos e outros felinos selvagens (Sundberg, Van Ranst, Montali *et al.*, 2000).

Além dos coelhos, os bovinos também são modelos fundamentais nos estudos da papilomatose tanto para investigação da interação do papilomavírus com o hospedeiro natural e sua relação com cofatores ambientais como também para o desenvolvimento de estratégias vacinais (Campo, 2003). O estudo da papilomatose bovina também tem grande interesse econômico devido aos prejuízos na pecuária, provocados pelas grandes baixas causadas nos rebanhos, queda na produção leiteira e redução do valor dos animais que se destinam ao abate e à indústria de

couro (Corrêa e Corrêa, 1992; Dassie, 1999). Hoje, a papilomatose bovina tem distribuição mundial com casos relatados no Japão, Escócia, Colômbia, Turquia, Estados Unidos, Canadá, Europa, Austrália, Índia e Nova Zelândia (Olson, 1990). No Brasil, os estados mais afetados pela doença que possuem registro são Goiás, Minas Gerais, São Paulo, Espírito Santo, Rio de Janeiro, Paraná e Rio Grande do Sul (Dassie, 1999).

1.2 Aspectos econômicos da papilomatose no Brasil

No Brasil, esta doença apresenta um relevante impacto econômico, como não é de notificação obrigatória pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), existe a dificuldade de controle da doença por não haver dados precisos sobre a extensão do comprometimento do rebanho e sobre tipos virais prevalentes, diferenças regionais e principais consequências clínicas (Smith, 1990; Blood, Radostits e Gay, 1991; Santin, Hermonat, Ravaggi *et al.*, 2001).

Os papilomas causam prejuízos tanto em rebanho leiteiro como de corte tais como, cegueira, emagrecimento e atraso no desenvolvimento corpóreo, desvalorização do couro, transtornos de ordenha das vacas ou sugação dos bezerros lactentes e conseqüentemente diminuição da produtividade dos rebanhos bovinos (Oliveira, 2008). Além do mais, ocorre ainda sensível depreciação do valor do animal, dificuldade de comercialização e de problemas relacionados com a capacidade reprodutiva, principalmente quando a localização do papiloma é observada na genitália. Animais com lesões nos tetos não podem ser adequadamente ordenhados, nem podem amamentar os bezerros. Frequentemente os papilomas pedunculados sofrem fissuras, com infecções oportunistas, onde ocorre perda de produtividade (Radostits, Gay, Blood *et al.*, 2000; Campo, 2002). Dassie (1999) e Ward *et al* (1989) relatam os problemas comerciais relacionados à papilomatose bovina e ressaltam que a presença de verrugas além de dificultar a comercialização, impede o animal de participar de feiras e exposições.

Os últimos dados sobre a densidade populacional bovina disponível para consulta no MAPA estão no senso agropecuário realizado em 2005. Esse estudo estima que a população bovina brasileira seja de 207.157 mil cabeças. Sendo que a região Sudeste apresenta 38.944 mil e é responsável por 39% da produção de leite no Brasil (9.535 milhões de litros). Com base nesse número pode-se analisar que esses aspectos da papilomatose bovina não estão sendo devidamente avaliados.

1.3 Classificação e Estrutura viral

Papilomavírus (PVs) são vírus oncogênicos epiteliotrópicos, de forma icosaédrica e não envelopados, com 55 a 60 nm de diâmetro. Seu capsídeo contém 72 capsômeros, sendo 60 hexaméricos e 12 pentaméricos com peso molecular médio de 5000 kDa. Seu genoma é composto por uma dupla fita de DNA de aproximadamente 8000 nucleotídeos complexados a histonas e com sequências virais conservadas (Borzacchiello e Roperto, 2008). Podemos dividi-los em, pelo menos três regiões, uma não codificante chamada “Long Control Region” (LCR) e duas outras formadas por regiões codificadoras de proteínas designadas como “Early” (E) e “Late” (L), que representam respectivamente 50% e 40% do genoma do vírus (Zheng e Baker, 2006).

A região LCR é uma região não codificante de aproximadamente 1000 nucleotídeos, responsável pela maior parte dos sinais “cis” da regulação da replicação e transcrição viral (Harrison, Gearing, Kim *et al.*, 1987). A LCR tem sítios de ligação com a proteína E2, que variam de número dependendo do tipo viral e formando complexos de diferentes estabilidades, sendo 12 para os *Deltapapilomavírus* e *Epsilonpapillomavirus*, e 4 para os *Xipapillomavirus* (Borzacchiello e Roperto, 2008).

As regiões codificadoras “E” são as primeiras a serem transcritas na infecção viral e estão relacionadas aos processos iniciais de replicação, transcrição e transformação celular (Iarc, 2007). A proteína viral E1 é uma proteína nuclear que é

fosforilada tanto em sua parte -N como -C terminal e de vida curta, sendo de maior importância na replicação viral (Lambert, 1991; Wilson, West, Woytek *et al.*, 2002). A E2 associada à LCR tem como principal função ativar ou reprimir a transcrição dos genes virais (Spalholz, Lambert, Yee *et al.*, 1987). Outra função da E2 é se ligar ao DNA do hospedeiro de forma episossomal através da proteína Brd4 e assegurar que durante a segregação dos cromossomos da célula hospedeira, os vírus acompanhem as cromátides irmãs durante toda a divisão celular (Baxter, McPhillips, Ozato *et al.*, 2005).

A proteína E4 é pequena e surge abundantemente no citoplasma de queratinócitos na fase de replicação do DNA viral (Anderson, Scobie, O'neil *et al.*, 1997). Alguns outros estudos feitos em HPV, também sugerem uma associação da E4 com as citoqueratinas e reorganização do citoesqueleto (Doorbar, Medcalf e Napthine, 1996).

As proteínas E5, E6 e E7 são consideradas oncoproteínas virais, pois levam a transformações e ações tumorais nas células hospedeiras. A E5 é uma proteína pequena e muito hidrofóbica que é encontrada dentro do compartimento endocelular da célula hospedeira, principalmente no Complexo de Golgi. Sua presença interfere tanto na não acidificação dos endossomos produzidos pelo Golgi comprometendo assim o processamento de proteínas da célula hospedeira como também na comunicação das junções intracelulares. Uma vez estando essas comunicações comprometidas, isso facilita a proliferação da célula transformada e seu estabelecimento de forma independente (Schapiro, Sparkowski, Adduci *et al.*, 2000). E5 também é responsável por uma série de transformações nas células tumorais quando interage com o receptor PDGF, causando uma alteração no controle que programa a proliferação celular (Dimaio e Mattoon, 2001; Talbert-Slagle e Dimaio, 2009). A proteína também está relacionada a um aumento da produção de ciclinas e quinases associadas, interferindo na atividade da proteína regulatória p27, permitindo assim que a célula se prolifere independentemente (O'brien, Grindlay e Campo, 2001).

A E6 é uma proteína ativadora transcricional que interfere na via de expressão do gene p53, conhecido supressor tumoral (Hamid, Brown e Gaston, 2009). A E6 também é responsável por transformações celulares ao interferir na

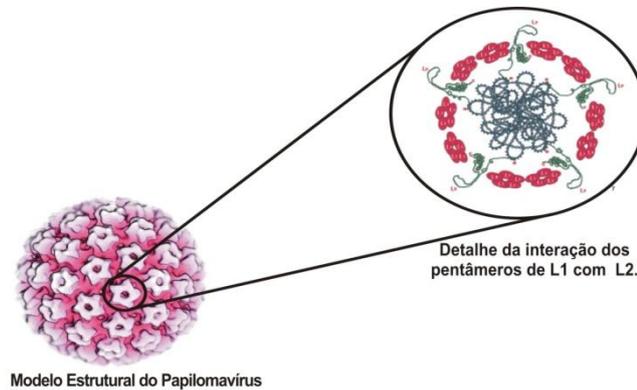
ligação da paxilina com a vinculina e outras proteínas de adesão focal, levando a célula a ter um crescimento independente de ancoragem e desarranjo completo das fibras de actina (Tong e Howley, 1997). Por fim, a proteína E6 interfere fisicamente e funcionalmente no complexo da telomerase, se associando diretamente a proteína hTERT e assim aumentando a atividade da telomerase (Liu, Dakic, Zhang *et al.*, 2009).

A proteína E7 tem uma função relevante de cooperação com as proteínas E5 e E6 durante as transformações celulares. Considerando HPV, E7 interfere na atividade do gene supressor de tumor p105Rb, desencadeando a proliferação incontrolada das células. Já em BPV, E7 age sobre a proteína p600 inibindo-a e dando seguimento às transformações celulares (Demasi, Huh, Nakatani *et al.*, 2005). Outra função da proteína estaria relacionada com a inibição de um tipo de morte programada celular chamada “anoikis”, que promove a apoptose das células dependentes de ancoragem que se destacam das matrizes celulares, permitindo desta maneira que as células já transformadas sobrevivam (Demasi, Chao, Kumar *et al.*, 2007).

As proteínas das regiões “L” são expressas na fase final da infecção e são responsáveis pela formação do capsídeo viral, ditas, portanto como proteínas estruturais (Baker e Howley, 1987). Existem duas proteínas do tipo “Late” nos mais diferentes tipos de papilomavírus, sendo a L1 a maior e responsável por se ligar a superfície celular; e a L2, menor, com função de agrupar a estrutura do vírion e também com função na infecção (Figura 2) (Iarc, 2007). Apenas no BPV-4 existe ainda a L3, mas sua função ainda é desconhecida. (Zhu, Dong, Shimizu *et al.*, 2012). Recentemente, a estrutura viral foi comparada a um tipo de modelo atômico onde a proteína L1 seria a mais exposta à superfície do vírus e tendo importante papel na infecção e imunogenicidade (Modis, Trus e Harrison, 2002). A proteína L1 também é considerada mais conservada, sendo sua ORF utilizada como base para identificação de novos tipos. Em relação aos outros genes dos PV, L1 é altamente imunogênica, sendo uma das mais visadas no estudo da construção de vacinas contra os papilomavírus e amplamente utilizada para detecção do tipo viral por sorologia em HPV (Kirnbauer, Hubbert, Wheeler *et al.*, 1994; Sehr, Müller, Höpfl *et al.*, 2002; Stanley, 2006). Mais recentemente, a L2 também tem se mostrado potencialmente uma excelente estratégia para vacinas profiláticas, permitindo uma

proteção cruzada contra os mais diferentes tipos (Ruiz, Sircili, Campo *et al.*, 2009; Campo e Roden, 2010).

Figura 2 - Esquema estrutural do Papilomavírus, no detalhe em vermelho L1 e em verde L2.



Fonte: Giovanni, D.N.S. 2009

1.3.1 Tipos Virais

Os primeiros estudos possibilitaram o isolamento de seis tipos de papilomavírus BPV 1 a 6 (Pfister, Linz, Gissmann *et al.*, 1979; Campo, Moar, Jarrett *et al.*, 1980; Campo, Moar, Laird *et al.*, 1981; Campo e Coggins, 1982; Chen, Howley, Levinson *et al.*, 1982; Jarrett, Campo, O'neil *et al.*, 1984). Anos depois, mais quatro novos tipos foram descritos BPV-7 a 10 (Ogawa, Tomita, Okada *et al.*, 2007; Tomita, Literak, Ogawa *et al.*, 2007; Hatama, Nobumoto e Kanno, 2008). E agora mais dois tipos foram detectados BPV-11 e BPV-12 (Zhu, Dong, Shimizu *et al.*, 2012). A classificação dos PV foi feita com base em similaridades do genoma de dupla fita de DNA, através de análises moleculares e da morfologia do capsídeo icosaédrico por microscopia eletrônica, sendo assim possível enquadrá-los dentro do grupo dos Polyomavirus, classificados na família *Papovaviridae*, juntamente com os *Polyomavirus*.

No momento, a análise de outros parâmetros peculiares ao genoma dos PV, diferentes tamanhos dos genomas, organização diferenciada do genoma e maiores similaridades de sequências de aminoácidos e nucleotídeos, permitiu ao Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV) separar os Polyomaviruses em duas famílias: *Polyomaviridae* e *Papillomaviridae*. Os papilomavírus (família *Papillomaviridae*, gênero *Papillomavirus*) formam um grupo muito heterogêneo de vírus compostos por 16 gêneros, diferenciados por suas sequências nucleotídicas, características biológicas e propriedades patológicas (Villiers, Fauquet, Broker *et al.*, 2004).

Estudos de biologia molecular, usando técnicas de PCR e a sequência conservada L1, revelaram 16 possíveis tipos de papilomas bovinos, detectando 5 possíveis novos tipos em fêmeas bovinas na Suécia (Antonsson e Hansson, 2002), 11 possíveis novos tipos em bovinos no Japão (Ogawa, Tomita, Okada *et al.*, 2004) e aqui no Brasil foram 4 possíveis novos tipos no interior do Paraná (Claus, Lunardi, Alfieri *et al.*, 2008). Onde, a divergência nesta região de mais de 10% de um tipo de PV conhecido, ele pode ser considerado um novo tipo, quando há diferenças entre 2% e 10% de homologia define-se um subtipo e menor que 2 %, uma variante (Villiers, Fauquet, Broker *et al.*, 2004).

Os BPVs, segundo Villiers (2004), dividem-se em três gêneros compreendendo as 13 espécies (Erro! Fonte de referência não encontrada.3), associadas a tipos diferentes de lesões histopatológicas (Campo, Moar, Laird *et al.*, 1981; Borzacchiello e Roperto, 2008):

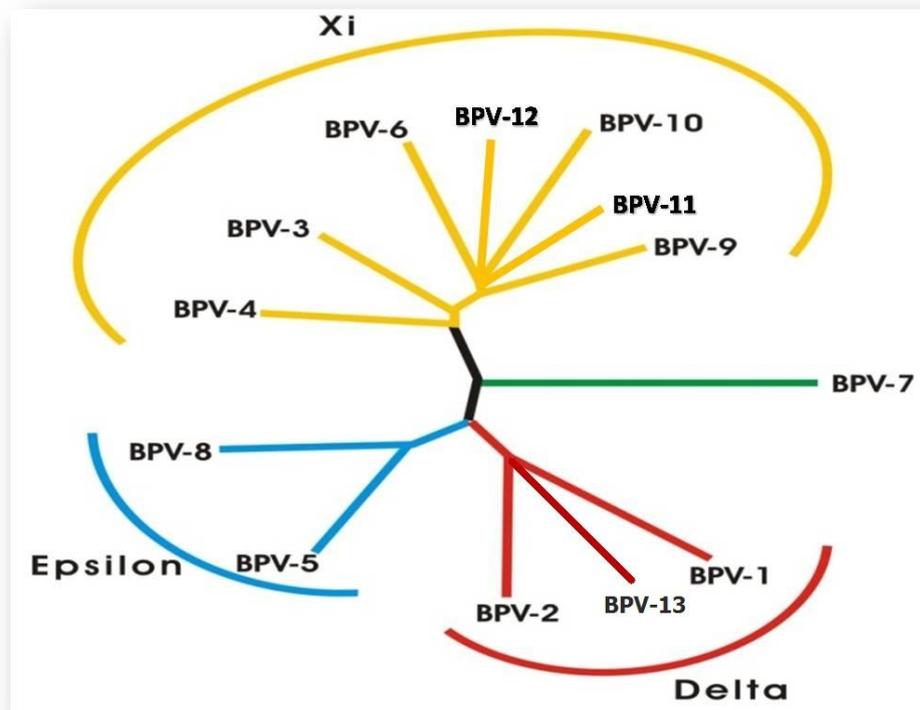
Xipapillomaviruses: BPV-3, BPV-4, BPV-6, BPV-9, BPV-10, BPV-11 e BPV-12 são restritos ao gado e infectam apenas células epiteliais (epiteliotrópicos) para induzir verdadeiros papilomas epiteliais (Zhu, Dong, Shimizu *et al.*, 2012);

Deltapapillomaviruses: BPV-1, BPV-2 e BPV-13 associados com fibropapilomas na pele em bovinos e sarcóides em cavalos, e exibem um tropismo de tecidos e uma gama de hospedeiros um pouco mais amplo (Zhu, Dong, Shimizu *et al.*, 2012);

Epsilonpapillomavirus; BPV-5 e BPV-8 parecem causar ambos os fibropapilomas e verdadeiros papilomas epiteliais (Zhu, Dong, Shimizu *et al.*, 2012).

O BPV-7 não possui classificação definida. Em amostras de pele normal, sequências de BPV-7 foram predominantemente encontradas em animais no Japão (Ogawa, Tomita, Okada *et al.*, 2004).

Figura 3 – Árvore filogenética do papilomavírus bovino



Fonte: Giovanni, D. N. S. Modificado.

Legenda: Em vermelho gênero *Deltapapilomavírus* (BPV-1, BPV-2 e BPV-13), em azul o gênero *Epsilonpapilomavírus* (BPV-5 e BPV-8), em amarelo *Xipapilomavírus* (BPV-3, BPV-4, BPV-6, BPV-9, BPV-10, BPV-11 e BPV-12) e em verde BPV-7 sem classificação, baseado na sequência de nucleotídeos na região L1 amplificada pelo par de iniciadores FAP59/FAP64.

A infecção característica do papilomavírus bovino é através do contato físico dos epitélios, estando as lesões mais frequentemente localizadas na fronte e pescoço dos animais confinados, por estes se esfregarem em ferramentas e mourões contaminados, permitindo assim, pela abrasão, a infiltração do vírus nas partes mais profundas da epiderme (Jarrett, 1985). Outros casos mais frequentes de desenvolvimento das doenças estão associados à marcação por tatuagem, brincos

nas orelhas, descornamento e até mesmo ordenha mecânica onde os animais estão mais sujeitos a feridas (Scott, 2008). Recentemente, se levantou também a possibilidade de transmissão do vírus por moscas que estão próximas aos animais (Finlay, Yuan, Burden *et al.*, 2009).

A infecção pode atingir e transformar o epitélio (*Xipapillomavírus*) como também tanto fibroblastos quanto queratinócitos (*Deltapapillomavírus*), mas é descrito que a replicação viral acontece apenas na epiderme, não sendo claro como o vírus atua em fibroblastos (Borzacchiello, 2007). Uma vez na parte mais basal da epiderme, os vírions de papilomavírus infectam as células-tronco epiteliais presentes nessa camada. Essas células e suas descendentes são chamadas de células amplificadoras de transição, responsáveis pelo alto índice de divisão celular do epitélio e é onde as partículas virais são segregadas juntamente com os cromossomos de forma episomal, como se fosse plasmídeos, graças à ação das proteínas E1 e E2 e a maquinaria de replicação da célula hospedeira. À medida que as células vão progredindo em sua diferenciação para a próxima camada a fim de se tornar queratinócitos maduros, entram em ação as oncoproteínas virais E6 e E7 atrasando a parada do ciclo celular e a diferenciação celular. Esse atraso permite que o vírus continue sua replicação usando a maquinaria celular e conseqüentemente causar o espessamento da pele, dando o aspecto morfológico da verruga. Quando ocorre a diferenciação final para queratinócito maduro e não replicante, as proteínas estruturais L1 e L2 dos papilomavírus se associam dentro do núcleo e são liberadas do epitélio, tornando-se assim novas partículas infectantes (Frazer, I. H., 2004; Pyeon, Pearce, Lank *et al.*, 2009). Em alguns papilomavírus, como os HPVs de alto risco, há a integração do DNA viral a cromatina hospedeira, o que leva a um aumento da capacidade de proliferação, expansão do tempo de vida da célula infectada e maior acúmulo das mutações. Sem a regulação da E2 que reprime o número de cópias virais duplicadas, essa integração leva ao completo descontrole do ciclo celular e, conseqüentemente, a progressão para câncer (Moody e Laimins, 2010).

A coinfeção em papilomavírus não é algo incomum. Em bovinos, a coinfeção já foi identificada em um mesmo tecido. No caso dos úberes de muitos animais, é possível encontrar infecção de BPV-1, BPV-5 e BPV-6, deformando tetas de tal maneira que inviabiliza a retirada de leites das vacas como também prejudica

o aleitamento de bezerros, além de se tornarem locais propensos a mastite (Campo, 2002). Mais recentemente, verificou-se a presença de dois ou três tipos virais em papilomas cutâneos nos mesmos animais e isso foi apontado como causa da persistência das lesões por mais tempo que o comum (Claus, Lunardi, Alfieri *et al.*, 2008).

Assim como ocorre em muitos vírus, os papilomavírus bovinos podem se estabelecer de uma forma latente no epitélio normal de animais sem promover sinais clínicos da doença. Dessa maneira, o vírus só entraria em atividade mediante abrasão da pele local que desencadeasse o processo inflamatório pela produção de citocinas e estímulo da proliferação celular (Campo, Jarrett, O'neil *et al.*, 1994).

O ciclo total de replicação dos vírus do papiloma está diretamente relacionado ao processo de diferenciação celular. Esta característica impossibilita a propagação *in vitro* de diferentes tipos de vírus do papiloma e junto à incapacidade de obtenção de quantidades razoáveis de vírus oriundas de lesões *in vivo*, dificultam o estudo das propriedades das proteínas do capsídeos, do mecanismo de seu arranjo em capsídeos, estudos de interação vírus-célula, e de suas propriedades imunológicas (Meyers, Tautz, Stark *et al.*, 1992; Frazer, I., 2004).

1.4 Aspectos clínicos

Papilomas e fibropapilomas ocorrem em diferentes tecidos do animal, com a possível infecção de mais de um tipo viral simultaneamente (Campo, 2006; Borzacchiello, Russo, Spoleto *et al.*, 2007).

- O BPV-1 pode causar fibropapilomas no pênis, acarretando necroses e perda das funções reprodutivas (Campo, 2006).
- Os BPV-2, BPV-3 e BPV-8 estão associados a papilomas cutâneos e o primeiro tipo ainda induz formações de fibropapilomas a neoplasias na

bexiga (Tomita, Literak, Ogawa *et al.*, 2007; Roperto, Brun, Paolini *et al.*, 2008).

- O BPV-4 esta ligado a papilomas no trato gastrointestinal podendo progredir para lesões cancerosas (Connolly, Morgan, Jackson *et al.*, 1998; Borzacchiello, Ambrosio, Roperto *et al.*, 2003).
- Os BPV-9 e BPV-10 associam-se a papilomas epiteliais nas tetas (Hatama, Nobumoto e Kanno, 2008).

Nos trabalhos de Freitas (2003) e Silva (2011), foi detectado DNA de BPV em células de esperma e fluidos seminais de touros de empresas que fornecem sêmen para todos os estados do Brasil.

As proteínas L1, E5 e E2 de BPV-2 foram observados em linfócitos, o que sugere que estas células podem carregar essa carga viral de BPV-2 na corrente sanguínea. Ou seja, a presença dessas proteínas em PBMCs deve ser considerado como um marcador de infecção por BPV, abrindo assim cenários novos na epidemiologia e fisiopatologia desta doença (Roperto, Comazzi, Ciusani *et al.*, 2011).

BPV-2 foi encontrado em tumores da bexiga de bovino e em amostras normais utilizados como controles (Stocco Dos Santos, Lindsey, Ferraz *et al.*, 1998; Borzacchiello, Iovane, Marcante *et al.*, 2003), indicando a possibilidade de uma infecção latente do vírus desempenhar um relevante papel na oncogênese de bexiga (assim como o BPV-1, que também está envolvido na formação deste tipo de tumor) (Campo, 2006).

No intuito não só de tratar, mas também de prevenir que animais sejam acometidos pelo BPV, alguns esforços para o desenvolvimento de vacinas foram feitos nos últimos anos. Pesquisas com vacinas profiláticas para BPV-2 e BPV-4 têm sido utilizadas como estratégias tanto a inoculação das proteínas dos capsídeos virais L1 e L2 como também a produção de "VLPs" (Virus Like Particles - estruturas similares ao capsídeo viral, porém desprovidas do genoma do vírus). Já as vacinas terapêuticas feitas a partir de L1 de BPV-2 e E7 de BPV-4 mostraram efetiva regressão e resposta imune, apesar de não ter sido discutido se essa resposta é de fato referente aos mesmos antígenos que atuam na rejeição do tumor (Kirnbauer, Chandrachud, O'neil *et al.*, 1996; Campo, 1997). Outros ensaios para o

desenvolvimento de vacinas atualmente estão sendo realizados (Carvalho, Ruiz, Stocco *et al.*, 2009; Ruiz, Sircili, Campo *et al.*, 2009).

1.5 Expressão de proteínas recombinantes

Nem sempre é possível obter preparações enriquecidas de proteínas específicas a partir de células, tecidos ou órgãos onde elas são naturalmente encontradas. Para contornar estes problemas, surgiram técnicas para a expressão em larga-escala de proteínas de diferentes organismos em células procarióticas. A expressão de genes em *E. coli*, talvez seja a via mais utilizada para a produção de proteínas recombinantes, devido a algumas características, como por exemplo, ser geneticamente bem caracterizado, fácil manipulação do microrganismo, baixo custo de cultivo, curto tempo para obtenção de grande quantidade da proteína (Hunt, 2005), além da disponibilidade de números cada vez maiores de vetores de clonagem e cepas mutantes de expressão, permitindo seu uso para uma grande variedade de atividades, tais como, produção de antígenos e vacinas, produção de anticorpos, análise estrutural, além de estudos bioquímicos (Saluta e Bell, 1998).

Em geral, é difícil decidir qual é o melhor sistema plasmidial e cepa bacteriana para expressão heteróloga de proteínas (Terpe, 2006). Entretanto, para esta escolha, há alguns elementos essenciais que devem ser levados em consideração. A expressão normalmente é induzida a partir de um plasmídeo que carrega um sistema genético compatível. Os elementos genéticos de um plasmídeo de expressão incluem a origem de replicação, um ou mais marcadores de resistência a antibiótico, um promotor da transcrição, com ou sem a região iniciadora da tradução, bem como a região terminadora da transcrição (Sørensen e Mortensen, 2005a).

Um fator importante é a marca de resistência de um plasmídeo. Os marcadores mais comuns são genes codificadores de proteínas de resistência a ampicilina, canamicina, cloranfenicol ou tetraciclina. Plasmídeos contendo o gene *bla*, expressam a β -lactamase que confere resistência a ampicilina. Esta enzima é

secretada para o periplasma, onde catalisa a hidrólise do anel β -lactâmico das penicilinas. A canamicina, o cloranfenicol e a tetraciclina interferem na síntese de proteínas por se ligarem em áreas críticas do ribossomo bacteriano. De forma análoga, vários genes conferem resistência à tetraciclina (Connell, Tracz, Nierhaus *et al.*, 2003).

Para a expressão da proteína recombinante, em altos níveis, em *E. coli* é necessário um promotor transcricional forte. O promotor do operon Lac de *E. coli* é o mais comumente utilizado, sendo a molécula de açúcar isopropil- β -Dtiogalactopiranosídeo (IPTG) o seu indutor (Hannig e Makrides, 1998). O sistema de expressão plasmidial pET (Novagen), contendo promotor T7, é de longe o mais utilizado em estudos obtidos a partir do sistema de expressão em *E. coli* (Sørensen e Mortensen, 2005a). Outro sistema muito utilizado é o pGEX (GE healthcare), que possui o promotor lac.

Outro fator decisivo para expressão de proteínas recombinantes é a escolha da cepa de *E. coli*, entretanto grandes variedades de cepas podem ser usadas na clonagem e na expressão. As cepas para expressão podem ser deficientes de proteases naturalmente nocivas, mantendo a expressão do plasmídeo estável e conferindo elementos genéticos relevantes para o sistema de expressão. A cepa mais comumente utilizada é a *E. coli* BL21, por apresentar algumas características importantes para o processo de expressão como a deleção de genes que codificam proteases e uma mutação responsável pela degradação de mRNA aumentando a estabilidade de transcrição do mRNA e conseqüentemente a síntese proteica.

Como foi dito anteriormente, um sistema de expressão para a produção de proteínas recombinantes em *E. coli* normalmente envolve a combinação de plasmídeo e uma cepa de bactéria (Sørensen e Mortensen, 2005a). O principal propósito da expressão é obter um grande acúmulo da proteína-alvo na célula bacteriana, preferencialmente na sua forma solúvel. Esta estratégia nem sempre é aceita pelo sistema metabólico da bactéria, podendo ocorrer respostas ao estresse celular como o acúmulo da proteína-alvo como agregados insolúveis, denominados corpúsculos de inclusão. Estes corpúsculos em geral não permitem a adequada conformação proteica e são biologicamente inativos (Villaverde e Carrió, 2003). Na literatura estão descritos alguns métodos para redirecionar corpos de inclusão para a

fração citoplasmática solúvel, ou modificar condições de expressão para obter a proteína na forma solúvel (Sørensen e Mortensen, 2005b).

Outro sistema muito utilizado é a expressão da proteína-alvo fusionada a uma cauda de aminoácidos que pode ser mais tarde removida por clivagem. Exemplo disto é a cauda de histidinas, amplamente utilizada em proteínas recombinantes possibilitando a purificação com resinas de afinidade a metais. A introdução de uma cauda pode trazer muitos benefícios como o aumento do rendimento da proteína, a prevenção contra a proteólise, o aumento da solubilidade, além de facilitar o processo de purificação (Arnau, Lauritzen, Petersen *et al.*, 2011). Por outro lado, a presença da cauda pode afetar a proteína-alvo através de alteração da atividade enzimática e biológica, por interferir na conformação correta da proteína (Chant, Kraemer-Pecore, Watkin *et al.*, 2005).

1.5.1 Sistema de expressão pGEX

O sistema pGEX, apresentado por Smith e Johnson (1988), possui um sítio de multiclonagem para ligação do gene de interesse, o qual será fusionado na sua porção N-terminal a uma proteína do parasito *Schistosoma japonicum*, a Glutathione-S-transferase (GST). Esta proteína, de 26 kDa, liga-se reversivelmente e com alta afinidade à resina de Glutathione-Sepharose, permitindo a rápida purificação da proteína de fusão, na maioria dos casos. A expressão de insertos clonados em vetor pGEX é controlada pelo promotor *tac* induzido por IPTG. Todos os vetores pGEX são construídos com um gene *lacIq*. O produto deste gene é uma proteína repressora que se liga à região operadora do promotor *tac*, prevenindo sua expressão até a indução com IPTG.

Muitas cepas de *E. coli* podem ser usadas na clonagem e expressão de vetor pGEX. A cepa mais comumente utilizada é a *E. coli* BL21, que como já descrito, possui características importantes para o processo de expressão como a deleção de

genes que codificam proteases e uma mutação responsável pela degradação de mRNA aumentando a estabilidade de transcrição do mRNA e conseqüentemente a síntese proteica.

Apesar deste sistema de expressão em *E. coli* ser bem estabelecido, há vários fatores que podem influenciar na obtenção da proteína de fusão na sua forma solúvel e sua purificação, sendo muito importante a escolha da cepa de *E. coli*, a otimização do processo de multiplicação bacteriana como temperatura e concentração do indutor IPTG e nos diversos passos subsequentes de purificação da proteína (Saluta e Bell, 1998).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Este projeto tem como objetivo a expressão e purificação da proteína recombinante L2 do Papilomavírus bovino tipo 2 (BPV-2) em sistema bacteriano.

2.2 Objetivos Específicos

- Indução da expressão proteica e detecção das proteínas recombinantes através da técnica de Western blot.
- Purificação da proteína alvo.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

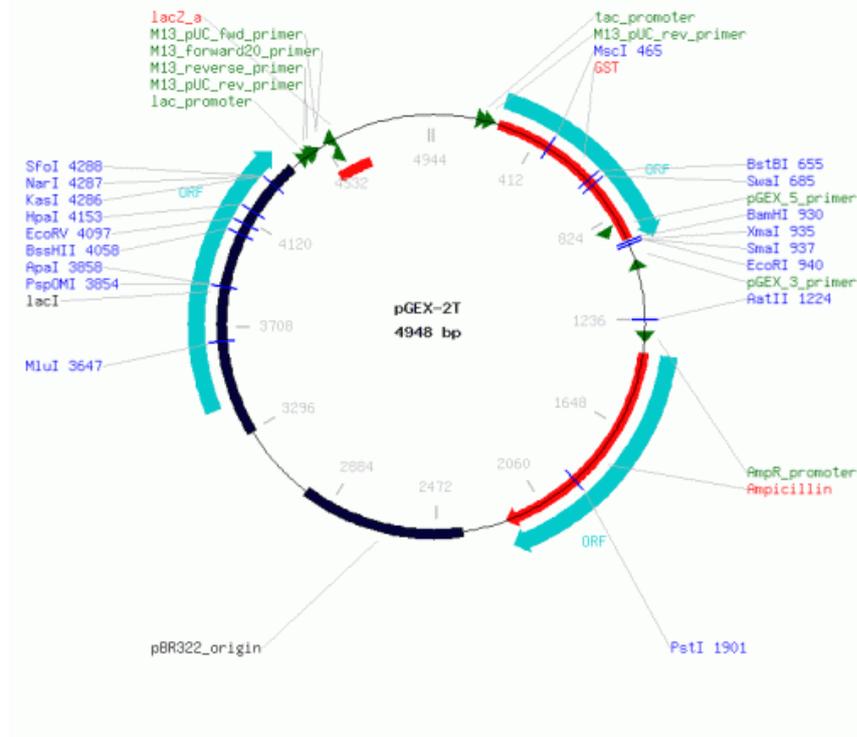
3.1 Linhagem celular e sequência de interesse

A linhagem utilizada neste trabalho foi *E. coli* BL21. E a sequência da porção N-terminal do gene L2 do BPV-2 (L2.2) clonado em vetor pGEX-2T foi gentilmente cedido pela pesquisadora Campo, MS.

3.2 Vetor pGEX-2T

A sequência veio no vetor de expressão pGEX-2T (GE Healthcare) (Figura 4) que apresenta uma configuração N-terminal glutathione S-transferase (GST)®.

Figura 4 – Mapa do vetor pGEX-2T (GE Healthcare)



Fonte: GE Healthcare

3.3 Desenho e Análise da Sequência de interesse

Utilizando o Software de análise de sequências BioEdit versão 7.0.5.3, foi feita a previsão da sequência do gene cedido pela Prof^a. Dr^a. Maria Savéria Campo.

Para analisar a qualidade do plasmídeo com a porção de interesse foram crescidas colônias de L2.2/pGEX-2T em 5,0 mL de meio LB com ampicilina (50µg/ml) a 37 °C, 200 rpm *overnight*.

Deste cultivo 4 ml foi feita extração do DNA plasmidial com kit Invisorb® Spin Plasmid Mini *Two*, segundo recomendações do fabricante, 5µl para PCR e o restante congelado em ultrafreezer -80°C em alíquotas de 200µl a 20% de Glicerol.

3.3.1 Triagem por PCR

Para a reação de PCR para a confirmação do clone L2.2/pGEX-2T, foram utilizados 12µl de Master Mix (Promega), 1µl de *primer sense*, 1µl *primer antisense* e 1µl de plasmídeo extraído do cultivo e completou-se com H₂O MiliQ autoclavada para volume final de 25µl de reação. Visualizando por eletroforese em gel de agarose 1%.

Segue na Figura 5 o esquema para a reação da PCR que foi utilizada:

Figura 5 - Representação dos ciclos de PCR para o gene L2 de BPV-2.

	Desnaturação Inicial	>	95°C	>	4 Minutos
35x	Desnaturação	>	95°C	>	1 Minuto
	Anelamento	>	50°C	>	1 Minuto
	Extensão	>	72°C	>	2 Minutos
	Extensão Final	>	72°C	>	5 Minutos

Fonte: Comenale, G. 2012

3.3.2 Ensaio de restrição enzimática (Análise dos Transformantes)

Os clones positivos, bem como o vetor pGEX 2T vazio (controle negativo), foram analisados quanto ao perfil de restrição enzimática. O mapeamento foi realizado com *Eco-RI* e *Not-I* (Fermentas).

Para estes ensaios, o plasmídeo pGEX2T e o inserto foram duplamente digeridos. A reação foi realizada com 3µl de FastDigest® Green buffer, 2µl de enzima *Eco-RI*, 2µl de enzima *Not-I*, 1µg de DNA e água *Milli-Q* para um volume final de 30µl. A reação foi incubada por 30 minutos à 37°C e posteriormente inativada por 20 minutos a 80°C. Posteriormente visualizado em gel de agarose 1% o padrão de banda (618pb inserto e 4948pb vetor linearizado).

3.3.3 Sequenciamento dos clones (Análise dos Transformantes)

Os clones positivos foram analisados quanto à ausência de mutações que possam ter sido originadas nas PCRs, bem como quanto à correta inserção dos insertos no vetor pGEX-2T pelo sequenciamento nucleotídico utilizando o kit BigDye™ pelo método do dideoxynucleotídeo. Foram utilizados os *primers* pGEX5' e pGEX3', contidos na sequência dos vetores, para a reação de sequenciamento.

O sequenciamento foi realizado em sequenciador automático ABI 3100™ DNA sequencer (Applied Biosystems, USA) e as sequências analisadas utilizando o programa BioEdit (versão 7.0.5.3). Com isso validamos os clones positivos na triagem por PCR congelados com 20% de glicerol a - 80°C.

3.4 Indução da Expressão Proteica

A linhagem de *E. coli* BL21 foi escolhida por apresentar algumas características importantes para o processo de expressão como a deleção de genes que codificam proteases e uma mutação responsável pela degradação de mRNA

aumentando a estabilidade de transcrição do mRNA e conseqüentemente a síntese proteica.

Os transformantes escolhidos após a análise de restrição foram pré-analisados para a expressão da proteína de interesse em inóculos de 5 ml de meio LB acrescido de ampicilina (50ug/ml), em condições padrões: 37°C e 200 rpm durante 2 horas no shaker modelo 4000 ic (IKA KS). Após a confirmação da expressão em diferentes linhagens de *E. coli*, diversas condições foram testadas, com variações na temperatura de incubação, tempo, agitação e aeração.

Uma vez determinada a melhor condição para expressão da proteína, ensaios de expressão em grande quantidade foram realizados para tal, as células portadoras do plasmídeo de interesse foram pré-inoculadas em 3 ml de LB contendo ampicilina e crescidas *overnight* a 37°C. Foi feito um inóculo em shot de 1 litro contendo 400 ml de meio LB + ampicilina e as células foram incubadas a 37°C com agitação de 200 rpm até que a DO 600 nm atingisse aproximadamente 0,4-0,6. Ao atingir a DO desejada foi acrescentado o IPTG na concentração final de 100mM seguindo a indução a 200 rpm, 37°C, por 4 horas. Após este período o meio de cultura foi centrifugado a 4°C, 6000rpm, durante 20 minutos para a precipitação das células que foram estocadas durante 18 horas a -20°C. Alíquota de 5 ml foi retirada antes da indução (t₀).

3.4.1 Lise bacteriana e avaliação da solubilidade da proteína recombinante

As cepas bacterianas que expressaram as proteínas recombinantes foram centrifugadas (8000 rpm por 15 minutos) e o sedimento ressuspensos em dois tampões de lise diferentes, Tampão A (Tris-HCl 20mM, NaCl 500mM e PMSF 0,1M/ml em pH 8,0), Tampão B (Tris-HCl 20mM, NaCl 500mM e Uréia 8M em pH 8,0). As células foram lisadas por meio físico onde a amostra é lisada com auxílio de um sonicador modelo Sonifier 250 da marca Branson em banho de gelo com tempo

suficiente para obter o maior número de células lisadas e uma maior concentração de proteínas na fração solúvel. Em seguida a amostra foi centrifugada a 18000 rpm durante 30 minutos a 4 °C. Ambas as frações, sobrenadante e precipitado, foram analisadas por SDS-PAGE a 12 % para averiguação da solubilidade das proteínas recombinantes. A solubilidade das proteínas determinou o protocolo de purificação que foi adotado.

3.4.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio

A avaliação dos testes de expressão e solubilidade bem como das várias etapas de purificação foi acompanhada pela técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante - dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE). As amostras foram diluídas em tampão 2-B-Mercaptoctanol, SDS 2%, azul de bromofenol 0,1%, glicerol 10% e H₂O destilada e fervidas quando necessário para depois, juntamente com um marcador de massa molecular (*PageRuler™ Unstained Protein Ladder* - Fermentas) serem aplicadas no gel e então submetidas a uma voltagem constante de 150 volts durante aproximadamente 80 minutos. A eletroforese foi realizada em um equipamento *Mini-Protean II Dual Slab Cell* (Bio-Rad), com gel de empacotamento 5 % e gel de separação 12 % (para proteínas de massa molecular de 20 a 50 kDa).

3.5 Purificação Proteica

Para a purificação da proteína expressa foi utilizado método de centrifugação com coluna de afinidade para GST – **Glutathione Sepharose 4 Fast Flow** (GE Healthcare) – utilizando protocolo descrito em *GST- Gene Fusion System Handbook* (Anexo A).

3.6 Detecção e análise da purificação da proteína por “Western-Blotting”

A separação dos extratos celulares totais foi realizada por eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida 10%, sob condições desnaturantes com transferência para membranas de nitrocelulose.

As membranas foram bloqueadas por 2 horas em solução de PBS suplementada com leite desnatado 10% (m/v) seguido de 3 lavagens de 5 minutos com PBS tween 0,05% (PBST) e incubadas por 60 minutos a temperatura ambiente com anticorpo monoclonal anti-GST HRP conjugado (GE Healthcare) para marcação da proteína recombinante. As membranas foram reveladas com solução reveladora (5 mg DAB (Uniscience), 30 ml de PBS 1x e 150 ul de H₂O₂ (Sigma)).

3.7 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

O *pellet* de um cultivo celular não induzido e induzido com IPTG 100mM foi processado pela técnica de contrastação negativa (preparo rápido) para a visualização estrutural da bactéria por MET. Para isto, as amostras foram suspensas em tampão apropriado (glutaraldeído) com posterior contato a grades metálicas, previamente cobertas com filme de colódio e estabilizadas com carbono. As amostras foram analisadas em microscópio eletrônico de transmissão LEO 906E.

3.8 Caracterização da proteína por bioinformática

3.8.1 Características físico-químicas

Através da análise da sequência de aminoácidos foi calculada pelo programa ProtParam (Expasy) o ponto isoelétrico da proteína, as possíveis porções hidrofóbicas entre outras características físico-químicas, como predito pelo algoritmo Hopp e Woods (1982). O programa gera um gráfico com as regiões hidrofóbicas.

3.8.2 JaMBW (Gráfico de antigenicidade)

Através da análise da sequência de aminoácidos foi calculada pelo programa JaMBW (JaMBW Chapter 3.1.7) as possíveis regiões de antigenicidade ao longo da cadeia polipeptídica, como predito pelo algoritmo Hopp e Woods (1981). O programa gera um gráfico com os valores de índices antigênicos em função da posição de aminoácidos, sendo que, quanto maior o índice, maior a probabilidade de estes grupos serem reconhecidos pelos anticorpos. Estas regiões permitem verificar se uma sequência tem a capacidade de estimular a formação de anticorpos (HOPP; WOODS, 1981).

3.8.3 Predição de dificuldade para cristalização (XtalPred)

Como um dos objetivos futuros do nosso grupo de pesquisa é a cristalização da proteína, para melhor caracterização da mesma, foram realizadas análises por bioinformática para verificar a dificuldade de cristalização da mesma (SLABINSKI, et al., 2007a; SLABINSKI, et al., 2007b). Estas análises são realizadas por um programa com base em previsões de combinações de probabilidades individuais de cristalização em uma pontuação única de cristalização. Esta pontuação classifica a proteína em cinco diferentes classes de dificuldade de cristalização: ótimo, bom, médio, difícil e muito difícil.

4 RESULTADOS

4.1 Desenho e Análise da Sequência

O programa BioEdit 7.0.5.3 foi utilizado para a realização de uma simulação da construção utilizada neste estudo quanto ao tamanho, matriz de leitura, análise de restrição enzimática e tradução (Quadro 1).

Quadro 1: L2.2/pGEX2T

Sequência	<p>ACGTTATCGACTGCACGGTGCACCAATGCTTCTGGCGTCAGGCAGCCATCGGAAGCTGT GGTATGGCTGTGCAGGTCGTAAATCACTGCATAATTCGTGTCGCTCAAGGCGCACTCCC GTTCTGGATAATGTTTTTGGCGCCGACATCATAACGGTCTGGCAAATATTCTGAAATG AGCTG TTGACAATTAATCATCGGCTCGTATAATG TGTGGAATTGTGAGCGGATAACAAT TTCACACAGGAAACAGTATTC ATGT CCCCTATACTAGGTTATTGGAAAATTAAGGGCCT TGTGCAACCCACTCGACTTCTTTTTGGAATATCTTGAAGAAAAATATGAAGAGCATTTGT ATGAGCGCGATGAAGGTGATAAATGGCGAAACAAAAGTTGAATTGGGTTTGGAGTTT CCCAATCTTCCTTATTATATTGATGGTGATGTTAAATTAACACAGTCTATGGCCATCAT ACGTTATATAGCTGACAAGCACAACATGTTGGGTGGTTGTCCAAAAGAGCGTGCAGAGA TTTCAATGCTTGAAGGAGCGGTTTTGGATATTAGATACGGTGTTCGAGAATTGCATAT AGTAAAGACTTTGAAACTCTCAAAGTTGATTTTTCTTAGCAAGCTACCTGAAATGCTGAA AATGTTCGAAGATCGTTTATGTCATAAAACATATTTAAATGGTGATCATGTAACCCATC CTGACTTCATGTTGTATGACGCTCTTGATGTTGTTTTATACATGGACCAATGTGCCTG GATGCGTTCCAAAATTAGTTTGTTTTAAAAAACGTATTGAAGCTATCCACAAAATTGA TAAGTACTTGAATCCAGCAAGTATATAGCATGGCCTTTCAGGG CTGGCAAGCCACGT TTGGTG GTGGCGACCATCCTCCAAAATCGGAT CTGGTCCGCGTGGATCC CCAG GAATT C CCAGTGCACGAAAAGGGTGAACGTGCAAAATGTCTATGACCTGTACAGGACTTGCAA GCAAGCGGGCACCTGTCCACCAGATGTGATACCTAAGGTAGAAGGTGACACTATAGCAG ACAAGATTTTTAAAATTAGGAGGCCTTGCAATTTATCTGGGGGGCCTAGGTATTGGAACA TGGTCTACAGGAAGAGTGGCTGCAGGAGGATCACCTAGGTATGTACCCTTAAGAACATC TGGATCCACTACAAGCCTGGCATCTGTAGGATCCAGGGCTGGTGCAGCCACTGGCACTC GCAGCAGCATCACAGGAATCCCCCTTGACACCCTAGAAACTATTGGGGCTCTTCGTCTT GGAGCTTATGAAGACACTGTGCTCCCAGAGGCCCTGCTATTGTCC C CCCCTGATGCTGT ACCTGCGGACACAGGGATAGATGGCCTTTCTATAGGCACTGACTCTTCCACTGAAACTT TAATCACATTGTTAGAGCCTGAGGGTCTGAAGACGTGGCAGTCTTAGAGCTGCAACCT CTAGACCATGCAAAATGGCAAGTTAGCAATGCTGTTTCATCAGGGCTCTGCATAACCACGC CCCTCTGCAGCTCGA CGGGCGG ATCGTGACTGACTGA CG ATCTGCCTCGCGGTTTCG GTGATGACGGTGAAAA CCTCTGACACATGCAGCTCC CGGAGACGGTACAGCTTGTCTG TAAGCGGATGCCGGGAGCAGACAAGCCC</p>
-----------	---

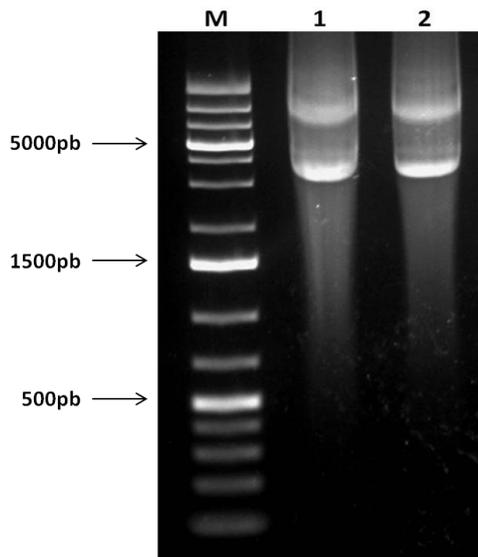
Legenda	Promotor GST, Sequência GST, Sítio de Trombina, Primers, Sequência L2, Sítio de Eco-RI e Sítio de Not-I
Tradução (ANEXO B)	<p>M SPILGYWKIKGLVQPTRLLEYLEEKYEEHLYERDEGDKWRN KKFELGLEFPNLPYYIDGDVKLTQSMAIIRYIADKHNMLGGCP KERAEISMLEGAVLDIRYGVSR IAYS KDFETLKVDFLSKLPEML KMFEDRLCHKTYLNGDHSVTHPDFMLYDALDVVLYMDPMCLD AFPKLVCFKKRIEAIPQIDKYLKSSKYIAWPLQG WQATFGGGD HPPKSDLVPRGSPGIPSARKRVK RANVYDLYRTCKQAGTCPP DVIPKVEGDTIADKILKLGGLAIYLGGLGIGTWSTGRVAAGGS PRYVPLRTSGSTTSLASVGSRAGAATGTRSSITGIPLDTLETIG ALRPGAYEDTVLPEAPAVTPDAVPADTGIDGLSIGTDSSTETL ITLLEPEGPEDVAVLELQPLDHANWQVSNVHVHQQSAYHAPLQ LERPHRD*L</p>
Primer senso	5'-GGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTG-3'
Primer Anti- senso	5'-CCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGG-3'

Fonte: Comenale, G. 2012

Para a obtenção do DNA plasmidial foram utilizadas cepas bacterianas de *E. coli* com sequência de L2 de BPV2, gentilmente cedido pela Prof^a Dr^a Maria Saveria Campo da Universidade de Glasgow, Escócia – Reino Unido.

Inicialmente, a qualidade e a concentração do DNA plasmidial obtido foi visualmente medida a partir da eletroforese em gel de agarose 1% e, subsequentemente, confirmada através de leituras em espectrofotômetro (A260/A280), (Figura 6).

Figura 6 – Gel de Agarose 1% demonstrando o plasmídeo íntegro com a sequência de interesse.



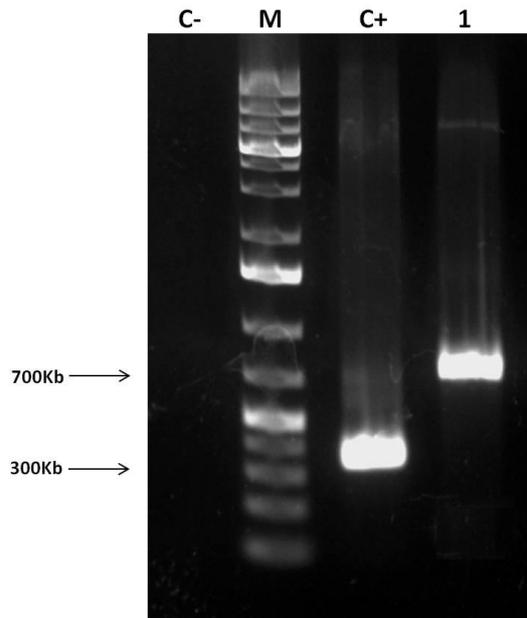
Fonte: Comenale, G. 2012.

Legenda: M – padrão de massa molecular 1 kb Plus DNA Ladder (Fermentas), 1 e 2 – plasmídeo íntegro com sequência de interesse.

4.1.1 Triagem por PCR

A sequência de DNA correspondente a proteína L2 de BPV-2 foi amplificada por meio da reação em cadeia da polimerase. A visualização foi realizada com o auxílio de um e visualizado num transluminador após eletroforese em gel de agarose 1%, onde apresentou uma banda correspondente ao tamanho esperado de 758 pares de base conforme Figura 7. Como controle positivo foi utilizado um fragmento amplificado de L2 de BPV-4 cujo tamanho esperado é de 352 pares de base.

Figura 7 - Gel de agarose 1 % corado por GelRed para visualização da amplificação do DNA de interesse por PCR.



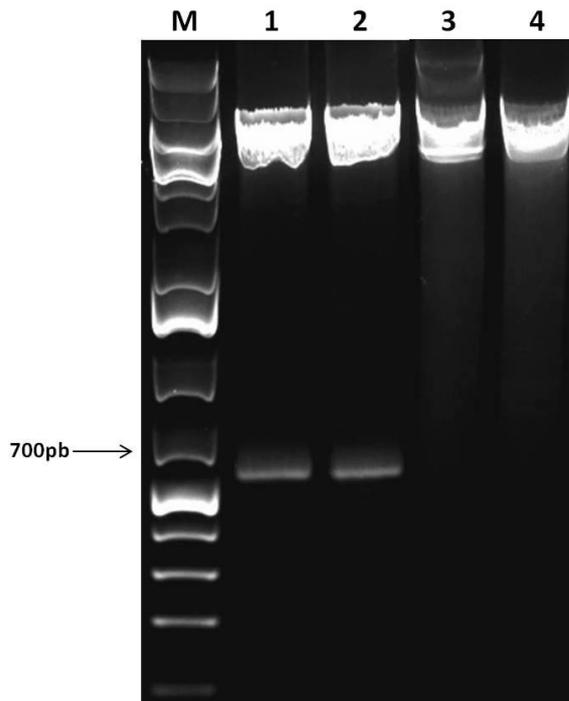
Fonte: Comenale, G.2012.

Legenda: M – padrão de massa molecular 1 kb Plus DNA Ladder (Fermentas); C- – Controle negativo; C+ – Controle positivo L2 de BPV-4 (352pb); 1 – PCR L2 de BPV-2 (758pb).

4.1.2 Ensaio de Restrição Enzimática

A análise de restrição empregando as enzimas *Eco-RI* e *Not-I* foi realizada a fim de confirmar a presença do inserto nos clones selecionados. Nesta análise, o tamanho do inserto foi avaliado pela clivagem do plasmídeo em sítios de restrição adjacentes ao sítio de clonagem, com posterior eletroforese em gel de agarose. A Figura 8 apresenta o perfil de restrição destes clones selecionados.

Figura 8 - Gel de agarose 1% para visualização da separação dos plasmídeos digeridos.



Fonte: Comenale, G. 2012.

Legenda: M – padrão de massa molecular 1 kb Plus DNA Ladder (Fermentas). As colunas 1 e 2 são os clones positivos selecionados para sequenciamento. A banda específica do plasmídeo digerido é um fragmento de aproximadamente 618pb. A coluna 3 representa o clone digerido somente com Eco-RI e a coluna 4 representa o clone digerido com Not-I.

4.1.3 Sequenciamento

Para a confirmação dos clones foram realizadas reações de sequenciamento. As sequências resultantes foram submetidas a um processo de busca por similaridade em diversos bancos de dados internacionais, através de servidores de busca disponíveis na rede. O principal programa utilizado foi o software público BLAST, cujos resultados mostraram similaridade de sequência superior a 99%, com apenas 1 base divergente entre 599 bases de identidade frente à cadeia nucleotídica correspondente a ORF deste estudo, confirmando a presença da região alvo desejada. Os plasmídeos L2.2/pGEX-2T destes cinco clones

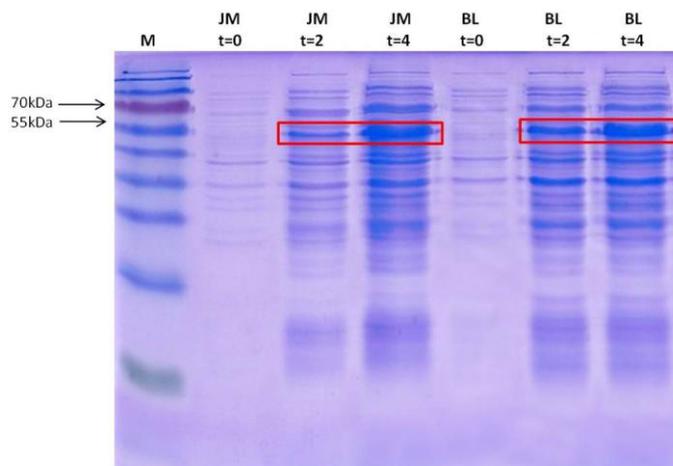
4.2 Expressão da Proteína de interesse

A expressão da proteína de interesse, L2 de BPV-2, foi testada em diferentes linhagens de *E. coli* e com diferentes características de indução. Neste sentido, diferentes cepas, temperaturas e tempos de indução foram testados. Abaixo estão apresentados os resultados mais representativos.

A produção da proteína recombinante foi realizada inicialmente por meio da indução da expressão por IPTG a 37°C. Visando a otimização do período de expressão alíquotas foram retiradas cada 2 horas para a quantificação da expressão. Esta metodologia foi utilizada para a obtenção de quantidades adequadas da proteína recombinante a serem empregadas nas etapas de caracterização. Passado o período de indução de 4 horas, as células bacterianas resultantes foram recuperadas por centrifugação e lisadas por tampão de lise. Os extratos proteicos foram avaliados quanto a sua solubilidade em SDS-PAGE, em tampão com condições próximas à fisiológica.

A Figura 10 mostra um gel de SDS-PAGE a 12% obtido após submeter às amostras a condições desnaturantes.

Figura 10 – Gel de Poliacrilamida 12%

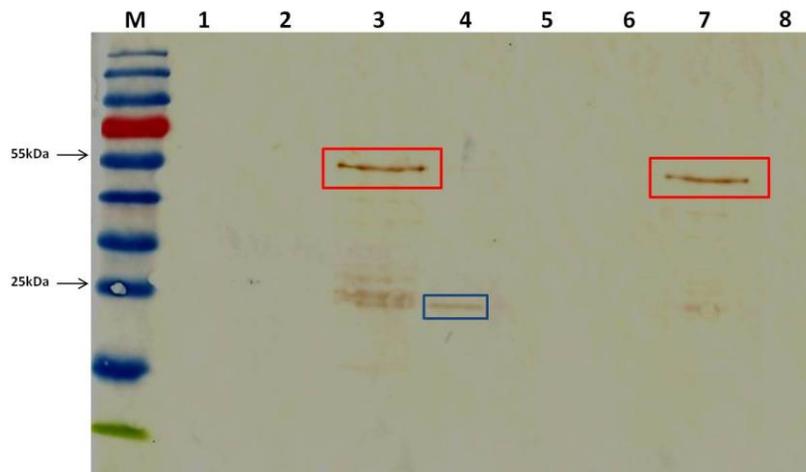


Legenda: M: Marcador; JM t=0: colônia de *E.coli* JM109 com tempo zero de indução, ou seja, sem induzir com IPTG; JM t=2: mesma colônia de *E.coli* JM109 com 2 horas de indução; JM t=4: mesma colônia de *E.coli* JM109 com 4 horas de indução; BL t=0: colônia de *E.coli* BL21 com tempo zero de indução, ou seja, sem induzir com IPTG; BL t=2: mesma colônia de *E.coli* BL21 com 2 horas de indução; BL t=4: mesma colônia de *E.coli* BL21 com 4 horas de indução. As possíveis bandas desejadas estão em destaque.

4.3 Análise da purificação proteica por “Western-Blotting”

As frações solúveis das culturas induzidas provenientes da lise celular foram submetidas à centrifugação com coluna de afinidade utilizando uma resina contendo *Glutathiona Sepharose 4B*. As frações eluídas durante o processo de centrifugação foram analisadas por Western blot. Também foram analisadas as frações referentes à lavagem da resina. A Figura 11 demonstra a análise de western blot onde bandas com aproximadamente 48 kDa eram esperadas. Esta análise permitiu, porém a identificação de uma banda de 26kDa referente à cauda de GST. Já na Figura 12, o Western blot é referente às frações de lavagem da resina onde se encontra a proteína com 48kDa, deixando claro que a etapa de purificação não está ocorrendo de forma adequada, uma vez que, a proteína de interesse não está se fixando na coluna. Desta forma, a proteína ao se ligar na coluna sofre uma provável clivagem na região da cauda de GST. Na Figura 13, o Western blot foi realizado com amostras utilizando o Tampão B.

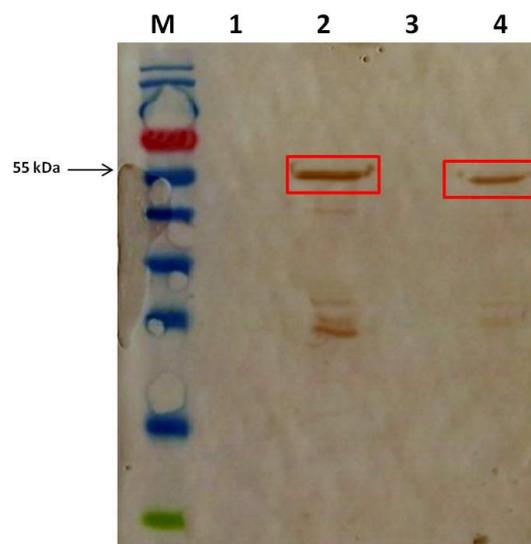
Figura 11 - Purificação da proteína por coluna de afinidade, utilizando Tampão A.



Fonte: Comenale, G. 2012.

Legenda: A análise das frações eluídas da coluna de Glutathiona Sepharose 4B foi realizada por Western blot. M – marcador de massa molecular; 1 – *E.coli* JM109 induzida e fervida; 2 – *E.coli* JM109 fervida e passada pela coluna de purificação; 3 – *E.coli* JM109 induzida e sonicada; 4 – *E.coli* JM109 sonicada e passada pela coluna de purificação; 5 – *E.coli* BL21 induzida e fervida; 6 – *E.coli* BL21 fervida e passada pela coluna de purificação; 7 – *E.coli* BL21 induzida e sonicada; 8 – *E.coli* BL21 sonicada e passada pela coluna de purificação. Destaque em vermelho para suposta proteína de interesse e destaque em azul para a cauda GST.

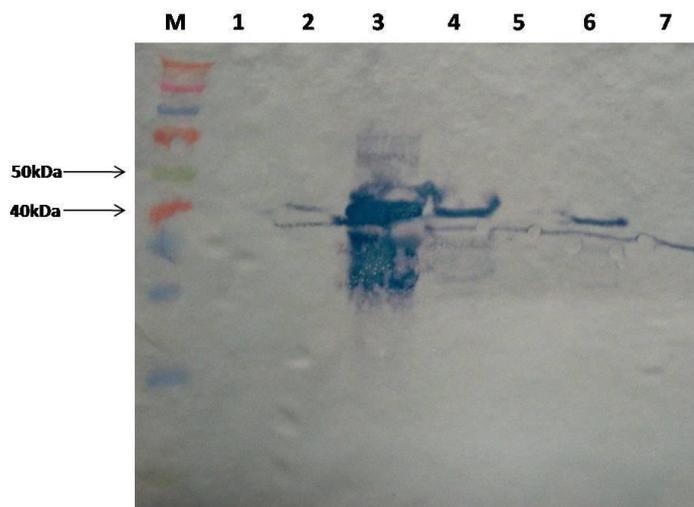
Figura 12 – Purificação da proteína por coluna de afinidade, utilizando Tampão A.



Fonte: Comenale, G. 2012.

Legenda: A análise das frações de lavagem da resina de Glutathiona Sepharose 4B foi realizada por Western blot. M – marcador de massa molecular; 1 – Fração de lavagem da *E.coli* JM109 induzida e fervida; 2 – Fração de lavagem da *E.coli* JM109 induzida e sonicada; 3 – Fração de lavagem da *E.coli* BL21 induzida e fervida; 4 – Fração de lavagem da *E.coli* BL21 induzida e sonicada. Destaque em vermelho para a suposta proteína de interesse.

Figura 13 - Purificação da proteína por coluna de afinidade, utilizando Tampão B.



Fonte: Comenale, G.2012.

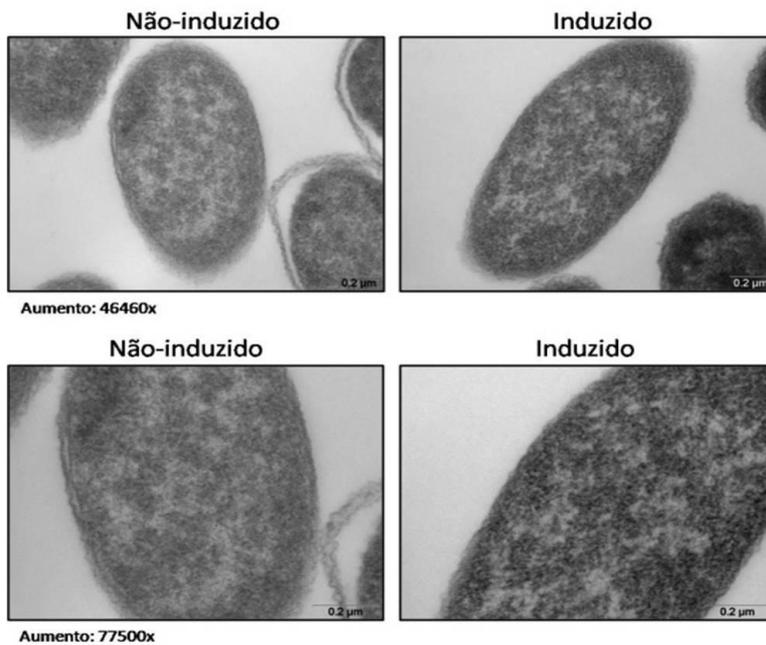
Legenda: A análise das frações de lavagem e das frações eluídas da coluna de *Glutathiona Sepharose 4B* foi realizada por Western blot. M – marcador de massa molecular; 1 – *E.coli* BL21 não induzida; 2 – *E.coli* BL21 induzida; 3 – *E.coli* BL21 induzida e sonicada; 4 – Fração de lavagem com PBS; 5 – Eluído por Glutathiona redutase + PBS; 6 – Fração de lavagem com Tampão B; 7 – Eluído por Glutathiona redutase + Tampão B.

4.4 Microscopia Eletrônica

De acordo com os resultados, foi sugerido que a proteína de interesse deste estudo pudesse estar em corpúsculo de inclusão e, portanto, não estaria se fixando na coluna. Para verificar se esses corpúsculos estavam de fato ocorrendo, foi realizada microscopia eletrônica. Foram utilizadas células não induzidas e

induzidas para essa formação. De acordo com a Figura 14, observa-se que não há formação de corpúsculos, o que não justificaria a proteína não se fixar na coluna durante a purificação.

Figura 14 - Comparação de células não induzidas e induzidas.



Fonte: Comenale, G. 2012.

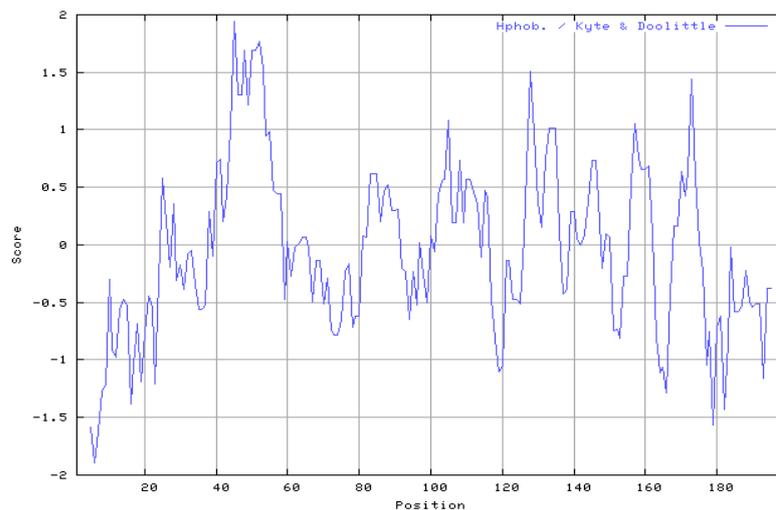
4.5 Bioinformática

4.5.1 Características físico-químicas

Para melhor caracterização desta proteína foram realizados testes de análise *in silico*.

Inicialmente foi realizada análise da proteína juntamente com a cauda GST para verificar a hidrofobicidade desta construção. A proteína L2 de BPV-2 juntamente com a cauda de GST apresenta tamanho de 48,52 kDa, ponto isoelétrico teórico de 4,97. Através da análise do gráfico gerado pelo programa conclui-se que esta proteína apresenta várias porções hidrofóbicas, de acordo com o Diagrama de hidrofobicidade (Kyte e Doolittle, 1982) – Figura 15. A proteína não apresenta modificações pós-traducionais, podendo ser clonada diretamente do Genoma do Vírus.

Figura 15 - Diagrama de Hidrofobicidade de Kyte e Doolittle da porção N-Terminal da proteína L2 de BPV-2.



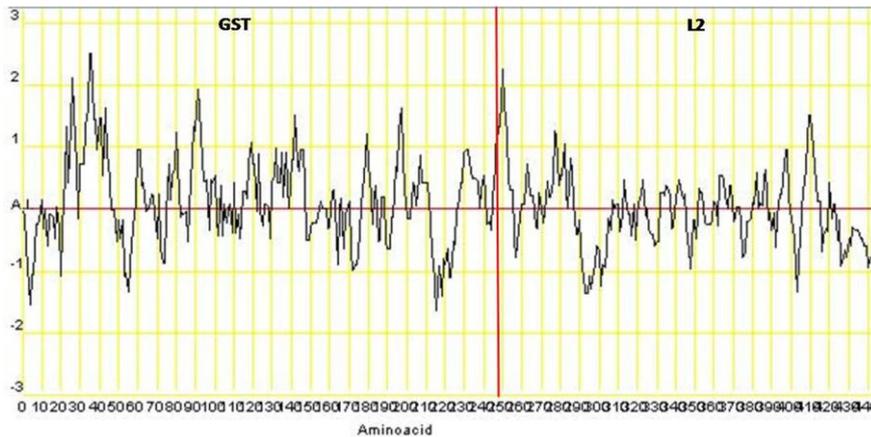
Fonte: Comenale, G.2012.

4.5.2 Determinação da região de atividade antigênica

A análise de propriedades físico-químicas da proteína através do programa (JaMBW) permitiu montar um gráfico de antigeneidade (Figura 16). A análise deste gráfico nos mostra que a proteína L2 isolada apresenta um pequeno número de picos, o que permite inferir que a mesma não é imunogênica se não

conjugada a algum outro elemento. Já o GST, pela grande presença de picos demonstrados no gráfico, apresenta-se como uma proteína bastante imunogênica.

Figura 16 - Gráfico de antigeneicidade.

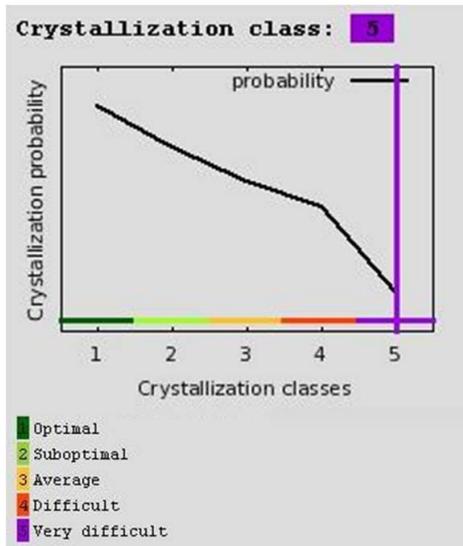


Fonte: Comenale, G. 2012.

4.5.3 Probabilidade de cristalização da proteína

A análise gerada pelo programa XtalPred permitiu classificar a sequência da proteína em 5 (Very Difficult), o que significa dificuldade extrema em ser cristalizada de acordo com parâmetros calculados (Figura 17). Esse dado pode justificar a falta de informações a respeito da estrutura desta proteína.

Figura 17 - Classificação de cristalização da proteína.



Fonte: Comenale, G. 2012.

5 DISCUSSÃO

A papilomatose bovina é uma doença infectocontagiosa disseminada no rebanho nacional e tem sido associada a enfermidades como a hematúria enzoótica e o “caraguatá”. A persistência viral nos rebanhos têm gerado consideráveis prejuízos financeiros, já que os animais infectados apresentam atraso no desenvolvimento, perda de peso, lesões no couro e redução na produção de leite.

Um melhor entendimento dos processos patogênicos associados com a infecção viral decorre, entre outros, da compreensão do padrão de expressão de diferentes proteínas durante o ciclo replicativo viral e suas alterações com o metabolismo celular. Abordagens que possam isolar esses fatores, proporcionando caracterizar suas propriedades biológicas, tornam-se não só atraentes como necessárias à elucidação de como os vírus atuam no organismo hospedeiro. Dessa forma, esse tipo de estudo pode gerar subsídios para o surgimento de novas metodologias de controle e tratamento das infecções virais. Nesse sentido, a clonagem de genes visando à purificação de proteínas virais recombinantes em sistema bacteriano apresenta algumas vantagens como a grande quantidade de biomassa gerada, baixo custo relativo e rapidez, servindo a diferentes propósitos, entre eles a produção de insumos imunológicos como testes diagnósticos ou mesmo vacinas.

Em relação aos papilomavírus, a expressão e purificação de genes em vetores bacterianos já vêm sendo utilizadas há algum tempo. Mas, apesar de inúmeros trabalhos envolvendo L2 de BPV-2, há poucos estudos estruturais e biofísicos devido às dificuldades na produção de proteínas recombinantes adequadas para estes fins já que *E. coli* possui algumas limitações em seu sistema de expressão. Dentre estes podem ser citados sua incapacidade de realizar modificações pós-tradução comum em eucariotos, ausência de um sistema de secreção para uma eficiente liberação da proteína recombinante para o meio de cultura e limitada capacidade de produzir algumas proteínas complexas (proteínas contendo múltiplas pontes de dissulfeto) (Duilio, Tutino e Marino, 2004).

A sequência fornecida gentilmente pela Profa. Dra. Maria Savéria Campo foi submetida a análises para constatação da qualidade da amostra para expressão e purificação da mesma. Foi feita uma triagem seguida de um sequenciamento no qual foi demonstrado apenas 1 (uma) mutação na sequência recombinante (Figura 9) quando comparada a sequência depositada no banco de dados – GenBank.

Até o momento, nenhuma proteína de capsídeo L2 inteira teve sua estrutura tridimensional determinada, devido às dificuldades na produção destas proteínas recombinantes, o que é realmente constatado com as análises feitas neste trabalho através do programa XtalPred (Figura 17). A adição da cauda GST pode ser utilizada como um veículo facilitador na determinação das estruturas cristalinas dos peptídeos a ela ligados. Isto pode ser comprovado ao compararmos os resultados obtidos pelo método padrão com proteínas GST fusionadas, sendo que, as últimas são mais facilmente cristalizadas em condições semelhantes (Park, Kim, Nam *et al.*, 2011).

Porém como demonstrado, a adição desta cauda ainda é insuficiente para permitir uma eficiente cristalização deste peptídeo. Para estas análises foi utilizada metodologia baseada em previsões de combinações de probabilidades individuais de cristalização em uma pontuação única de cristalização. A proteína de interesse demonstrou-se com grau 5 “Average”, grau muito difícil para cristalização de acordo com parâmetros calculados.

A antigeneicidade também foi testada com base em propriedades físico-químicas da proteína pelo programa (JaMBW) através da análise do gráfico gerado. Na análise deste gráfico pode ser observada uma concentração de picos altos na sequência GST, o que não foi encontrado para a proteína L2 de BPV2 (Figura 16). A análise de antigeneicidade é de extrema relevância uma vez que na literatura são relatados casos de resposta imune desencadeada pela presença da cauda utilizada na construção para facilitação da purificação. Como exemplo, temos a sequência polipeptídica de histidina em proteínas recombinantes reportados (Masek, Bartheldyova, Turanek-Knotigova *et al.*, 2011).

Neste trabalho foi visto a dificuldade para a purificação da proteína com a cauda GST. Conforme visto nas Figuras 11 e 12, onde deveriam aparecer bandas de 48kDa que seria o tamanho da proteína L2 agregado a cauda GST, podemos ver

bandas de aproximadamente 55kDa ou bandas de 26kDa onde podemos sugerir a ocorrência de formação de dímeros de GST ou GST desfragmentada da proteína L2. Não se sabe o porque acontece essa dissociação da cauda GST e da proteína L2, mas foram feitos estudos que descartam a possibilidade de repulsão de cargas elétricas (*dados não apresentados*), pois o ponto isoelétrico tanto da cauda quanto da proteína são próximos.

Uma possibilidade é que segundo a pesquisadora Juliana Silva da Luz¹, o sistema de GST não é bom para expressar proteínas maiores que 20kDa, pois por motivos ainda desconhecido, acontece muita parada prematura de transcrição e tradução, produzindo assim muita GST isolada, sem a fusão de interesse (informação verbal).

Foi descrita pela primeira vez em 1988 (Smith e Johnson, 1988) a purificação de polipeptídios com fusões com glutathione-S-transferase (GST). A GST de 26kDa de *Schistosoma japonicum* foi clonado em um vetor de expressão *E. coli*.

A cauda GST pode ser colocada na extremidade N- ou C- terminal e pode ser usada em bactérias, em leveduras, células de mamíferos e células de inseto. Essas proteínas de fusão se tornaram uma ferramenta básica para a biologia molecular. Elas são também frequentemente utilizadas em estudos de interações DNA-proteína, interações proteína-proteína e como antígenos para a imunologia ou estudos vacinais (Terpe, 2003).

Essa cauda pode ajudar a proteger contra a clivagem de protease intracelular e estabilizar a proteína recombinante. Em alguns casos, essas proteínas de fusão podem aumentar a solubilidade de algumas proteínas insolúveis ou semi-solúveis. Ainda não se sabe quais fatores são responsáveis pela insolubilidade, mas em vários exemplos de insolubilidade essas proteínas GST foram associadas com a presença de regiões hidrofóbicas. Outra vantagem é que os peptídeos se ligam mais facilmente a essas proteínas. A cauda GST também pode ser facilmente detectada utilizando um ensaio enzimático ou imunoensaio. No entanto, uma desvantagem de marcadores de afinidade de proteínas grandes, em geral, é que consomem mais energia metabólica durante superprodução do que pequenas caudas. Outra

¹ Informação fornecida por Luz, J.S., Professora colaboradora do Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Ciência Farmacêuticas – UNESP/Araraquara.

desvantagem da GST é a de que se trata de uma cauda com tendências homodiméricas, o que pode complicar a purificação das proteínas de fusão e torna esta cauda inadequada para o isolamento de algumas proteínas (Waugh, 2005).

Dessa forma, não foi possível alcançar o objetivo final dessa dissertação que seria a purificação da proteína de estudo para futura produção de antígenos vacinais e produção de anticorpos mono ou policlonais. No entanto, a execução deste projeto permitiu-nos a aquisição do conhecimento necessário para estudos posteriores, bem como o entendimento da problemática da expressão heteróloga. Nossos estudos demonstraram que a cauda de GST apesar de ser utilizada em diversos trabalhos presentes na literatura (Campo, Grindlay, O'neil *et al.*, 1993; Terpe, 2003), não é a alternativa mais adequada para a proteína de interesse L2 de BPV2. Desta forma propõe-se que para a expressão recombinante da mesma faça-se necessário a troca por outra cauda, como por exemplo, a cauda de histidina, para permitir posteriores etapas de purificação.

6 CONCLUSÕES

Podemos concluir que:

- A troca de cauda para uma de menor tamanho, por exemplo, cauda de Histidina é essencial para a continuação desse trabalho.
- A cauda de GST apesar de ser ótima na maioria dos casos, neste especificamente acabou atrapalhando a purificação e continuação do projeto.
- Os processos vacinais ainda apresentam aspectos que carecem de maiores esclarecimentos, principalmente no que se refere a estrutura das moléculas clivadas, como sequências que são adicionadas para isolamento e purificação.
- As respostas imunológicas aos produtos vacinais precisam ser analisadas isoladamente, proteína alvo e artefatos de purificação.

REFERÊNCIAS

- ANDERSON, R. A.; SCOBIE, L.; O'NEIL, B. W.; GRINDLAY, G. J.; CAMPO, M. S. Viral proteins of bovine papillomavirus type 4 during the development of alimentary canal tumours. **Vet J**, v. 154, n. 1, p. 69-78, Jul 1997.
- ANTONSSON, A.; HANSSON, B. G. Healthy skin of many animal species harbors papillomaviruses which are closely related to their human counterparts. **J Virol**, v. 76, n. 24, p. 12537-42, Dec 2002.
- ANTONSSON, A.; MCMILLAN, N. A. Papillomavirus in healthy skin of Australian animals. **J Gen Virol**, v. 87, n. Pt 11, p. 3195-200, Nov 2006.
- ARNAU, J.; LAURITZEN, C.; PETERSEN, G. E.; PEDERSEN, J. Reprint of: Current strategies for the use of affinity tags and tag removal for the purification of recombinant proteins. **Protein Expr Purif**, Sep 2011.
- BAKER, C. C.; HOWLEY, P. M. Differential promoter utilization by the bovine papillomavirus in transformed cells and productively infected wart tissues. **EMBO J**, v. 6, n. 4, p. 1027-35, Apr 1987.
- BAXTER, M. K.; MCPHILLIPS, M. G.; OZATO, K.; MCBRIDE, A. A. The mitotic chromosome binding activity of the papillomavirus E2 protein correlates with interaction with the cellular chromosomal protein, Brd4. **J Virol**, v. 79, n. 8, p. 4806-18, Apr 2005.
- BERNARD, H. U.; BURK, R. D.; CHEN, Z.; VAN DOORSLAER, K.; HAUSEN, H.; DE VILLIERS, E. M. Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. **Virology**, v. 401, n. 1, p. 70-9, May 2010.
- BLOOD, D. C.; RADOSTITS, O. M.; GAY, C. C. E., P. **Clínica Veterinária**. 7 Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991. 1263
- BORZACCHIELLO, G. Bovine papillomavirus infections in animals. **Medical and Veterinary Microbiology, Medical Genetics**, v. 1, n. 1, p. 673-679, 2007.
- BORZACCHIELLO, G.; AMBROSIO, V.; ROPERTO, S.; POGGIALI, F.; TSIRIMONAKIS, E.; VENUTI, A.; CAMPO, M. S.; ROPERTO, F. Bovine papillomavirus type 4 in oesophageal papillomas of cattle from the south of Italy. **J Comp Pathol**, v. 128, n. 2-3, p. 203-6, Feb-Apr 2003.
- BORZACCHIELLO, G.; IOVANE, G.; MARCANTE, M. L.; POGGIALI, F.; ROPERTO, F.; ROPERTO, S.; VENUTI, A. Presence of bovine papillomavirus type 2 DNA and expression of the viral oncoprotein E5

in naturally occurring urinary bladder tumours in cows. **J Gen Virol**, v. 84, n. Pt 11, p. 2921-6, Nov 2003.

BORZACCHIELLO, G.; ROPERTO, F. Bovine papillomaviruses, papillomas and cancer in cattle. **Vet Res**, v. 39, n. 5, p. 45, 2008 Sep-Oct 2008.

BORZACCHIELLO, G.; RUSSO, V.; SPOLETO, C.; ROPERTO, S.; BALCOS, L.; RIZZO, C.; VENUTI, A.; ROPERTO, F. Bovine papillomavirus type-2 DNA and expression of E5 and E7 oncoproteins in vascular tumours of the urinary bladder in cattle. **Cancer Lett**, v. 250, n. 1, p. 82-91, May 18 2007.

CAMPO, M. S. Bovine papillomavirus and cancer. **Vet J**, v. 154, n. 3, p. 175-88, Nov 1997.

CAMPO, M. S. Animal models of papillomavirus pathogenesis. **Virus Res**, v. 89, n. 2, p. 249-61, Nov 2002.

CAMPO, M. S. Papillomavirus and disease in humans and animals. **Vet Comp Oncol**, v. 1, n. 1, p. 3-14, Mar 2003.

CAMPO, M. S. Bovine papillomavirus: old system, new lessons? Chap 23. In: CAMPO, M. S. (Ed.). **Papillomavirus research: from natural history to vaccine and beyond**: Caister Academic Press, 2006. cap. 23,

CAMPO, M. S.; COGGINS, L. W. Molecular cloning of bovine papillomavirus genomes and comparison of their sequence homologies by heteroduplex mapping. **J Gen Virol**, v. 63, n. 2, p. 255-64, Dec 1982.

CAMPO, M. S.; GRINDLAY, G. J.; O'NEIL, B. W.; CHANDRACHUD, L. M.; MCGARVIE, G. M.; JARRETT, W. F. Prophylactic and therapeutic vaccination against a mucosal papillomavirus. **J Gen Virol**, v. 74 (Pt 6), p. 945-53, Jun 1993.

CAMPO, M. S.; JARRETT, W. F.; O'NEIL, W.; BARRON, R. J. Latent papillomavirus infection in cattle. **Res Vet Sci**, v. 56, n. 2, p. 151-7, Mar 1994.

CAMPO, M. S.; MOAR, M. H.; JARRETT, W. F.; LAIRD, H. M. A new papillomavirus associated with alimentary cancer in cattle. **Nature**, v. 286, n. 5769, p. 180-2, Jul 10 1980.

CAMPO, M. S.; MOAR, M. H.; LAIRD, H. M.; JARRETT, W. F. Molecular heterogeneity and lesion site specificity of cutaneous bovine papillomaviruses. **Virology**, v. 113, n. 1, p. 323-35, Aug 1981.

CAMPO, M. S.; RODEN, R. B. Papillomavirus prophylactic vaccines: established successes, new approaches. **J Virol**, v. 84, n. 3, p. 1214-20, Feb 2010.

CARVALHO, R. F.; RUIZ, R. M.; STOCCO, R. C.; BEÇAK, W.; M.P., S. BPV-1 L1 Expression In *E. coli*. 25th International Papillomavirus Conference, 2009. Malmö.

CASTELLSAGUÉ, X.; MUÑOZ, N. Cofactors in human papillomavirus carcinogenesis -role of parity, oral contraceptives, and tobacco smoking. In: (Ed.). **J Natl Cancer Inst Monogr.**, v.31, 2003. cap. 3, p.20-8.

CHANG, F. Role of papillomaviruses. **J Clin Pathol**, v. 43, n. 4, p. 269-76, Apr 1990.

CHANT, A.; KRAEMER-PECORE, C. M.; WATKIN, R.; KNEALE, G. G. Attachment of a histidine tag to the minimal zinc finger protein of the *Aspergillus nidulans* gene regulatory protein AreA causes a conformational change at the DNA-binding site. **Protein Expr Purif**, v. 39, n. 2, p. 152-9, Feb 2005.

CHEN, E. Y.; HOWLEY, P. M.; LEVINSON, A. D.; SEEBURG, P. H. The primary structure and genetic organization of the bovine papillomavirus type 1 genome. **Nature**, v. 299, n. 5883, p. 529-34, Oct 7 1982.

CLAUS, M. P.; LUNARDI, M.; ALFIERI, A. F.; FERRACIN, L. M.; FUNGARO, M. H.; ALFIERI, A. A. Identification of unreported putative new bovine papillomavirus types in Brazilian cattle herds. **Vet Microbiol**, v. 132, n. 3-4, p. 396-401, Dec 2008.

CONNELL, S. R.; TRACZ, D. M.; NIERHAUS, K. H.; TAYLOR, D. E. Ribosomal protection proteins and their mechanism of tetracycline resistance. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 47, n. 12, p. 3675-81, Dec 2003.

CONNOLLY, J. A.; MORGAN, I. M.; JACKSON, M. E.; CAMPO, M. S. The BPV-4 co-carcinogen quercetin induces cell cycle arrest and up-regulates transcription from the LCR of BPV-4. **Oncogene**, v. 16, n. 21, p. 2739-46, May 28 1998.

CORRÊA, W.; CORRÊA, C. **Papilomatoses**. 1992.

DASSIE, C. **Papilomatose: prejuízos não estão só na aparência**. Revista Balde Branco. São Paulo. 414: 50-54 p. 1999.

DEMASI, J.; CHAO, M. C.; KUMAR, A. S.; HOWLEY, P. M. Bovine papillomavirus E7 oncoprotein inhibits anoikis. **J Virol**, v. 81, n. 17, p. 9419-25, Sep 2007.

DEMASI, J.; HUH, K. W.; NAKATANI, Y.; MÜNGER, K.; HOWLEY, P. M. Bovine papillomavirus E7 transformation function correlates with cellular p600 protein binding. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 102, n. 32, p. 11486-91, Aug 2005.

DIMAIO, D.; MATTOON, D. Mechanisms of cell transformation by papillomavirus E5 proteins. **Oncogene**, v. 20, n. 54, p. 7866-73, Nov 2001.

DOORBAR, J.; MEDCALF, E.; NAPHTHINE, S. Analysis of HPV1 E4 complexes and their association with keratins in vivo. **Virology**, v. 218, n. 1, p. 114-26, Apr 1996.

DUILIO, A.; TUTINO, M. L.; MARINO, G. Recombinant protein production in Antarctic Gram-negative bacteria. **Methods Mol Biol**, v. 267, p. 225-37, 2004.

FINLAY, M.; YUAN, Z.; BURDEN, F.; TRAWFORD, A.; MORGAN, I. M.; CAMPO, M. S.; NASIR, L. The detection of Bovine Papillomavirus type 1 DNA in flies. **Virus Res**, v. 144, n. 1-2, p. 315-7, Sep 2009.

FRAZER, I. Is vaccine therapy the future in cancer prevention? **Expert Opin Pharmacother**, v. 5, n. 12, p. 2427-34, Dec 2004.

FRAZER, I. H. Prevention of cervical cancer through papillomavirus vaccination. **Nat Rev Immunol**, v. 4, n. 1, p. 46-54, Jan 2004.

FREITAS, A. C.; CARVALHO, C.; BRUNNER, O.; BIRGEL JR, E. H.; DELLALIBERA, A. M. M. P.; BENESI, F. J.; GREGORY, L.; BEÇAK, W.; STOCCO DOS SANTOS, R. C. Viral DNA sequences in peripheral blood vertical transmission of the virus: a discussion about BPV-1. **Braz. J. Microbiol**, v. 34, n. 1, p. 76-78, 2003.

HAMID, N. A.; BROWN, C.; GASTON, K. The regulation of cell proliferation by the papillomavirus early proteins. **Cell Mol Life Sci**, v. 66, n. 10, p. 1700-17, May 2009.

HANNIG, G.; MAKRIDES, S. C. Strategies for optimizing heterologous protein expression in Escherichia coli. **Trends Biotechnol**, v. 16, n. 2, p. 54-60, Feb 1998.

HARRISON, S. M.; GEARING, K. L.; KIM, S. Y.; KINGSMAN, A. J.; KINGSMAN, S. M. Multiple cis-active elements in the long control region of bovine papillomavirus type 1 (BPV-1). **Nucleic Acids Res**, v. 15, n. 24, p. 10267-84, Dec 1987.

HATAMA, S.; NOBUMOTO, K.; KANNO, T. Genomic and phylogenetic analysis of two novel bovine papillomaviruses, BPV-9 and BPV-10. **J Gen Virol**, v. 89, n. Pt 1, p. 158-63, Jan 2008.

HUNT, I. From gene to protein: a review of new and enabling technologies for multi-parallel protein expression. **Protein Expr Purif**, v. 40, n. 1, p. 1-22, Mar 2005.

IARC. **Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans: Human Papillomaviruses**. 90: 670 p. 2007.

JACKSON, M. E.; CAMPO, M. S.; GAUKROGER, J. M. Cooperation between papillomavirus and chemical cofactors in oncogenesis. **Crit Rev Oncog**, v. 4, n. 3, p. 277-91, 1993.

JARRETT, W. The natural history of bovine papillomavirus infection. **Adv. Viral Oncol.**, v. 5, p. 83-101, 1985.

JARRETT, W. F.; CAMPO, M. S.; O'NEIL, B. W.; LAIRD, H. M.; COGGINS, L. W. A novel bovine papillomavirus (BPV-6) causing true epithelial papillomas of the mammary gland skin: a member of a proposed new BPV subgroup. **Virology**, v. 136, n. 2, p. 255-64, Jul 30 1984.

KIRNBAUER, R.; CHANDRACHUD, L. M.; O'NEIL, B. W.; WAGNER, E. R.; GRINDLAY, G. J.; ARMSTRONG, A.; MCGARVIE, G. M.; SCHILLER, J. T.; LOWY, D. R.; CAMPO, M. S. Virus-like particles of bovine papillomavirus type 4 in prophylactic and therapeutic immunization. **Virology**, v. 219, n. 1, p. 37-44, May 1996.

KIRNBAUER, R.; HUBBERT, N. L.; WHEELER, C. M.; BECKER, T. M.; LOWY, D. R.; SCHILLER, J. T. A virus-like particle enzyme-linked immunosorbent assay detects serum antibodies in a majority of women infected with human papillomavirus type 16. **J Natl Cancer Inst**, v. 86, n. 7, p. 494-9, Apr 1994.

KLING, M.; ZEICHNER, J. A. The role of the human papillomavirus (HPV) vaccine in developing countries. **Int J Dermatol**, v. 49, n. 4, p. 377-9, Apr 2010.

KYTE, J.; DOOLITTLE, R. F. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. **J Mol Biol**, v. 157, n. 1, p. 105-32, May 5 1982.

LAMBERT, P. F. Papillomavirus DNA replication. **J Virol**, v. 65, n. 7, p. 3417-20, Jul 1991.

LIU, X.; DAKIC, A.; ZHANG, Y.; DAI, Y.; CHEN, R.; SCHLEGEL, R. HPV E6 protein interacts physically and functionally with the cellular telomerase complex. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 106, n. 44, p. 18780-5, Nov 2009.

MASEK, J.; BARTHELDYOVA, E.; TURANEK-KNOTIGOVA, P.; SKRABALOVA, M.; KORVASOVA, Z.; PLOCKOVA, J.; KOUDELKA, S.; SKODOVA, P.; KULICH, P.; KRUPKA, M.; ZACHOVA, K.; CZERNEKOVA, L.; HORYNOVA, M.; KRATOCHVILOVA, I.; MILLER, A. D.; ZYKA, D.; MICHALEK, J.; VRBKOVA, J.; SEBELA, M.; LEDVINA, M.; RASKA, M.; TURANEK, J. Metallochelating liposomes with associated lipophilised norAbuMDP as biocompatible platform for construction of vaccines with recombinant His-tagged antigens: preparation, structural study and immune response towards rHsp90. **J Control Release**, v. 151, n. 2, p. 193-201, Apr 30 2011.

MEYERS, G.; TAUTZ, N.; STARK, R.; BROWNLIE, J.; DUBOVI, E. J.; COLLETT, M. S.; THIEL, H. J. Rearrangement of viral sequences in cytopathogenic pestiviruses. **Virology**, v. 191, n. 1, p. 368-86, Nov 1992.

MODIS, Y.; TRUS, B. L.; HARRISON, S. C. Atomic model of the papillomavirus capsid. **Embo J**, v. 21, n. 18, p. 4754-62, Sep 16 2002.

MOODY, C. A.; LAIMINS, L. A. Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. **Nat Rev Cancer**, v. 10, n. 8, p. 550-60, Aug 2010.

MUNDAY, J. S.; KIUPEL, M. Papillomavirus-associated cutaneous neoplasia in mammals. **Vet Pathol**, v. 47, n. 2, p. 254-64, Mar 2010.

NICHOLLS, P. K.; KLAUNBERG, B. A.; MOORE, R. A.; SANTOS, E. B.; PARRY, N. R.; GOUGH, G. W.; STANLEY, M. A. Naturally occurring, nonregressing canine oral papillomavirus infection: host immunity, virus characterization, and experimental infection. **Virology**, v. 265, n. 2, p. 365-74, Dec 1999.

O'BRIEN, P. M.; CAMPO, M. S. Papillomaviruses: a correlation between immune evasion and oncogenicity? **Trends Microbiol**, v. 11, n. 7, p. 300-5, Jul 2003.

O'BRIEN, V.; GRINDLAY, G. J.; CAMPO, M. S. Cell transformation by the E5/E8 protein of bovine papillomavirus type 4. p27(Kip1), Elevated through increased protein synthesis is sequestered by cyclin D1-CDK4 complexes. **J Biol Chem**, v. 276, n. 36, p. 33861-8, Sep 2001.

OGAWA, T.; TOMITA, Y.; OKADA, M.; SHINOZAKI, K.; KUBONOYA, H.; KAIHO, I.; SHIRASAWA, H. Broad-spectrum detection of papillomaviruses in bovine teat papillomas and healthy teat skin. **J Gen Virol**, v. 85, n. Pt 8, p. 2191-7, Aug 2004.

OGAWA, T.; TOMITA, Y.; OKADA, M.; SHIRASAWA, H. Complete genome and phylogenetic position of bovine papillomavirus type 7. **J Gen Virol**, v. 88, n. Pt 7, p. 1934-8, Jul 2007.

OLIVEIRA, V. M. Papilomatose ou verruga dos bovinos.
<http://www.cnpqi.embrapa.br/nova/sala/artigos/artigolinha.php?id=38>
 2008.

OLSON, C. **Papillomaviruses**. In: DINTER, Z. & MOREIN, B. **Virus infections of ruminants**. Amsterdam: Elsevier Science Publisher, 1990. 189-200

PARK, D. W.; KIM, S. S.; NAM, M. K.; KIM, G. Y.; KIM, J.; RHIM, H. Improved recovery of active GST-fusion proteins from insoluble aggregates: solubilization and purification conditions using PKM2 and HtrA2 as model proteins. **BMB Rep**, v. 44, n. 4, p. 279-84, Apr 2011.

PFISTER, H.; LINZ, U.; GISSMANN, L.; HUCHTHAUSEN, B.; HOFFMANN, D.; ZUR HAUSEN, H. Partial characterization of a new type of bovine papilloma viruses. **Virology**, v. 96, n. 1, p. 1-8, Jul 15 1979.

PYEON, D.; PEARCE, S. M.; LANK, S. M.; AHLQUIST, P.; LAMBERT, P. F. Establishment of human papillomavirus infection requires cell cycle progression. **PLoS Pathog**, v. 5, n. 2, p. e1000318, Feb 2009.

RADOSTITS, O. M.; GAY, C. C.; BLOOD, D. C.; HINCHCLIFF, K. W. **Clínica veterinária. Um tratado de doenças dos bovinos, suínos, caprinos e eqüinos**. 9. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. 1735

ROPERTO, S.; BRUN, R.; PAOLINI, F.; URRARO, C.; RUSSO, V.; BORZACCHIELLO, G.; PAGNINI, U.; RASO, C.; RIZZO, C.; ROPERTO, F.; VENUTI, A. Detection of bovine papillomavirus type 2 in the peripheral blood of cattle with urinary bladder tumours: possible biological role. **J Gen Virol**, v. 89, n. Pt 12, p. 3027-33, Dec 2008.

ROPERTO, S.; COMAZZI, S.; CIUSANI, E.; PAOLINI, F.; BORZACCHIELLO, G.; ESPOSITO, I.; LUCÀ, R.; RUSSO, V.; URRARO, C.; VENUTI, A.; ROPERTO, F. PBMCs are additional sites of productive infection of bovine papillomavirus type 2. **J Gen Virol**, v. 92, n. Pt 8, p. 1787-94, Aug 2011.

RUIZ, R.; SIRCILI, M.; CAMPO, M.; BEÇAK, W.; CARVALHO, R.; STOCCO, R. Avaliação imunológica preliminar da utilização da proteína recombinante L2 do papilomavírus bovino. 25º Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2009. Porto de Galinhas.

SALUTA, M.; BELL, P. A. **Troubleshooting GST fusion protein expression in *E. coli***. *Amersham Biosciences* 1998.

SANTIN, A. D.; HERMONAT, P. L.; RAVAGGI, A.; BELLONE, S.; ROMAN, J. J.; JAYAPRABHU, S.; PECORELLI, S.; PARHAM, G. P.; CANNON, M. J. **Clinical Cancer Research**, v. 7, p. 804-810, 2001.

SCHAPIRO, F.; SPARKOWSKI, J.; ADDUCI, A.; SUPRYNOWICZ, F.; SCHLEGEL, R.; GRINSTEIN, S. Golgi alkalization by the papillomavirus E5 oncoprotein. **J Cell Biol**, v. 148, n. 2, p. 305-15, Jan 2000.

SCOTT, D., Ed. **Skin Diseases**. *Rebhun's Diseases of Dairy Cattle*, Rebhun's Diseases of Dairy Cattle, 2 ed. 2008.

SEHR, P.; MÜLLER, M.; HÖPFL, R.; WIDSCHWENDTER, A.; PAWLITA, M. HPV antibody detection by ELISA with capsid protein L1 fused to glutathione S-transferase. **J Virol Methods**, v. 106, n. 1, p. 61-70, Oct 2002.

SILVA, M. A.; PONTES, N. E.; DA SILVA, K. M.; GUERRA, M. M.; FREITAS, A. C. Detection of bovine papillomavirus type 2 DNA in commercial frozen semen of bulls (*Bos taurus*). **Anim Reprod Sci**, v. 129, n. 3-4, p. 146-51, Dec 2011.

SMITH, B. P., Ed. **Papillomatosis (warts, fibropapillomas)**. *Large Animal Internal Medicine Missouri*, p.1234, *Large Animal Internal Medicine* ed. 1990.

SMITH, D. B.; JOHNSON, K. S. Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. **Gene**, v. 67, n. 1, p. 31-40, Jul 1988.

SØRENSEN, H. P.; MORTENSEN, K. K. Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. **J Biotechnol**, v. 115, n. 2, p. 113-28, Jan 2005a.

SØRENSEN, H. P.; MORTENSEN, K. K. Soluble expression of recombinant proteins in the cytoplasm of *Escherichia coli*. **Microb Cell Fact**, v. 4, n. 1, p. 1, Jan 2005b.

SPALHOLZ, B. A.; LAMBERT, P. F.; YEE, C. L.; HOWLEY, P. M. Bovine papillomavirus transcriptional regulation: localization of the E2-responsive elements of the long control region. **J Virol**, v. 61, n. 7, p. 2128-37, Jul 1987.

STANLEY, M. HPV vaccines. **Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol**, v. 20, n. 2, p. 279-93, Apr 2006.

STOCCO DOS SANTOS, R. C.; LINDSEY, C. J.; FERRAZ, O. P.; PINTO, J. R.; MIRANDOLA, R. S.; BENESI, F. J.; BIRGEL, E. H.; PEREIRA, C. A.; BECAK, W. Bovine papillomavirus transmission and chromosomal aberrations: an experimental model. **J Gen Virol**, v. 79 (Pt 9), p. 2127-35, Sep 1998.

SUNDBERG, J. P.; VAN RANST, M.; MONTALI, R.; HOMER, B. L.; MILLER, W. H.; ROWLAND, P. H.; SCOTT, D. W.; ENGLAND, J. J.; DUNSTAN, R. W.; MIKAELIAN, I.; JENSON, A. B. Feline papillomas and papillomaviruses. **Vet Pathol**, v. 37, n. 1, p. 1-10, Jan 2000.

TALBERT-SLAGLE, K.; DIMAIO, D. The bovine papillomavirus E5 protein and the PDGF beta receptor: it takes two to tango. **Virology**, v. 384, n. 2, p. 345-51, Feb 2009.

TERPE, K. Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 60, n. 5, p. 523-33, Jan 2003.

TERPE, K. Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 72, n. 2, p. 211-22, Sep 2006.

TOMITA, Y.; LITERAK, I.; OGAWA, T.; JIN, Z.; SHIRASAWA, H. Complete genomes and phylogenetic positions of bovine papillomavirus type 8 and a variant type from a European bison. **Virus Genes**, v. 35, n. 2, p. 243-9, Oct 2007.

TONG, X.; HOWLEY, P. M. The bovine papillomavirus E6 oncoprotein interacts with paxillin and disrupts the actin cytoskeleton. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 94, n. 9, p. 4412-7, Apr 1997.

VILLAVERDE, A.; CARRIÓ, M. M. Protein aggregation in recombinant bacteria: biological role of inclusion bodies. **Biotechnol Lett**, v. 25, n. 17, p. 1385-95, Sep 2003.

VILLIERS, E. M.; FAUQUET, C.; BROKER, T. R.; BERNARD, H. U.; ZUR HAUSEN, H. Classification of papillomaviruses. **Virology**, v. 324, p. 17-27, 2004.

WARD, P.; COLEMAN, D. V.; MALCOLM, A. D. Regulatory mechanisms of the papillomaviruses. **Trends Genet**, v. 5, n. 4, p. 97-9, Apr 1989.

WAUGH, D. S. Making the most of affinity tags. **Trends Biotechnol**, v. 23, n. 6, p. 316-20, Jun 2005.

WILSON, V. G.; WEST, M.; WOYTEK, K.; RANGASAMY, D. Papillomavirus E1 proteins: form, function, and features. **Virus Genes**, v. 24, n. 3, p. 275-90, Jun 2002.

ZHENG, Z. M.; BAKER, C. C. Papillomavirus genome structure, expression, and post-transcriptional regulation. **Front Biosci**, v. 11, p. 2286-302, 2006.

ZHU, W.; DONG, J.; SHIMIZU, E.; HATAMA, S.; KADOTA, K.; GOTO, Y.; HAGA, T. Characterization of novel bovine papillomavirus type 12 (BPV-12) causing epithelial papilloma. **Arch Virol**, v. 157, n. 1, p. 85-91, Jan 2012.

ANEXOS

ANEXO A – Purification of multiple samples using GST MicroSpin columns with a microcentrifuge

Do not apply more than 600 µl of sample at a time to a GST MicroSpin column. This procedure will accommodate lysates produced from 2 to 12 ml of culture.

Components in GST MicroSpin Purification Module

10× PBS: 1.4 M NaCl, 27 mM KCl, 100 mM Na₂HPO₄, 18 mM KH₂PO₄, pH 7.3. To prepare 1× PBS for use, dilute 10× PBS with sterile H₂O. Store at 4 °C. Reduced glutathione: 0.154 g. To prepare elution buffer, pour the entire 50 ml volume of dilution buffer supplied with the module into the bottle containing the reduced glutathione. Shake until completely dissolved. Store as 1–20 ml aliquots at -20 °C.

Dilution buffer: 50 mM Tris-HCl, pH 8.0

IPTG: 500 mg. To prepare 100 mM IPTG, dissolve contents of the IPTG vial in 20 ml of sterile H₂O. Store as 1 ml aliquots at -20 °C.

MicroSpin columns: 50 units

Equipment required: Microcentrifuge

Steps

1. Resuspend the Glutathione Sepharose 4B in each column by vortexing gently.
2. Loosen the column caps one-fourth turn. Remove (and save) bottom closures.
3. Place each column into a clean 1.5 or 2 ml microcentrifuge tube. Spin for 1 min at 735 × g.
4. Discard the buffer from each centrifuge tube and replace the bottom closures.
5. Apply up to 600 µl of lysate to a column.
6. Recap each column securely and mix by gentle, repeated inversion. Incubate at room temperature for 5–10 min.
7. Remove (and save) the top caps and bottom closures. Place each column into a clean, pre-labelled 1.5 or 2 ml microcentrifuge tube.
8. Spin for 1 min at 735 × g to collect the flow-through.
9. Place each column into a clean, pre-labelled 1.5 or 2 ml microcentrifuge tube.

10. Apply 600 μ l of 1 \times PBS wash buffer to each column and repeat the spin procedure. Additional 600 μ l washes with 1 \times PBS can be performed if desired.
11. Add 100–200 μ l of elution buffer to each column. Replace top caps and bottom closures. Incubate at room temperature for 5–10 min.
12. Remove and discard top caps and bottom closures and place each column into a clean 1.5 or 2 ml microcentrifuge tube.
13. Spin all columns again to collect the eluates. Save for analysis.

ANEXO B – Abreviatura e códons dos Aminoácidos

Aminoácido	Abreviatura (3 letras)	Abreviatura (1letra)	Códons RNA mensageiros
Ac. Aspártico	Asp	D	GAC GAU
Ac. Glutámico	Glu	E	GAA GAG
Arginina	Arg	R	CGA CGC CGG CGU AGA AGG
Lisina	Lys	K	AAA AAG
Asparagina	Asn	N	AAC AAU
Histidina	His	H	CAC CAU
Glutamina	Gln	Q	CAA CAG
Serina	Ser	S	UCA UCC UCG UCU AGC AGU
Treonina	Thr	T	ACA ACC ACG ACU
Alanina	Ala	A	GCA GCC GCG GCU
Glicina	Gly	G	GGA GGC GGG GGU
Valina	Val	V	GUA GUC GUG GUU
Prolina	Pro	P	CCA CCC CCG CCU
Leucina	Leu	L	CUA CUC CUG CUU UUA UUG
Fenilalanina	Phe	F	UUC UUU
Tirosina	Tyr	Y	UAC UAU
Isoleucina	Ile	I	AUA AUC AUU
Metionina	Met	M	AUG
Triptofano	Trp	W	UGG
Cisteína	Cys	C	UGC UGU
Parada			UAA UAG UGA