

Expressão da Proteína L1 do Capsídio de HPV-16 em Leveduras Metilotróficas.

Dissertação de Mestrado, 2007

Prêmio de Incentivo em Ciência e Tecnologia para o SUS -
2008

RESUMO

Expressão da Proteína L1 do Capsídio de HPV-16 em Leveduras Metilotróficas. Dissertação de Mestrado, 2007

Papilomavírus humanos (HPVs) são vírus de DNA que infectam células epiteliais, podendo ser responsáveis pelo aparecimento de lesões benignas e malignas. Dentre os mais de 120 tipos identificados, o HPV-16 constitui o principal agente etiológico do câncer cervical, que é uma das maiores causas de morte por câncer em mulheres no mundo. Sendo assim, infecções associadas ao HPV devem ser prevenidas por vacinas indutoras de resposta imune vírus-específicas. A proteína L1 do capsídio viral é capaz de arranjar-se em partículas morfológicamente e antigenicamente semelhantes ao vírus, denominadas “virus-like particles” (VLPs), que induzem altos títulos de anticorpos neutralizantes. Neste trabalho, foram clonados os genes L1 selvagem e otimizado de HPV-16 em vetores de expressão de leveduras metilotróficas como *Hansenula polymorpha* e *Pichia pastoris*. Foi observada uma expressão consistente da proteína recombinante apenas em *P. pastoris*, com o gene L1 otimizado. Foram realizadas diversas tentativas de purificação da proteína heteróloga, empregando técnicas de cromatografia e ultracentrifugação em gradiente descontínuo de sacarose. A correta montagem das VLPs foi confirmada por microscopia eletrônica. Problemas de agregação, adsorção a superfícies e heterogeneidade apresentados pela proteína L1 foram resolvidos após utilização de surfactante não-iônico e de um procedimento de desmontagem e remontagem das partículas, gerando preparações mais homogêneas. Ensaio de hemaglutinação e inibição da hemaglutinação comprovaram a apresentação de epítomos conformacionais na superfície das VLPs. Este trabalho demonstrou pela primeira vez a expressão da proteína L1 de HPV-16 em *P. pastoris*, visando ao desenvolvimento de uma vacina profilática de baixo custo para o sistema público de saúde.

Palavras-chave: HPV-16, proteína L1, VLPs, *Pichia pastoris*.

ABSTRACT

Bazan, S.B. **Expression of the HPV-16 L1 Capsid Protein in Methylophilic Yeasts.**
Masters Thesis, 2007

Human papillomaviruses (HPVs) are DNA viruses that infect epithelial cells and can cause both benign and malignant lesions. From over 120 types catalogued so far, HPV-16 is the major etiologic agent of cervical cancer, which is the one of the most common causes of cancer deaths among women worldwide. Thus, HPV-associated infections might be prevented by vaccine inducing virus-specific immune responses. The L1 major capsid protein can self-assemble into virus-like particles (VLPs), which are morphologically and antigenically indistinguishable from native viruses and induce high titers of neutralizing antibodies. In this work, we have cloned wild-type and codon-optimized L1 genes from HPV-16 in expression vectors of the methylophilic yeasts *Hansenula polymorpha* and *Pichia pastoris*. Consistent L1 expression was only observed in *P. pastoris* transformed with the construction containing the codon-optimized gene. Many attempts to purify the heterologous protein were made, including chromatography and ultracentrifugation in sucrose density gradients. The correct assembly of VLPs was confirmed by electron microscopy. Some problems presented by recombinant L1, like aggregation, surface adsorption and heterogeneity were solved by using non-ionic surfactants and a procedure of disassembly and reassembly of the particles. Hemagglutination and hemagglutination inhibition assays corroborated the display of surface conformational epitopes by VLPs. This work showed for the first time the expression of the HPV-16 L1 protein, aiming the development of a prophylactic vaccine free of charge for the public health system in Brazil.

Keywords: HPV-16, L1 protein, VLPs, *Pichia pastoris*.

1. INTRODUÇÃO

1.1 – Papilomavírus Humanos

1.1.1. Epidemiologia

Papilomavírus humanos (HPVs) são patógenos epiteliotrópicos, etiologicamente associados tanto a verrugas benignas como a tumores malignos e, de acordo com dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), há em todo o mundo cerca de 630 milhões de casos de doenças sexualmente transmissíveis (DST) associadas a este vírus. A incidência anual de infecções por HPV transmitidas sexualmente é de aproximadamente 5,5 milhões. Cerca de 75% dos indivíduos sexualmente ativos são expostos ao HPV em algum momento de suas vidas (Koutsky et al, 1988).

Atualmente, o HPV é reconhecido como o fator etiológico principal no desenvolvimento do câncer cervical, sendo responsável pela morte de mais de 200 000 mulheres por ano, constituindo-se como a segunda maior causa de mortes por câncer em indivíduos do sexo feminino (Bosch et al., 2002). A cada ano, mais de 500 000 mulheres desenvolvem câncer cervical, sendo que 80% destas encontram-se nos países em desenvolvimento. As áreas de maior risco para o câncer cervical são Caribe, América Central, Melanésia, África sub-saariana, com taxas de incidência acima de 30 por 100 000 mulheres ao ano (Parkin et al., 2006). Em todas as regiões, os tipos 16 e 18 são os mais comuns, juntos contribuindo para aproximadamente 70% dos casos de câncer do colo do útero.

No Brasil, o HPV infecta cerca de 10 milhões de pessoas por ano. Estima-se que o câncer de colo do útero represente 10% de todos os tumores malignos em mulheres, sendo o terceiro mais comum na população feminina brasileira, atrás apenas do câncer de pele não melanoma

e do câncer de mama. É a quarta causa de morte por câncer em mulheres e, de acordo com dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA), as estimativas da incidência de câncer no Brasil para o ano de 2006 apontam a ocorrência de 19.260 novos casos de câncer do colo do útero (Instituto Nacional do Câncer, 2005).

Existem aproximadamente 120 tipos de HPV identificados (de Villiers et al., 2004), dos quais mais de 40 infectam o epitélio do trato anogenital e outras regiões mucosas do organismo. Estes tipos de HPV podem ser classificados como de baixo ou alto risco oncogênico (tabela 1), de acordo com sua capacidade em promover transformação maligna.

HPVs de baixo risco	6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81, CP6108
HPVs de alto risco	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59
HPVs potencialmente de alto risco	26, 53, 66, 68, 73, 82

Tabela 1 - Classificação dos tipos de HPV. Adaptado de Muñoz et al., 2006.

Os HPVs de baixo risco oncogênico estão associados a tumores benignos anogenitais, lesões cervicais de baixo grau e, muito raramente, a carcinomas cervicais. Os tipos 6 e 11 são responsáveis por aproximadamente 90% dos casos de verrugas genitais (condylomata acuminata). Infecções clínicas por HPVs de baixo risco são associadas a uma morbidade substancial e demandam altos custos para o tratamento de lesões clinicamente relevantes.

Os HPVs de alto risco, encontrados ocasionalmente na forma clínica da infecção, são verificados em mais de 99% dos tumores cervicais analisados, sendo o HPV-16 o tipo mais freqüente (Walboomers *et al.*, 1999), presente em 50% a 60% dos casos, seguido pelo HPV-18 (aproximadamente 15% dos casos).

Os papilomavírus humanos de alto risco, sobretudo o HPV-16, também estão associados ao desenvolvimento de outros tipos de câncer anogenital e no trato aero-digestivo

superior (tabela 2). No entanto, há poucos estudos epidemiológicos sobre o papel do HPV nestes outros tipos de câncer que não o cervical.

Local	Atribuíveis ao HPV (%)	Países desenvolvidos		Países em desenvolvimento	
		Total	Atribuíveis ao HPV	Total	Atribuíveis ao HPV
Colo do útero	100	83400	83400	409400	409400
Pênis	40	5200	2100	21100	8400
Vulva, vagina	40	18300	7300	21700	8700
Ânus	90	14500	13100	15900	14300
Boca	3	91200	2700	183100	5500
Oro-faringe	12	24400	2900	27700	3300
Total		5016100	111500	5827500	449600

Tabela 2 - Infecções atribuídas ao HPV em 2002. Adaptado de Parkin et al., 2006.

Diversos cofatores aumentam o potencial de desenvolvimento do câncer de colo do útero em mulheres infectadas pelo papilomavírus. Cofatores ambientais ou exógenos envolvem o uso de contraceptivos orais, tabagismo, número elevado de gestações, status nutricional, número de parceiros sexuais e presença de outras doenças sexualmente transmissíveis, como herpes e clamídia. Cofatores virais incluem co-infecção com outros tipos de HPV, carga viral e integração viral. Cofatores do hospedeiro estão relacionados a hormônios endógenos, imunidade e fatores genéticos.

A prevalência de infecções causadas por HPV é mais elevada em mulheres jovens, logo após a iniciação sexual, e tende a cair gradualmente com a idade. Em algumas populações, há um segundo pico na prevalência em mulheres de aproximadamente 50 anos, seguido por um novo declínio. As causas da existência deste segundo pico, embora não muito bem definidas, são atribuídas provavelmente à reativação de infecções latentes adquiridas anteriormente ou à aquisição de novas infecções provenientes de contatos sexuais com novos parceiros (Trottier et al., 2006).

A maioria das infecções genitais por HPV em homens são assintomáticas e não aparentes, e o HPV-16 é o tipo mais comumente detectado (Partridge et al., 2006). A falta de informações epidemiológicas sobre infecções por HPV em homens deve-se, em parte, ao fato de as taxas de morbidade e mortalidade relacionadas a este vírus serem muito mais elevadas em mulheres.

1.1.1. O HPV como agente infeccioso

O HPV é um vírus não envelopado da família *Papillomaviridae*. Seu genoma é composto por uma única molécula de DNA circular de fita dupla combinado com histonas, formando um complexo semelhante a um cromossomo, de aproximadamente 8000 pares de bases, contido num capsídeo viral icosaédrico de 55 nm. O genoma destes vírus pode ser dividido em três regiões principais: tardia, ou “late” (L), precoce, ou “early” (E) e uma região regulatória, LCR, “long control region”, que contém elementos necessários para a regulação da expressão gênica e para a replicação do DNA. Todas as janelas abertas de leitura estão presentes em uma fita. Os genes das regiões “L” e “E” seguem um padrão temporal de expressão (figura 1).

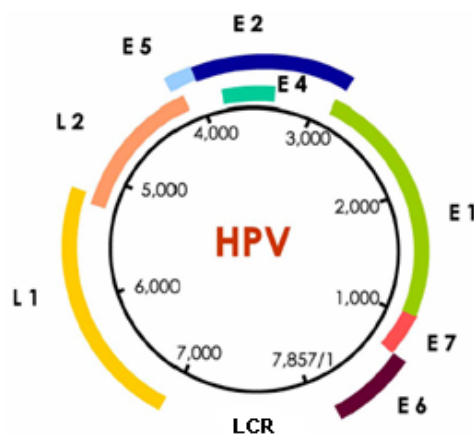


Figura 1: Mapa genômico do HPV. Adaptado de Muñoz et al., 2006.

Os genes L1 e L2, transcritos na etapa tardia do ciclo reprodutivo do vírus, codificam as proteínas do capsídio viral, L1 (proteína principal) e L2 (proteína menor). Os epítomos de neutralização imunodominantes estão localizados na proteína L1. A proteína L2 participa na encapsidação do DNA viral.

Os genes da fase precoce codificam para proteínas não estruturais. O produto do gene E1 possui uma atividade helicase dependente de ATP, necessária para a replicação do DNA viral. A replicação do DNA viral é iniciada após a ligação da proteína E1 a seqüências ricas em AT da origem de replicação (Wilson et al., 2002). A proteína E2 está envolvida no controle da transcrição e também da replicação viral. Em baixos níveis, E2 ativa a transcrição viral, enquanto que em altas concentrações, a transcrição é reprimida. Isto sugere que E2 atue como um regulador de atividades do ciclo celular mediadas por E6 e E7, além de contribuir para o número de cópias. A perda da expressão de E2 está correlacionada com o aumento da proliferação celular induzido por E6 e E7 (Hegde, 2002). A proteína codificada pelo gene E4 associa-se com a rede de queratina celular, provocando sua desestabilização, o que sugere um papel na liberação de partículas virais (Doorbar *et al.*, 2004). A proteína E4 é formada por *splicing* de seqüências de RNA codificando os cinco primeiros aminoácidos de E1 com a janela de leitura E4, formando transcritos E1^{E4}, que são expressos durante todo o ciclo do HPV, porém em maior grau nas camadas suprabasais diferenciadas. E5 é uma proteína hidrofóbica de membrana expressa nos estágios iniciais da infecção viral. Sua expressão modifica a resposta celular a fatores de crescimento e bloqueia a expressão na superfície de moléculas de MHC (Bravo et al., 2005; Alonso *et al.*, 2003). Possui fraca atividade oncogênica, porém é capaz de aumentar a malignização de queratinócitos mediada pela proteína E7 (Bouvard et al., 1994). Os produtos dos genes E6 e E7 são essenciais no processo de transformação e imortalização celular induzidas pelo HPV. A proteína E6 dos papilomavírus de alto risco inativa a proteína supressora de tumor p53, facilitando sua

degradação (Münger *et al.*, 2002). Outros potenciais alvos celulares da proteína E6 foram identificados e, aparentemente, estão também envolvidos nos processos de transformação celular. A proteína E7, entre outras funções, liga-se à forma hipofosforilada da proteína do retinoblastoma (pRB), resultando na inativação desta última, o que permite a progressão para a fase S do ciclo celular. Foi demonstrado que a proteína E7 dos HPVs de baixo risco oncogênico ligam-se a pRB com menor eficiência em relação à E7 dos HPVs de alto risco. O rompimento da região E1 – E2 é necessário para o evento de integração no genoma do hospedeiro e tem como consequência a desregulação do controle transcricional dos genes virais, mais criticamente dos oncogenes E6 e E7 (Peña *et al.*, 2002).

Os papilomavírus infectam queratinócitos basais primitivos, onde sofrem três estágios de replicação. Dentro das camadas epidérmicas basal e primeira suprabasal, o DNA viral é propagado até haver 50 a 100 cópias por célula. Durante o segundo estágio, o estágio de manutenção, a replicação do DNA viral é realizada em sincronia com o ciclo celular do hospedeiro, ocorrendo apenas durante a fase S do ciclo celular deste último. Durante ambos os estágios, o DNA do HPV é mantido como plasmídios epissomais nos núcleos das células infectadas. O terceiro e último estágio é o estágio vegetativo da replicação viral. Este estágio apenas ocorre em tecidos com diferenciação terminal e incluem tanto um aumento no número de cópias do genoma viral, como a expressão dos genes tardios e formação de um novo vírus (Bedell *et al.*, 1991).

O genoma viral encontra-se integrado ao cromossomo do hospedeiro nas linhagens celulares do carcinoma no colo uterino, porém encontra-se na forma epissomal extracromossômico nas lesões benignas (Choo *et al.*, 1987).

Nas infecções produtivas, o tempo entre a infecção e a liberação dos vírus é de aproximadamente três semanas, que corresponde ao tempo necessário para o queratinócito basal sofrer diferenciação completa e descamação. Não há morte citopática ou lise celular

como consequência da replicação do HPV ou da liberação das partículas virais, visto que o queratinócito é uma célula destinada à morte e à descamação, longe dos sítios de vigilância imunológica. Sendo assim, a infecção por HPV não é acompanhada por inflamação e não há um sinal de perigo óbvio para alertar o sistema imune sobre a presença do vírus. Isto pode resultar em infecção crônica, persistente, uma vez que a presença do patógeno não é percebida pelo hospedeiro por longos períodos de tempo (Stanley et al., 2005).

O carcinoma cervical desenvolve-se a partir de lesões precursoras denominadas neoplasias intraepiteliais cervicais (CIN), que são patologicamente classificadas em uma escala de I a III, dependendo da extensão da disrupção da diferenciação epitelial. Estas neoplasias são assintomáticas e podem ser detectadas através de exame citológico como o papanicolaou e confirmadas por biópsia. Se não tratadas, essas lesões podem estender-se por toda a espessura do epitélio cervical (carcinoma cervical *in situ*) e eventualmente tornar-se invasivas. As principais etapas necessárias na carcinogênese cervical incluem infecção por HPV de alto risco, persistência da infecção, progressão para lesões pré-cancerosas e, eventualmente, invasão. Virtualmente, todos os carcinomas cervicais contêm DNA de papilomavírus humanos.

1.1.2. Resposta imune a infecções por HPV

O ciclo de vida do HPV evoluiu de maneira a minimizar sua exposição ao sistema imune do hospedeiro. Entretanto, muitos aspectos da biologia do papilomavírus apontam para a importância da resposta imune na determinação do curso da infecção.

Estudos epidemiológicos sugerem fortemente que a resposta imune a infecções por HPV segue um padrão semelhante. A infecção genital pelo papilomavírus é muito comum em mulheres jovens sexualmente ativas, com prevalências cumulativas de até 80% em alguns

grupos de adolescentes (Brown et al., 2005). A maioria dessas infecções curam-se espontaneamente, isto é, o DNA de um tipo específico de HPV não mais é detectado após um certo período. O tempo médio necessário para a eliminação de HPVs de alto risco, particularmente o HPV-16, é significativamente maior do que para os tipos de baixo risco (Brown et al., 2005; Giuliano et al., 2002; Franco et al., 1999).

No entanto, caso o sistema imune não seja capaz de curar ou de controlar a infecção, uma infecção persistente é estabelecida, geralmente com altos níveis de replicação do DNA viral. Indivíduos com infecção persistente possuem uma maior probabilidade de progressão para neoplasia intraepitelial cervical de alto grau e carcinoma invasivo (Ho et al., 1998).

Uma resposta imune celular está relacionada à regressão de lesões associadas ao papilomavírus. Pacientes com lesões de alto grau e carcinoma cervical geralmente apresentam uma resposta pobre de células T a proteínas virais. Indivíduos com condições que afetam a imunidade mediada por células T, tais como quimioterapia imunossupressiva, infecção por HIV, gravidez ou leucemia, possuem maior risco para infecção persistente por HPV, assim como para o câncer cervical.

Os papilomavírus de alto risco empregam diversas estratégias para escapar do sistema imune do hospedeiro, como a produção de baixos níveis de proteínas virais. Outros estudos demonstraram que algumas proteínas do HPV são capazes de alterar as respostas do sistema imune inato, diminuindo a expressão e inibindo a função de genes induzidos por interferon. Os interferons do tipo I, α e β , são citocinas secretadas por células infectadas por vírus em resposta ao reconhecimento de componentes virais.

A geração de anticorpos neutralizantes ocorre na maioria dos indivíduos infectados, porém não em todos, e são direcionados contra epítopos conformacionais da proteína L1. A proteção é tipo-específica, embora tenha sido observada proteção cruzada entre os tipos 18 e 45, 31 e 33, 6 e 11.

Os títulos de anticorpos gerados após infecções naturais pelo HPV são baixos (Villa et al., 2005), o que provavelmente reflete o ciclo infeccioso exclusivamente intraepitelial, assim como a produção de partículas virais nas células epiteliais superficiais, distantes de células apresentadoras de antígenos e macrófagos. Ainda assim, esses anticorpos neutralizantes são considerados protetores contra novas infecções com o mesmo tipo viral.

1.1.3 – Proteína L1

L1 é uma proteína de 55 kDa que compõe o capsídio viral em uma conformação de 72 pentâmeros, também denominados capsômeros (figura 2, A e B). A união destes capsômeros em um arranjo icosaédrico constitui o capsídio de HPV, que possui diâmetro de aproximadamente 55 nm e aparência esférica à microscopia eletrônica. A proteína L1 é a proteína principal do capsídio, presente em uma proporção de 30 moléculas para cada molécula de L2 (Kirnbauer et al., 1993). A proteína L1 representa aproximadamente 80% da proteína viral total.

A proteína L1 apresenta uma propriedade intrínseca de se auto-montar em uma estrutura semelhante ao capsídio viral, ou “virus-like particles” (VLPs), quando expressa em sistemas eucarióticos (Kirnbauer et al., 1992) e em alguns sistemas procarióticos (Nardelli-Haefliger et al., 1997; Aires et al., 2006). As VLPs são morfológicamente indistinguíveis dos autênticos vírions icosaédricos (figura 2 C), com exceção de que elas são desprovidas do genoma potencialmente oncogênico.

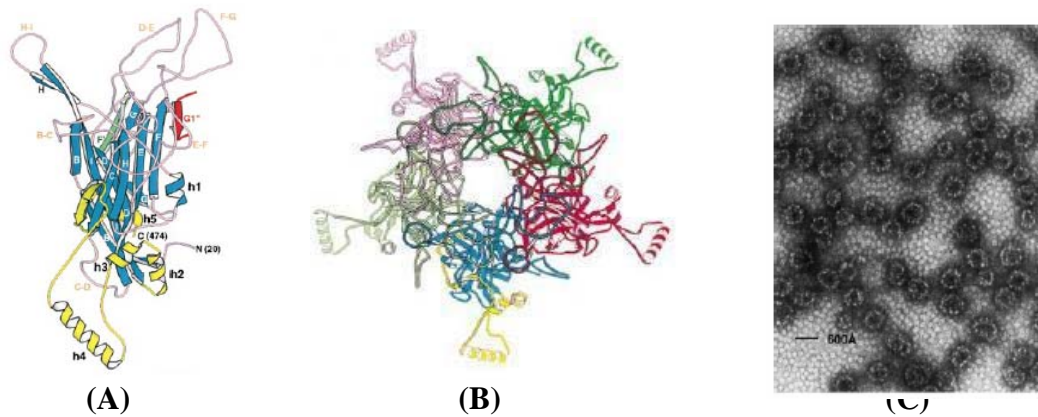


Figura 2: **A.** O monômero L1. **B.** Pentâmero de L1. **C.** “Virus-like particles”. Adaptado de Chen et al., 2000.

Diferentes abordagens de expressão da proteína L1 de HPV-16 foram realizadas: em bactérias, tais como *Salmonella typhimurium* (Nardelli-Haefliger et al., 1997), *Escherichia coli* (Chen et al., 2001), *Shigella flexneri* (Yang et al., 2005), *Lactobacillus casei* (Aires et al., 2006); em leveduras, como *Saccharomyces cerevisiae* (Carter et al., 1991), *Schizosaccharomyces pombe* (Sasagawa et al., 2005); em células de inseto infectadas com vetor baculovírus (Le Can et al., 1994); em plantas transgênicas, como tabaco e batata (Biemelt et al., 2003); e em células de mamífero (McLean et al., 1990).

Chen et al. (2000) mapearam seqüências da proteína L1 de 49 tipos de HPV para verificar a relação entre estrutura e variação de seqüência. O alinhamento demonstrou regiões altamente variáveis intercaladas entre segmentos de resíduos conservados. Foi sugerido que esse padrão de variabilidade observado deva-se à seleção para evasão do sistema imune do hospedeiro.

1.1.4 – Vacinas profiláticas contra o HPV

Na maioria dos países em desenvolvimento, o controle do câncer cervical através de programas de triagem, como a realização de exames tipo papanicolaou, não tem sido muito efetivo devido aos altos custos a eles associados. Dessa forma, o desenvolvimento de vacinas para prevenir infecções pelo HPV tem se tornado uma questão fundamental. A produção de uma vacina eficiente contra HPVs de alto risco pode levar a uma grande redução nas taxas de incidência e mortalidade do câncer de colo de útero.

Atualmente, há uma imensa variedade de estudos sobre vacinas profiláticas e terapêuticas contra o HPV. As vacinas terapêuticas são baseadas na indução de imunidade celular contra células expressando antígenos virais, visando à regressão de lesões associadas ao HPV. As proteínas não estruturais E6 e E7 são alvos da maioria dessas vacinas, uma vez que são proteínas consistentemente expressas em células de tumores associados ao papilomavírus (Mantovani et al., 2001; Munger et al., 2001). Alguns estudos com a proteína E5 do HPV-16 demonstraram redução de crescimento de tumores em animais (Liu et al., 2000; Chen et al., 2004). Mais recentemente, estudos tendo como alvo a proteína E2 também têm se mostrado eficazes na regressão de lesões pré-cancerosas associadas à infecção por papilomavírus (García-Hernández et al., 2006; Corona Gutierrez et al., 2004).

As vacinas profiláticas são baseadas na indução de anticorpos neutralizantes capazes de prevenir a infecção pelo HPV. Para isso, os antígenos utilizados baseiam-se nas proteínas estruturais do capsídio viral, L1 e L2. O desenvolvimento de uma vacina tradicional baseada no vírus morto ou atenuado não é possível, em parte devido à falta de sistemas que permitam a obtenção de grandes quantidades de partículas virais. Embora L2 apresente alguns epítomos capazes de induzir a produção de anticorpos neutralizantes, a maioria dos anticorpos neutralizantes induzidos por VLPs formadas por L1 e L2 reconhecem predominantemente

epítomos de L1 (Lowy et al., 2004), demonstrando o potencial imunogênico e protetor de VLPs formadas apenas pela proteína principal do capsídio do HPV.

Anticorpos neutralizantes contra papilomavírus são altamente tipo-específicos (Roden et al., 1996). A neutralização do capsídio viral pode ocorrer de dois modos distintos: alguns anticorpos bloqueiam a ligação à célula, provavelmente por interferência estérica com o sítio do receptor (Roden et al., 1994); outros anticorpos inibem provavelmente a descapsidação e, conseqüentemente, a liberação do DNA viral no núcleo (Booy et al., 1998).

A proteína L2 possui regiões mais conservadas entre os diferentes genótipos de papilomavírus humanos. Estudos de imunização em modelo animal com a proteína L2 de HPV-16 demonstraram neutralização cruzada com os HPVs dos tipos 6 e 18 (Roden et al., 2000). Um estudo clínico no qual humanos foram imunizados com um peptídeo de apenas 13 aminoácidos da proteína L2 de HPV-16 demonstrou neutralização cruzada com HPV-52 (Kawana et al., 2003). Kondo et al. (2007) demonstraram que anticorpos neutralizantes contra peptídeos de L2 de HPV-16 foram capazes de neutralizar HPVs dos tipos 18, 31 e 58 em animais imunizados. Esses estudos representam uma estratégia para a geração de vacinas com espectro mais amplo contra papilomavírus genitais. No entanto, como L2 é antigenicamente subdominante a L1 no capsídio viral, a grande maioria dos estudos de vacinas profiláticas tem como alvo preferencial a proteína L1.

As VLPs de L1 constituem excelentes candidatos a vacinas profiláticas, na medida em que previnem infecções e a neoplasia epitelial a elas associadas. As VLPs são capazes de induzir a formação de anticorpos neutralizantes sistêmicos e de mucosa, além de induzir imunidade celular em animais imunizados (Liu *et al.*, 1998).

Animais vacinados com VLPs de L1 dos papilomavírus homólogos (papilomavírus de coelho, canino e bovino) foram protegidos frente a desafio experimental (Breitburd et al., 1995; Suzich et al., 1995; Kirnbauer et al., 1996), o que evidenciou que uma vacina contra o

HPV baseada em VLPs seria um candidato atraente para a profilaxia contra infecções associadas a este vírus.

A proteína L1 em sua forma pentamérica também mostrou ser um importante candidato vacinal, na medida em que reproduz características antigênicas dos vírions nativos. Os domínios antigênicos do capsídio do HPV estão inteiramente contidos dentro dos capsômeros. Estudos de imunização com capsômeros de L1 demonstraram que essas estruturas foram capazes de gerar anticorpos neutralizantes virais em modelos animais (Rose et al., 1998), indicando que a formação de uma estrutura complexa como as VLPs não é estritamente necessária para a indução de uma resposta imune por parte do hospedeiro. Neste estudo, os capsômeros utilizados para gerar os anticorpos eram desprovidos de 86 aminoácidos da porção C-terminal de L1, que é responsável por mediar os contatos entre pentâmeros. Dessa forma, os resultados obtidos não podem ser atribuídos à remontagem dos capsômeros em capsídios. Öhlschläger et al. (2003) demonstraram que capsômeros de L1 de HPV-16 foram capazes de induzir a produção de anticorpos neutralizantes após imunização intranasal de camundongos.

Estudos com vacinas de DNA contendo o gene L1 de HPV-16 demonstraram produzir resposta imune humoral e celular específicas após imunização de animais via intranasal (Dupuy et al., 1999), intramuscular, oral ou subcutânea (Rocha-Zavaleta et al., 2002). A imunogenicidade foi aumentada quando um plasmídeo contendo o gene com códons otimizados para expressão em células de mamíferos foi utilizado (Cheung et al., 2004).

Outras abordagens empregando a proteína L1 têm sido testadas, inclusive a utilização de VLPs como veículos para a apresentação de genes encapsidados ou de epítopos heterólogos expostos na superfície (Xu et al., 2006), inclusive de proteínas oncogênicas do próprio papilomavírus (Greenstone et al., 1998), neste caso criando uma ação profilática e terapêutica combinada.

Atualmente, encontra-se disponível no mercado a vacina desenvolvida pela Merck&Co. (Gardasil[®]), que consiste na proteína L1 dos HPV's tipo 6, 11, 16 e 18, produzida na levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Em fase final de estudos clínicos está a vacina composta por VLPs formadas pela proteína L1 de HPV-16 e 18 obtidas através de sistemas de expressão em células de inseto *Spodoptera frugiperda* (Cervarix[®], GlaxoSmithKline Biologicals). Os estudos de ambas as empresas demonstraram resultados semelhantes em relação à elevada eficácia das vacinas em prevenir infecções contra os respectivos tipos de HPV e lesões cervicais relacionadas aos tipos de alto risco, o que sugere que a imunização pode realmente reduzir a incidência do câncer cervical.

Estudos clínicos após 5 anos de acompanhamento de mulheres vacinadas com a vacina quadrivalente demonstraram que a incidência de infecção persistente relacionada a HPV's dos tipos 6, 11, 16 e 18 foi reduzida em 96%. Não houve casos de displasia cervical pré-cancerosa ou verrugas genitais associadas aos HPV's 6, 11, 16 e 18. Durante os 5 anos, os títulos de anticorpos anti-HPV induzidos pela vacina permaneceram iguais ou superiores aos que ocorreriam após infecção natural (Villa et al., 2006a).

A vacina comercializada pela Merck no Brasil possui um custo mínimo de R\$ 820,00. Apesar de a vacina estar disponível no setor privado, um grande impacto na redução da morbidade e da mortalidade associadas ao HPV só ocorreria em caso de uso regular pelo sistema público de saúde. O preço elevado torna sua incorporação pelo Sistema Único de Saúde um processo economicamente inviável. Dessa forma, devem ser buscadas alternativas para a produção de uma vacina eficaz e de baixo custo, que possa ser acessível para a maioria da população brasileira.

1.2 – Sistemas de expressão em levedura

Sistemas de expressão em leveduras oferecem vantagens consideráveis em relação a sistemas procarióticos ou a outros sistemas eucarióticos. Leveduras não são partículas pirogênicas, são capazes de secretar proteínas e realizar processos de modificação relacionados à secreção. Como um sistema microbiano eucariótico, combinam a facilidade de manipulação genética e crescimento relativamente rápido a altas densidades celulares em meios relativamente simples (Gellissen, 2000). Possuem genoma de pequeno tamanho, cerca de 200 vezes menor que o de mamíferos, o que simplifica análises moleculares e genéticas.

Um número limitado de espécies pertencentes ao gênero *Hansenula*, *Candida*, *Torulopsis* e *Pichia* é capaz de crescer utilizando metanol como única fonte de carbono. Estas leveduras metilotróficas são utilizadas como poderosos sistemas de expressão para um número crescente de aplicações biotecnológicas. Os sistemas de produção dependem de linhagens adequadas e componentes eficazes derivados, na maioria, dos genes envolvidos no metabolismo do metanol. Além disso, em leveduras metilotróficas, os vetores utilizados para transformação são integrados ao genoma de forma estável, proporcionando um processo consistente de produção (Gellissen, 2000).

As espécies *Hansenula polymorpha* e *Pichia pastoris* demonstraram ser hospedeiros eficientes para a expressão de genes heterólogos, resultando na produção em larga escala de uma variedade de proteínas recombinantes. Dessa forma, têm sido muito utilizadas nas últimas décadas. São espécies atrativas, pois o uso do metanol como única fonte de carbono requer um único conjunto de enzimas metabolizadoras do metanol, cuja produção é estritamente regulada. A enzima melhor caracterizada é a álcool oxidase, que catalisa a primeira etapa da via de utilização do metanol, a oxidação deste composto a formaldeído.

As reações iniciais do metabolismo do metanol ocorrem em microcorpúsculos especializados, os peroxissomos, seguidas por etapas metabólicas subseqüentes no

citoplasma. O metanol entra nos peroxissomos, onde é oxidado por oxidases específicas, gerando formaldeído e peróxido de hidrogênio, que é decomposto a água e oxigênio molecular pela catalase (Gellissen, 2000). Genes que codificam as oxidases foram identificados e clonados. A espécie *Pichia pastoris* contém dois genes, denominados AOX1 e AOX2 (álcool oxidase 1 e 2, respectivamente). A enzima AOX2 possui a mesma atividade específica que a AOX1, porém seu nível de expressão é muito menor, devido ao fato de seu promotor ser mais fraco. No caso da espécie *Hansenula polymorpha*, um único gene que codifica a oxidase está presente, denominado MOX (metanol oxidase) ou AOX (álcool oxidase). A enzima álcool oxidase possui baixa afinidade por oxigênio e esta característica é compensada pela sua maior expressão pelo promotor AOX1 (ou AOX, no caso de *H. polymorpha*) para produzir grandes quantidades da enzima, cuja abundância pode chegar a até 30% do conteúdo de proteína celular total quando o metanol é utilizado como única fonte de carbono. Sendo assim, os fortes promotores AOX1 e AOX podem ser utilizados para direcionar a expressão de proteínas recombinantes a altos níveis. Estes promotores podem ser “desligados”, quando fontes de carbono em quantidades não limitantes, como a glicose, causam sua repressão no nível transcricional, minimizando a possibilidade de seleção de mutantes que não expressam a proteína heteróloga. A produção de proteínas eventualmente tóxicas para a célula pode ser conseguida ao submeter as culturas inicialmente a crescimento em condições repressoras e então induzir a expressão após uma elevada biomassa ter sido alcançada.

Uma ampla variedade de vetores de expressão para *P. pastoris* e *H. polymorpha* encontra-se disponível. Os plasmídios são geralmente direcionados a loci genômicos específicos ou integrados aleatoriamente, porém há vetores que permanecem episossomais, devido à presença de uma seqüência de replicação autônoma. Os vetores integrativos devem ser linearizados antes da transformação, pois as extremidades do DNA são substratos

favoráveis para enzimas de recombinação. Vetores lineares podem gerar transformantes estáveis via recombinação homóloga entre seqüências compartilhadas pelo vetor e pelo genoma do hospedeiro (Orr-Weaver et al., 1981). Por esse motivo, a linearização do plasmídeo é normalmente realizada na seqüência do promotor ou do marcador de prototrofia. Plasmídios linearizados em regiões que não possuem homologia com o DNA cromossomal são geralmente recircularizados por sistemas de reparo de quebras de dupla fita (Faber et al., 1992).

A crescente descoberta de elementos genéticos regulatórios relevantes permitiu a transformação de muitas das espécies metilotróficas em poderosos sistemas de expressão para um número crescente de aplicações biotecnológicas. Há atualmente uma grande variedade de proteínas produzidas em leveduras metilotróficas, que inclui anticorpos, citocinas, enzimas, hormônios, além de proteínas de bactérias, vírus, invertebrados e plantas (Gellissen, 2000).

A espécie *Hansenula polymorpha* apresenta algumas vantagens específicas em relação a outras leveduras metilotróficas, sendo mais termotolerante e capaz de crescer a taxas mais elevadas. A temperatura ótima de crescimento relativamente alta (37 – 43°C, versus 30°C para *P. pastoris*) pode ser favorável para a produção de algumas proteínas, como de mamíferos, por exemplo (van Dijk et al., 2000).

A segurança e conveniência desses sistemas de expressão oferecem processos competitivos para a produção de compostos industriais. Deve-se destacar que a vacina recombinante contra o vírus da Hepatite B produzido no Instituto Butantan, que hoje faz parte do programa de vacinação do Ministério da Saúde, é produzida utilizando-se a levedura *Hansenula polymorpha*.

2. OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo a expressão da proteína L1 de HPV-16, utilizando para tal propósito sistemas de expressão baseados em leveduras metilotróficas como *Hansenula polymorpha* e *Pichia pastoris*. Como parte integrante do projeto, foram realizadas as seguintes etapas:

- Clonagem dos genes L1 selvagem e sintético de HPV-16 nos vetores de expressão pHIPX7, pHIPX4, pPICHOLI®;
- Determinação de um esquema de expressão da proteína recombinante L1;
- Purificação da proteína heteróloga;
- Caracterização da proteína L1 quanto ao seu potencial de formar VLPs quando expressa;
- Caracterização da proteína L1 quanto à presença de epítomos conformacionais superficiais;

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Linhagens de Microorganismos Utilizadas

- *Escherichia coli* DH5 α (Life Technologies[®]): genótipo [*F* Φ 80*lacZ* Δ M15 Δ (*lacZYA-argF*)U169 *recA1 endA1 hsdR17*(r_k⁻, m_k⁺) *phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1* λ]. Esta linhagem possibilita a realização de manipulações genéticas, como propagação e amplificação de DNAs plasmidiais provenientes de ligações de produtos de PCR no vetor pGEM-T easy[®] e de clonagens de genes de interesse nos vetores de expressão.

- *Hansenula polymorpha* NCYC495 (*leu 1.1*): esta linhagem, gentilmente cedida pelo Dr. Meis van der Heide (Universidade de Groningen, Holanda), possui uma mutação no gene *leu2*, o que a impede de sintetizar o aminoácido leucina. Foi utilizada para a expressão da proteína L1 de HPV-16.

- *Pichia pastoris*: As linhagens GS115 (*his4*) e KM71 (*his4, aox1::ARG4, arg4*), ambas patenteadas pela Invitrogen, possuem mutação no gene *histidinol desidrogenase (his4)*, o que as impede de sintetizar o aminoácido histidina. A cepa KM71 contém o gene AOX1 não funcional e depende da enzima álcool oxidase produzida pelo gene AOX2. As taxas de consumo de metanol nesta linhagem são baixas, portanto seu fenótipo é denominado “methanol utilization slow” (Mut^s). A linhagem parental de KM71 possui o gene *argininosuccinato liase (arg4)* mutado, o que a impediria de crescer na ausência de arginina. Porém, o gene *arg4* selvagem foi utilizado para causar a disrupção do gene *aox1*, criando a linhagem Mut^s Arg⁺ His⁻. Ambas as linhagens foram utilizadas para expressão da proteína L1 de HPV-16.

3.2 Soluções e meios de cultura utilizados

3.2.1 Soluções

1. Solução tampão TAE (tris-acetato-EDTA) 10x: Tris base 400 mM, ácido acético 190 mM, EDTA 10 mM, pH 7,6.
2. Solução tampão de amostra para DNA *Ficoll Dye* 10x: azul de bromofenol 0,2% (m/V), xileno cianol 0,42% (m/V), glicerol 50% (v/v).
3. Solução tampão Tris-glicina 5x: Tris base 1,5% (m/v), glicina 9,4% (m/v), SDS 0,5% (m/v).
4. Solução tampão de amostra para SDS-PAGE 10x: Tris-HCl 1M pH 6,8, SDS 10% (m/v), azul de bromofenol 0,5% (m/v), glicerol 50% (v/v) e b-mercaptoetanol 1 M.
5. Solução tampão de lise celular: PBS 1x, EDTA 1 mM, glicerol 5% (v/v).
6. PBS (solução tampão fosfato): NaCl 3 mM, KCl 27 mM, Na₂HPO₄ 100 mM, KH₂PO₄ 14 mM, pH 7,4.
7. PBST: solução tampão PBS, Tween[®] 20 0,05% (v/v).
8. Solução de transferência: Tris-glicina 1x, SDS 1% (m/v), etanol 20%.

3.2.2. Meios de Cultura

1. 2YT: triptona 1,6% (m/v), extrato de levedura 1% (m/v), cloreto de sódio 0.5% (m/v).
2. 2YT ágar: meio 2YT, ágar 1,5% (m/v).
3. LB: meio de cultura para bactérias composto por triptona 1% (m/v), extrato de levedura 0.5%(m/v) e cloreto de sódio 0.5% (m/v).
4. LB ágar: meio LB, ágar 1,5% (m/v).
5. YP: extrato de levedura 1%, triptona 1%.
6. YPD: meio YP, glicose 2%.

7. YNB: yeast nitrogen base (com sulfato de amônio, sem aminoácidos) 1,34%.
8. YND: YNB, glicose 2%.
9. BMMY: extrato de levedura 1%, triptona 1%, “yeast nitrogen base” com sulfato de amônio 1,34%, histidina 0,004%, biotina 4×10^{-5} %, tampão fosfato de potássio 100 mM pH 6,0, zeocina 100 $\mu\text{g/mL}$.

3.3. Gene L1 selvagem de HPV-16

3.3.1. Clonagem do gene L1 de HPV-16 nos vetores de expressão

O gene L1 de HPV 16, clonado num vetor de baculovírus, pEVmod, foi gentilmente cedido pela Dra. Luísa Lina Villa (Instituto Ludwig, São Paulo). Oligonucleotídeos complementares à seqüência de L1 já haviam sido desenhados para amplificação do gene de 1593 pares de bases por PCR (Aires et al, 2006).

3.3.1.1. Manipulação do gene

a) Reação de amplificação do gene L1:

Para a amplificação do gene L1 por PCR, em uma reação com volume final de 50 µL, utilizou-se cerca de 10 ng de DNA, 5U da enzima *Pfx* DNA Polimerase (Invitrogen), 0,2 mM de dNTP mix, 0,4 pmoles dos oligonucleotídeos L1 *forward* (5' ATG CAT GCC GGC ATG TCA CTT TGG CTG CCA AGT 3') e L1 *reverse* (5'AGA TCT TTA CAG CTT ACG CTT CTT G 3'), tampão de reação 1x e 1,5 mM de MgSO₄. A reação foi realizada com temperatura de desnaturação de 94°C durante 5 min e 35 ciclos de: 94°C por 30 segundos; 50°C por 30 segundos; 68°C por 2 minutos, finalizando com 68°C por 5 minutos.

O produto da reação de PCR foi submetido a eletroforese em gel de agarose 1%, em tampão TAE 1x, e purificado com o kit *GFX DNA and Gel Band Purification*[®] (GE Healthcare), conforme instruções do fabricante. Em seguida, o produto foi incubado com dATP na presença de Taq DNA Polimerase (Invitrogen) para viabilizar a sua ligação ao vetor pGEM-T easy[®] (Promega). Em uma reação com volume final de 50 µL, realizada a 72 °C

durante 30 min, foram utilizados aproximadamente 10 ng do DNA, 5U da enzima *Taq* DNA Polimerase[®], MgCl₂ 1,5 mM, dATP 0,2 mM e tampão de reação 1x. A enzima *Taq* DNA Polimerase ancora, nas extremidades do DNA, o nucleotídeo deoxiadenina trifosfato. O DNA em solução foi purificado com o kit *GFX DNA and Gel Band Purification*[®] (GE Healthcare).

b) Reação de ligação

A reação de ligação do produto de PCR com o vetor pGEM-T easy[®] foi realizada a 16°C por 16 horas. Foram utilizados 200 ng do DNA e 50 ng do vetor pGEM-T easy[®], 5U de T4 DNA Ligase (Invitrogen) e tampão de reação 1x, em um volume final de 20µL.

c) Transformação de bactérias competentes

Um volume de 10 µL do produto da reação de ligação foi usado para transformar bactérias *E. coli* DH5α quimiocompetentes. A mistura foi incubada em gelo por 30 minutos, submetida a choque térmico (42°C) por 2 minutos e novamente incubada em gelo por 5 minutos. Após adição de 350 µL de meio 2YT, a mistura foi incubada a 37°C por 90 minutos e plaqueada em meio 2YT ágar, contendo 100 µg/mL de ampicilina. As placas foram incubadas a 37°C por 16 horas.

d) Seleção de clones recombinantes

A detecção de clones positivos foi realizada através da análise da diferença de migração dos plasmídios bacterianos recombinantes e do vetor vazio em gel de agarose (Beuken et al, 1998). Colônias resistentes à ampicilina foram crescidas em meio líquido 2YT por 16 horas, sob agitação a 150 rpm. Uma alíquota de 400 µL de cada cultura foi centrifugada. Após o descarte do sobrenadante, foram adicionados 100 µL de tampão *Ficoll dye* 2x e 38 µL de uma mistura de fenol-clorofórmio 1:1 (v/v) ao precipitado bacteriano. Após

agitação em vórtex por 20 segundos e centrifugação por 2 minutos a 13000 rpm, uma alíquota de 20 µL do sobrenadante foi aplicada em gel de agarose 1% (m/v) contendo 0,5 g/L de brometo de etídio, em tampão TAE 1x. Através da diferença de mobilidade eletroforética dos DNAs plasmidiais, foram selecionados alguns clones positivos para purificação e seqüenciamento.

e) Mini-preparações plasmidiais

Clones positivos de *E. coli* DH5α crescidos em meio sólido 2YT contendo ampicilina foram inoculados em 5 mL de meio líquido 2YT com 100 µg/mL de ampicilina e incubados a 37°C por 16 horas, sob agitação a 150 rpm. Uma fração de 4 mL de cada cultura foi centrifugada e o precipitado bacteriano foi tratado com reagentes do kit *GFX Micro Plasmid Prep*[®] (GE Healthcare), conforme as instruções do fabricante, para a purificação do DNA plasmidial.

f) Seqüenciamento de DNA

Uma alíquota das mini-preparações plasmidiais contendo 300 ng de DNA foi utilizada em reação de seqüenciamento utilizando o kit BigDye[®] pelo método do dideoxinucleotídeo. Foram utilizados oligonucleotídeos *M13 forward* ou *M13 reverse* como iniciadores. O seqüenciamento foi realizado em seqüenciador automático (ABI 3100).

3.3.1.2. Vetor pHIPX7

O vetor pHIPX7, de 7065 pares de bases, foi gentilmente cedido pelo Dr. Meis van der Heide, da Universidade de Groningen, Holanda. Possui, entre outros elementos, o promotor constitutivo TEF, do gene *EFA-1* (fator de alongação da tradução), o gene *leu2*, que codifica para a proteína β -isopropilmalato desidrogenase, envolvida na via biossintética da leucina, uma origem de replicação de *E. coli* e o gene de resistência ao antibiótico canamicina, para a seleção genética em *E. coli* (figura 2).

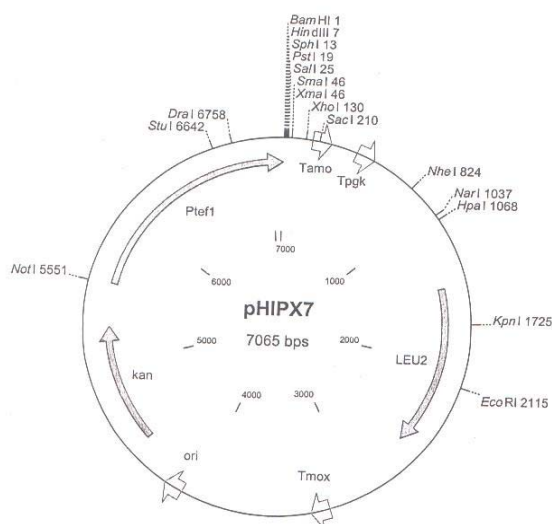


Figura 3: Vetor pHIPX7 de expressão em *H. polymorpha*, baseado no promotor constitutivo TEF1.

a) Clonagem de L1 no vetor pHIPX7:

Foi realizada a digestão da construção pGEM T-easy[®]/L1 com a enzima *BglII*, por 90 minutos, a 37°C. Aproximadamente 5 μ g de DNA foram incubados com 10 U da endonuclease. Após preenchimento com 1 U de *Klenow* (Invitrogen) e dNTP (1,1mM) com a finalidade de obter extremidades cegas, foi realizada digestão com *NsiI*, nas mesmas condições descritas previamente, para liberação do gene L1. O vetor pHIPX7 foi digerido nos sítios *PstI* e *SmaI*, nas mesmas condições descritas anteriormente. A enzima *SmaI* cliva a

dupla fita de DNA deixando as extremidades cegas. Já a enzima *PstI* cliva o DNA de forma a gerar extremidades coesivas com as geradas após digestão com *NsiI*.

Após eletroforese em gel de agarose 0,75%, os fragmentos correspondentes a L1 e pHIPX7 foram purificados com o kit *GFX DNA and Gel Band Purification*[®] (GE Healthcare). Para a reação de ligação, foram utilizados 150 ng do fragmento L1 e 50 ng do vetor pHIPX7 digerido, 5 U da enzima T4 DNA Ligase e 4 µL do tampão de ligação 5x, totalizando 20 µL de volume final. A reação foi incubada durante 16 horas a 16°C e, após este período, 10 µL foram utilizados para transformar *E. coli* DH5α quimiocompetentes, que foram plaqueadas em meio ágar LB suplementado com 50 µg/mL de canamicina.

Após seleção de clones positivos por fenol-clorofórmio, mini-preparações plasmidiais foram realizadas e as construções foram submetidas a seqüenciamento, conforme métodos previamente descritos, utilizando oligonucleotídeo senso que anela no final da região do promotor TEF1.

b) Transformação de *H. polymorpha* com pHIPX7/L1:

Aproximadamente 10 µg de DNA plasmidial, obtidos por protocolo de midi-prep, foram linearizados através de digestão com 20 U da enzima *Hpa* I, por 120 minutos a 37°C. O produto de digestão foi purificado após tratamento com fenol-clorofórmio: foi adicionado ao produto de digestão um volume de fenol-clorofórmio (1:1) igual ao volume da amostra. A mistura foi submetida a agitação em vórtex por 20 segundos e centrifugada em seguida a 12000g, durante 5 minutos. A fase aquosa foi transferida para um outro tubo, ao qual foi adicionado novamente o mesmo volume de fenol-clorofórmio. Após repetição das etapas subseqüentes, o ácido nucléico foi precipitado com etanol e acetato de amônio 1,5M, a -20°C, durante 12 horas. Após este período, a amostra foi centrifugada a 4°C, durante 15 minutos, a

12000g. O precipitado foi lavado com etanol 70%, centrifugado novamente e ressuspensão em água.

Foram adicionados 5 µg do DNA linearizado a 60 µL de células competentes de *H. polymorpha* NCYC 495 (*leu* 1.1) em cubeta de eletroporação de 2 mm. Após o pulso (1,5 kV, 200Ω, 25 µF), foram adicionados 940 µL de YPD (meio rico composto por extrato de levedura 1%, peptona 1%, glicose 2%) à cubeta e a cultura foi transferida para um tubo plástico estéril de 2 mL e incubada a 37°C, sob agitação a 250 rpm.

Parte da cultura foi plaqueada em meio mínimo YND ágar sem leucina após 1 hora e parte foi plaqueada após 4 horas, após serem submetidas a centrifugação a 7000 rpm por 2 minutos e lavagem com YNB por 4 vezes. As placas foram incubadas por até 4 dias a 37°C.

c) Expressão de L1 e lise celular:

Colônias de diferentes tamanhos foram selecionadas e crescidas por aproximadamente 50 gerações em 20 mL de meio rico YPD (contendo 100 µg/mL de ampicilina para prevenir contaminação bacteriana), de maneira que o meio fosse renovado a cada 12 horas, aproximadamente. Este procedimento permite que apenas as células que apresentarem o DNA exógeno integrado em seus genomas sejam capazes de crescer em meio mínimo após 50 gerações, uma vez que o crescimento em meio rico é desprovido de qualquer forma de pressão seletiva permite que o DNA episomal eventualmente presente, não seja propagado às próximas gerações.

Após esse período, as culturas foram centrifugadas a 7000 rpm por 5 minutos e diluídas em meio YND (diluições a 10^{-3} , 10^{-4} e 10^{-5}). Um volume de 50 µL de cada diluição foram plaqueados em meio ágar YND e as placas foram incubadas por 3 dias a 37°C. Dezesete colônias foram escolhidas para verificação da presença do gene L1 integrado no DNA genômico, isolado de acordo com o protocolo descrito em Tomita *et. al.* (2002). A

reação de PCR foi realizada nas seguintes condições: desnaturação a 95°C por 4 minutos, 35 ciclos de 95°C (30 segundos), 50°C (30 segundos) e 72°C (1,5 minutos), finalizando com 72°C por 3 minutos. Para uma reação de 50 µL, foram utilizados aproximadamente 1 µg do DNA genômico, 5U da enzima *Taq* DNA Polimerase (Invitrogen), MgCl₂ 1,5 mM, dNTP 0,2 mM, primer L1 *forward* 0,4 pM, primer L1 *reverse* 0,4 pM, tampão de reação 1x. As amostras foram então submetidas a eletroforese em gel de agarose 1%.

Foram escolhidas 14 colônias para verificação da expressão protéica: 7 clones foram inoculados em 5 mL de YPD cada e outros 7, em mesmo volume de YND cada. Após 24 horas, as células foram centrifugadas por 5 minutos a 6000 rpm e ressuspensas em 10 mL de meio fresco (mantendo a distribuição dos meios entre cada clone). 24 horas depois, as culturas foram submetidas à centrifugação a 2000 g a 4°C. Após descarte do sobrenadante, o centrifugado foi ressuspense em 300 µL de tampão de lise contendo 1mM de PMSF e coquetel de inibidores de proteases. Após adição de 0,5 a 1 volume de mini pérolas de vidro (0,5 mm), foram efetuados 8 ciclos de agitação em vórtex durante 30 segundos, seguido de 30 segundos de incubação no gelo. Os lisados foram clarificados por centrifugação a 2000 g durante 10 minutos a 4°C e congelados a -20°C.

d) Análise da expressão de L1 por Western-blotting:

Os extratos totais foram separados por eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida 10%, sob condições desnaturantes e transferidos para membranas de nitrocelulose. As membranas foram bloqueadas por 12 horas a 4°C em solução de PBST suplementada com leite desnatado 10% (m/v) e incubadas por 90 minutos a temperatura ambiente com anticorpo monoclonal anti-L1 de HPV-16 Camvir[®] (Chemicon). As membranas foram lavadas 3 vezes com PBST por 10 minutos e então incubadas com anti-IgG de camundongo gerado em cabra conjugado à peroxidase (Sigma) e diluída em PBST contendo leite desnatado 5%, por 1 hora a

temperatura ambiente. Após 3 lavagens em PBST, as membranas foram reveladas com reagente de quimioluminescência ECL[®] (GE Healthcare) e expostas a filme de raios-X.

3.3.1.3. Vetor pHIPX4

O vetor de expressão pHIPX4, de 7076 pares de bases, possui o promotor AOX de *H. polymorpha*, fortemente induzido por metanol. Os demais elementos genéticos são os mesmos dos descritos para o vetor pHIPX7.

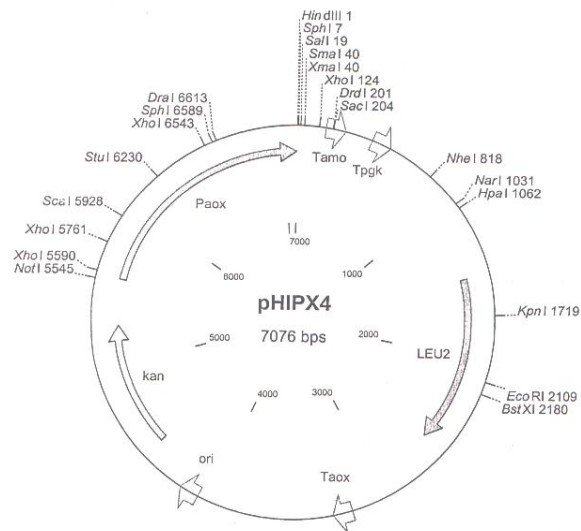


Figura 4: O vetor pHIPX4, para expressão de proteínas heterólogas em *H. polymorpha* sob a regulação do promotor AOX.

a) Clonagem de L1 no vetor pHIPX4:

Devido à limitação de sítios de restrição no sítio múltiplo de clonagem deste vetor, foram digeridos os sítios *HindIII* e *KpnI* do vetor pHIPX7/L1 e o fragmento foi ligado ao vetor pHIPX4 digerido com as mesmas enzimas. As reações de digestão e ligação foram realizadas nas mesmas condições descritas anteriormente, assim como as etapas subseqüentes

de transformação de *E. coli* DH5 α , seleção de clones positivos e mini-preparações plasmidiais. Para a realização da reação de seqüenciamento, foi utilizado um oligonucleotídeo que anela no final da seqüência do promotor AOX.

b) Transformação de *H. polymorpha* com pHIPX4/L1:

Aproximadamente 10 μ g da construção pHIPX4/L1 foram linearizados após digestão com 20 U da endonuclease *Hpa* I, por 120 minutos, a 37°C. O produto de digestão foi purificado através de tratamento com fenol-clorofórmio.

O procedimento de transformação de *H. polymorpha* com o vetor pHIPX4/L1 foi o mesmo empregado na transformação com pHIPX7/L1.

c) Indução da expressão de L1 e lise celular:

Neste caso, foram utilizados os mesmos protocolos de crescimento em YPD por 50 gerações e seleção de colônias, conforme anteriormente descrito.

Vinte e duas colônias foram escolhidas para verificação da presença do gene L1 integrado no DNA genômico por PCR. O isolamento do DNA genômico e a reação de PCR foram realizados conforme descrito previamente.

Foram selecionados 14 clones para a indução da expressão de L1: as colônias foram inoculadas em 5 mL de YPD e, após crescimento a 37°C por 12 horas e agitação a 250 rpm, foram centrifugadas, lavadas 4 vezes com YNB e ressuspensas em 10 mL de YNB contendo metanol a uma concentração final de 0,5%. O sistema foi induzido por 48 horas. Após este período, as culturas foram centrifugadas a 2000 g (4°C). Após descarte do sobrenadante, as células foram ressuspensas em 300 μ L de tampão de lise contendo coquetel de inibidor de proteases e 1 mM de PMSF. O procedimento de lise foi efetuado conforme descrito anteriormente.

d) Análise da expressão de L1:

Para análise da expressão intracelular de L1 em *H. polymorpha* transformada com pHIPX4/L1, foi efetuado o mesmo procedimento de Western-blotting previamente descrito.

3.3.1.4. Vetor pPICHOLI®:

O vetor comercial pPICHOLI® (MOBITECH), de 3579 pares de bases, foi confeccionado para a expressão de genes heterólogos em *P. pastoris* e em *E. coli* (figura 4). Este plasmídeo contém seqüências que permitem sua replicação autônoma (PARS) em *P. pastoris*. Dessa forma, não é necessária a linearização do vetor para a transformação. O fragmento utilizado como marcador confere resistência à zeocina tanto em *E.coli* (através do promotor EM7) quanto em *P. pastoris* (através do promotor *TEF1*). O uso do marcador de resistência à zeocina permite que transformantes resistentes possam ser selecionados diretamente.

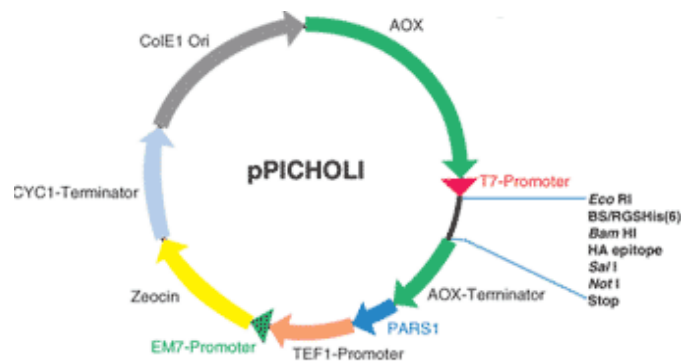


Figura 5: Vetor pPICHOLI, contendo o promotor AOX de *P. pastoris* e uma seqüência de replicação autônoma, entre outros elementos.

a) Clonagem de L1 no vetor pPICHOLI[®]:

O vetor pPICHOLI[®], proveniente de miniprep, foi digerido com *EcoRI*, de acordo com procedimentos descritos previamente. Após 90 minutos, foram adicionados dNTP e *Klenow*, a fim de serem obtidas extremidades cegas. O produto obtido, após purificado conforme descrito anteriormente, foi então digerido com *SalI*, nas mesmas condições anteriores. O gene L1 foi liberado do vetor pGEM-T easy[®] após digestão com *NcoI*, incubação com *Klenow* e dNTP, e digestão com *SalI*. O gene L1 foi ligado ao vetor pPICHOLI[®] conforme previamente descrito. O material de ligação foi utilizado para transformar bactérias DH5 α quimiocompetentes. Após a transformação, as bactérias foram plaqueadas em meio 2YT ágar suplementado com 25 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de zeocina. Para realização do procedimento de fenol-clorofórmio, colônias foram inoculadas em meio 2YT contendo zeocina e incubadas por aproximadamente 12 horas a 37°C. Foram realizadas minipreparações de plasmídios de alguns clones positivos, que foram seqüenciadas com oligonucleotídeos que anelam no promotor AOX e no sítio de término da transcrição.

b) Transformação de *Hansenula polymorpha* com pPICHOLI/L1:

Um volume de 40 μL de células competentes de *H. polymorpha* foi adicionado a uma cubeta de eletroporação (2 mm) previamente gelada, juntamente com 5 μg da construção pPICHOLI/L1. Imediatamente após o pulso de 1,5 kV, 200 Ω e 25 μF , foram adicionados 950 μL de sorbitol 1M. A suspensão foi transferida para um tubo plástico estéril de 2 mL, que permaneceu por 2 horas sob agitação a 250 rpm, a 37°C. Aliquotas de 200 μL foram plaqueadas em placas de meio YPD ágar suplementado com 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de zeocina e incubadas por 3 dias a 37°C. Foram selecionados 21 clones para verificação da presença da construção pPICHOLI/L1 por PCR de colônia. Cada colônia foi inoculada em 1 mL de meio YPD suplementado com 100 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de zeocina e incubada a 37°C, sob agitação de 250 rpm,

por 12 horas. Para a realização de PCR, foi seguido o protocolo descrito por Akada et al. (2000): 100 µL de cada cultura foram centrifugados a 14000 rpm e o sobrenadante foi descartado. Ao precipitado foram adicionados 20 µL de SDS 25% e cada tubo foi submetido a agitação em vórtex por 20 segundos, seguida de incubação a 90°C por 3 minutos. Após centrifugação a 14000 rpm, 1 µL do sobrenadante de cada tubo foi adicionado à reação de PCR. Para um volume final de reação de 50 µL, foram adicionados 5U da enzima *Pfu* DNA Polimerase, 0,2 mM de dNTP mix, 0,4 pM dos oligonucleotídeos L1 *forward* e L1 *reverso*, tampão de reação 1x e 1,5 mM de MgSO₄. A reação foi realizada com temperatura de desnaturação de 95°C durante 4 min e 35 ciclos de: 95°C por 30 segundos; 50°C por 30 segundos; 72°C por 5 minutos, finalizando com 72°C por 3 minutos. Quatro clones foram escolhidos para posterior indução e análise da expressão. Tais clones foram armazenados em glicerol 20% a -80°C.

c) Indução da expressão de L1 em *H. polymorpha* e lise celular:

Aproximadamente 50 µL da cultura em estoque de glicerol foram inoculados em 5 mL de YPD contendo 100 µg/mL de zeocina e crescidos a 37°C, sob agitação de 250 rpm, durante 12 horas. Um volume de 500 µL do pré-inóculo foram inoculados em 5 mL de YPD contendo zeocina e submetidos a agitação de 250 rpm, durante 12 horas a 37°C. Aliquotas de 500 µL destes inóculos foram transferidas para 5 mL de meio BMMY. Após atingir uma densidade óptica igual a 1, foram adicionados a cada cultura 25 µL de metanol para indução da expressão da proteína heteróloga. Um novo volume de metanol foi adicionado a cada 24 horas e alíquotas foram retiradas antes de cada indução (0, 24, 48 horas). Após 48h de indução, as amostras foram centrifugadas e lisadas da mesma maneira previamente descrita.

d) Transformação de *Pichia pastoris* com pPICHOLI/L1:

Foram preparadas células eletrocompetentes de *Pichia pastoris*, tanto da linhagem KM71, como da linhagem GS115, de acordo com o protocolo descrito no manual do fornecedor do plasmídeo (MOBITECH).

Foi utilizado o mesmo procedimento de transformação descrito anteriormente para *H. polymorpha*, exceto pelo fato de que as placas foram incubadas a 30°C.

Para a seleção dos transformantes, foram escolhidas colônias de diferentes tamanhos. Cada colônia foi inoculada em 1 mL de meio YPD suplementado com 100 µg/µL de zeocina e incubada a 30°C, sob agitação de 250 rpm, por 12 horas. Para a realização do PCR de colônia, foi seguido o protocolo descrito previamente. Alguns dos clones positivos para a presença de L1 foram selecionados para indução e verificação da expressão.

e) Indução da expressão de L1 em *Pichia pastoris* e lise celular:

Para indução da expressão heteróloga em *P. pastoris*, tanto da linhagem KM71, como da GS115, foram utilizados os mesmos procedimentos empregados para *H. polymorpha* transformada com este vetor, exceto pela temperatura de 30°C utilizada no caso de *P. pastoris*. Os procedimentos de centrifugação e lise celular também seguiram protocolos descritos anteriormente.

f) Análise da expressão de L1:

Os procedimentos para análise da expressão de L1 por Western-blotting, tanto em *Pichia pastoris* como em *Hansenula polymorpha*, seguiram as mesmas etapas já descritas.

3.4. Gene L1 de HPV-16 com Códons Otimizados para Expressão em *Pichia pastoris*

3.4.1. Amplificação e Clonagem do Gene L1

O gene L1 de HPV-16, contendo códons otimizados para expressão em *Pichia pastoris*, foi gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Robert L. Garcea (Universidade do Colorado, EUA). Este gene apresenta 64,4% dos códons mutados, de maneira que estão presentes os códons de maior utilização pela levedura.

Foram desenhados oligonucleotídeos para amplificação do gene, que se apresentava fusionado à trombina, em uma construção no vetor pPICZB® (Invitrogen).

No oligonucleotídeo “forward”, foi incluída a sequência Kozak ACC antes do códon ATG iniciador:

1) L1 cod_opt *Forward*:

5' ACC ATG TCT TTG TGG TTG CCA 3'

2) L1 cod_opt *Reverse*:

5' GCG CGC TCT AGA CTA CTA TTA 3'

Para a amplificação por PCR, em uma reação com volume final de 50 µL, foram utilizados cerca de 10 ng de DNA plasmidial contendo o gene L1 com códons otimizados, 5U da enzima *Pfx* DNA Polimerase (Invitrogen), 0,2 mM de dNTP mix, 0,4 pM dos oligonucleotídeos 1 e 2, tampão de reação 1x e 2,5 mM de MgSO₄. A reação foi realizada com temperatura de desnaturação de 94°C durante 5 min e 35 ciclos de: 94°C por 30 segundos; 50°C por 30 segundos; 68°C por 2 minutos, finalizando com 68°C por 5 minutos. Após a amplificação por PCR, o fragmento foi submetido a eletroforese em gel de agarose 1% e purificado com kit de purificação. O produto foi então incubado por 30 minutos a 72°C com dATP 0,2 mM, 5U da enzima *Taq* DNA Polimerase (Invitrogen), MgCl₂ 1,5 mM e tampão de

reação 1x, em um volume final de 50 μL , para possibilitar a ligação ao vetor **pGEM-T easy**[®]. A reação de ligação foi efetuada nas mesmas condições descritas anteriormente e utilizada para transformar bactérias *E. coli* DH5 α quimiocompetentes, que foram então plaqueadas em meio 2YT ágar, contendo 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ampicilina. As placas foram incubadas a 37°C por 16 horas. Minipreparações do plasmídeo foram realizadas e submetidas a seqüenciamento, utilizando oligonucleotídeos *M13 forward* e *M13 reverse*.

3.4.2. Ligação de L1 otimizado a pHIPX4:

O vetor pHIPX4 foi digerido com as enzimas *Sma*I e *Sal*I durante 90 minutos, a 37°C, e submetido a eletroforese em gel de agarose 0,75%.

O fragmento L1 otimizado foi liberado do vetor pGEM-T easy[®] da seguinte maneira: após digestão com *Sph*I a 37°C, durante 90 minutos, o produto de digestão foi incubado com *Klenow* e dNTP, nas mesmas condições descritas previamente. Após purificação, o produto foi digerido com a endonuclease *Sal*I e submetido a eletroforese em gel de agarose 0,75%. As quantidades de cada reagente utilizadas seguiram protocolos anteriormente descritos.

Os fragmentos correspondentes a L1 otimizado e pHIPX4 foram purificados a partir do gel de agarose. Para a reação de ligação, foram utilizados 150 ng do fragmento L1 otimizado, 50 ng do vetor pHIPX4 digerido, 5 U da enzima T4 DNA Ligase e 4 μL do tampão de ligação 5x. A reação foi incubada durante 16 horas a 16°C e, após este período, 10 μL foram utilizados para transformar *E. coli* DH5 α quimiocompetentes.

Após a transformação, foram plaqueados 200 μL da suspensão de bactérias em cada placa contendo meio 2YT ágar suplementado com 25 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de canamicina. Colônias crescidas foram inoculadas em 5 mL de meio 2YT contendo canamicina e incubadas por aproximadamente 12 horas a 37°C. A seleção de clones positivos foi realizada por tratamento

com fenol-clorofórmio, conforme descrito previamente. Foram realizadas minipreparações de plasmídios e estes foram seqüenciados para verificação da clonagem.

a) Transformação de *Hansenula polymorpha* com pHIPX4/L1 otimizado:

Aproximadamente 10 µg de DNA da construção pHIPX4/L1 otimizado, obtidos por protocolo de midi-prep, foram linearizados através de digestão com 20 U da enzima *Stu* I, por 120 minutos, a 37°C. O produto de digestão foi purificado após tratamento com fenol-clorofórmio.

O procedimento de transformação de *H. polymorpha* com o vetor pHIPX4/L1otimizado foi o mesmo empregado na transformação dessa espécie com as construções pHIPX7/L1 e pHIPX4/L1.

b) Indução da expressão de L1 códon otimizado e lise celular:

O mesmo protocolo de crescimento em meio rico por 50 gerações mencionado previamente foi utilizado para esta construção.

Quinze colônias foram escolhidas para verificação da presença do gene L1 otimizado integrado no DNA genômico. Este foi extraído para realização da reação de PCR, que foi efetuada da seguinte maneira: em uma reação com volume final de 50 µL, foram utilizados cerca de 1 µg de DNA genômico, 5U da enzima *Taq* DNA Polimerase (Invitrogen), 0,2 mM de dNTP mix, 0,4 pM dos oligonucleotídeos específicos para L1 otimizado, tampão de reação 1x e 1,5 mM de MgCl₂. A reação foi realizada com temperatura de desnaturação de 94°C durante 5 min e 35 ciclos de: 94°C por 30 segundos; 50°C por 30 segundos; 72°C por 2 minutos, finalizando com 72°C por 5 minutos. Em seguida, as amostras foram submetidas a eletroforese em gel de agarose 1%.

Foram selecionadas 7 colônias para a indução da expressão de L1 otimizado. Os protocolos de expressão e lise celular foram realizados conforme descrito anteriormente.

c) Análise da expressão de L1 otimizado:

Para análise da expressão intracelular de L1 em *H. polymorpha* transformada com pHIPX4/L1 otimizado, foi efetuado o mesmo procedimento de Western-blotting previamente descrito.

3.4.3. Ligação de L1 otimizado a pPICHOLI®:

O vetor pPICHOLI® foi inicialmente digerido com a enzima de restrição *SaII*. Após preenchimento com *Klenow* e dNTP, o vetor foi novamente digerido com *EcoRI*. As condições das reações de digestão e preenchimento foram realizadas conforme anteriormente relatado.

O fragmento L1 códon otimizado foi liberado do vetor pGEM-T easy® através da digestão com *SpeI* e posteriormante com *EcoRI*, sendo que o produto da digestão com *SpeI* foi incubado com *Klenow* e dNTP, nas mesmas condições descritas previamente.

Após eletroforese em gel de agarose 0,75%, os fragmentos correspondentes a L1 otimizado e pPICHOLI foram purificados. Para a reação de ligação, foram utilizados 150 ng do fragmento L1, 50 ng do vetor pPICHOLI digerido, 5 U da enzima T4 DNA Ligase e 4 µL do tampão de ligação 5x. A reação foi incubada durante 16 horas a 16°C e, após este período, 10 µL foram utilizados para transformar *E. coli* DH5α quimiocompetentes, que foram plaqueadas em meio 2YT ágar suplementado com 25 µg/µL de zeocina. Após seleção de

clones positivos por fenol-clorofórmio, foram realizadas minipreparações de plasmídios, que foram submetidos a seqüenciamento para verificação da clonagem de L1 otimizado.

a) Transformação de *Pichia pastoris* com pPICHOLI/L1 otimizado:

Para o procedimento de eletroporação, foram adicionados a 40 µL de leveduras competentes, tanto da linhagem GS115 como da linhagem KM71, em cubetas de eletroporação, 5 µg do vetor contendo o gene L1 (códon otimizado) proveniente de midiprep, utilizando o mesmo protocolo descrito acima.

Para a análise dos transformantes, foram escolhidas colônias que variavam em tamanho. Cada colônia foi inoculada em 1 mL de meio YPD suplementado com 100 µg/µL de zeocina e incubada a 30°C, sob agitação de 250 rpm, por 12 horas. Para a realização de PCR, foi seguido o protocolo desenvolvido por Akada et al. (2000), conforme descrito anteriormente, porém utilizando os oligonucleotídeos específicos para o gene L1 otimizado.

Alguns dos clones positivos para a presença de L1 foram armazenados em estoque de glicerol 20% a -80°C e utilizados para indução e verificação da expressão.

b) Transformação de *Hansenula polymorpha* com pPICHOLI/L1 otimizado:

Foi empregado o mesmo procedimento de transformação utilizado para *P. pastoris*, apenas alterando a temperatura de incubação, neste caso para 37°C.

Foram selecionados 12 clones para verificação da presença da construção pPICHOLI/L1 códon otimizado por PCR de colônia. Sete clones foram escolhidos para posterior indução e análise da expressão. Tais clones foram armazenados a -80°C em glicerol 20%.

c) Indução da expressão de L1 otimizado:

Um volume de 50 μ L de cada cultura em estoque de glicerol foi inoculado em 5 mL de YPD contendo 100 μ g/mL de zeocina e incubado a 30°C, no caso de *P. pastoris* ou a 37°C, no caso de *H. polymorpha*, sob agitação de 250 rpm, durante 12 horas. Um volume de 400 μ L de cada pré-inóculo foi inoculado em 5 mL de YPD contendo zeocina e submetido a agitação de 250 rpm, durante 12 horas a 30°C ou a 37°C (para *P. pastoris* e *H. polymorpha*, respectivamente). Alíquotas de 500 μ L destes inóculos foram transferidas para 5 mL de meio BMMY. Após atingir uma densidade óptica igual a 1, foram adicionados a cada cultura 25 μ L de metanol para indução da expressão da proteína heteróloga. Um novo volume de metanol foi adicionado a cada 24 horas e alíquotas foram retiradas antes de cada indução (0, 24, 48 horas).

d) Lise celular e análise da expressão:

As alíquotas retiradas foram submetidas à centrifugação a 2000 g a 4°C e congeladas por pelo menos 20 minutos a -80°C.

O centrifugado foi descongelado e ressuspensão em 300 μ L de tampão de lise contendo coquetel de inibidor de proteases e 1 mM de PMSF.

Após adição de 0,5 a 1 volume de mini pérolas de vidro (0,5 mm), foram efetuados 8 ciclos de agitação em vórtex durante 30 segundos, seguido de 30 segundos de incubação no gelo.

Os lisados foram clarificados por centrifugação a 2000 g durante 10 minutos a 4°C e congelados a -20°C para posterior análise da expressão intracelular de L1 por Western-blotting utilizando o anticorpo monoclonal anti-L1 de HPV-16 Camvir[®].

3.4.4. Ensaio cinético de expressão de L1

O clone 1 de *P. pastoris* KM71 transformada com pPICHOLI/L1 otimizado, previamente em estoque de glicerol, foi inoculado em 5 mL de meio YPD contendo 100 µg/mL de zeocina e incubado por 12 horas a 30°C, a agitação de 250 rpm. Esta cultura foi inoculada em 45 mL de meio BMMY e submetida à indução da expressão da mesma maneira já descrita, porém o clone foi induzido por 144 horas (6 dias), com adição de metanol a cada dia. Os valores de densidade óptica a $\lambda = 600\text{nm}$ foram determinados em intervalos de tempo específicos. A cada 24 horas e imediatamente antes da indução, foram coletados 2 mL de cultura, que foi centrifugada e lisada conforme previamente descrito.

Foi realizado Western-blotting dos extratos celulares totais, de acordo com o procedimento já descrito. As concentrações dos extratos foram igualadas após leitura em espectrofotômetro a $\lambda = 280\text{nm}$.

3.5. Purificação da Proteína L1 de HPV-16

3.5.1. Purificação da proteína L1 de HPV-16 em coluna de Heparina-Sepharose

Uma alíquota de 50 µL de um clone de *Pichia pastoris* KM71, estocado em glicerol 20%, que apresentou expressão da proteína L1 de HPV-16, foi inoculada em 5 mL de meio YPD contendo 100µg/mL de zeocina e submetida a crescimento por 24 horas a 30°C, sob agitação a 150 rpm. Em seguida, o volume total da cultura foi inoculado em 100 mL de YPD contendo zeocina e a cultura foi novamente crescida durante 24 horas, quando então foi

introduzida em um frasco contendo 900 mL de meio BMMY e zeocina. Após a cultura atingir uma densidade óptica de 1,0 a $\lambda = 600$ nm, foi adicionado metanol a uma concentração final de 0,5%. A cultura foi mantida a 30°C, sob agitação a 150 rpm, durante 48 horas, sendo que uma nova alíquota de metanol foi adicionada a cada 24 horas.

Após o período de indução, a cultura foi centrifugada a 6000 rpm, a 4°C, por 10 minutos. As células foram ressuspensas em tampão de lise contendo coquetel de inibidores de proteases, de forma que o volume final ficasse em torno de 100 mL. Às células, foram adicionadas mini pérolas de vidro (0,5 mm) e a amostra foi lisada em 8 ciclos de agitação em vórtex durante 30 segundos, seguido de incubação por 30 segundos no gelo. O lisado foi clarificado por centrifugação a 7500 rpm durante 10 minutos a 4°C e prontamente dialisado contra 2 L de tampão fosfato pH 7,4 contendo cloreto de sódio 0,4M (PBS/NaCl), durante 12 horas, sendo que o tampão foi trocado duas vezes.

Para a etapa de purificação por cromatografia de afinidade, foi utilizada uma resina de Heparina Sepharose CL-6B[®] (Amersham). Foram empacotados 5 mL de resina em uma coluna de 1,6 cm de diâmetro.

a) Eluição com gradiente salino

O lisado celular foi então aplicado na coluna de heparina pré-equilibrada com PBS/NaCl 0,4M, a uma velocidade de 0,5 mL/minuto. Em seguida, a coluna foi lavada com 25 mL do tampão de equilíbrio e 25 mL de PBS/NaCl 0,5M. Então, foram aplicados 5 mL de soluções PBS/NaCl variando de 0,6M NaCl a 1,0M NaCl, seguido de PBS/NaCl 1,2M, PBS/NaCl 1,5M (5 mL cada) e finalizando com 25 mL de PBS/NaCl 2,0M.

As alíquotas provenientes de cada etapa foram coletadas e armazenadas a -20°C, para posterior análise da purificação. Além disso, foi determinado o índice de refração das

amostras de entrada e de saída, a fim de que fosse possível determinar com precisão a concentração de cloreto de sódio na qual foi eluída a proteína L1.

Para análise da purificação, foi realizado primeiramente Western-blotting das amostras de saída da coluna, utilizando anticorpo monoclonal anti-L1 de HPV-16 (CamVir®). Posteriormente, parte das amostras foi submetida a eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida, que foi corado com Coomassie Brilliant Blue®.

A fim de concentrar a proteína L1, as amostras nas quais esta foi detectada foram reunidas, dialisadas contra 2x 500 mL de tampão fosfato pH 7,4 (PBS) contendo 0,5M de NaCl e posteriormente submetidas a ultracentrifugação a 50000 rpm, por 90 minutos, a 4°C. O precipitado foi recolhido e lavado com tampão PBS. As amostras foram analisadas em gel de poliacrilamida 10%.

b) Utilização de surfactante não iônico

Inicialmente, foi realizado um teste para verificar o efeito do surfactante não iônico sobre a etapa de purificação em coluna de heparina: foram adicionados 250 mg de resina heparina-sepharose em um tubo de polipropileno contendo 1 mL de água destilada. Uma alíquota de 100 µL desta resina foi lavada duas vezes com tampão PBS contendo NaCl 0,3M e dividida em dois tubos de polipropileno. Parte de uma cultura de *Pichia pastoris* expressando L1 foi lisada em tampão de lise, após 48 horas de indução, na presença de polissorbato 80 0,01% (p/v) e outra parte, na ausência do surfactante. Um volume de 50 µL de cada amostra foi incubado em um tubo de polipropileno com 1 mL de resina heparina-sepharose, por 2 horas, com agitação. Após centrifugação a 1400 rpm, o sobrenadante foi coletado, a resina foi lavada com 150 µL de tampão PBS contendo NaCl 0,3M e novamente centrifugada a 1400 rpm, sendo que o sobrenadante foi novamente coletado. À resina foram adicionados 50µL de tampão SDS 1x contendo β-mercaptoetanol. Esta mistura foi fervida por

20 minutos, centrifugada a 1400 rpm e o sobrenadante foi recuperado. As amostras coletadas foram analisadas por Western-blotting utilizando anticorpo monoclonal anti-L1 de HPV-16, conforme descrito anteriormente.

c) Eluição com solução PBS/NaCl 1,0 M

Um volume de 2 L de cultura de *Pichia pastoris* expressando a proteína L1 foi lisado após 48h de indução, com tampão de lise contendo coquetel de inibidores de proteases e polissorbato 80 0,01%, clarificado conforme descrito previamente e dialisado contra 2 L de tampão fosfato pH 7,4 contendo cloreto de sódio 0,25 M (PBS/NaCl) e polissorbato 80 0,01%, durante 12 horas, sendo que neste período foram realizadas duas trocas da solução tampão.

A seguir, a amostra foi aplicada na coluna de heparina pré-equilibrada com PBS/NaCl 0,25M, a uma velocidade de 0,5 mL/minuto. Em seguida, a coluna foi lavada com 25 mL do tampão de equilíbrio. Foi realizada a eluição diretamente com 25 mL da solução fosfato contendo 1,0M NaCl (alíquotas de 1 mL cada), finalizando com 25 mL de PBS/NaCl 2,0M. A todas as soluções utilizadas foi adicionado polissorbato 80 a uma concentração final de 0,01%.

As alíquotas coletadas foram armazenadas a -20°C e posteriormente analisadas por eletroforese em gel de acrilamida (SDS-PAGE).

- **Recromatografia:**

As frações em que foi verificada a presença da proteína L1 foram reunidas e dialisadas por 24 h contra 2 L de tampão fosfato pH 7,4 (PBS) contendo NaCl 0,3M. A amostra foi então adicionada à coluna de heparina-sepharose pré-equilibrada com o tampão mencionado, a uma velocidade de 0,5 mL/min. A coluna foi lavada com 25 mL do tampão de equilíbrio e, posteriormente, com 25 mL do tampão fosfato contendo 0,4M de NaCl, a uma velocidade de

1 mL/min. Em seguida, foram aplicados sobre a coluna 25 mL do tampão fosfato contendo NaCl 1,0M. As alíquotas eluídas foram coletadas a cada 1 mL. Finalmente, foram aplicados 25 mL de PBS contendo NaCl 2,0M. Todas as soluções continham polissorbato 80 a uma concentração final de 0,01%.

3.5.2. Purificação da proteína L1 de HPV-16 em coluna POROS 50HS

Foram empacotados 2 mL de resina POROS 50HS (Applied Biosystems) em uma coluna cromatográfica de 1,6 cm de diâmetro. A resina foi equilibrada com solução (Na⁺)MOPS 50 mM, pH 7,0, contendo NaCl 0,4 M.

O lisado celular clarificado por centrifugação de *Pichia pastoris* expressando L1 foi dialisado contra 2 L de tampão (Na⁺)MOPS 50 mM, pH 7,0, contendo NaCl 0,4 M, durante 12 horas (2 trocas). A amostra foi aplicada na coluna a uma velocidade de 0,5 mL/minuto. Foram realizadas lavagens com 10 mL de MOPS/NaCl 0,4M e 10 mL de MOPS/NaCl 0,5M. Para a realização das eluições, foram aplicados 5 mL de soluções (Na⁺)MOPS 50 mM, pH 7,0 contendo concentrações de NaCl que variaram de 0,6 M a 1,6 M, finalizando com 2,0 M de cloreto de sódio.

As alíquotas provenientes de cada etapa foram armazenadas a -20°C e posteriormente analisadas por SDS-PAGE e Western-blotting. Os índices de refração das alíquotas também foram determinados e comparados com os valores das soluções de entrada.

3.5.3. Desmontagem e remontagem de VLPs

Primeiramente, as amostras coletadas dos processos de purificação em coluna de heparina, nas quais foi verificada a presença da proteína L1 de HPV-16, foram reunidas e divididas em duas partes de volumes iguais. Uma parte serviu como controle e a outra foi dialisada contra tampão fosfato pH 7,4 (PBS) contendo 0,15 M NaCl, β -mercaptoetanol 5% e polissorbato 80 0,01%, por aproximadamente 16 horas. Para remoção do agente redutor, as amostras foram novamente dialisadas contra PBS contendo cloreto de sódio 0,5 M (4x 1 L) e polissorbato 80 0,01%, por um período de 24 horas.

Tanto a amostra controle quanto a que foi submetida ao processo de desmontagem e remontagem foram divididas em duas partes cada, sendo que apenas uma de cada foi submetida a ultracentrifugação (50000 rpm, 4°C, 1,5 h) em rotor de ângulo fixo 70Ti. Os precipitados visíveis das amostras ultracentrifugadas foram ressuspensos em 200 μ L de tampão PBS/NaCl 0,5 M. Todas as alíquotas foram submetidas à visualização por microscopia eletrônica.

Para as amostras obtidas por purificação em coluna POROS 50HS, foi tentado um outro protocolo de desmontagem e remontagem de VLPs. Todas as alíquotas coletadas das eluições que continham a proteína L1 foram reunidas. A desmontagem das partículas foi realizada em 1 L de uma solução MOPS 50 mM, pH 8,2, contendo NaCl a uma concentração de 0,166 M, 2 mM de ditioneitol (DTT) e 2 mM de EDTA. A amostra permaneceu em diálise contra esta solução, durante 1 hora, a 4°C. Após esta etapa, a amostra foi dialisada contra 1 L de uma solução MOPS 50 mM pH 7,0, contendo 0,5 M de NaCl, a 4°C, durante 12 horas. A seguir, as VLPs foram concentradas por ultracentrifugação a 50000 rpm, por 3 horas, a 4°C, em colchão de sacarose 25%. As VLPs foram recolhidas no precipitado com 2 mL de MOPS

50 mM / NaCl 0,5M, pH7,0 e visualizadas por microscopia eletrônica. Todas as soluções continham polissorbato 80 a uma concentração de 0,01%.

Este último protocolo foi também utilizado após purificação parcial de L1 em coluna de heparina-sepharose. As condições das etapas de desmontagem e remontagem foram mantidas, exceto pelo fato de ter sido utilizado PBS 1x ao invés de MOPS 50 mM.

3.5.4. Ultracentrifugação de VLPs em gradiente de sacarose

Primeiramente, as amostras contendo VLPs parcialmente purificadas por cromatografia e submetidas a procedimentos de desmontagem e remontagem foram aplicadas sobre um gradiente descontínuo de sacarose formado por tampão fosfato pH 7,0, cloreto de sódio 0,5M, polissorbato 80 0,01% e sacarose 10% (p/v), 20% e 30%. Após 3 horas de ultracentrifugação em um rotor de ângulo fixo a 50000 rpm, 4°C, o sobrenadante foi coletado e o precipitado foi ressuspensão em 120 µL de PBS contendo cloreto de sódio 0,5M e polissorbato 80 0,01%. Ambos foram submetidos à análise por eletroforese em gel de poliacrilamida.

Em uma outra tentativa, as amostras contendo L1 foram aplicadas sobre uma solução de PBS contendo cloreto de sódio 0,5M, polissorbato 80 0,01% e outras três diferentes concentrações de sacarose (30%, 35% e 60% p/v). Foi realizada ultracentrifugação a 188000g, durante 16 horas, a 4°C, em um rotor swing. Após este procedimento, foram coletadas alíquotas a cada 100 µL, com o auxílio de um tubo capilar acoplado a uma bomba peristáltica. As alíquotas foram analisadas por Western-blotting.

3.6. Caracterização Biológica de VLPs de L1 de HPV-16 produzidas em *Pichia pastoris*

3.6.1. Visualização das amostras por microscopia eletrônica

Amostras obtidas das tentativas de purificação, tanto em coluna de heparina-sepharose quanto em POROS 50HS, submetidas ou não a procedimentos de desmontagem e remontagem de VLPs e de ultracentrifugação, foram submetidas a análise por microscopia eletrônica para verificação da presença de partículas intactas.

As amostras foram adsorvidas a grades de cobre cobertas com carbono e negativamente coradas com acetato de uranila 2%. As grades foram analisadas em um microscópio eletrônico de transmissão Zeiss EM 109.

3.6.2. Ensaio de Hemaglutinação e Inibição da Hemaglutinação

Para realização do ensaio de hemaglutinação, 1 mL de sangue de camundongo Balb/C foi adicionado a um tubo contendo 1000 U.I. de heparina. A amostra foi suspensa em 9 mL de tampão fosfato pH 7,4 contendo 1 mg de albumina sérica bovina (BSA) e centrifugada a 1500 rpm durante 5 minutos. O sobrenadante foi aspirado e os eritrócitos foram ressuspensos em 10 mL de PBS contendo 1 mg de BSA e centrifugados a 1500 rpm por 5 minutos. Após 3 lavagens, o precipitado de hemácias final foi diluído a 1% (v/v) em PBS contendo BSA a uma concentração de 1mg/mL. Cem microlitros desta suspensão foram misturados com o mesmo volume de VLPs em diferentes concentrações e despejados em uma placa de 96 poços de fundo redondo, que foi incubada a 4°C por 3 horas e fotografada.

Para o ensaio de inibição da hemaglutinação, 400 ng de um anticorpo que reconhece epítomos conformacionais de L1 de HPV-16 (BIODESIGN) foram incubados com diferentes concentrações de VLPs por 1 hora, a temperatura ambiente (volume final = 100 μ L). A mistura foi então adicionada a 100 μ L da suspensão de hemácias, incubada a 4°C por 3 horas e fotografada.

Em todas as etapas foi utilizado PBS contendo polissorbato 80 a uma concentração de 0,01% e cloreto de sódio 0,5 M, que corresponde à solução de estocagem de VLPs.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Gene L1 selvagem de HPV-16

4.1.1. Expressão de L1 selvagem de HPV-16 em *Hansenula polymorpha* no vetor pHIPX7:

Após a transformação de *H. polymorpha* com a construção pHIPX7/L1, foi observado crescimento apenas nas placas YND ágar cuja cultura permaneceu em incubação por 4 horas antes do plaqueamento, resultando em inúmeras colônias individualizadas.

Após o crescimento em meio rico por 50 gerações, foi verificado o aparecimento de colônias de diferentes tamanhos nas placas YND ágar.

Através de reação de PCR, foi observada em gel de agarose 1% a amplificação do gene L1 (1500 pares de bases) a partir do DNA genômico em todos os clones selecionados de *H. polymorpha* transformada com pHIPX7/L1 e crescidos em meio mínimo sem leucina (figura 6).

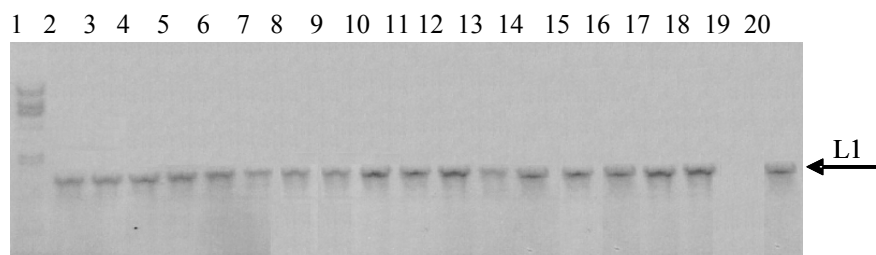


Figura 6: Gel de agarose 1% do produto de PCR de L1 a partir do DNA genômico extraído de colônias de *H. polymorpha* transformada com pHIPX7/L1. O poço 1 corresponde ao padrão de DNA λ HindIII, os poços 2 a 18 correspondem aos clones 1 a 17 de *H. polymorpha* transformada. Como controle negativo foi utilizado o DNA genômico de *H. polymorpha* não transformada (poço 19) e, como controle positivo, foi utilizada a construção pHIPX7/L1 (poço 20).

Quatorze clones foram escolhidos para o procedimento de expressão, sendo 7 em meio mínimo (YND) e 7 em meio rico (YPD). A expressão de L1 foi realizada conforme descrito em "Materiais e Métodos". Os lisados celulares foram submetidos à análise da expressão por Western-blotting. Como controle positivo foram utilizados 20 µL de extrato total de *Lactobacillus casei* expressando L1 (Aires et al., 2006), e como controle negativo, 20 µL de extrato total de *H. polymorpha* selvagem.

Não foi observada expressão de L1 em *Hansenula polymorpha* (figura não mostrada). O fato de não ter ocorrido expressão pode indicar a impossibilidade da expressão desta proteína num sistema constitutivo. Além disso, há a possibilidade de o promotor pTEF1 ser um promotor fraco (não há relato na literatura mostrando a expressão em *H. polymorpha* de uma proteína heteróloga sob a regulação deste promotor).

4.1.2. Expressão de L1 selvagem de HPV-16 em *Hansenula polymorpha* utilizando o vetor pHIPX4:

Foi observado o crescimento de inúmeras colônias de *H. polymorpha* de diferentes tamanhos nas placas YND ágar, tanto após a transformação com a construção pHIPX4/L1, como após o crescimento de colônias por 50 gerações em meio rico.

A reação de PCR amplificou o gene L1 integrado no genoma de *H. polymorpha* na maioria dos clones selecionados que apresentaram prototrofia à leucina (figura 7).

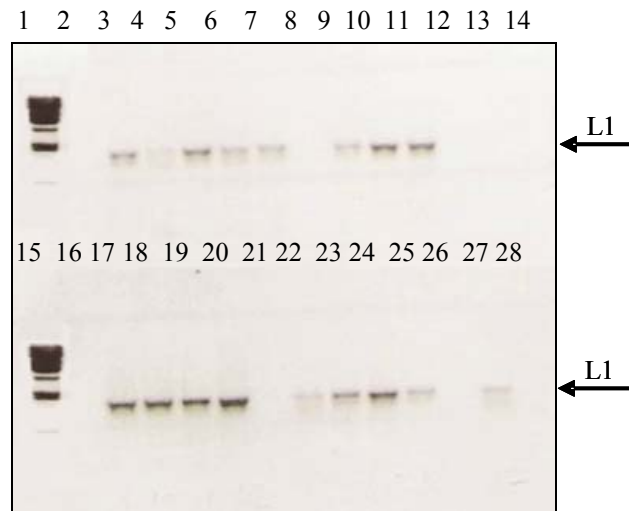


Figura 7: Gel de agarose 1%. PCR do DNA genômico de *Hansenula polymorpha* transformada com pHIPX4/L1. Como controle negativo, foi utilizado o DNA genômico da levedura não transformada (poços 2 e 16) e, como controle positivo, foi utilizada a construção pHIPX4/L1 (poços 3 e 17). Os poços 1 e 15 correspondem ao marcador de DNA λ *Hind*III e os poços 4 a 14 e 18 a 28 referem-se aos clones 1 a 22 de *H. polymorpha* transformada.

Quatorze clones foram selecionados para indução da expressão com metanol. Os lisados de *H. polymorpha* após 48 horas de indução foram submetidos à análise de expressão por Western-blotting. Foram observadas bandas imunorreativas de aproximadamente 55 kDa, correspondentes ao tamanho de L1, em apenas 2 clones (figura 8).

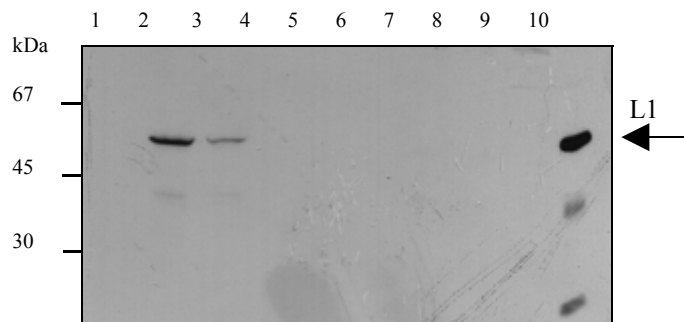


Figura 8: Western-blotting de amostras de extrato total de *H. polymorpha* após 48 horas de indução. O poço 1 refere-se ao padrão de massa molecular, o poço 10 corresponde ao controle positivo *Lactobacillus casei*/L1 e os poços 2 a 9 representam os clones 1 a 7 de *H. polymorpha*.

No entanto, os dois clones apresentaram-se instáveis e, após algumas gerações, não mais expressaram a proteína L1. Muitas outras tentativas de transformação foram feitas e análises de inúmeros clones também foram realizadas, mas não evidenciaram a expressão da proteína recombinante.

4.1.3. Expressão de L1 selvagem HPV-16 em *Hansenula polymorpha* com o vetor pPICHOLI®:

De acordo com Raschke et al. (1996), é possível verificar expressão de genes sob a regulação do promotor AOX de *Pichia pastoris* em *Hansenula polymorpha*, inclusive com produção de altos níveis de proteína recombinante (Rodriguez et. al., 1996). Por esse motivo, o vetor pPICHOLI, que possui o promotor AOX de *P. pastoris*, foi testado também em *H. polymorpha*. A estratégia de utilização de um vetor episomal garantiria um menor tempo entre os processos de transformação e verificação da expressão.

Foi verificado o crescimento de diversas colônias de *H. polymorpha* em meio YPD ágar suplementado com zeocina, após transformação com a construção pPICHOLI/L1.

A reação de PCR de colônia realizada para seleção de transformantes resistentes à zeocina amplificou o gene L1 em apenas alguns clones, como pode ser visualizado em gel de agarose 1% (figura 9).

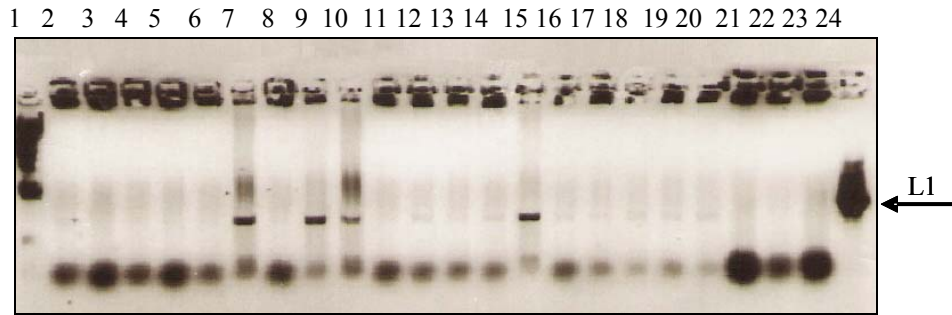


Figura 9: Gel de agarose 1% da PCR de colônia de *H. polymorpha* transformada com pPICHOLI/L1. Como controle positivo, foi utilizada a construção pPICHOLI/L1 (poço 24) e, como controle negativo, *H. polymorpha* não transformada (poço 2). Os poços 3 a 23 correspondem aos clones 1 a 21 de *H. polymorpha* transformada e o poço 1 refere-se ao marcador de DNA λ HindIII.

Foram escolhidos 4 clones para indução da expressão, que foi realizada como descrito em "Materiais e Métodos". A expressão de L1 de HPV-16 foi testada por Western-blotting nos lisados de *H. polymorpha* transformada com pPICHOLI/L1, porém não foi observada expressão em nenhum dos clones (figura não mostrada).

4.1.4. Expressão de L1 selvagem em *Pichia pastoris* com o vetor pPICHOLI®

a) Linhagem GS115:

O gene L1 foi amplificado por PCR de colônia em todos os clones de *Pichia pastoris* GS115 selecionados após crescimento em YPD ágar suplementado com zeocina, como mostrado no gel de agarose 1% (figura 10).

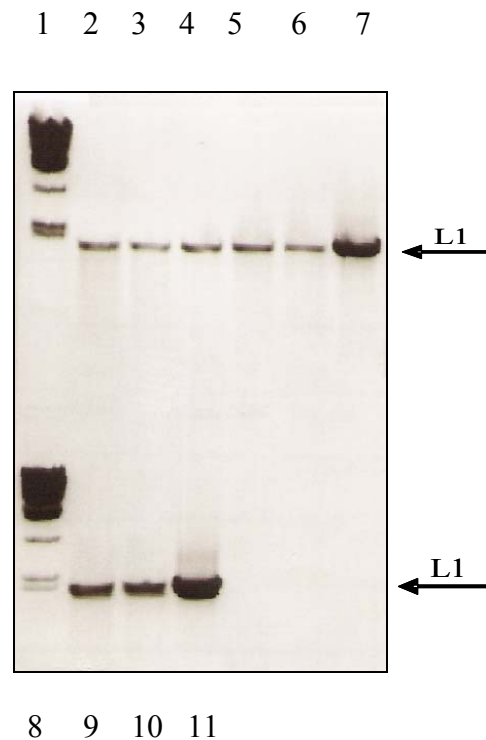


Figura 10: Gel de agarose 1% após PCR de colônia de *P. pastoris* GS115 transformada com pPICHOLI/L1. Os poços 1 e 8 correspondem ao padrão de DNA λ HindIII. Como controle positivo, foi utilizada a construção pPICHOLI/L1 (poços 7 e 11) e como controle negativo, foi utilizada *P. pastoris* GS115 não transformada (poço 12). Os poços 2 a 6, 9 e 10 referem-se aos clones 1 a 7 de *P. pastoris* GS115.

Dos 7 clones de *Pichia pastoris* GS115 testados para a expressão de L1 após indução com metanol, nenhum apresentou expressão após análise por Western-blotting (figura não mostrada).

b) Linhagem KM71:

Apenas alguns clones de *Pichia pastoris* KM71 resistentes à zeocina apresentaram positividade para a presença do gene L1 após reação de PCR de colônia (figura 11).

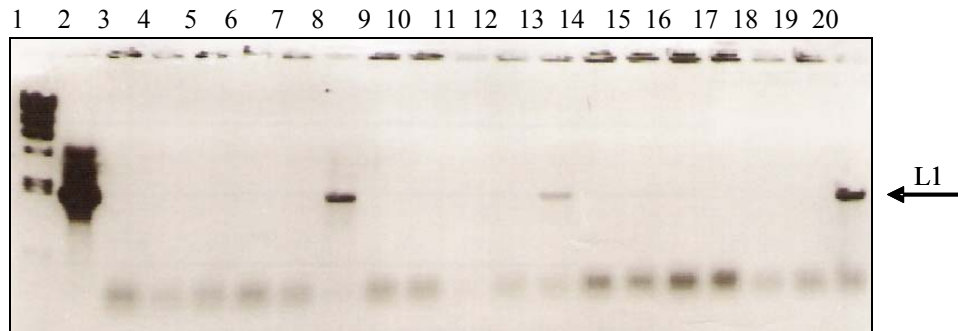


Figura 11: Gel de agarose 1%. Análise dos clones através de PCR de colônia de *P.pastoris* KM71 transformada com pPICHOLI/L1. Foi utilizado como controle positivo a construção pPICHOLI/L1 (poço 2) e, como controle negativo, *P. pastoris* KM71 não transformada (poço 3). O poço 1 corresponde ao marcador de DNA λ *Hind*III e os poços 4 a 20 equivalem aos clones 1 a 17 de *P.pastoris* KM71.

Mesmo após a indução dos clones positivos, não foi observada expressão de L1 na linhagem KM71 de *P. pastoris* em ensaio de Western-blotting (dados não mostrados). Todos estes resultados no seu conjunto indicam a não expressão da proteína L1, o que pode ser resultado da grande quantidade de códons restritivos presentes no gene L1 selvagem.

4.2. Gene L1 otimizado de HPV-16

4.2.1 Amplificação do gene e clonagem

O gene L1 otimizado foi amplificado a partir do plasmídeo pPICZB/L1, após reação de PCR utilizando os oligonucleotídeos especificados anteriormente. Um fragmento de aproximadamente 1500 pares de bases pôde ser visualizado após eletroforese em gel de agarose (figura 12).

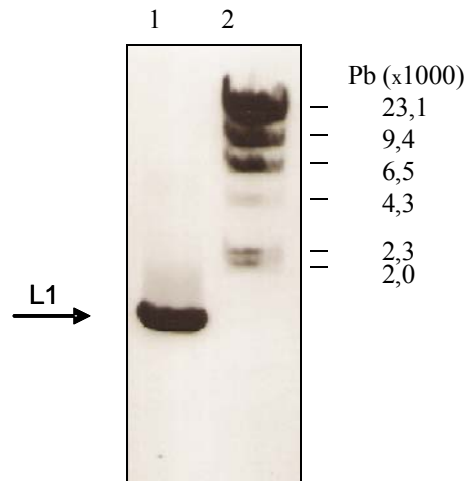


Figura 12: Gel de agarose 1% com produto da reação de PCR de L1 otimizado (poço 1) e marcador de DNA λ HindIII (poço 2).

Após purificação da banda de L1 otimizado e ligação deste ao vetor pGEM-T easy[®], a seqüência foi confirmada por seqüenciamento. A construção pGEM-T/L1 otimizado foi devidamente digerida para possibilitar a liberação do fragmento L1 otimizado e sua clonagem subsequente nos vetores de expressão.

4.2.2 Expressão de L1 otimizado em *H. polymorpha* com o vetor pHIPX4

Foi verificado o crescimento de colônias heterogêneas em tamanho nas placas YND ágar, após a transformação de *H. polymorpha* com a construção pHIPX4/L1 otimizado e também após o crescimento por 50 gerações em meio YPD.

A reação de PCR do DNA genômico de colônias de *H. polymorpha* prototróficas à leucina revelou a presença do gene L1 otimizado em alguns dos clones testados (figura 13).

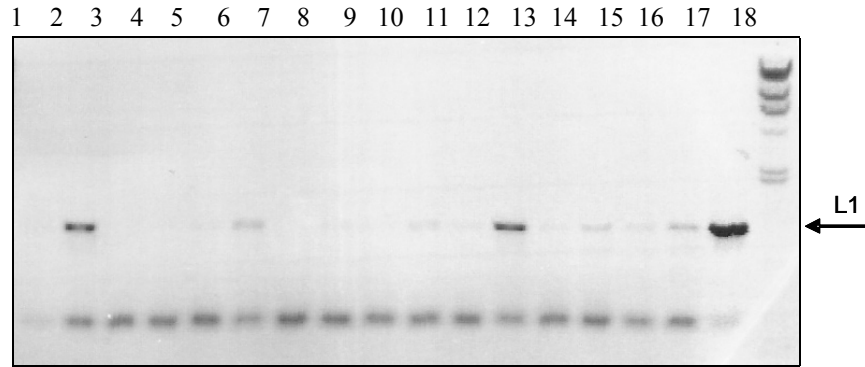


Figura 13: Gel de agarose 1% mostrando o produto de PCR do DNA genômico de *Hansenula polymorpha* transformada com pHIPX4/L1 otimizado. Os poços 2 a 16 correspondem aos clones 1 a 15 de *H. polymorpha* transformada. Como controle positivo, foi utilizada a construção pHIPX4/L1 otimizado (poço 17) e, como controle negativo, o DNA genômico de *H. polymorpha* não transformada (poço 1). O poço 18 refere-se ao marcador de DNA λ HindIII.

Nenhum dos sete clones submetidos à indução da expressão de L1 otimizado apresentou produção da proteína recombinante (dados não mostrados). Outras tentativas de expressão foram realizadas, porém não foram bem sucedidas.

4.2.3. Expressão de L1 otimizado em *H. polymorpha* com o vetor pPICHOLI®

Inúmeras colônias cresceram nas placas YPD ágar suplementado com zeocina. A PCR de colônia realizada em clones de *H. polymorpha* transformada com pPICHOLI/L1 otimizado revelou a presença do gene na maioria dos clones testados (figura 14).



Figura 14: Gel de agarose 1%. PCR de colônia de *H. polymorpha* transformada com pPICHOLI/L1 otimizado. O poço 1 refere-se ao padrão de DNA λ HindIII. Os poços 4 a 15

equivalem aos clones 1 a 12 de *H. polymorpha* transformada. Como controle positivo, foi utilizada a construção pPICHOLI/L1 otimizado (poço 3) e, como controle negativo, foi utilizada *H. polymorpha* não transformada (poço 2).

A análise da expressão de L1 por Western-blotting em 14 clones selecionados para indução não revelou a presença de L1 em nenhum clone de *H. polymorpha* transformada com pPICHOLI/L1 códon otimizado (dados não mostrados).

As abordagens de utilizar o promotor AOX de *P. pastoris* e o gene L1 com códons otimizados não foram suficientes para promover a expressão da proteína recombinante em *H. polymorpha*. As dificuldades apresentadas com a utilização desta levedura levaram a outras tentativas de obtenção da proteína heteróloga, como a utilização de *P. pastoris* como plataforma de expressão.

4.2.4. Expressão de L1 otimizado em *P. pastoris* com o vetor pPICHOLI®

a) Linhagem GS115:

Foi observado o crescimento de inúmeras colônias de *Pichia pastoris* GS115 transformada com o vetor pPICHOLI/L1 otimizado nas placas de YPD suplementado com zeocina.

A PCR de colônia realizada amplificou o gene L1 em quase todos os clones selecionados por resistência ao antibiótico (figura 15).

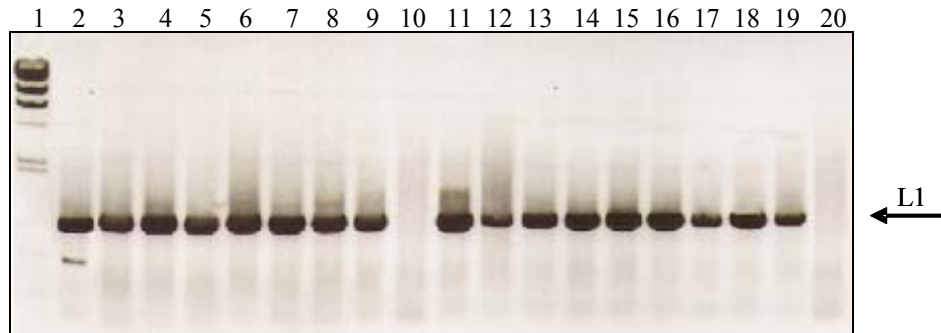


Figura 15: Gel de agarose 1% mostrando amplificação do gene L1 otimizado. O poço 1 refere-se ao marcador de DNA λ *Hind*III. Foi utilizado como controle positivo a construção pPICHOLI/L1 otimizado (poço 2) e como controle negativo, a linhagem GS115 não transformada (poço 20). Os poços 3 a 19 correspondem aos clones 1 a 17 de *P. pastoris* GS115 transformada.

Os lisados celulares após 48 horas de indução foram submetidos à análise da expressão por Western-blotting. Foi observada a banda de aproximadamente 55 kDa, correspondente a L1 em todos os clones contendo o vetor pPICHOLI/L1 códon otimizado. Aparentemente, a proteína L1 foi expressa em quantidades equivalentes por cada clone (figura 16).

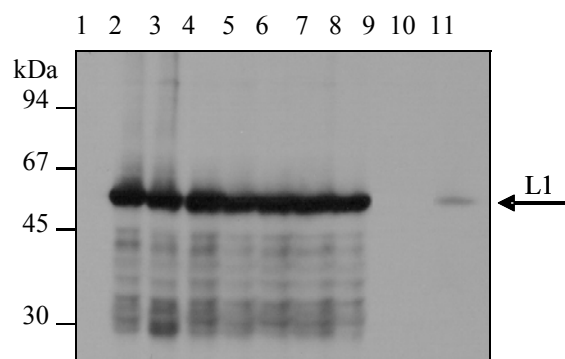


Figura 16: Western-blotting de extrato total de GS115 após 48 h de indução. O poço 1 refere-se ao marcador de massa molecular, os poços 2 a 8 correspondem aos clones 1 a 9 de *P. pastoris* GS115, o poço 9 corresponde ao extrato total do clone 1 antes da indução. Foi utilizado como controle negativo o extrato de *P. pastoris* GS115 transformada com o vetor pPICHOLI vazio (poço 10). Como controle positivo (poço 11), foi utilizada uma alíquota de extrato total de *Lactobacillus casei* expressando L1 (20 μ L do extrato de D.O.₆₀₀=1).

Foi verificada a presença de outras bandas reconhecidas pelo anticorpo no ensaio de Western-blotting. Essas bandas muito provavelmente correspondem a produtos de degradação da proteína L1, apesar do emprego de inibidores de proteases no processo de lise.

Não foi verificada a expressão no clone não induzido (figura 16, poço 9), o que demonstra que o promotor AOX foi induzido apenas na presença de metanol, não ocorrendo níveis basais de expressão ou escape.

b) Linhagem KM71:

Foi verificada a presença de várias colônias de *P. pastoris* KM71 resistentes à zeocina após transformação com a construção pPICHOLI/L1 otimizado.

A PCR de colônia realizada amplificou o gene L1 otimizado na maioria dos clones, conforme visualizado em gel de agarose 1% (figura 17):

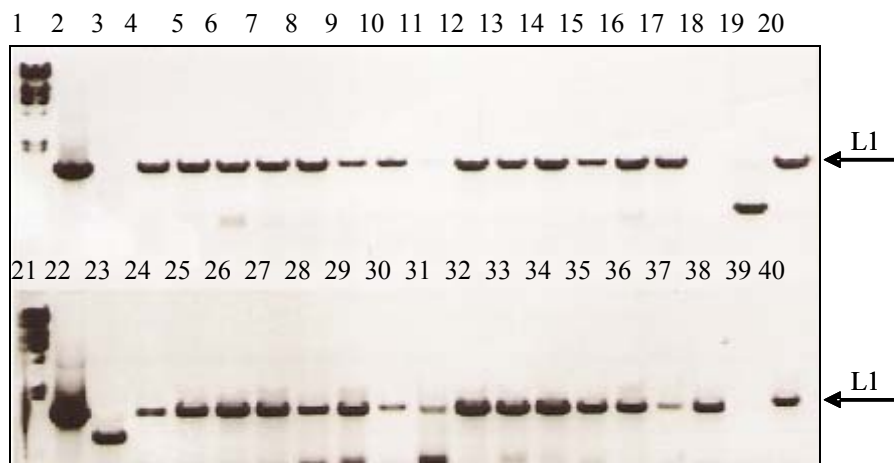


Figura 17: Gel de agarose 1% após PCR de colônia para a verificação da presença de L1 otimizado. Os poços 1 e 21 correspondem ao marcador de DNA λ HindIII. Como controle positivo, foi utilizada a construção pPICHOLI/L1 otimizado (poços 2 e 22) e como controle negativo, a linhagem KM71 não transformada (poço 3). Os poços 4 a 20 e 23 a 40 referem-se aos clones 1 a 35 de *P. pastoris* KM71.

Os lisados celulares de todos os clones contendo o vetor pPICHOLI/L1 otimizado submetidos à análise por Wester-blotting demonstraram a presença da proteína L1 (55 kDa). Aparentemente todos os clones contendo a construção pPICHOLI/L1 otimizado expressaram quantidades semelhantes da proteína heteróloga (figura 18). Não foi observada expressão de L1 no clone não submetido à indução (figura 18, poço 2).

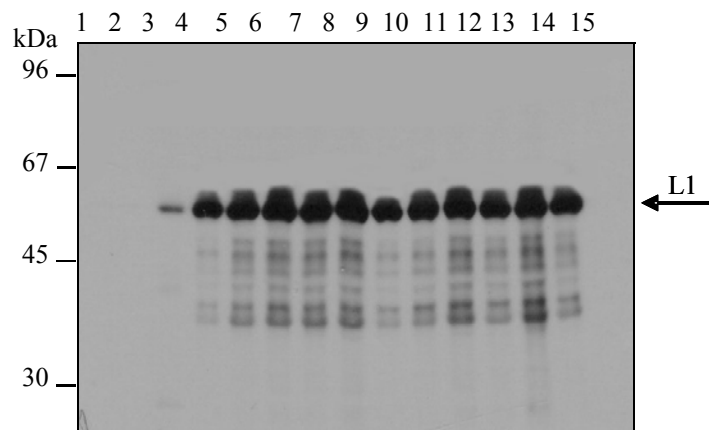


Figura 18: Western-blotting de extrato total de KM71 após 48 h de indução. Como controle negativo, foi utilizado o extrato de *P. pastoris* KM71 transformada com o vetor pPICHOLI vazio (poço 1). O poço 2 corresponde ao extrato total do clone 1 antes da indução e os poços 4 a 14 correspondem aos clones 1 a 6, 10, 12, 14, 18 e 26 de *P. pastoris* KM71. Como controle positivo (poço 3), foi utilizada uma alíquota de extrato total de *Lactobacillus casei* expressando L1 (20 μ L do extrato de D.O.=1). O poço 15 refere-se ao padrão de massa molecular.

Também foi observado um padrão de degradação proteica de L1, à semelhança do que ocorreu com a linhagem GS115.

A proteína L1 foi expressa intracelularmente em *P. pastoris* após utilização do gene L1 otimizado. Entretanto, os níveis da proteína heteróloga não são visíveis aos das demais proteínas visualizadas no extrato total de levedura após eletroforese em gel de poliacrilamida e coloração com Coomassie Brilliant Blue[®] (dados não mostrados). Apesar das tentativas de obtenção de um alto nível da proteína recombinante, como a utilização de um gene com

códons otimizados sob a regulação de um promotor forte e estritamente regulável, ficou evidenciada a dificuldade de expressão da proteína L1.

Li et al. (2003) tentaram a superexpressão da proteína L1 de HPV tipo 6 em *P. pastoris* após reconstrução do gene L1 com códons preferenciais para esta espécie de levedura, porém o rendimento máximo obtido foi de 125 µg de proteína por litro de cultura.

4.3. Ensaio cinético de expressão de L1

A fim de que fosse verificado o número ótimo de dias de indução para obtenção de maior quantidade de proteína, foi realizado um ensaio cinético de expressão com o clone 1 de *P. pastoris* KM71. O Western-blotting dos extratos celulares totais correspondentes a cada dia de indução mostrou que não houve variação na quantidade de proteína recombinante expressa ao longo do tempo (figura 19).

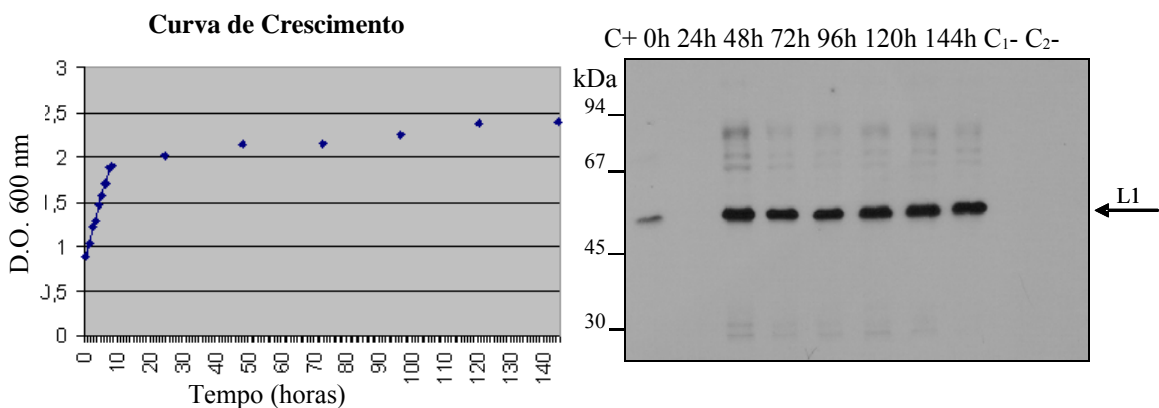


Figura 19: Curva de crescimento e Western-blotting de extrato total de KM71 a cada 24h de indução. Como controle positivo (C+), foi utilizado o extrato total de *L. casei* expressando L1. C₁- representa KM71 contendo o vetor pPICHOLI vazio e C₂- representa KM71 contendo o vetor pPICHOLI/L1 selvagem.

Devido ao padrão de expressão observado e considerando a curva de crescimento da levedura, que não apresenta aumento significativo na biomassa após 24 horas, foi utilizado o tempo de expressão de 48 horas para a realização dos ensaios subseqüentes.

4.4. Purificação de L1 de HPV-16 em coluna de Heparina

4.4.1. Eluição com gradiente salino

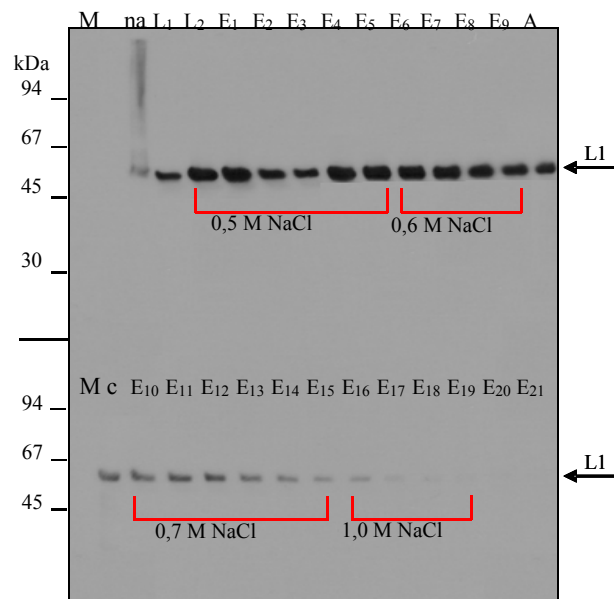
Conforme descrito na literatura, a proteína L1 de HPV 11 é capaz de interagir com heparina. VLPs aplicados sobre uma coluna de heparina-sepharose ligam-se à resina em concentrações salinas de até 0,5M NaCl e podem ser eluídos através de um gradiente linear de NaCl (Joyce *et. al.*, 1999). Uma região conservada nos 15 resíduos de aminoácidos finais da proteína L1, do tipo XBBBBXB (B = lisina, arginina ou histidina), apresenta um padrão similar a seqüências consenso de proteínas que se ligam à heparina e foi sugerida para mediar a interação com glicosaminoglicanas. No entanto, Giroglou et al. (2001) demonstraram que a deleção desta região não afeta a interação de VLPs com heparina. Rommel et al. (2005), através de experimentos de ELISA baseado em VLPs de HPV utilizando “coating” de heparina, sugeriram que a interação entre o capsídio do HPV e a heparina requer uma estrutura externa superficial intacta, o que fornece um grupo conformacional de aminoácidos básicos, ao invés de um arranjo linear de aminoácidos positivamente carregados.

Após a realização de cromatografia em resina de Heparina-Sepharose, foram verificadas bandas de aproximadamente 55 kDa, correspondentes a L1, após análise por Western-blotting, das amostras eluídas com altas concentrações de cloreto de sódio. A maior parte da proteína L1 foi eluída a 0,5M NaCl e 0,6M NaCl, uma pequena parte foi eluída com

0,7M NaCl e o restante foi eluído nas primeiras frações a 1,0M NaCl. Uma quantidade considerável da proteína saiu na etapa de lavagem com 0,4M NaCl. Foi possível observar também que uma certa quantidade da proteína não foi capaz de se ligar à resina (figura 18 A). Porém, este fato pode indicar que a fração não adsorvida corresponda à proteína L1 monomérica, uma vez que foi demonstrado que a interação entre heparina e L1 requer conformações superficiais externas das VLPs ou capsômeros intactos (Rommel *et al.*, 2005). O monômero L1 apresenta epítomos lineares não acessíveis em VLPs ou capsômeros corretamente montados. Outra possibilidade poderia ser que a quantidade de VLPs fosse maior do que a capacidade da coluna, ou que a concentração de NaCl fosse muito alta.

Após visualização do perfil de proteínas nas membranas de nitrocelulose, foi possível verificar que a grande maioria das proteínas contaminantes não foi adsorvida à resina ou foi eliminada na lavagem com cloreto de sódio a 0,4M. As amostras com concentrações de NaCl de 0,5M e 0,6M apresentaram praticamente a proteína L1 livre de contaminantes, porém, a partir de 0,7M de NaCl, foi possível notar a presença predominante de uma proteína de aproximadamente 45kDa (figura 18 B).

(A)



(B)

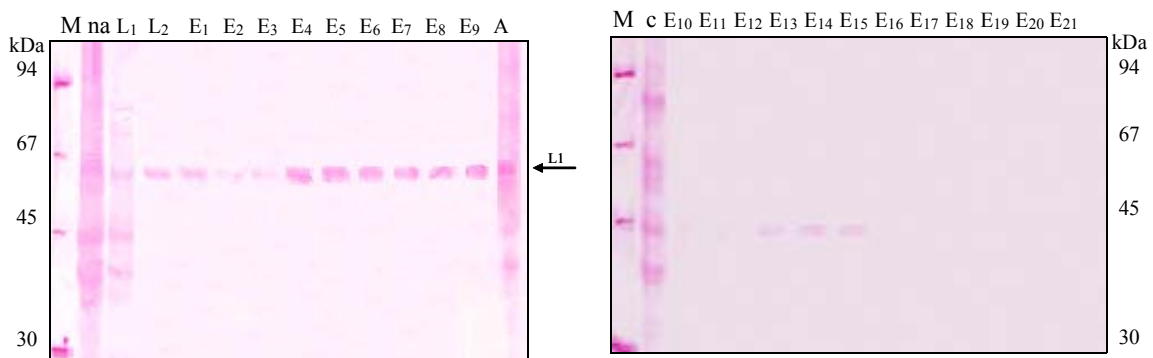


Figura 20: (A) Western-blotting das alíquotas resultantes da purificação em coluna de heparina. As concentrações salinas reais, determinadas por comparação dos índices de refração, estão indicadas. M = padrão de massa molecular, na = não adsorvido, L = lavagem, E = eluições, A= amostra de entrada na coluna, C = controle positivo (*P. pastoris* KM71 / L1). (B) Membranas de nitrocelulose correspondentes coradas com corante vermelho Ponceau S.

As alíquotas purificadas em coluna de heparina-sepharose foram então submetidas à análise por microscopia eletrônica (figura 21).

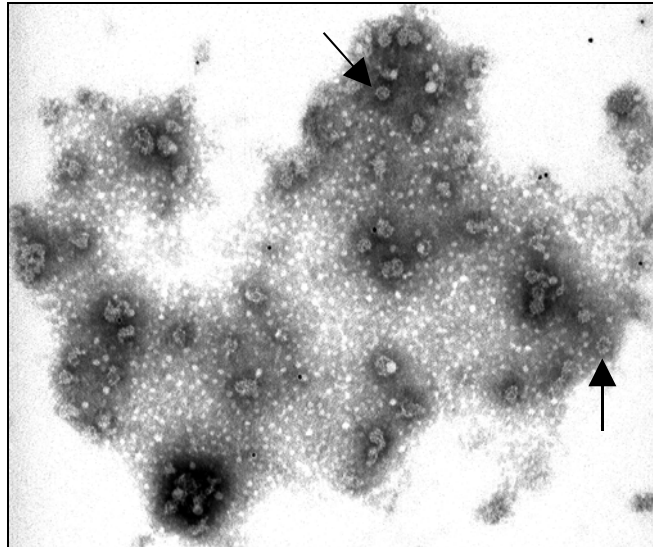


Figura 21: Microscopia eletrônica das amostras de VLPs após purificação em resina de heparina. Aumento de 20000x. As setas apontam para partículas intactas.

Como pôde ser observado, as amostras apresentaram-se bastante heterogêneas. Foi verificado um grande número de pentâmeros e de material amorfo, porém também foram observadas partículas intactas, apresentando estrutura quaternária.

As alíquotas provenientes desta purificação foram submetidas posteriormente à eletroforese em gel de acrilamida 10% e coradas com o corante Coomassie Brilliant Blue[®], no entanto, a proteína L1 não mais foi visualizada. A causa desta perda protéica foi inicialmente atribuída à degradação da proteína, porém dados da literatura demonstraram que VLPs de HPV expostos a superfícies de membranas ou submetidos a procedimentos de diálise apresentam uma alta tendência a agregação. VLPs também apresentam afinidade a superfícies, como polipropileno e vidro. Uma maneira que permitiria reduzir essas ocorrências seria utilizar surfactantes não iônicos, uma vez que estes ligam-se fracamente a proteínas e não causam sua desnaturação, além de adsorverem preferencialmente a superfícies, minimizando a agregação proteica (Shi et al., 2005).

4.4.2. Utilização de surfactante não iônico (polissorbato 80)

Para evitar a agregação das VLPs e a sua adsorção a superfícies como plástico, vidro, membranas de diálise, foi utilizado o polissorbato 80 (Shi et al., 2005).

O teste em pequena escala realizado com resina de heparina-sepharose na presença e na ausência de polissorbato 80 (PS80) demonstrou que a presença deste surfactante não interfere na ligação da proteína L1 à resina (figura 22).

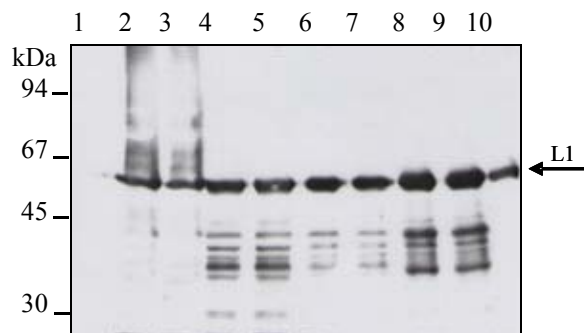


Figura 22: Teste com PS80. No Western-blotting das amostras contendo ou não o surfactante não iônico, foi utilizado o anticorpo monoclonal anti-L1 de HPV-16 CamVir[®]. O poço 1 refere-se ao marcador de massa molecular. O poço 2 corresponde ao extrato total de *P. pastoris* KM71 expressando o gene L1 otimizado, 3 refere-se ao mesmo extrato lisado na presença de PS80, 4 e 5 referem-se à amostra não adsorvida, porém em 5 há PS80. Os poços 6 e 7 correspondem à lavagem, porém só 7 contém PS80. As amostras 8 e 9 equivalem à eluição com 0,3 M de NaCl, sendo que 9 contém PS80. O poço 10 corresponde ao controle positivo (extrato de *P. pastoris* GS115 expressando L1 otimizado).

Através da análise do Western-blotting realizado, foi possível verificar que a presença do surfactante não interferiu na ligação da proteína L1 à resina de heparina. Esta constatação permitiu que fosse utilizado o polissorbato 80 nos demais procedimentos.

4.4.3. Eluição com solução PBS/NaCl 1,0 M

Devido ao fato de a proteína L1 ter sido eluída a diferentes concentrações de cloreto de sódio na primeira purificação, foi realizada uma nova tentativa de purificação em coluna de heparina, porém com variações nas etapas de lavagem e eluição. Sendo assim, foi feita uma tentativa de concentrar a proteína em apenas uma molaridade específica de cloreto de sódio (1,0 M). A coluna também foi equilibrada com uma solução de menor força iônica (0,25 M NaCl) em relação à primeira cromatografia, em uma tentativa de minimizar as perdas da proteína L1 na lavagem (figura 23).

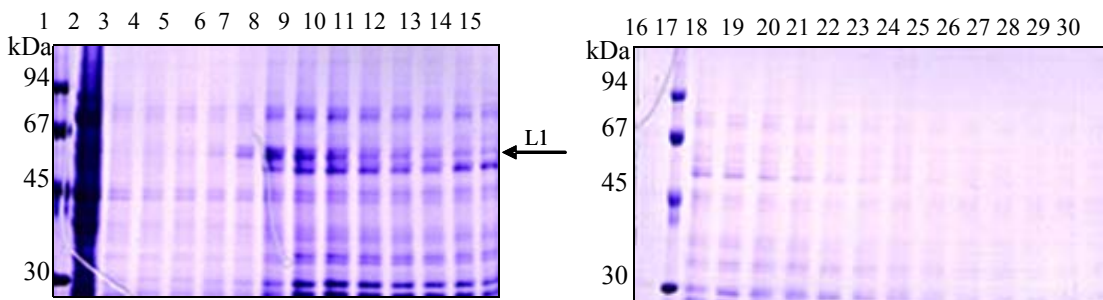


Figura 23: Gel de acrilamida 10% das amostras provenientes de purificação em resina de heparina-sepharose, corado com Coomassie Brilliant Blue[®]. Os poços 1 e 17 correspondem ao marcador de massa molecular, 2 refere-se à amostra não adsorvida, 3 refere-se à lavagem, 4 a 15 e 18 a 30 correspondem às frações 1 a 25 da eluição, 16 corresponde a eluição com NaCl 2,0 M.

Foi possível verificar que a entrada da amostra com uma concentração salina menor em relação à primeira purificação (0,25 M NaCl) e uma eluição única com alta concentração de sal (1,0 M NaCl) resultou em amostras eluídas contendo grande quantidade de proteínas contaminantes.

- **Recromatografia:**

Para tentar obter a proteína L1 de HPV-16 totalmente livre de contaminantes, foi realizada uma recromatografia.

Foi possível obter a proteína L1 com maior grau de pureza após nova passagem das amostras anteriormente eluídas (figura 23) pela resina de heparina (figura 24). A proteína L1 foi eluída nas frações 5 a 14 da eluição, conforme confirmado por Western-blotting (dados não mostrados).



Figura 24: Gel de acrilamida 10% das amostras provenientes de recromatografia em resina de heparina-sepharose, corado com Coomassie Brilliant Blue[®]. O poço 1 refere-se ao padrão de massa molecular, 2 corresponde ao extrato total de *P. pastoris* KM71 transformada com pPICHOLI/L1 otimizado antes da indução, 3 refere-se ao extrato total do mesmo clone após indução, 4 equivale à amostra de entrada na coluna, 5 à amostra não adsorvida, 6 refere-se à lavagem com NaCl 0,3 M, 7 representa a lavagem com NaCl 0,4 M e os poços 8 a 15 correspondem às frações 1 a 8 da eluição.

Muitas outras tentativas de purificação foram feitas utilizando resina de heparina, com protocolos alterando tanto a concentração salina da solução de entrada quanto das soluções de eluição. No entanto, em todas as tentativas, não foi possível obter a proteína L1 totalmente livre de contaminantes, sendo este o motivo de ter sido também tentada a purificação em resina POROS 50HS.

4.5. Purificação da proteína L1 de HPV-16 em coluna POROS 50HS

Cook *et al.* (1999) descreveram um método de purificação de VLPs recombinantes de HPV-11 incluindo uma etapa de cromatografia de troca iônica utilizando uma resina catiônica POROS 50HS e tampão (Na⁺)MOPS pH 7,0 com diferentes concentrações de cloreto de sódio. O tamanho grande dos poros desta resina estaria diretamente relacionado à acessibilidade das VLPs a sítios de ligação no interior das “beads”, resultando em uma alta capacidade de ligação. Dessa forma, foi também realizada uma tentativa de purificação nessa resina, com algumas modificações no protocolo.

Foram observadas bandas correspondentes à proteína L1 (55 kDa) nas eluições com concentrações salinas correspondentes a 0,8 M NaCl até 1,6 M NaCl. Porém, também foi notada a presença de outras proteínas contaminantes nestas frações (figura 25).

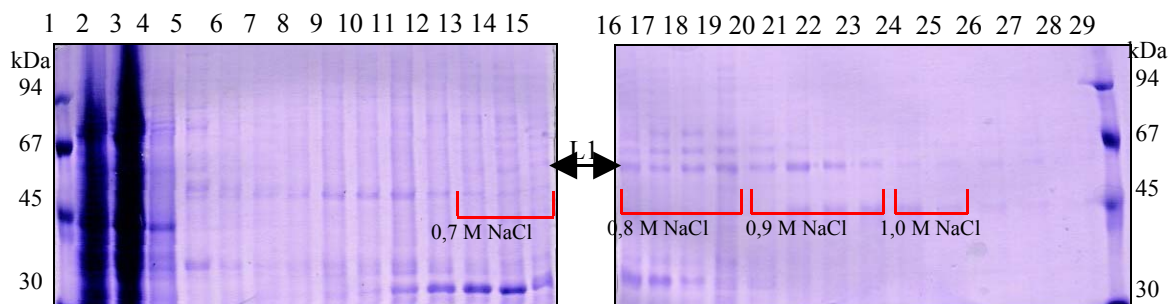


Figura 25: Gel de acrilamida 10% da purificação da proteína L1 de HPV-16 em resina POROS 50HS, corado com Coomassie Brilliant Blue[®]. Os poços 1 e 29 correspondem ao padrão de massa molecular, o poço 2 refere-se à amostra de entrada na coluna, 3 à amostra não adsorvida, 4 à lavagem com NaCl 0,4 M, 5 é a lavagem com NaCl 0,5 M. Os seguintes poços correspondem a eluições com diferentes concentrações de NaCl: 6 a 8 = NaCl 0,6 M, 9 e 10 = NaCl 0,7 M, 11 a 13 = NaCl 0,8 M, 14 e 15 = NaCl 0,9 M, 16 a 18 = NaCl 1,0 M, 19 e 20 = NaCl 1,3 M, 21 a 23 = NaCl 1,4 M, 24 e 25 = NaCl 1,6 M, 26 a 28 = NaCl 2,0 M.

Outras estratégias de purificação com resina POROS 50HS foram testadas, porém também não foram bem sucedidas em promover a obtenção da proteína L1 livre de contaminantes.

Esses resultados indicam que uma estratégia de purificação de VLPs baseada apenas em cromatografia de troca iônica ou com Heparina-Sepharose não poderá ser realizada isoladamente. Outras abordagens de purificação serão necessárias para a obtenção de um maior grau de pureza das partículas recombinantes.

4.6. Desmontagem e remontagem de VLPs

De acordo com dados da literatura, foi verificado que a expressão da proteína L1 de alguns tipos de HPV, inclusive HPV-16, em sistemas recombinantes eucariotos, levou à geração de VLPs de formato irregular e tamanhos menores do que o esperado. A ligação de componentes celulares da levedura a VLPs não completamente formadas poderia inibir a formação de interfaces adequadas entre os capsômeros e resultar em VLPs parcialmente formadas (Mach et al., 2006).

A incubação prolongada com relativamente altas concentrações de agente redutor em força iônica fisiológica levou à geração de capsômeros homogêneos e solúveis a partir de VLPs purificados. A remoção do agente redutor em alta força iônica geraria uma população de VLPs intactos e de tamanho apropriado (McCarthy *et al.*, 1998).

Este protocolo foi testado e as amostras (figura 26) submetidas a análise por microscopia eletrônica.

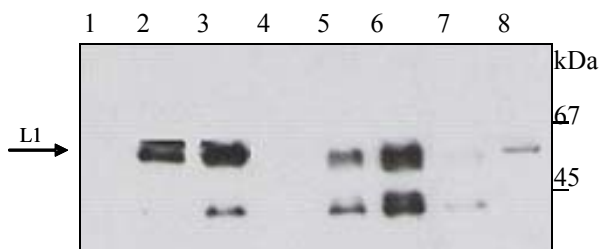


Figura 26: Western-blotting das amostras submetidas ou não (controle) ao protocolo de desmontagem e remontagem de VLPs. O poço 1 refere-se ao padrão de massa molecular, 2

ao controle sem ultracentrifugação, 3 ao controle com ultracentrifugação, 4 ao sobrenadante da ultracentrifugação do controle, o poço 5 corresponde à amostra submetidas a desmontagem e remontagem, 6 corresponde a amostra submetida aos processos de desmontagem, remontagem e ultracentrifugação, 7 é o sobrenadante da ultracentrifugação da amostra submetida a desmontagem e remontagem. Como controle positivo, foi utilizado o extrato de *P. pastoris* KM71 expressando L1 (poço 8).

Após análise destas amostras por microscopia eletrônica, foi observado apenas material amorfo, tanto antes do procedimento de desmontagem e remontagem de VLPs, quanto após a ele (dados não mostrados). Ficou também evidente uma maior proteólise de L1 após a realização deste protocolo de desmontagem e remontagem das VLPs.

Como o protocolo acima mencionado não resultou em melhora visível no estado das VLPs e tampouco influenciou na quantidade de partículas intactas, um novo protocolo foi testado na purificação seguinte. O procedimento foi realizado empregando incubação em baixa força iônica e pH alcalino na presença de baixas concentrações de agentes redutores, seguido de incubação em pH neutro e alta força iônica, uma vez que foi demonstrado que este método levou à formação de VLPs homogêneos, com estabilidade estrutural aumentada e melhor imunogenicidade (Mach et al., 2006).

Este protocolo foi testado nas amostras provenientes de purificação em resina POROS 50HS (figura 18) e as VLPs foram, após desmontagem, remontagem e concentração por ultracentrifugação, visualizadas por microscopia eletrônica (figura 27).

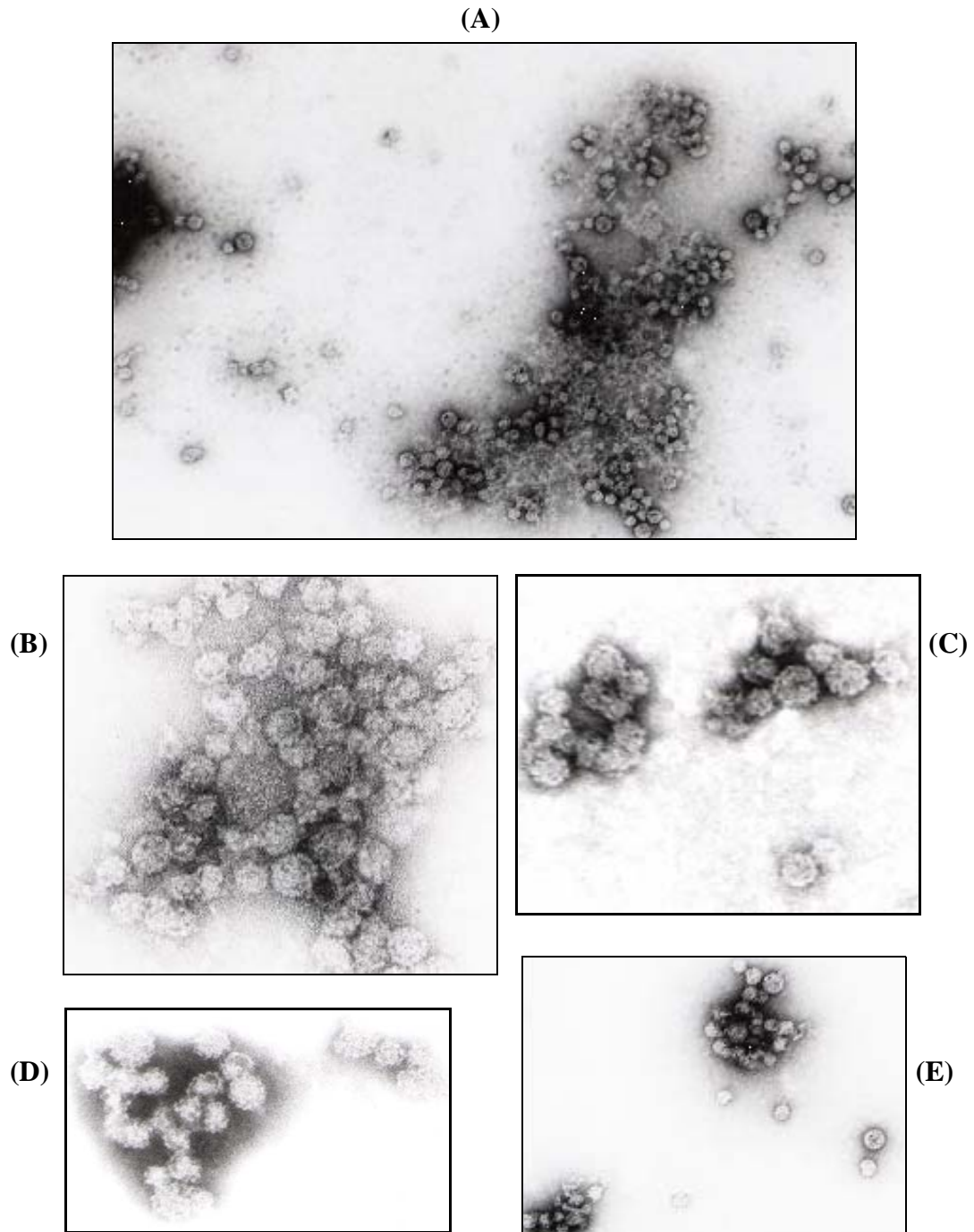


Figura 27: Microscopia eletrônica das amostras deVLPs, após purificação em resina POROS 50HS e procedimento de desmontagem e remontagem. As amostras foram coradas negativamente com acetato de uranila 2%. **(A)** Aumento de 20000x. **(B)** e **(C)** Aumento de 50000x. **(D)** Aumento de 30000x. **(E)** Aumento de 30000x.

Foi possível observar um grande número de partículas intactas e de formato mais definido e regular. Este último protocolo de desmontagem e remontagem de VLPs aparentemente levou à obtenção de VLPs relativamente homogêneas de maneira eficiente. Uma alíquota retirada antes de ser realizado o procedimento referido também foi analisada (figura 28).

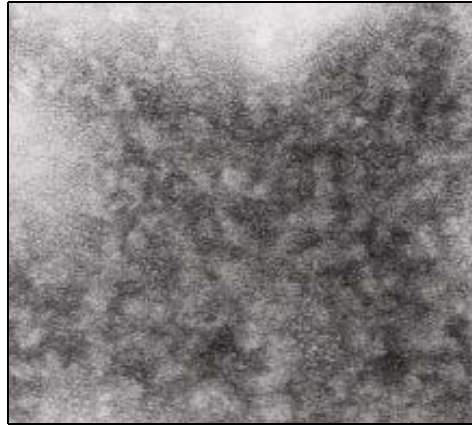


Figura 28: Microscopia eletrônica de amostra contendo VLPs submetidas a processo de desmontagem. Aumento de 30000x.

A amostra analisada é formada predominantemente por material amorfo. Não foram observadas partículas intactas, comprovando a eficácia do processo de desmontagem.

Mach et al. (2006) demonstraram a importância do efeito do pH nos processos de desmontagem e remontagem, atribuindo este fato à similaridade do que ocorre durante o ciclo do vírus no interior das células-alvo. Dessa maneira, um valor de pH próximo ao que existe no Retículo Endoplasmático e no Complexo de Golgi (pH 6,5), favorece a montagem da estrutura protéica, enquanto que o ambiente redutor do citoplasma favorece a desmontagem da referida estrutura. Sendo assim, uma vez que são aplicadas condições de pH e força iônica adequadas, são necessárias concentrações relativamente baixas de agente redutor para completar o processo de desmontagem e remontagem de VLPs.

4.7. Ultracentrifugação em gradiente de sacarose

Foi demonstrado que VLPs apresentam um padrão de sedimentação em frações de 30% a 40% de sacarose (McCarthy et al., 1998; Aires et al., 2006). Moléculas de L1 arranjadas em pentâmeros e na forma monomérica bandeiam aproximadamente nas frações de 20% e 10% de sacarose, respectivamente. Com a finalidade de obter o máximo rendimento possível de VLPs, o processo de ultracentrifugação foi efetuado após a realização dos processos de desmontagem e remontagem de VLPs obtidas após cromatografia em Heparina-Sepharose (figura não mostrada), conforme protocolo descrito em “Materiais e Métodos”.

Após procedimento de eletroforese em gel de poliacrilamida, foi possível visualizar a presença da banda correspondente a L1 na amostra equivalente ao precipitado formado após a ultracentrifugação (figura 29, poço 7). A proteína L1 não foi detectada na amostra correspondente ao sobrenadante gerado após a ultracentrifugação (figura 29, poço 6), mesmo após experimento de Western-blotting (dados não mostrados).

O processo de ultracentrifugação em gradiente de sacarose não foi capaz de permitir uma melhora no grau de pureza da proteína L1. Pôde ser observada no gel de poliacrilamida a presença de inúmeras bandas referentes a proteínas contaminantes na amostra correspondente ao precipitado (figura 29, poço 7).

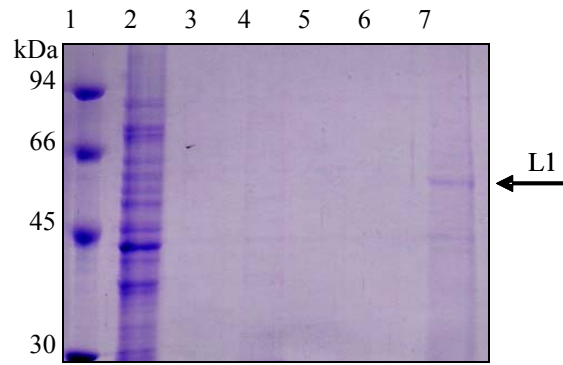


Figura 29: Gel de poliacrilamida 10% corado com Coomassie Brilliant Blue[®]. O poço 1 refere-se ao marcador da massa molecular, 2 corresponde ao extrato total de *P. pastoris* KM71 expressando L1 (48 h de indução), 3 corresponde à reunião das amostras parcialmente purificadas em resina de heparina-sepharose, 4 corresponde à amostra após desmontagem, 5 corresponde à amostra após procedimentos de desmontagem e remontagem, 6 equivale ao sobrenadante da ultracentrifugação e 7 corresponde ao precipitado da ultracentrifugação.

4.8. Ensaios de Hemaglutinação e Inibição da Hemaglutinação

Foi possível verificar que as VLPs de L1 de HPV-16 produzidas em *Pichia pastoris* foram capazes de aglutinar eritrócitos de camundongo após 3 horas de incubação (figura 28, linha B).

Também foi observado que o anticorpo utilizado no ensaio inibiu a ação das VLPs sobre os eritrócitos, neutralizando eficientemente epítomos conformacionais presentes nessas partículas (figura 30, linha C).

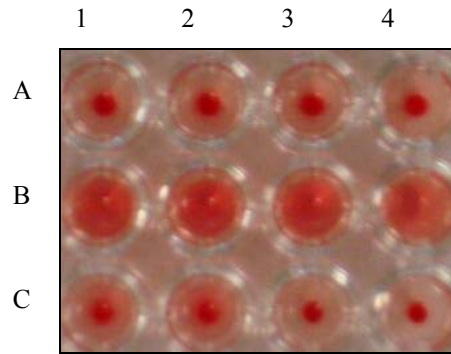


Figura 30: Hemaglutinação e inibição da hemaglutinação. **A:** controle negativo (PBS / NaCl 0,5M / PS80 0,01%). **B1:** 200 ng VLPs; **B2:** 100 ng VLPs; **B3:** 50 ng VLPs; **B4:** 25 ng VLPs. **C1 a C4:** respectivas concentrações de VLPs incubadas previamente com 400 ng de anticorpo que neutraliza epítomos conformacionais de L1 de HPV-16.

O ensaio de inibição da hemaglutinação com o anticorpo utilizado deve mostrar a sua ligação com os capsídios corretamente montados. Dessa forma, o ensaio confirma a correta montagem das VLPs expressas em *P. pastoris* e a apresentação de epítomos conformacionais neutralizantes nestas partículas.

5. DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES

Infecções clínicas e subclínicas pelo papilomavírus humano constituem as doenças sexualmente transmissíveis mais comuns em todo o mundo. Evidências epidemiológicas e bioquímicas demonstram a forte associação entre infecção por HPVs de alto risco oncogênico e desenvolvimento de carcinoma cervical. A geração de uma vacina efetiva contra HPVs de alto risco, especialmente o HPV-16, que é encontrado em aproximadamente 50% dos casos de câncer do colo do útero, reduziria significativamente as taxas de incidência de lesões malignas e pré-malignas associadas a este vírus.

Sendo assim, malignidades associadas ao HPV devem ser prevenidas por vacinas indutoras de resposta imune vírus-específicas. Tradicionalmente, a maioria das vacinas virais profiláticas consistem de vírus vivos, atenuados ou inativos. No entanto, as dificuldades de obtenção de grandes quantidades de papilomavírus autênticos em cultura, assim como os argumentos sobre os riscos potenciais da administração de uma vacina contendo oncogenes virais, mobilizou grandes esforços visando ao desenvolvimento de uma vacina de subunidade. A proteína principal do capsídeo do HPV, L1, é capaz de auto arranjar-se em uma conformação morfológicamente indistinguível dos vírions autênticos e mostrou-se altamente imunogênica, induzindo altos títulos de anticorpos neutralizantes, quando inoculada tanto em modelos animais quanto em humanos.

Apesar da existência de sistemas de expressão da proteína L1 de HPV-16 em outros microorganismos, como em *E. coli*, tais processos são economicamente limitados em suas habilidades de produzir quantidades significativas de VLPs de L1 (Lai *et al.*, 2002). O sistema de expressão em levedura, baseado em promotores fortes, permite a obtenção de altos níveis de expressão de proteínas heterólogas e tem sido muito utilizado para a produção em larga escala.

O objetivo inicial do trabalho foi expressar a proteína L1 de HPV-16 em *Hansenula polymorpha*. No entanto, os níveis de expressão da proteína L1 com o gene selvagem observados em *H. polymorpha* transformada com o vetor pHIPX4/L1 foram muito baixos, indetectáveis ou instáveis e, portanto, não satisfizeram os requisitos básicos para a produção em larga escala. Além disso, não foi observada expressão de L1, tanto selvagem como com os códons otimizados, em *H. polymorpha* sob a regulação do promotor AOX de *Pichia pastoris* com o vetor pPICHOLI[®]. Uma análise posterior realizada, quando foram comparadas as seqüências promotoras do AOX de *Pichia pastoris* e de *Hansenula polymorpha*, revelou que tais seqüências são muito distintas. Isso poderia explicar a falta de expressão de L1 em *H. polymorpha* utilizando o vetor pPICHOLI, que possui a região promotora de *P. pastoris*, ainda que dados da literatura tenham mostrado que o promotor AOX de *P. pastoris* funcione em *H. polymorpha* (Raschke *et. al.*, 1996; Rodriguez *et. al.*, 1996).

Sendo assim, foram realizadas tentativas de expressão de L1 em *Pichia pastoris*. A expressão só foi possível com a utilização do gene L1 contendo códons otimizados. O gene L1 selvagem apresenta muitos códons restritivos para *Pichia pastoris* e *Hansenula polymorpha*, dificultando sua expressão, mesmo sob a regulação de promotores fortes.

Dados da literatura demonstraram a necessidade de otimização de códons de uma grande variedade de genes com a finalidade de aumentar os níveis de expressão da proteína recombinante em *Pichia pastoris* (Outchkourov *et al.*, 2002; Woo *et al.*, 2002; Yadava *et al.*, 2003).

Não houve diferenças mensuráveis entre as expressões da proteína L1 nas linhagens GS115 e KM71. Não foi observada diferença relativa da expressão de L1 ao longo do tempo de indução.

Foram realizadas inúmeras tentativas para o estabelecimento de um protocolo de purificação das VLPs de L1 de HPV-16 expressas em *Pichia pastoris*, utilizando resinas

cromatográficas. As tentativas de purificação de L1 em resina POROS 50HS não proporcionaram a obtenção da proteína pura e, aparentemente, apresentaram-se menos eficientes do que as tentativas utilizando heparina.

Mesmo após tentativas de purificação combinadas, como a realização de ultracentrifugação em colchões de sacarose após passagem pela resina de cromatografia, as dificuldades de obtenção da proteína totalmente livre de contaminantes persistiram.

A proteína L1 demonstrou capacidade de se auto-montar em VLPs, apresentando estrutura quaternária, como pôde ser confirmado por microscopia eletrônica. Ensaio de hemaglutinação e inibição da hemaglutinação mostraram a funcionalidade destas estruturas. No entanto, devido a uma característica inerente à própria L1, esta apresentou problemas de agregação e de adsorção a superfícies, além de ter havido a formação de partículas heterogêneas em relação à forma e ao tamanho, e da ocorrência de estruturas não muito bem formadas. Foram efetuadas tentativas de minimizar estes problemas. Aparentemente, a utilização do surfactante não iônico nas etapas de lise, purificação e nos testes subsequentes amenizou o problema de adsorção a superfícies.

Quanto aos protocolos de desmontagem e remontagem das VLPs, apenas o descrito por Mach et al. (2006) demonstrou ser eficiente em promover melhorias na morfologia das VLPs, conforme mostrado por microscopia eletrônica. Estes resultados foram confirmados e este método foi utilizado nos protocolos de obtenção de VLPs a partir da proteína L1 de HPV-16.

Até o momento, não existem relatos na literatura mostrando a expressão da proteína L1 de HPV-16 em *Hansenula polymorpha* e em *Pichia pastoris*. Este trabalho demonstrou que a levedura *P. pastoris* foi capaz de sintetizar a proteína L1 de HPV-16, porém apenas quando foi utilizado o gene com os códons otimizados para a expressão. No entanto, não foi possível determinar o rendimento do processo, uma vez que a proteína L1 não foi obtida com

alto grau de pureza. Além disso, a dificuldade de visualização da proteína em gel de poliacrilamida corado com Coomassie Brilliant Blue[®] impede sua quantificação utilizando, por exemplo, curva padrão de BSA. De qualquer forma, foi possível verificar a correta montagem da proteína heteróloga e a apresentação de epítomos conformacionais em sua superfície. Outras etapas ainda serão necessárias, como ensaios de imunização em modelo animal e teste de inibição da hemaglutinação realizado com o soro dos animais imunizados. Um dificultador para esta etapa é justamente o baixo rendimento de obtenção da proteína recombinante.

Visando ao desenvolvimento de um processo produtivo em larga escala, outras adaptações seriam necessárias. Por exemplo, deve ser considerada a impossibilidade de um sistema produtivo utilizando zeocina como marcador seletivo. Os altos custos associados a este antibiótico tornariam a produção em larga escala um processo economicamente inviável. Sendo assim, a presença de um marcador de prototrofia no vetor de expressão tornaria o processo mais econômico. Por outro lado, devem ser avaliadas as implicações de um marcador deste tipo no número de cópias do vetor necessário para que os transformantes sejam capazes de crescer em um meio deficiente de um determinado aminoácido. No caso de a seleção ser feita através de resistência a antibiótico, é possível selecionar clones contendo um maior número de cópias do vetor de expressão, aumentando-se a dosagem do antibiótico. Tal método de seleção de múltiplas cópias não seria possível no caso de seleção por prototrofia. É fundamental para um processo produtivo a obtenção de um clone altamente produtor. Portanto, é desejável que sejam utilizados transformantes estáveis carregando plasmídios múltiplos integrados em seus genomas, possibilitando um alto nível de expressão da proteína heteróloga.

Haveria ainda outras barreiras a serem superadas, já que muitos protocolos precisariam ser adaptados para um processo produtivo. Devem ser providenciadas novas soluções para os

problemas de agregação, adsorção e heterogeneidade das partículas. A realização dos procedimentos de desmontagem e remontagem de VLPs seria impossível para grandes volumes, típicos de um processo em larga escala. Além disso, o polissorbato 80 não poderia ser empregado em uma formulação injetável destinada a uso humano.

Uma vacinação efetiva para prevenir o câncer cervical requer um alto grau de proteção contra infecção e lesões pré-cancerosas. Dessa forma, uma vacina ideal contra infecções causadas pelo HPV deve conferir, pelo menos, proteção contra HPV-16 e HPV-18. Somados, estes dois tipos são responsáveis por mais de 70% dos casos de câncer do colo do útero.

O Instituto Butantan considera a expressão da proteína L1 de HPVs de alto risco um projeto prioritário. O Instituto já possui uma planta de produção da vacina de Hepatite B, e poderá utilizar esta instalação para a produção de uma vacina anti-HPV. Além disso, a apresentação de outros antígenos poderá ser feita nessas VLPs. A expressão de L1 fusionada com o próprio gene E7 do papilomavírus permite a expressão de VLPs com potencial terapêutico em tumores do colo do útero provocado por este vírus (Greenstone *et al.*, 1998). Por outro lado, a apresentação de outros antígenos nestes VLPs poderá resultar em vacinas multivalentes contra outros patógenos humanos, além do papilomavírus.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGAPHONOV, M.O.; POZNYAKOVSKI, A.I.; BOGDANOVA, A.I.; TER-AVANESYAN, M.D. Isolation and characterization of the LEU2 gene of *Hansenula polymorpha*. *Yeast* v. 10, p. 509 – 513, 1994.

AIRES, K.A.; CIANCIARULLO, A.M.; CARNEIRO, S.M.; VILLA, L.L.; BOCCARDO, E.; PÉREZ-MARTINEZ, G.; PEREZ-ARELLANO, I.; OLIVEIRA, M.L.S.; HO, P.L. Production of Human Papillomavirus Type 16 L1 Virus-Like Particles by Recombinant *Lactobacillus casei* Cells. *Applied and Environmental Microbiology* v. 72, n. 1, p. 745-752, 2006.

AKADA, R.; MURAKANE, T.; NISHIZAWA, Y. DNA extraction method for screening yeast clones by PCR. *Biotechniques* v. 28, n. 4, p. 668 - 674, 2000.

BEDELL, M.A.; HUDSON, J.B.; GOLUB, T.R.; TURYK, M.E.; HOSKEN, M.; WILBANKS, G.D.; LAIMINS, L.A. Amplification of human papillomavirus genomes in vitro is dependent on epithelial differentiation. *J Virol* v. 65, n. 5, p. 2254 - 2260, 1991.

BEUKEN, E.; VINK, C.; BRUGGEMAN, C. A. One-Step Procedure for Screening Recombinant Plasmids by Size. *Biotechniques* v. 24, p. 748-750, 1998.

BIEMELT, S.; SONNEWALD, U.; GALMBACHER, P.; WILLMITZER, L.; MÜLLER, M. Production of human papillomavirus type 16 virus-like particles in transgenic plants. *J Virology* v. 77, n. 17, p. 9211-9220, 2003.

BOOY, F.P.; RODEN, R.B.; GREENSTONE, H.L.; SCHILLER, J.T.; TRUS, B.L. Two antibodies that neutralize papillomavirus by different mechanisms show distinct binding patterns at 13 Å resolution. *J Mol Biol* v. 281, n. 1, p. 95 – 106, 1998.

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

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

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

BREITBURD, F.; KIRNBAUER, R.; HUBBERT, N.L.; NONNENMACHER, B.; TRIN-DINH-DESMARQUET, C.; ORTH, G.; SCHILLER, J.T.; LOWY, D.R. Immunization with virus-like particles from cottontail rabbit papillomavirus (CRPV) can protect against experimental CRPV infection. *J. Virology* v. 69, p. 3959 – 3963, 1995.

BROWN, D.R.; SHEW, M.L.; QADADRI, B.; NEPTUNE, N.; VARGAS, M.; TU, W.; JULIAR, B.E.; BREEN, T.E.; FORTENBERRY, J.D. A Longitudinal Study of Genital Human Papillomavirus Infection in a Cohort of Closely Followed Adolescent Women. *J Infect Dis* v. 191, p. 182 – 192, 2005.

CARTER, J.J.; YAEGASHI, N.; JENISON, S.A.; GALLOWAY, D.A. Expression of Human Papillomavirus Proteins in Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Virology* v. 182, p. 513 – 521, 1991.

CHEN, X.S.; GARCEA, R. L.; GOLDBERG, I.; CASINI, G.; HARRISON, S.C. Structure of small virus-like particles assembled from the L1 protein of Human Papillomavirus 16. *Molecular Cell* v. 5, p. 557 - 567, 2000.

CHEN, X. S.; CASINI, G.; HARRISON, S. C.; GARCEA, R. L. Papillomavirus capsid protein expression in *Escherichia coli*: purification and assembly of HPV11 and HPV16 L1. *J. Mol. Biol.* v. 307, p. 173 – 182, 2001.

CHEN, Y.F.; LIN, C.W.; TSAO, Y.P.; CHEN, S.L. Cytotoxic-T lymphocyte human papillomavirus type 16 E5 peptide with CpG-oligodeoxynucleotide can eliminate tumor growth in C57BL/6 mice. *J. Virol* v. 78, p. 1333 – 1343, 2004.

CHEUNG, Y.K.; CHENG, S.C.S.; SIN, F.W.Y.; XIE, Y. Plasmid encoding papillomavirus Type 16 (HPV16) DNA constructed with codon optimization improved the immunogenicity against HPV infection. *Vaccine* v. 23, n. 5, p. 629 – 638, 2004.

CHOO, K.B.; PAN, C.C.; HAN, S.H. Integration of human papillomavirus type 16 into cellular DNA of cervical carcinoma: preferential deletion of the E2 gene and invariable retention of the long control region and the E6/E7 open reading frames. *Virology* v. 161, p. 259 – 261, 1987.

CHRISTENSEN, N.D.; DILLNER, J.; EKLUND, D.; CARTER, J.J.; WIPF, G.C.; REED, C.A.; CLADEL, N.M.; GALLOWAY, D.A. Surface conformational and linear epitopes on HPV-16 and HPV-18 L1 virus-like particles as defined by monoclonal antibodies. *Virology* v. 223, p. 174 – 184, 1996.

COOK, J.C; JOYCE, J.G.; GEORGE, H.A.; SCHULTZ, L.D.; HURNI, W.M.; KELLER, P.M.; LEHMAN, E.D. Purification of virus-like particles of recombinant human papillomavirus type 11 major capsid protein L1 from *Saccharomyces cerevisiae*. *Protein Expression and Purification* v. 17, p. 477 – 484, 1999.

CORONA GUTIERREZ, C.M.; TINOCO, A.; NAVARRO, T.; CONTRERAS, M.L.; CORTES, R.R.; CALZADO, P.; REYES, L.; POSTERNAK, R.; MOROSOLI, G.; VERDE, M.L.; ROSALES, R. Therapeutic vaccination with MVA E2 can eliminate precancerous lesions (CIN 1, CIN 2, and CIN 3) associated with infection by oncogenic human papillomavirus. Hum Gene Ther. v. 15, n. 5, p. 421 - 431, 2004.

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

DUPUY, C.; BUZONI-GATEL, D.; TOUZE, A.; BOUT, D.; COURSAGET, P. Nasal Immunization of Mice with Human Papillomavirus Type 16 (HPV-16) Virus-Like Particles or with the HPV-16 L1 Gene Elicits Specific Cytotoxic T Lymphocytes in Vaginal Draining Lymph Nodes. *Journal of Virology* v. 73, n. 11, p. 9063 – 9071, 1999.

FABER, K.N.; SWAVING, G.J.; FABER, F.; AB, G.; HARDER, W.; VEENHUIS, M.; HAIMA, P. Chromosomal targeting of replicating plasmids in the yeast *Hansenula polymorpha*. *J Gen Microbiol.* v. 138, p. 2405 – 2416, 1992.

FRANCO, E.L.; VILLA, L.L.; SOBRINHO, J.P.; PRADO, J.M.; ROUSSEAU, M.C.; DÉSY, M.; ROHAN, T.E. Epidemiology of Acquisition and Clearance of Cervical Human Papillomavirus Infection in Women from a High-Risk Area for Cervical Cancer. *J Infect Dis* v. 180, p. 1414 – 1423, 1999.

GARCÍA-HERNÁNDEZ, E.; GONZÁLEZ-SÁNCHEZ, J.L.; ANDRADE-MANZANO, A.; CONTRERAS, M.L.; PADILLA, S.; GUZMÁN, C.C.; JIMÉNEZ, R.; REYES, L.; MOROSOLI, G.; VERDE, M.L.; ROSALES, R. Regression of papilloma high-grade lesions (CIN 2 and CIN 3) is stimulated by therapeutic vaccination with MVA E2 recombinant vaccine. *Cancer Gene Ther.* v. 13, n. 6, p. 592 – 597, 2006.

GATZKE, R.; WEYDEMANN, U.; JANOWICZ, Z.A.; HOLLENBERG, C.P. Stable multicopy integration of vector sequences in *Hansenula polymorpha*. *Appl Microbiol Biotechnol* v. 43, p. 844-849, 1995.

GELLISSEN, G.; HOLLENBERG, C.P.; JANOWICZ, Z.A. Gene expression in methylotrophic yeasts. *Bioproc Technol* v. 22, p. 195 – 239, 1995.

GELLISSEN, G. Heterologous protein production in methylotrophic yeasts. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* v. 54, p. 741-750, 2000.

GIETL, C.; FABER, K.N.; VAN DER KLEI, I.J.; VEENHUIS, M. Mutational analysis of the N-terminal topogenic signal of watermelon glyoxysomal malate dehydrogenase using the heterologous host *Hansenula polymorpha*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* v. 91, p. 3151 – 3155, 1994.

GIROGLOU, T.; FLORIN, L.; SCHÄFER, F.; STREECK, R.E.; SAPP, M. Human papillomavirus infection requires cell surface heparan sulfate. *J. Virology* v. 75, p. 1565 – 1570, 2001.

GIULIANO, A.R.; HARRIS, R.; SEDJO, R.L.; BALDWIN, S.; ROE, D.; PAPENFUSS, M.R.; ABRAHAMSEN, M.; INSERRA, P.; SANDRA OLVERA, S.; HATCH, K. Incidence, Prevalence, and Clearance of Type-Specific Human Papillomavirus Infections: The Young Women's Health Study. *J Infect Dis* v. 186, p. 462 – 469, 2002.

GLEESON, M.A.; SUDBERY, P.E. Genetic analysis in the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*. *Yeast* v. 4, p. 293–303, 1998.

GREENSTONE, H.L.; NIELAND, J.D.; DE VISSER, K.E.; DE BRUIJN, M.L.H.; KIRNBAUER, R.; RODEN, R.B.S.; LOWY, D.R.; KAST, W.M.; SCHILLER, J.T.

Chimeric papillomavirus virus-like particles elicit antitumor immunity against the E7 oncoprotein in an HPV16 tumor model. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* v. 95, p. 1800 – 1805, 1998.

HARPER, D.M.; FRANCO, E.L.; WHEELER, C.M.; MOSCICKI, A.B.; ROMANOWSKI, B.; ROTELI-MARTINS, C.M.; JENKINS, D.; SCHUIND, A.; CLEMENS, S.A.C.; DUBIN, G. Sustained efficacy up to 4.5 years of a bivalent L1 virus-like particle vaccine against human papillomavirus types 16 and 18: follow-up from a randomized control trial. *Lancet* v. 367, p. 1247-1255, 2006.

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

HEGDE, R.S. The papillomavirus E2 proteins: structure, function, and biology. *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* v. 31, p. 343 – 360, 2002.

HO, G.Y.; BIERMAN, R.; BEARDSLEY, L.; CHANG, C.J.; BURK, R.D. Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. *N Engl J Med.* v. 338, n. 7, p. 423 - 428, 1998.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. Estimativa 2006: Incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2005. 94p.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER Human Papillomaviruses. In: Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. v. 64, World Health Organization, 1995.

JOYCE, J.G.; TUNG, J.S.; PRZYSIECKI, C.T.; COOK, J.C.; LEHMAN, E.D.; SANDS, J.A.; JANSEN, K.U.; KELLER, P.M. The L1 major capsid protein of human papillomavirus type 11 recombinant virus-like particles interacts with heparin and cell-surface glycosaminoglycans on human keratinocytes. *J Biol Chem* v. 274, n. 9, p. 5810 - 5822, 1999.

KAWANA, K.; KAWANA, Y.; YOSHIKAWA, H.; TAKETANI, Y.; YOSHIKE, K.; KANDA, T. Nasal immunization of mice with peptide having a cross-neutralization epitope on minor capsid protein L2 of human papillomavirus type 16 elicit systemic and mucosal antibodies. *Vaccine* v. 19, n. 11 – 12, p. 1496 – 1502, 2001.

KIM, S.N.; JEONG, H.S.; PARK, S.N.; KIM, H.J. Purification and immunogenicity study of human papillomavirus type 16 L1 protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Virol. Methods*, v. 139, n. 1, p. 24 – 30, 2007.

KIRNBAUER, R.; TAUB, J.; GREENSTONE, H.; RODEN, R.; DÜRST, M.; GISSMANN, L.; LOWY, D.R.; SCHILLER, J.T. Efficient self-assembly of human papillomavirus type 16 L1 and L1-L2 into virus-like particles. *Journal of Virology* v. 67, n. 12, p. 6929-6936, 1993.

KIRNBAUER, R.; BOOY, F.; CHENG, N.; LOWY, D.R.; SCHILLER, J.T. Papillomavirus L1 major capsid protein self-assembles into virus-like particles that are highly immunogenic. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* v. 89, p. 12180 – 12184, 1992.

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, 1996.

KONDO, K.; ISHII, Y.; OCHI, H.; MATSUMOTO, T.; YOSHIKAWA, H.; KANDA, T. Neutralization of HPV16, 18, 31, and 58 pseudovirions with antisera induced by immunizing rabbits with synthetic peptides representing segments of the HPV16 minor capsid protein L2 surface region. *Virology* v. 358, n. 2, p. 266 - 272, 2007.

KOUTSKY, L.A.; AULT, K.A.; WHEELER, C.M.; BROWN, D.R.; BARR, E.; ALVAREZ, F.B.; CHIACCHIERINI, L.M.; JANSEN, K.U. A Controlled Trial of a Human Papillomavirus Type 16 Vaccine. *N. Engl. J. Med.* v. 347, n. 21, p. 1645 – 1651, 2002.

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

LAI, W.B.; MIDDELBERG, A.P. The production of human papillomavirus type 16 L1 vaccine product from *Escherichia coli* inclusion bodies. *Bioprocess Biosyst Eng.* v. 25, n. 2, p. 121 - 128, 2002.

LE CANN, P.; COURSAGET, P.; IOCHMANN, S.; TOUZE, A. Self-assembly of human papillomavirus type 16 capsids by expression of the L1 protein in insect cells. *FEMS Microbiol. Lett.* v. 117, p. 269 – 274, 1994.

LEDEBOER, A.M.; EDENS, L.; MAAT, J.; VISSER, C.; BOS, J.W.; VERRIPS, C.T.; JANOWICZ, Z.; ECKART, M.; ROGGENKAMP, R.; HOLLENBERG, C.P. Molecular cloning and characterization of a gene coding for methanol oxidase in *Hansenula polymorpha*. *Nucleic Acids Research* v. 13, n. 9, 1985.

LI, P.C.; ZHANG, X.G.; ZHOU, L.; ZENG, Y. Gene optimization is necessary to express HPV type 6 L1 protein in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi* v. 17, n. 4, p. 310 – 314, 2003.

LIU, D.W.; CHANG, J.L.; TSAO, Y.P.; HUANG, C.W.; KUO, S.W.; CHEN, S.L. Co-Vaccination with Adeno-Associated Virus Vectors Encoding Human Papillomavirus 16 L1 Proteins and Adenovirus Encoding Murine GM-CSF can Elicit Strong and Prolonged Neutralizing Antibody. *Int. J. Cancer* v. 113, n. 1, p. 93 – 100, 2005.

LIU, D.W.; TSAO, Y.P.; HSIEH, C.H.; HSIEH, J.T.; KUNG, J.T.; CHIANG, C.L.; et al., Induction of CD8 T cells by vaccination with recombinant adenovirus expressing human papillomavirus type 16 E5 gene reduces tumor growth. *J. Virol* v. 74, p. 9083 – 9089, 2000.

LIU, X.S.; JABBAR, I.A.; QI, Y.M.; FRAZER, I.H.; ZHOU, J. Mucosal immunisation with papillomavirus virus-like particles elicits systemic and mucosal immunity in mice. *Virology* v. 252, p. 39 – 45, 1998.

LOWE, R.S., JANSEN, K., LING, J. *et al.* Inventors: Merck and Co. Inc., assigne. Protein delivery system using Human Papillomavirus virus-like particles. US patent application number US9917931 and European patent application number EP99940951, 24 February 2000.

LOWY, D.R.; KIRNBAUER, R.; SCHILLER, J.T. Genital human papillomavirus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. v. 91, p. 2436 - 2440, 1994.

MACH, H.; VOLKIN, D.B.; TROUTMAN, R.D.; WANG, B.; LUO, Z.; JANSEN, K.U.; SHI, L. Disassembly and reassembly of yeast-derived recombinant human papillomavirus virus-like particles (HPV VLPs). *J Pharm Sci* v. 95, n. 10, p. 2195-206, 2006.

MANTOVANI, F.; BANKS, L. The Human Papillomavirus E6 protein and its contribution to malignant progression. *Oncogene* v. 20, p. 7874 – 7887, 2001.

MCCARTHY, M.P.; WHITE, W.I.; PALMER-HILL, F.; KOENIG, S.; SUZICH, J.A. Quantitative disassembly and reassembly of human papillomavirus type 11 viruslike particles in vitro. *J Virol*. v. 72, n. 1, p. 32 - 41, 1998.

MCLEAN, C.S.; CHURCHER, M.J.; MEINKE, J.; SMITH, G.L.; HIGGINS, G.; STANLEY, M.; MINSON, A.C. Production and characterisation of a monoclonal antibody to human papillomavirus type 16 using recombinant vaccinia virus. *J Clin Pathol* v. 43, p. 488 – 492, 1990.

MIDDLETON, K.; PEH, W.; SOUTHERN, S.; GRIFFIN, H.; SOTLAR, K.; NAKAHARA, T.; EL-SHERIF, A.; MORRIS, L.; SETH, R.; HIBMA, M.; JENKINS, D.; LAMBERT, P.; COLEMAN, N.; DOORBAR, J. Organization of human papillomavirus productive cycle during neoplastic progression provides a basis for selection of diagnostic markers. *J Virol* v. 77, p. 10186– 10201, 2003.

MÜNGER, K.; HOWLEY, P.M. Human papillomavirus immortalization and transformation functions. *Virus Research* v. 89, p. 213 – 228, 2002.

MÜNGER, K.; BASILE, J.R.; DUENSING, S.; EICHTEN, A.; GONZALEZ, S.L.; GRACE, M.; ZACNY, V.L. Biological activities and molecular targets of the human papillomavirus E7 oncoprotein. *Oncogene* v. 20, p. 7888 - 7898, 2001.

MUÑOZ, N.; BOSCH, F.X.; DE SANJOSE, S.; HERRERO, R.; XAVIER, C.; SHAH, K.V.; SNIJDERS, P.J.F.; MEIJER, C.J.L.M. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N. Engl. J. Med.* v. 348, p. 518 - 527, 2003.

MUÑOZ, N.; CASTELLSAGU, X.; DE GONZÁLEZ, A.B.; GISSMANN, L. Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. *Vaccine* v. 24S3, p. S3/1 – S3/10, 2006.

NARDELLI-HAEFLIGER, D.; RODEN, R.B.S.; BENYACOUB, J.; SAHLI, R.; KRAHEMBUHL, J.P.; SCHILLER, J.T.; LACHAT, P.; POTTS, A.; DE GRANDI, P. Human papillomavirus type 16 virus-like particles expressed in attenuated *Salmonella typhimurium* elicit mucosal and systemic neutralizing antibodies in mice. *Infection and Immunity* v. 65, n. 8, p. 3328-3336, 1997.

NEEPER, M.P.; HOFMANN, K.J.; JANSEN, K.U. Expression of the major capsid protein of human papillomavirus type 11 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* v. 180, p. 1 – 6, 1996.

OHLSCHLÄGER, P.; OSEN, W.; DELL, K.; FAATH, S.; GARCEA, R.L.; JOCHMUS, I.; MÜLLER, M.; PAWLITA, M.; SCHÄFER, K.; SEHR, P.; STAIB, C.; SUTTER, G.; GISSMANN, L. Human papillomavirus type 16 L1 capsomeres induce L1-specific cytotoxic T lymphocytes and tumor regression in C57BL/6 mice. *J Virol* v. 77, n. 8, p. 4635 - 4645, 2003.

ORR-WEAVER, T.L.; SZOSTAK, J.W.; ROTHSTEIN, R.J. Yeast transformation: a model system for the study of recombination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* v. 78, p. 6354 – 6358, 1981.

OUTCHKOUROV, N.S.; STIEKEMA, W.J.; JONGSMA, M.A. Optimization of the expression of equistatin in *Pichia pastoris*. *Protein Expr Purif* v. 24, n. 1, p. 18 – 24, 2002.

PARKIN, D.M.; BRAY, F. Chapter 2: The burden of HPV-related cancers. *Vaccine* v. 24S3, p. S3/11 – S3/25, 2006.

PARTRIDGE, J.M.; KOUTSKY, L.A. Genital human papillomavirus infection in men. *Lancet Infect Dis* v. 6, n. 1, p. 21 – 31, 2006.

PEÑA, L.M.; LAIMINS, L.A. Regulation of human papillomavirus gene expression in the vegetative cell cycle. In: *Human Papillomaviruses*, Elsevier, 2002.

PISANI, P.; PARKIN, D.M.; FERLAY, J. Estimates of the worldwide mortality from eighteen major cancers in 1985. Implications for prevention and projections of future burden. *Int J Cancer* v. 55, p. 891 – 903, 1993.

RASCHKE, W.C.; NEIDITCH, B.R.; HENDRICKS, M.; CREGG, J.M. Inducible expression of a heterologous protein in *Hansenula polymorpha* using the alcohol oxidase 1 promoter of *Pichia pastoris*. *Gene* v. 177, p. 163-167, 1996.

ROCHA-ZAVALA, L.; ALEJANDRE, J.E.; GARCIA-CARRANCA, A. Parenteral and Oral Immunization With A Plasmid DNA Expressing the Human Papillomavirus 16-L1 Gene Induces Systemic and Mucosal Antibodies and Cytotoxic T Lymphocyte Responses. *Journal of Medical Virology* v. 66, p. 86 – 95, 2002.

RODEN, R.B.S.; YUTZY, W.H.; FALLON, R.; INGLIS, S.; LOWY, D.R.; SCHILLER, J.T. Minor capsid protein of human genital papillomaviruses contains subdominant, cross-neutralizing epitopes. *Virology* v. 270, n. 2, p. 254 – 257, 2000.

RODEN, R.B.S.; HUBBERT, N.L.; KIRNBAUER, R.; CHRISTENSEN, N.D.; LOWY, D.R.; SCHILLER, J.T. Assessment of the Serological Relatedness of Genital Human Papillomaviruses by Hemagglutination Inhibition. *Journal of Virology* v. 70, n. 5, p. 3298 – 3301, 1996.

RODEN, R.B.S.; HUBBERT, N.L.; KIRNBAUER, R.; BREITBURD, F.; LOWY, D.R.; SCHILLER, J.T. Papillomavirus L1 Capsids Agglutinate Mouse Erythrocytes through a Proteinaceous Receptor. *Journal of Virology* v. 69, n. 8, p. 5147 – 5151, 1995.

RODEN, R.B.S.; WEISSINGER, E.M.; HENDERSON, D.W.; BOOY, F.; KIRNBAUER, R.; MUSHINSKI, J.F.; LOWY, D.R.; SCHILLER, J.T. Neutralization of Bovine Papillomavirus by Antibodies to L1 and L2 Capsid Proteins. *Journal of Virology* v. 68, n. 11, p. 7570 - 7574, 1994.

RODRIGUEZ, L.; NARCIANDI, R.E.; ROCA, H.; CREMATA, J.; MONTESINOS, R.; RODRIGUEZ, E.; GRILLO, J.M.; MUZIO, V.; HERRERA, L.S.; DELGADO, J.M. Invertase secretion in *Hansenula polymorpha* under the AOX1 promoter from *Pichia pastoris*. *Yeast* v. 12, n. 9, p. 815 - 822, 1996.

ROGGENKAMP, R.; HANSEN, H.; ECKART, M.; JANOWICZ, Z.; HOLLENBERG, C.P. Transformation of the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha* by autonomous replication and integration vectors. *Molec. Gen. Genet.* v. 202, p. 302 – 308, 1986.

ROMMEL, O.; DILLNER, J.; FLIGGE, C.; BERGSDORF, C.; WANG, X.; SELINKA, H-C.; SAPP, M. Heparan Sulfate Proteoglycans Interact Exclusively With Conformationally Intact HPV L1 Assemblies: Basis for a Virus-Like Particle ELISA. *Journal of Medical Virology* v. 75, p. 114 - 121, 2005.

ROSE, R.C.; WHITE, W.I.; LI, M.; SUZICH, J.A.; LANE, C.; GARCEA, R.L. Human papillomavirus type 11 recombinant L1 capsomeres induce virus-neutralizing antibodies. *Journal of Virology* v. 72, n. 7, p. 6151 – 6154, 1998.

ROSE, R. Human papillomavirus immunology and vaccine development. In: Human Papillomaviruses, Elsevier, 2002.

SASAGAWA, T.; TANI, M.; BASHA, W.; ROSE, R.C.; TOHDA, H.; GIGA-HAMA, Y.; AZAR, K.K.; YASUDA, H.; SAKAI, A.; INOUE, M. A human papillomavirus type 16 vaccine by oral delivery of L1 protein. *Virus Research* v. 110, n. 1-2, p. 81 - 90, 2005.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. Molecular Cloning – a Laboratory Manual, 2. ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SHI, L.; SANYAL, G.; NI, A.; LUO, Z.; DOSHNA, S.; WANG, B.; GRAHAM, T.L.; WANG, N.; VOLKIN, D.B. Stabilization of Human Papillomavirus Virus-Like Particles by Non-Ionic Surfactants. *Journal of Pharmaceutical Sciences* v. 94, n. 7, p. 1538 - 1551, 2005.

SONG, H.; LI, Y.; FANG, W.; GENG, Y.; WANG, X.; WANG, M.; QIU, B. Development of a set of expression vectors in *Hansenula polymorpha*. *Biotechnology Letters* v. 25, p. 1999 - 2006, 2003.

STELLER, M.A. Cervical Cancer Vaccines: Progress and Prospects. *J Soc Gynecol Investig.* v. 9, n. 5, p. 254 – 264, 2002.

SUZICH, J. A.; GHIM, S.J.; PALMER-HILL, F.J.; WHITE, W.I.; TAMURA, J.K.; BELL, J.A.; NEWSOME, J.A.; JENSON, A.B.; SCHLEGEL, R. Systemic immunization with papillomavirus L1 protein completely prevents the development of viral mucosal papillomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* v. 92, p. 11553 – 11557, 1995.

TOMITA, E.Y.; RAMOS, C.R.R.; NASCIMENTO, A.L.T.O.; HO, P.L. Isolation of genomic DNA from *Pichia pastoris* without hydrolases. *Biotechnologia Aplicada* v. 19, p. 167 – 168, 2002.

TROTTIER, H.; FRANCO, E.L. The epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Vaccine* v. 24, n. 1, p. 1 - 15, 2006.

VAN DIJK, R.; FABER, K.N.; KIEL, J.A.K.W.; VEENHUIS, M.; VAN DER KLEI, I. The methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*: a versatile cell factory. *Enzyme and Microbial Technology* v. 26, p. 793 – 800, 2000.

VILLA, L.L.; COSTA, R.L.; PETTA, C.A.; ANDRADE, R.P.; PAAVONEN, J.; IVERSEN, O.E.; OLSSON, S.E.; HOYE, J.; STEINWALL, M.; RIIS-JOHANNESSEN, G.; ANDERSSON-ELLSTROM, A.; ELFGREN, K.; KROGH, G.; LEHTINEN, M.; MALM, C.; TAMMS, G.M.; GIACOLETTI, K.; LUPINACCI, L.; RAILKAR, R.; TADDEO, F.J.; BRYAN, J.; ESSER, M.T.; SINGS, H.L.; SAAH, A.J.; BARR, E. High sustained efficacy of a prophylactic quadrivalent human papillomavirus types 6/11/16/18 L1 virus-like particle vaccine through 5 years of follow-up. *British J Cancer* v. 95, n. 11, p. 1459 - 1466, 2006a.

VILLA, L.L.; AULT, K.A.; GIULIANO, A.R.; COSTA, R.L.R.; PETTA, C.A.; ANDRADE, R.P.; BROWN, D.R.; FERENCZY, A.; HARPER, D.M.; KOUTSKY, L.A.; KURMAN, R.J.; LEHTINEN, M.; MALM, C.; OLSSON, S.E.; RONNETT, B.M.; SKJELDESTAD, F.E.; STEINWALL, M.; STOLER, M.H.; WHEELER, C.M.; TADDEO, F.J.; YU, J.; LUPINACCI, L.; RAILKAR, R.; MARCHESE, R.; ESSER, M.T.; BRYAN, J.; JANSEN, K.U.; SINGS, H.L.; TAMMS, G.M.; SAAH, A.J.; BARR, E. Immunologic responses following administration of a vaccine targeting human papillomavirus types 6, 11, 16 and 18. *Vaccine* v. 24, p. 5571 - 5583, 2006.

VILLA, L.L.; COSTA, R.L.; PETTA, C.A.; ANDRADE, R.P.; AULT, K.A.; GIULIANO, A.R.; WHEELER, C.M.; KOUTSKY, L.A.; MALM, C.; LEHTINEN, M.; SKJELDESTAD, F.E.; OLSSON, S.E.; STEINWALL, M.; BROWN, D.R.; KURMAN, R.J.; RONNETT, B.M.; STOLER, M.H.; FERENCZY, A.; HARPER, D.M.; TAMMS, G.M.; YU, J.; LUPINACCI, L.; RAILKAR, R.; TADDEO, F.J.; JANSEN, K.U.; ESSER, M.T.; SINGS, H.L.; SAAH, A.J.; BARR, E. Prophylactic quadrivalent human papillomavirus (types 6, 11, 16, and 18) L1 virus-like particle vaccine in young women: a randomised double-blind placebo-controlled multicentre phase II efficacy trial. *Lancet Oncol.* v. 6, n. 5, p. 271 - 278, 2005.

XU, Y.F.; ZHANG, Y.Q.; XU, X.M.; SONG, G.X. Papillomavirus virus-like particles as vehicles for the delivery of epitopes or genes. *Arch Virol.* v. 151, n. 11, p. 2133 – 2148, 2006.

YADAVA, A.; OCKENHOUSE, C.F. Effect of Codon Optimization on Expression Levels of a Functionally Folded Malaria Vaccine Candidate in Prokaryotic and Eukaryotic Expression Systems. *Infect Immun.* v. 71, n.9, p. 4961 – 4969, 2003.

YANG, X.F.; QU, X.Z.; WANG, K.; ZHENG, J.; SI, L.S.; DONG, X.P.; WANG, Y.L. Construction of prophylactic human papillomavirus type 16 L1 capsid protein vaccine delivered by live attenuated *Shigella flexneri* strain sh42. *Acta Biochim Biophys Sin* v. 37, n. 11, p. 743 - 750, 2005.

WALBOOMERS, J.M.; JACOBS, M.V.; MANOS, M.M.; BOSCH, F.X.; KUMMER, J.A.; SHAH, K.V.; SNIJDERS, P.J.; PETO, J.; MEIJER, C.J.; MUÑOZ, N. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J. Pathol.* v. 189, p. 12 – 19, 1999.

WANG, J.; ZHAO, C.; WANG, K.; ZHENG, J.; WANG, Y.; SI, L. Enhanced immunization after intranasal coadministration of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin B subunit and human papillomavirus 16-L1 DNA vaccine. *Chin Med J*; v. 119, n. 5, p. : 408-411, 2006.

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

WOO, J.H.; LIU, Y.Y.; MATHIAS, A.; STAVROU, S.; WANG, Z.; THOMPSON, J.; NEVILLE, D.M. Gene optimization is necessary to express a bivalent anti-human anti-T cell immunotoxin in *Pichia pastoris*. *Protein Expr Purif.* v. 25, n. 2, p. 270 – 282, 2002.