

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS AGGEU MAGALHÃES
Mestrado Acadêmico em Saúde Pública

RENATO CÉSAR VIEIRA DE SOUSA

**CONSTRUÇÃO E ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE
PROTÓTIPOS VACINAIS RECOMBINANTES CONTRA
O VÍRUS DA HEPATITE A**

Recife

2011

RENATO CÉSAR VIEIRA DE SOUSA

**CONSTRUÇÃO E ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE PROTÓTIPOS VACINAIS
RECOMBINANTES CONTRA O VÍRUS DA HEPATITE A**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado Acadêmico em Saúde Pública do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, para a obtenção do grau de mestre em Ciências.

Orientador: Dr. Rafael Dhalia

Recife
2011

RENATO CÉSAR VIEIRA DE SOUSA

**CONSTRUÇÃO E ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE PROTÓTIPOS VACINAIS
RECOMBINANTES CONTRA O VÍRUS DA HEPATITE A**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado Acadêmico em Saúde Pública do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, para a obtenção do grau de mestre em Ciências.

Aprovado em: __/__/____

BANCA EXAMINADORA

Dr. Rafael Dhália (Orientador)
CPqAM/FIOCRUZ-PE

Dra. Constância Flávia Junqueira Ayres (Titular Interno)
CPqAM/FIOCRUZ-PE

Dr. Carlos Gustavo Régis da Silva (Titular Externo)
CPqAM/FIOCRUZ-PE

AGRADECIMENTOS

À minha família, por sempre me apoiar e me incentivar mesmo distante

À Adriana, por estar ao meu lado em todos os momentos, compartilhando conquistas, dividindo alegrias e nunca me deixando abalar nas situações mais difíceis. Por ser companheira de todas as horas e fazer com que eu me esforce para tentar ser uma pessoa melhor a cada dia.

Ao meu orientador, Dr. Rafael Dhalia, pela oportunidade que me deu de realizar este trabalho, pelos valiosos ensinamentos, não apenas científicos, que me passou e por não deixar de me incentivar mesmo quando os resultados pareciam não sair.

À Fábria e Isabelle, por estarem sempre dispostas a me ajudar, quando eu ainda estava “meio perdido” naquele novo ambiente e por me passarem seus conhecimentos “da bancada” sempre com muita boa vontade e paciência.

À Klécia e Gabriel, pela ótima convivência no dia-a-dia do laboratório e pelas ajudas constantes nos experimentos.

À Geórgia, Andréa Melo e André, pela companhia nos almoços, pelos bons momentos de descontração e também por sempre me ajudarem no meu trabalho e nas “coisas” do laboratório.

À Sandra, pela amizade construída e pela fundamental ajuda no cultivo do vírus.

À Sabrina e Andréa Rangel, que mesmo na correria diária sempre se dispuseram a dar valiosas contribuições a este trabalho

A todos os amigos de longa data, um em cada lugar do Brasil, mas que a cada novo encontro a amizade torna-se mais fortalecida

À Dra. Vanessa de Paula, pelo fornecimento do vírus e das células sem os quais não seria possível a realização deste trabalho

A Pós-Graduação e ao CPqAM, por disponibilizarem excelente infra-estrutura para que eu pudesse desenvolver esta dissertação

A todos do LaViTE, alunos, técnicos, pesquisadores e funcionários. Quero agradecer a todos do laboratório, pois cada contribuição, por menor que possa ter parecido, tenho certeza que foi grandiosa na sua intenção. Muito obrigado a todos pela compreensão e paciência!

SOUSA, Renato César Vieira de. **Construção e análise da expressão de protótipos vacinais recombinantes contra o vírus da hepatite A**. 2011. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2011.

RESUMO

A infecção pelo Vírus da Hepatite A (HAV) ainda acomete milhões de pessoas em todo o mundo, causando uma doença que pode variar desde um quadro assintomático até casos mais severos. Apesar da existência de vacinas comerciais, produzidas a partir do vírus inativado ou atenuado, elas ainda não estão disponíveis para grande parte da população mundial, em virtude do seu alto custo. Uma alternativa atraente consiste na pesquisa e desenvolvimento de vacinas de DNA, que potencialmente apresentam algumas vantagens em relação a vacinas convencionais como a maior estabilidade, maior segurança e possibilidade de serem produzidas com um menor custo final. Neste trabalho foi realizada a construção, otimização e avaliação da expressão de protótipos vacinais recombinantes, visando o desenvolvimento de uma vacina de DNA contra o HAV. O segmento traduzível do genoma do HAV é composto por: região P1, formada pelas proteínas estruturais VP1, VP2, VP3 e VP4; região P2, da qual fazem parte a proteína 2A (que funciona como primeiro sinal para a montagem do capsídeo) e as proteínas 2B e 2C (as quais participam do processo de replicação do RNA viral); região P3, onde encontram-se a protease 3C (responsável pelo processamento de todas as proteínas estruturais e não-estruturais) e a RNA polimerase 3D. A sequência vacinal foi gerada a partir dos genes das proteínas estruturais, e da protease 3C viral, sendo denominada de poliproteína truncada (HAV-PTRUNC). Esta sequência foi otimizada e também fusionada a região N-terminal da Proteína de Associação à Membrana Lisossomal (LAMP), com o objetivo de promover a secreção dos antígenos virais, gerando a construção N-LAMP_HAV-PTRUNC. Para a detecção da expressão de HAV-PTRUNC e N-LAMP_HAV-PTRUNC, as proteínas individuais VP1, VP3 e 3C foram produzidas em bactérias e utilizadas para imunizar coelhos, para a obtenção de anticorpos policlonais específicos contra as mesmas. Os anticorpos obtidos foram capazes de reconhecer não só as respectivas proteínas recombinantes, como também as proteínas nativas do vírus e N-LAMP_HAV-PTRUNC. De acordo com os resultados obtidos, pretendemos dar continuidade aos nossos estudos através de ensaios clínicos, no intuito de produzir a primeira vacina de DNA contra HAV regulamentada para uso em humanos.

Palavras-chave: 1. Hepatite A - virologia. 2. Vacinas de DNA – imunologia. 3. Expressão gênica - imunologia. 4. Proteínas recombinantes.

SOUSA, Renato César Vieira de. **Construction and expression analysis of recombinant vaccine prototypes against Hepatitis A virus**. 2011. Dissertation (Master degree of Public Health) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2011.

ABSTRACT

Infection with Hepatitis A Virus (HAV) still affects millions of people around the world, causing a disease that can vary from asymptomatic to severe cases. Despite the existence of commercial vaccines produced from inactivated or attenuated viruses, they are not yet available for most of the world population, because of its high cost end. An attractive alternative is the research and development of DNA vaccines, which potentially offer some advantages over conventional vaccines as greater stability, greater security and possibility of being produced with a lower overall cost. This study aims to construct, optimize and evaluate the expression of recombinant vaccine prototypes, aiming to develop a DNA vaccine against HAV. The translatable segment of the genome of HAV is composed of P1 region, formed by structural proteins VP1, VP2, VP3 and VP4; P2 region, where are protein 2A (which has the important function of serving as the first signal for the assembly of the capsid proteins) and 2B and 2C (which participates in the process replication of viral RNA); P3 region, where are the 3C protease (responsible for processing all structural and non-structural proteins) and RNA polymerase 3D. The vaccine sequence was generated from the structural protein genes, and viral 3C protease, being called truncated polyprotein (HAV-PTRUNC). This sequence was also optimized and fused to the N-terminal region of the Lysosome Associated Membrane Protein (LAMP), aiming to promote the secretion of viral antigens, leading to the construction of N-LAMP_HAV-PTRUNC. To detect the expression of HAV-PTRUNC and N-LAMP_HAV-PTRUNC, individual proteins VP1, VP3 and 3C were produced in bacteria and used to immunize rabbits to obtain polyclonal antibodies against them. The antibodies generated were able to recognize not only the respective recombinant proteins as the native protein of the virus and N-LAMP_HAV-PTRUNC. According to the results, we intend to continue our studies through clinical trials in order to produce the first DNA vaccine against HAV regulated for use in humans.

Keywords: 1. Hepatitis A - virology. 2. Vaccines, DNA – immunology. 3. Gene expression - immunology. 4. Recombinant proteins.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Organização do genoma do HAV e processamento da poliproteína	16
Figura 2 – Visão geral do ciclo de replicação do HAV	18
Figura 3 – Modelo mostrando a via de montagem do capsídeo do vírus da Hepatite A e as funções dos domínios terminais VP4 e 2A	19
Figura 4 – Curso clínico, infectividade e perfil sorológico na Hepatite A aguda	23
Figura 5 – Prevalência estimada da infecção pelo vírus da Hepatite A no mundo em 2005	26
Figura 6 – Número de casos notificados de Hepatite A no Brasil de 1994 a 2005	27
Figura 7 – Visão geral da indução da imunidade celular e humoral pela vacina de DNA	30
Figura 8 – Modelo de construção da sequência da vacina de DNA contra o HAV, baseada apenas nas proteínas estruturais (VP1-4) e proteínas 2A e 3C do vírus.	40
Figura 9 – Construção dos vetores de expressão em bactéria	42
Figura 10 – Otimização de <i>codon usage</i> , para o aminoácido valina, visando melhorar a eficiência de expressão da poliproteína truncada do vírus da Hepatite A (HAV-PTRUNC) em células humanas.	55
Figura 11 – Otimização da sequência codificante da proteína VP1 do HAV, em relação às estruturas secundárias de seu mRNA	56
Figura 12 – Digestão dos vetores comerciais contendo os fragmentos otimizados de VP1, VP3 e 3C	57
Figura 13 – Digestão das preparações contendo os fragmentos otimizados de VP1, VP3 e 3C clonados no vetor pMal_c4X	58
Figura 14 – Representação esquemática das construções contendo as sequências de VP1, VP3 e 3C, otimizadas, para a expressão em bactéria	58
Figura 15 – Expressão em pequena escala das proteínas recombinantes de HAV em sistema bacteriano	59
Figura 16 – Purificação da proteína MBP fusionada ao fragmento α da β -	60

galactosidase

Figura 17 – Purificação da proteína de fusão MBP-VP1 _{OPT} .	61
Figura 18 – Purificação da proteína de fusão MBP-VP3 _{OPT}	61
Figura 19 – Purificação da proteína de fusão MBP-3C _{OPT}	62
Figura 20 – Clivagem da proteína recombinante MBP-3C _{OPT} com a protease Fator Xa	63
Figura 21 – Clivagem da proteína recombinante MBP-VP1 _{OPT} com a protease Fator Xa	63
Figura 22 – Clivagem da proteína recombinante MBP-VP3 _{OPT} com a protease Fator Xa	64
Figura 23 – Titulação do anticorpo anti-VP1 _{OPT} para avaliar seu limite de detecção	65
Figura 24 – Titulação do anticorpo anti-VP3 _{OPT} para avaliar seu limite de detecção	65
Figura 25 – Titulação do anticorpo anti-3C _{OPT} para avaliar seu limite de detecção	65
Figura 26 – Digestão do vetor comercial contendo o fragmento otimizado de HAV-PTRUNC	66
Figura 27 – Digestão para confirmação da clonagem de HAV-PTRUNC vetor p43.2.	67
Figura 28 - Digestão para confirmação da clonagem de HAV-PTRUNC fusionado à região N terminal de LAMP no vetor p43.2	68
Figura 29 – Representação esquemática dos vetores vacinais	68
Figura 30 – Imunofluorescência de células BHK-21 transfectadas com a construção p43.2_hN-LAMP_HAV-PTRUNC _{OPT} , mostrando a expressão da região N-terminal de LAMP	69
Figura 31 – Imunofluorescência de células HEK-293 transfectadas com a construção p43.2_hN-LAMP_HAV-PTRUNC _{OPT} , mostrando a expressão da poliproteína truncada.	71

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGMK	<i>African Green Monkey Kidney Cell</i> (Célula de Rim de Macaco Verde Africano)
AMP	Ampicilina
APC	<i>Antigen Presenting Cell</i> (Célula Apresentadora de Antígeno)
BHK-21	<i>Baby Hamster Kidney cell</i> (Célula de rim de hamster)
BSA	<i>Bovine serum albumine</i> (Albumina sérica bovina)
CDC	<i>Center for Disease Control and Prevention</i> (Centro de Controle e Prevenção de Doenças)
CRIE	Centro de Referências em Imunobiológicos Especiais
CVB3	Coxsackievirus B3
CTL	<i>Cytolytic Cell</i> (Célula Citolítica)
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagles's Medium</i> (Meio de Eagle modificado por Dulbecco)
DNA	<i>Desoxiribonucleic acid</i> (Ácido Desoxirribonucleico)
ECMV	<i>Encephalomyocarditis virus</i> (Vírus da Encefalomiocardite)
EV71	Enterovírus 71
FITC	<i>Fluorescein Isothiocyanate</i> (isotiocianato de fluoresceína)
FMDV	<i>Foot and Mouth Disease Virus</i> (Vírus da febre aftosa)
FRhK	<i>Fetal Rhesus Kidney Cell</i> (Célula de Rim de Feto de Macaco Rhesus)
HAV	<i>Hepatitis A virus</i> (vírus da Hepatite A)
HAVCR1	<i>Hepatitis A virus Cell Receptor</i> (Receptor celular do vírus da Hepatite A)
HEK-293	<i>Human Embryonic Kidney Cell 293</i> (Célula de Rim de Embrião Humano 293)
g	grama
IgG	Imunoglobulina do tipo G
IgM	Imunoglobulina do tipo M
IPTG	IsoPropil-beta-DTioGalactopiranosídeo
IRES	<i>Internal Ribosome Entry Site</i> (Sítio Interno de Entrada para o Ribossomo)

Kb	Kilobase
KDa	KiloDáton
LAMP	<i>Lisosomal Associated Membrane Protein</i> (Proteína de Associação a Membrana Lisossomal)
LB	<i>Luria Bertani medium</i> (meio de Luria Bertani)
MBP	<i>Maltose Binding Protein</i> (Proteína Ligadora de Maltose)
MCS	<i>Multiple Cloning Site</i> (Sítio Múltiplo de Clonagem)
MEM	<i>Modified Eagles's Medium</i> (Meio de Eagle modificado)
mg	miligrama
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i> (Complexo principal de Histocompatibilidade)
mRNA	<i>Messenger Ribonucleic Acid</i> (Ácido ribonucléico mensageiro)
NTPase	Nucleotídeo Fosfatase
NTR	<i>Non-translated region</i> (Região não-traduzível)
OMS	Organização Mundial de Saúde
OPAS	Organização Pan-Americana de Saúde
ORF	<i>Open Reading Frame</i> (Fase Aberta de Leitura)
PAGE	<i>Polyacrilamide Gel Electrophoresis</i> (Eletroforese em gel de poliacrilamida)
PBS	<i>Phosphate Buffer Saline</i> (Tampão salina fosfato)
PNI	Programa Nacional de Imunização
rpm	rotações por minuto
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i> (Dodecil sulfato de sódio)
tRNA	<i>transfer ribonucleic acid</i> (Ácido ribonucleico transportador)
VLP	<i>Virus Like Particle</i> (Partícula Semelhante a Vírus)
µg	micrograma
µl	microlitro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	Hepatite A: Um breve histórico	13
1.2	Aspectos clínicos da Hepatite A	14
1.3	O vírus da Hepatite A (HAV): Classificação e estrutura	15
1.4	Ciclo de replicação viral	17
1.5	Crescimento em cultura celular: características e estratégias de replicação	20
1.6	Patogênese da infecção e resposta imune ao HAV	21
1.7	Epidemiologia da infecção pelo HAV	24
1.8	Vacinação contra o HAV	28
1.9	Vacinas de DNA: Características gerais	29
1.10	Modelo proposto para uma nova vacina contra o HAV	32
2	OBJETIVOS	36
2.1	Objetivo geral	36
2.2	Objetivos específicos	36
3	MATERIAIS E MÉTODOS	38
3.1	Cultivo de células e vírus	38
3.2	Montagem da sequência vacinal	38
3.3	Otimização e estratégias de clonagem da sequência da poliproteína truncada	39
3.4	Otimização e estratégias de clonagem das sequências de VP1, VP3 e 3C para a expressão das respectivas proteínas de fusão em bactérias	41
3.5	Construção dos vetores vacinais p43.2_HAV-PTRUNC _{OPT} e p43.2_hN-LAMP_HAV-PTRUNC _{OPT} e dos vetores de expressão em bactéria pMal_c4X_VP1 _{OPT} , pMal_c4X_VP3 _{OPT} e pMal_c4X_3C _{OPT}	42
3.5.1	Preparação dos vetores comerciais contendo os genes otimizados	42
3.5.2	Subclonagem de VP1 _{OPT} , VP3 _{OPT} e 3C _{OPT} no vetor pMal_c4X de expressão bacteriana	43
3.5.3	Subclonagem de HAV-PTRUNC _{OPT} no vetor p43.2	45

3.6 Expressão das proteínas recombinantes MBP-VP1_{OPT}, MBP-VP3_{OPT} e MBP-3C_{OPT} em bactérias	45
3.7 Expressão em larga escala e purificação das proteínas recombinantes	46
3.8 Digestão das proteínas de fusão MBP-VP1_{OPT}, MBP-VP3_{OPT} e MBP-3C_{OPT} com o fator Xa para a remoção da proteína MBP	47
3.9 Imunização de coelho para obtenção de anticorpos policlonais contra VP1_{OPT}, VP3_{OPT} e 3C_{OPT}	47
3.10 Imunoadsorção e avaliação dos anticorpos produzidos contra as proteínas recombinantes	48
3.11 Transfecção de células BHK-21 com o plasmídeo p43.2_hN-LAMP_HAV-PTRUNC_{OPT}	49
3.12 Análise da expressão da proteína LAMP por imunofluorescência	50
3.13 Transfecção de células HEK-293	50
3.14 Análise da expressão da poliproteína truncada	51
3.14.1 Imunofluorescência	51
3.14.2 <i>Western-blot</i>	52
4 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	53
5 RESULTADOS	54
5.1 Otimização da sequência da poliproteína truncada do HAV e das proteínas individuais VP1, VP3 e 3C	54
5.2 Construção dos vetores de expressão pMal_c4X_VP1_{OPT}, pMal_c4X_VP3_{OPT} e pMal_c4X_3C_{OPT}	56
5.2.1 Preparo dos genes otimizados e digestão dos vetores comerciais	56
5.2.2 Subclonagem das sequências de VP1, VP3 e 3C no vetor de expressão pMal_c4X	57
5.3 Expressão das proteínas recombinantes MBP-VP1_{OPT}, MBP-VP3_{OPT} e MBP-3C_{OPT}	59
5.4 Expressão em larga escala e purificação das proteínas recombinantes MBP-VP1_{OPT}, MBP-VP3_{OPT} e MBP-3C_{OPT}	60
5.5 Digestão das proteínas de fusão MBP-VP1_{OPT}, MBP-VP3_{OPT} e MBP-3C com a protease Fator Xa	62
5.6 Imunização dos coelhos e imunoadsorção para a obtenção dos	64

anticorpos contra as proteínas recombinantes	
5.7 Construção dos vetores de expressão, vetores vacinais, p43.2_HAV-PTRUNC_{OPT} e p43.2_hN-LAMP_HAV-PTRUNC_{OPT}	66
5.7.1 Preparação do gene otimizado e digestão do vetor comercial	66
5.7.2 Subclonagem da sequência de HAV-PTRUNC no vetor de expressão p43.2	67
5.8 Transfecção de células BHK-21 com o plasmídeo p43.2_hN-LAMP_HAV-PTRUNC_{OPT} e análise da expressão, para a detecção da região N-terminal da proteína LAMP	68
5.9 Transfecção de células HEK-293 com as construções p43.2_HAV-PTRUNC_{OPT} e p43.2hN-LAMP_HAV-PTRUNC_{OPT} e análise da expressão nas células transfectadas	70
5.9.1 Análise da expressão por imunofluorescência	70
5.9.2 Detecção das proteínas por <i>Western-blot</i>	73
6 DISCUSSÃO	74
7 CONCLUSÕES	83
REFERÊNCIAS	84
ANEXO A – Carta de aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA)	97
ANEXO B – Relatórios de otimização	98

1 INTRODUÇÃO

1.1 Hepatite A: Um breve histórico

A Hepatite A é conhecida desde as antigas civilizações grega e chinesa, com relato para a ocorrência da então chamada icterícia catarral (ZUCKERMAN, 1983). Mas foi apenas no século XX, que Cockaine (1912) realizou a primeira descrição de uma epidemia da doença, na ilha de Minorca, e que foi chamada de icterícia catarral epidêmica. Ele acreditava que a transmissão ocorria por meio de aerossóis e a denominou de hepatite infecciosa. Ainda no início do século passado, MacDonald (1908) e o próprio Cockaine (1912) foram os primeiros a utilizar a palavra “vírus” para descrever o agente causador da doença, contudo o termo foi utilizado em seu sentido genérico, como uma partícula infecciosa qualquer.

Blummer (1923) demonstrou novos aspectos da doença a partir de vários surtos ocorridos nos Estados Unidos. Ele caracterizou principalmente o período de incubação e o modo de transmissão, feco-oral, da Hepatite A. Estudos epidemiológicos e experimentos em militares voluntários, durante a 2ª Guerra Mundial, confirmaram que a doença era transmitida através de fezes contaminadas e também, excepcionalmente, pelo soro de pessoas na fase inicial da infecção (BOGGS et al., 1970; HAVENS, 1947; 1963; KRUGMAN; GILES; HAMMOND, 1967). Estes mesmos estudos também estabeleceram a existência de duas formas de hepatite: uma chamada de hepatite infecciosa, e a outra de hepatite do soro homólogo, as quais tinham modos de transmissão e períodos de incubação distintos. MacCallum (1947) introduziu o termo “Hepatite A” para a hepatite infecciosa e “Hepatite B” para a hepatite do soro homólogo.

Os trabalhos de Krugman, Giles e Hammond (1967) levaram as primeiras avaliações dos métodos profiláticos contra a doença e, além disso, demonstraram a utilidade da transaminase oxalo-acética na identificação da Hepatite A, em pacientes anictéricos. Finalmente, Feinstone e outros (1973) observaram o vírus presente nas fezes de pessoas infectadas, através de microscopia eletrônica. A partir de então um grande avanço foi feito na caracterização do vírus da Hepatite A (HAV) e da própria doença. Nos anos seguintes foram desenvolvidos ensaios imunológicos de alta

sensibilidade para o diagnóstico da infecção (HOLLINGER; DIENSTAG; SWENSON, 1991) bem como técnicas para o cultivo do vírus (PROVOST; HILLEMANN, 1979), levando assim a um maior conhecimento acerca da biologia do HAV e dos primeiros estudos na produção das vacinas contra este agente.

1.2 Aspectos clínicos da Hepatite A

A Hepatite A representa uma infecção que acomete primariamente o fígado e que pode ter um curso extremamente variável, com pacientes apresentando desde formas assintomáticas ou subclínicas, passando pela doença sintomática ou icterícia, até quadros mais severos, como a hepatite fulminante. A infecção assintomática pelo HAV ocorre normalmente em crianças menores do que cinco anos, fazendo com que o número de casos diagnosticados nessa faixa etária seja pequeno, principalmente em regiões endêmicas para a presença do vírus (FERREIRA; PRETO, 1995; NAINAN et al., 2006). A infecção sintomática inicia-se com a fase prodrômica, após um período de incubação de 15 a 50 dias, na qual muitas pessoas desenvolvem sintomas não específicos, como vômitos, febre, dor abdominal e mialgia (CUTHBERT, 2001). Depois de 10 dias, em média, inicia-se a fase icterícia, que se caracteriza pelo aparecimento de urina escura, em virtude do aumento da bilirrubina sérica, seguido da eliminação de fezes pálidas e a presença de uma coloração amarelada nas membranas mucosas, conjuntiva, esclera e pele (HOLLINGER; EMERSON, 2001). Esta condição é observada em 80% dos pacientes sintomáticos, sendo normalmente autolimitada e com duração menor que oito semanas (SCHIFF, 1992). Diferentemente de outros vírus hepatotrópicos, como vírus da hepatite B (HBV) e da hepatite C (HCV), o HAV não tem sido implicado como causa de doença crônica no fígado (LEMON, 1997).

Além do quadro característico, a infecção pelo vírus da Hepatite A pode produzir manifestações atípicas como hemólise, colestase, artrite reativa, pancreatite e nefrite intersticial, sendo estas três últimas decorrentes da formação de imunocomplexos (CUTHBERT, 2001). Uma complicação mais grave está relacionada ao desenvolvimento de hepatite fulminante, caracterizada por um aumento da icterícia, associado a uma encefalopatia e extensa necrose do fígado,

levando à perda das principais funções deste órgão e à necessidade de transplante (HOLLINGER; EMERSON, 2001; O'GRADY, 1992). A hepatite fulminante ocorre com mais frequência em adultos e representa menos de 1% de todos os casos, no entanto mesmo após o transplante o índice de mortalidade ultrapassa os 50% (LEMON; SHAPIRO, 1994).

1.3 O Vírus da Hepatite A (HAV): Classificação e estrutura

O Vírus da Hepatite A (HAV) é classificado dentro da família *Picornaviridae* em virtude de suas características morfológicas e organização do seu genoma (MINOR, 1991). Inicialmente fazia parte do gênero *Enterovirus*, por dividir com este grupo aspectos biofísicos semelhantes e o mesmo tipo de transmissão (LEMON; ROBERTSON, 1993). Após anos de estudo, tornou-se evidente que o HAV possuía características que o distinguia de outros enterovírus, dentre as que seguem: (1) sequência de nucleotídeos e aminoácidos com pequena similaridade aos membros deste gênero, (2) dificuldade de crescimento em cultura celular, apresentando uma baixa taxa de replicação e ausência de efeito citopático, (3) resistência a altas temperaturas e drogas que inativam outros enterovírus, (4) estabilidade em pH 1 e (5) existência de apenas um sorotipo conhecido. Dessa forma, foi criado um novo gênero, denominado *Hepatovirus*, do qual o HAV faz parte e é o único representante (HOLLINGER; EMERSON, 2001; MINOR, 1991).

O HAV é um vírus não-envelopado, com capsídeo de simetria icosaédrica e genoma formado por uma molécula de RNA linear, com sentido positivo e de aproximadamente 7,5 Kb de tamanho (HOLLINGER; EMERSON, 2001). O único sorotipo existente está distribuído em sete genótipos, sendo que três infectam naturalmente primatas não-humanos e quatro acometem o homem, principalmente os genótipos I e III (LEMON et al., 1992).

A estrutura genômica do HAV pode ser dividida em três partes: (1) uma região 5' não-traduzível (NTR), que compreende aproximadamente 10% do genoma e está ligada covalentemente à proteína viral VPg ou 3B; (2) uma única Fase de Leitura Aberta (ORF) que codifica todas as proteínas virais, na forma de uma poliproteína, sendo dividida em três regiões funcionais denominadas de P1 (proteínas do

capsídeo), P2 e P3 (proteínas não-estruturais); (3) e uma região 3' NTR curta e poliadenilada (COHEN et al., 1987; HOLLINGER; EMERSON, 2001; PAUL et al., 1987) (Figura 1).

A região 5' NTR representa a sequência mais conservada do genoma viral, possuindo em torno de 750 pb. Esta região contém uma extensa estrutura secundária, onde está inserido o sítio interno de entrada para o ribossomo (IRES), responsável pelo início do processo de tradução do RNA viral (COSTA-MATTIOLI et al., 2003; CUTHBERT, 2001). Apesar da similaridade com o de outros vírus da mesma família, como por exemplo, o vírus da encefalomiocardite (ECMV), o IRES do HAV é bem menos eficiente e ativo que os demais, o que implica numa pequena taxa de tradução da poliproteína e de replicação viral (PINTÓ et al., 2007). A região 3' NTR possui em torno de 40 a 80 nucleotídeos e sua função está relacionada com o término do processo de tradução e a replicação do RNA (COHEN et al., 1987).

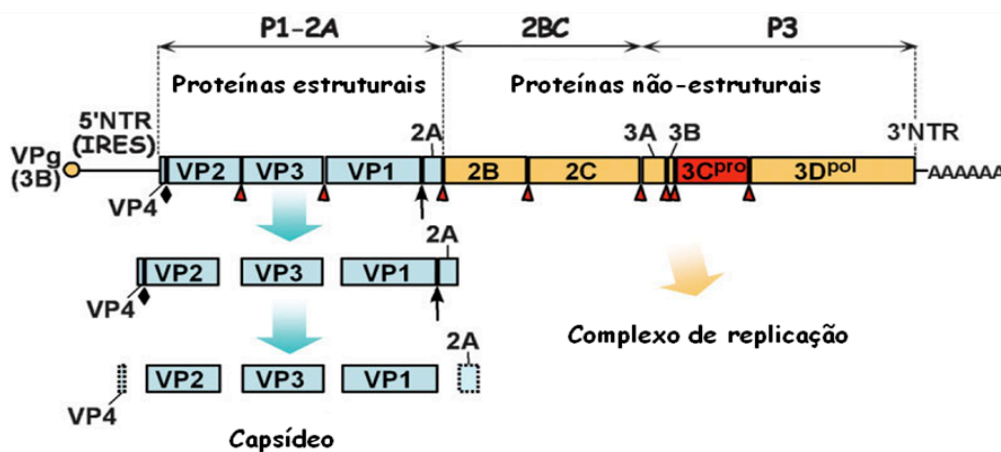


Figura 1 – Organização do genoma do HAV e processamento da poliproteína.

Fonte: Martin e Lemon (2006). Nota: O RNA genômico contém uma única Fase de Leitura Aberta que codifica uma poliproteína, a qual é proteoliticamente processada pela protease 3C (sítios de clivagem são mostrados como triângulos vermelhos). Existem também sítios que são clivados por protease celulares (seta) ou por mecanismo ainda desconhecido (losango preto). Este processamento leva a produção das proteínas estruturais (capsídeo) e não estruturais (complexo de replicação do RNA viral).

O segmento traduzível do genoma do HAV gera uma poliproteína de aproximadamente 250 kDa, que posteriormente é clivada em 11 proteínas com diferentes funções no ciclo biológico do vírus. A região P1 é formada pelas proteínas estruturais VP1, VP2, VP3 e VP4. O capsídeo é composto por 60 monômeros de VP1, VP2 e VP3, as quais também formam as principais estruturas antigênicas do vírus (MARTIN; LEMON, 2006). A proteína VP4 não é detectada nas partículas maduras do HAV, porém ela é essencial na formação do vírion, estando

provavelmente envolvida no empacotamento do RNA viral (PROBST; JECHE; GAUSS-MULLER, 1999). Na região P2 encontram-se as proteínas 2B e 2C, as quais participam do processo de replicação do RNA viral e a proteína 2A, que possui a importante função de servir como primeiro sinal para a montagem do capsídeo (COHEN et al., 2002; PROBST; JECHE; GAUSS-MULLER, 1999). As principais proteínas da região P3 são a protease 3C e a RNA polimerase RNA-dependente 3D. A proteína 3C é a única protease presente no HAV, promovendo sua própria liberação da poliproteína e atuando na clivagem desta última para gerar tanto as proteínas estruturais como as não-estruturais (MARTIN; LEMON, 2006). Além dessas, ainda fazem parte de P3 as proteínas 3A e 3B (VPg), que participam da replicação do RNA viral (Figura 1).

1.4 Ciclo de replicação viral

O ciclo de replicação inicia-se com a ligação do vírus ao seu receptor celular (HAVCR1), sendo este uma glicoproteína integral de classe I que apresenta dois domínios extracelulares: um domínio semelhante à imunoglobulina (IgV) e outro semelhante a mucina (KAPLAN et al., 1996). A ligação ao receptor resulta em uma mudança de conformação na estrutura do capsídeo, promovendo a liberação do RNA viral no interior do citoplasma (SILBERSTEIN; KONDURU; KAPLAN, 2009).

O genoma viral comporta-se como um RNA mensageiro, sendo desta forma, prontamente traduzido assim que entra no citoplasma. A síntese da poliproteína começa a partir da ligação do IRES ao ribossomo, em um processo independente da estrutura *cap*, a qual está presente nos RNAs celulares e em muitos RNAs virais (MARTIN; LEMON, 2006). O processamento da poliproteína ocorre simultaneamente ao processo de tradução e acontece através de uma série de clivagens proteolíticas mediadas por 3C para gerar as proteínas individuais maduras (HOLLINGER; EMERSON, 2001). Essas proteínas individuais permitirão a continuidade do ciclo viral através da produção de novas moléculas de RNA genômico viral e montagem do capsídeo (Figura 2).

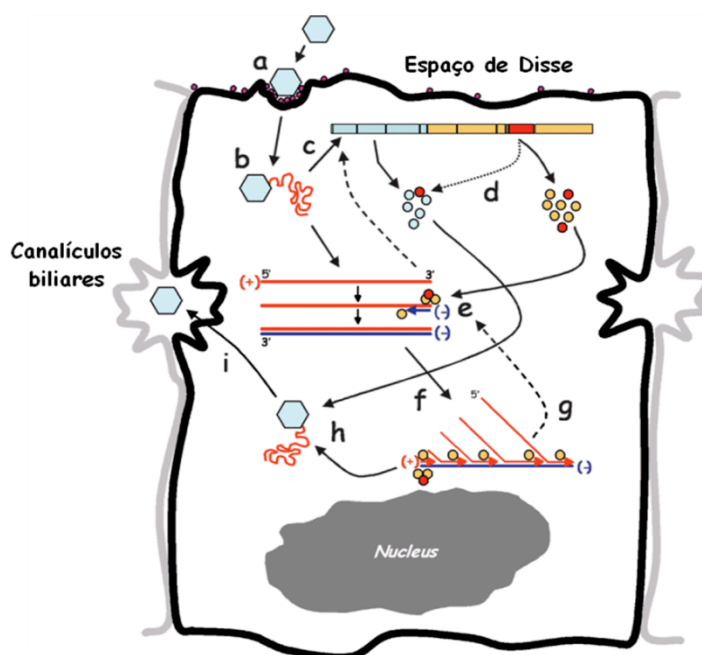


Figura 2 – Visão geral do ciclo de replicação do HAV.

Fonte: Martin e Lemon (2006). Nota: (a) O vírus entra na célula via interação com seu receptor celular (b) Liberação do RNA no citoplasma. (c) O IRES inserido na região 5' NTR promove a tradução *cap*-independente da poliproteína. (d) A poliproteína é processada através de uma série de clivagens. (e) As proteínas não-estruturais formam o complexo de replicação em membranas intracelulares e ligam-se a porção 3' do RNA, iniciando a síntese da cópia de sentido negativo. (f) Algumas dessas cópias servem como molde para a síntese de múltiplas cópias do RNA positivo. (g) Algumas dessas novas fitas positivas são recicladas para nova síntese de RNA ou tradução. (h) Outras moléculas são empacotadas pelo capsídeo recém-formado. (i) As partículas virais saem pela membrana apical do hepatócito e entram nos canalículos biliares pelos quais chegam ao intestino.

A síntese de novas moléculas de RNA viral envolve a formação de um complexo de replicação do qual participam as proteínas não estruturais e acontece em membranas oriundas do retículo endoplasmático (MARTIN; LEMON, 2006). Como o HAV possui um RNA de sentido positivo, é necessária inicialmente a síntese de uma fita de RNA negativo que servirá como molde para a produção de múltiplas cópias do genoma (Figura 2). A transcrição do RNA é mediada pela 3D RNA-polimerase, com a proteína VPg (3B) uridinilada servindo como iniciador da síntese da nova molécula. As proteínas 2B e 2C induzem rearranjos na estrutura das membranas intracelulares para a formação do complexo de replicação, além disso, a proteína 2C possui ainda atividades de helicase e NTPase. A proteína 3A possui uma sequência de aproximadamente 21 aminoácidos hidrofóbicos que promove a ancoragem do complexo de replicação às membranas celulares logo que a região

P3 é traduzida (JECHT; PROBST; GAUSS-MULLER, 1998; MARTIN; LEMON, 2006; TOTSUKA; MORITSUGU, 1999).

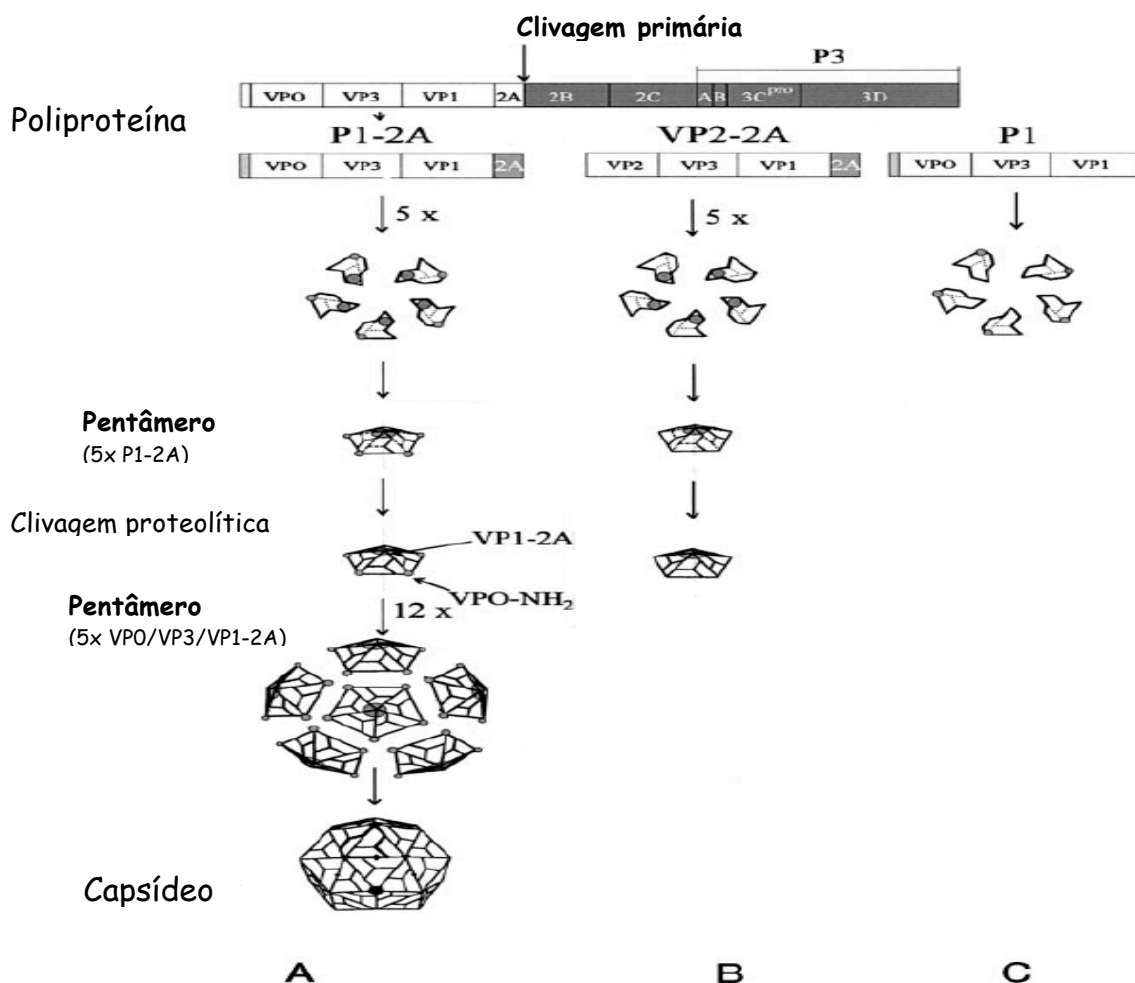


Figura 3 – Modelo mostrando a via de montagem do capsídeo do vírus da Hepatite A e as funções dos domínios terminais VP4 e 2A.

Fonte: Probst, Jecht e Gauss-Muller (1999). Nota: (A) Após as clivagens realizadas por 3C, cinco moléculas de P1-2A se organizam para formar os pentâmeros, sendo esta fase mediada por 2A. Os pentâmeros sofrem novas clivagens gerando VP0, VP3 e VP1, as quais formam os epítomos neutralizantes. Na última fase, 12 pentâmeros se agregam formando o capsídeo, etapa dependente de VP4 (B) Na presença de 2A os pentâmeros pode se formar, porém as demais etapas ficam impossibilitadas pela ausência de VP4. (C) Na ausência de 2A, o precursor P1 não se organiza em pentâmeros.

A formação do capsídeo começa a partir da clivagem, pela protease 3C, da junção 2A/2B, produzindo o precursor P1-2A. Este polipeptídeo se agrupa em pentâmeros, provavelmente devido a um processo de sinalização mediada por 2A (PROBST; JECHT; GAUSS-MULLER, 1999). A partir de então, três clivagens realizadas por 3C produzem os precursores VP4-VP2(VP0); VP3 e VP1-2A (ANDERSON; ROSS, 1990; MARTIN et al., 1995). Em seguida, 12 pentâmeros de cada um dos precursores se agrupam formando procapsídeos e esta etapa parece

dependem da proteína VP4 (PROBST; JECHT; GAUSS-MULLER, 1999) (Figura 3). O empacotamento do RNA viral e estágios finais de formação do capsídeo envolvem a clivagem de VP0 e de VP1-2A, possivelmente por um processo autocatalítico e por proteases celulares, respectivamente (BISHOP; ANDERSON, 1993; HOLLINGER; EMERSON, 2001; MARTIN et al., 1999). Tanto 2A como VP4 não são observados nas partículas infecciosas, porém suas funções no ciclo de replicação do HAV sugerem que ambos os domínios são essenciais não apenas na montagem do capsídeo mas também no processo de maturação viral (PROBST; JECHT; GAUSS-MULLER, 1999). Após a sua formação, o vírus inicia seu processo de evasão da célula sem promover a lise celular (HOLLINGER; EMERSON, 2001).

1.5 Crescimento em cultura celular: características e estratégias de replicação

O vírus da Hepatite A tem sido cultivado em diversos tipos de células humanas, de linhagem hepatocitária ou não, bem como de primatas não-humanos como células de Rim de Macaco Verde Africano (*AGMK*) e de Rim de Feto de Macaco Rhesus (*FRhK*) (NAINAN et al., 2006). O HAV possui características de crescimento que o diferenciam dos demais vírus de sua família, como o poliovírus. Cepas isoladas de espécimes clínicos apresentam um lento ciclo de replicação, sem causar efeito citopático e nem interferência na síntese de proteínas e/ou outras macromoléculas da célula. Após várias passagens o vírus torna-se adaptado a célula, causando uma infecção persistente, o que curiosamente difere da infecção *in vivo*, na qual esta condição não é observada (GAUSS-MULLER; DEINHRDT, 1984; LEMON et al., 1991; VALLBRACHT et al., 1984).

Muitos mecanismos são propostos na tentativa de explicar a baixa capacidade replicativa do HAV em cultura celular. O primeiro deles estaria relacionado à ineficiente entrada do vírus na célula em virtude da sua incompleta maturação (não clivagem de VP0 em VP4 e VP2) durante o ciclo anterior (BISHOP; ANDERSON, 1993). Um segundo motivo consiste na característica do seu IRES, o qual possui uma baixa eficiência em dirigir a tradução da poliproteína viral em comparação ao IRES dos demais representantes da família *Picornaviridae* (WHETTER et al., 1994).

Outro mecanismo seria a incapacidade do vírus em inibir a síntese proteica celular. Enquanto o HAV codifica apenas uma protease (3C), outros picornavírus apresentam uma protease adicional e que funciona clivando o fator de iniciação da tradução celular, eIF4G, favorecendo a tradução IRES-dependente (viral) e inibindo a *cap*-dependente (celular). Além de não clivar o fator eIF4G, o HAV ainda o utiliza intacto no seu complexo de iniciação da tradução (BORMAN et al., 1997; JACKSON, 2002; PINTÓ et al., 2007). Finalmente, outra característica do HAV que demonstra sua estratégia peculiar de replicação refere-se ao seu *codon usage*. Este vírus se adaptou na utilização de raros códons em relação aqueles utilizados pela maquinaria celular. Seu *codon usage* é sempre complementar ao da célula hospedeira, nunca adotando como seus abundantes códons aqueles também abundantes na célula. Essa característica única do HAV é interpretada como um mecanismo para evitar o máximo possível a competição pelos RNAs transportadores da célula (tRNAs), uma vez que ele não apresenta um mecanismo preciso de inibição da síntese de proteínas celulares (SÁNCHEZ; BOSCH; PINTÓ, 2003b).

Algumas cepas adaptadas ao crescimento *in vitro* podem, após repetidas passagens em células permissivas, apresentar fenótipo associado a um rápido ciclo de replicação e capacidade de desenvolver efeito citopático (LEMON et al., 1991). A sequência de nucleotídeos desses vírus apresenta várias mutações quando comparada a do vírus parental. As mutações essenciais para o aparecimento desse fenótipo ocorrem principalmente na sequência das proteínas 2B e 2C, confirmando que ambas estão fortemente associadas à replicação do RNA viral. Mutações na região 5' NTR e na região P3 não tem efeito independente, porém agem cooperando e acentuando àquelas da região P2 para produzir o vírus com alta capacidade de replicação (ZHANG et al., 1995).

1.6 Patogênese da infecção e resposta imune ao HAV

Muito do que se conhece acerca da infecção pelo vírus da hepatite A decorre de estudos realizados em primatas não-humanos e das infecções naturais em humanos (NAINAN et al., 2006). A infecção natural se dá pela ingestão de material

contaminado contendo o vírus, iniciando uma sequência de eventos que vão desde a entrada no trato gastrointestinal até o desenvolvimento da hepatite (HOLLINGER; EMERSON, 2001). A resistência do HAV ao pH ácido permite que ele passe pelo estômago e chegue ao intestino onde se replica inicialmente nas células epiteliais intestinais para então, através da circulação portal ou sistêmica, atingir o fígado (CUTHBERT, 2001; MARTIN; LEMON, 2006).

Estudos em modelos experimentais mostram que após se replicar no fígado, o vírus é eliminado através da membrana apical do hepatócito, passa pelos canálculos biliares e juntamente com a bile chega ao intestino para, então, ser eliminado nas fezes (PURCELL; EMERSON, 2001; ROBERTSON, 2001). A presença do HAV no sangue e nas fezes ocorre ao mesmo tempo durante o período de incubação, contudo os títulos virais presentes no sangue são bem mais baixos que os encontrados no material fecal. A viremia termina logo que os sintomas aparecem, enquanto a excreção do vírus pode permanecer por vários meses (MARTIN; LEMON, 2006; NAINAN, et al., 2006) (Figura 4).

Apesar do fígado ser o órgão primário de replicação do HAV, vários sítios extra-hepáticos podem existir. Infecções experimentais em primatas não-humanos demonstraram a presença do material genômico e antígenos virais no baço, rins, tonsilas, saliva e células epiteliais do intestino (ASHER et al., 1995; COHEN; FEINSTONE; PURCELL, 1989; TAYLOR, et al., 1992).

O vírus da Hepatite A induz tanto uma resposta imune humoral como celular, sendo ambas importantes no mecanismo de defesa e eliminação da infecção. A imunologia da Hepatite A ainda é importante por duas razões: a primeira é que o desenvolvimento de testes diagnósticos que confirmam a infecção pelo HAV é dependente da produção de anticorpos neutralizantes gerados pela resposta humoral. Esta última também pode desencadear a formação de imunocomplexos, que estão relacionados a sintomas atípicos presentes em alguns pacientes. A segunda é que a manifestação da doença, com o aparecimento dos sinais clínicos está fortemente associada com a resposta imune celular (CUTHBERT, 2001; TSAI et al., 1996).

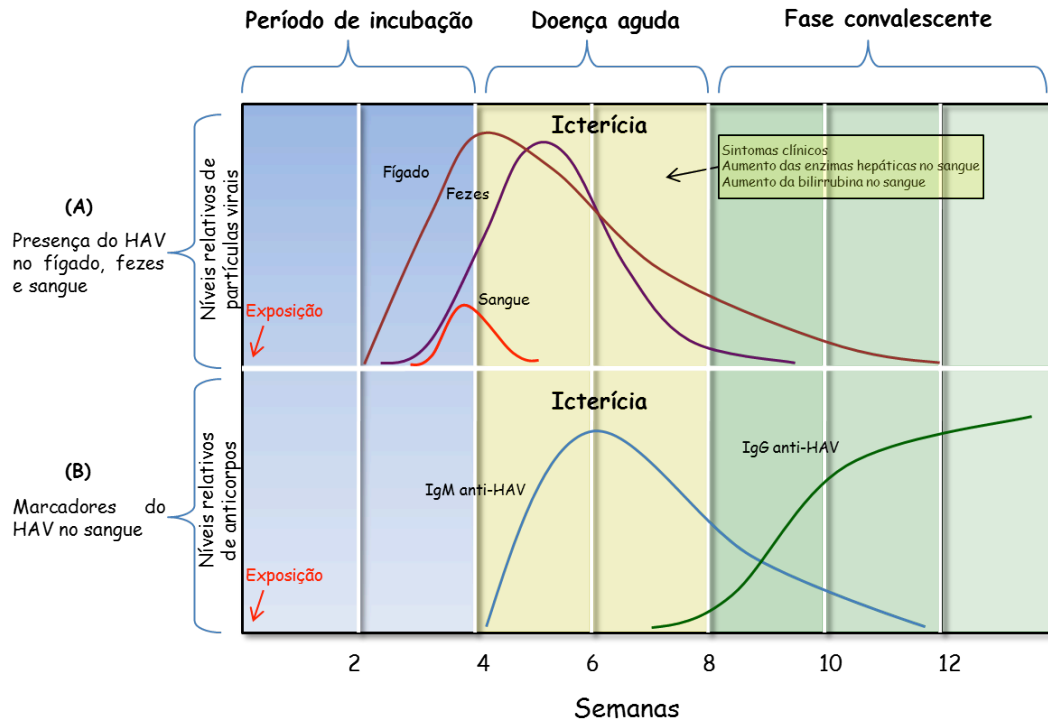


Figura 4 – Curso clínico, infectividade e perfil sorológico na Hepatite A aguda.

Fonte: Dentinger (2009). Nota: (A) A infecção no fígado é seguida pelo aparecimento do vírus no sangue e nas fezes. (B) A icterícia e outros sintomas da infecção aguda são acompanhados pelo surgimento de anticorpos anti-HAV do tipo IgM. O aparecimento de anticorpos do tipo IgG representa um sinal de cura (fase convalescente) e imunidade contra uma nova infecção.

A existência de um único sorotipo conhecido do HAV faz com que indivíduos que já tenham adquirido o vírus estejam protegidos contra uma nova infecção (LEMON; BINN, 1983; ZAHN; VALLBRACHT; FLEHMIG, 1984). A estrutura antigênica do HAV é formada a partir da sobreposição de um número restrito de epítomos que se combinam para formar o sítio imunodominante, o qual interage com os anticorpos neutralizantes. Esta região antigênica é altamente conformacional e formada por resíduos de aminoácidos das proteínas do capsídeo (PING; LEMON, 1992). Soros obtidos de pacientes em fase convalescente mostraram que eles são reativos primariamente para VP1 e em menor grau para VP3 e VP0 (WANG et al., 1996). O conhecimento de que partículas semelhantes ao vírus (VLP), que não contém o RNA viral, são antigenicamente idênticas ao vírus completo e que as proteínas do capsídeo isoladas ou peptídeos sintéticos não geram ou não são capazes de gerar uma boa produção de anticorpos neutralizantes comprovam que a antigenicidade depende fundamentalmente da formação do capsídeo ou de seus precursores (HOLLINGER; EMERSON, 2001; LABRECQUE et al., 1998).

A resposta imune humoral inicia-se com aparecimento de anticorpos anti-HAV do tipo IgM, mesmo antes do surgimento dos primeiros sintomas e que marca a fase aguda da infecção, permanecendo por até seis meses, quando não são mais detectados pelos testes diagnósticos comerciais. Assim que o indivíduo evolui para a cura e entra na fase convalescente, os níveis de IgM anti-HAV começam a diminuir e de forma concomitante ocorre a elevação dos anticorpos IgG anti-HAV, que persistem por vários anos conferindo a imunidade duradoura (NAINAN et. al, 2006) (Figura 4). Anticorpos IgA também são produzidos durante a infecção, porém seu papel permanece incerto uma vez que eles parecem não exercer uma efetiva resposta imune na região intestinal (STAPLETON et al., 1991).

A resposta imune celular contra o HAV é mediada principalmente pelos linfócitos T CD8⁺ citotóxicos, que destroem as células infectadas. A ausência de casos de doença crônica em humanos indica que há um eficiente reconhecimento e combate ao vírus por este tipo de resposta. Apesar da sua importância na eliminação do HAV, a resposta imune mediada por célula é relatada como a causa do dano hepatocelular na doença aguda e conseqüentemente dos sintomas relacionados (CUTHBERTH, 2001; FLEISCHER et al., 1990; MAIER et al., 1988). O fato de grande quantidade de partículas virais serem excretadas antes do aparecimento de qualquer sintoma, aliado ao conhecimento de que cepas oriundas de infecção em humanos não produzem efeito citopático em cultura celular reforçam o caráter imunopatológico da doença (CUTHBERTH, 2001).

1.7 Epidemiologia da infecção pelo HAV

A infecção pelo HAV tem distribuição universal e representa a causa mais comum de hepatite viral aguda em todo mundo (VITRAL; GASPAR; SOUTO, 2006). Aproximadamente 1,5 milhões de casos clínicos são reportados anualmente segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), no entanto, dados de soroprevalência podem indicar que cerca de 10 milhões pessoas sejam infectadas no mesmo período. As altas prevalências são observadas principalmente nos países em desenvolvimento, onde as precárias condições de higiene e saneamento

facilitam a transmissão do vírus. A infecção é adquirida primariamente pela rota fecal-oral e é rapidamente disseminada pelo contato pessoal ou pela ingestão de água e alimentos contaminados (WASLEY; FIORE; BELL, 2006).

Mesmo atingindo todos os continentes, a infecção apresenta diferentes padrões de acordo com o nível de desenvolvimento sócio econômico de cada região (BELL, 2002; JACOBSEN; KOOPMAN, 2004). Em áreas de alta endemicidade (África e parte da Ásia e América Latina), o vírus espalha-se facilmente como resultado da falta de condições sanitárias adequadas e do baixo nível de desenvolvimento econômico e social. A maioria das infecções ocorre em crianças, predominando a forma assintomática e, além disso, grande parte da população adquire a infecção até a adolescência. Sendo assim, surtos ou epidemias são raros uma vez que a população já apresenta imunidade ao vírus (COURSAGET et al., 1995; TSEGA et al., 1986). Nas regiões com nível endêmico moderado (parte da Ásia e América latina), a média de idade das pessoas acometidas aumenta em virtude de melhorias nas condições de vida comparadas às regiões de alta endemicidade. O risco de epidemias torna-se maior já que existe um aumento no número de jovens e adultos susceptíveis, e caso estes venham a contrair o vírus, provavelmente apresentarão a infecção na sua forma sintomática. A contaminação da água e dos alimentos pelo HAV é a principal causa de epidemias nestas áreas (WASLEY; FIORE; BELL, 2006). Nos países desenvolvidos a incidência da doença é geralmente baixa, com a maioria dos casos ocorrendo em surtos circunscritos a uma pequena área geográfica ou em grupos de risco, como pessoas provenientes de regiões endêmicas (VITRAL; GASPAR; SOUTO, 2006; WASLEY; FIORE; BELL, 2006) (Figura 5).

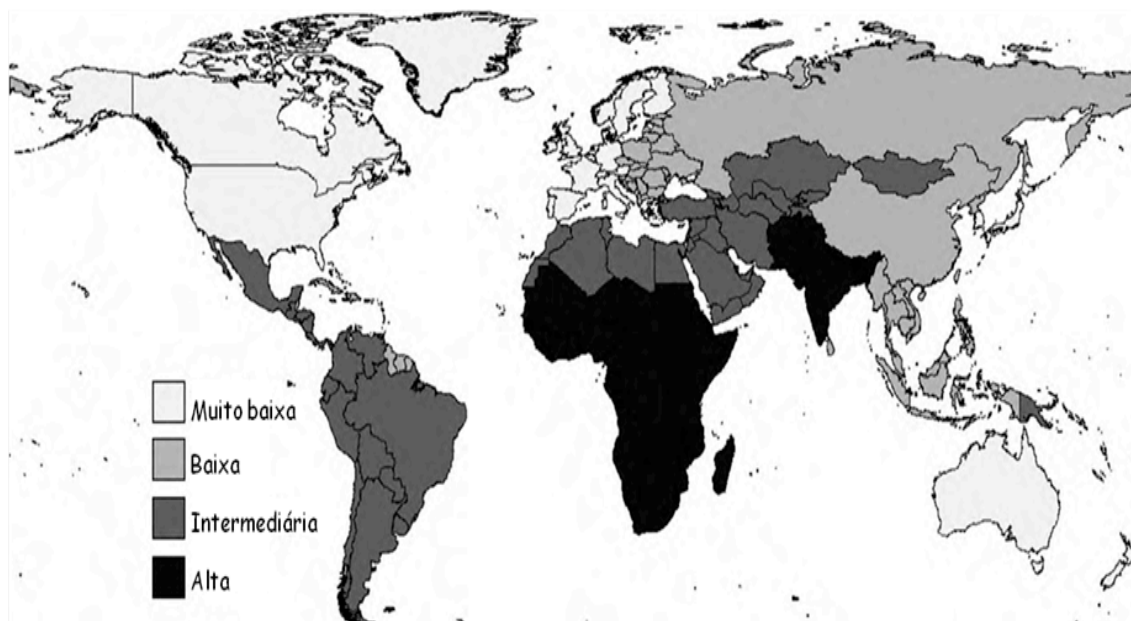


Figura 5 – Prevalência estimada da infecção pelo vírus da Hepatite A no mundo em 2005.
 Fonte: Jacobsen e Wiersma (2010).

O Brasil apresenta diferentes níveis de soroprevalência entre suas regiões, com as regiões Norte e Nordeste apresentando os índices mais elevados, que variam de 70% a 90%, enquanto que as regiões Sudeste e Sul possuem níveis em torno de 30% de prevalência da infecção. Esses números refletem principalmente a discrepância com relação à existência de sistemas de saneamento ambiental nessas regiões, uma vez que cerca de 81,7% dos municípios da região Sudeste são saneados enquanto 5,8% da região Norte possuem o mesmo do tipo de infraestrutura (VITRAL; SOUTO; GASPAR, 2008).

Embora todas as formas de Hepatites Virais agudas se enquadrem como doenças de notificação compulsória, os dados de incidência da Hepatite A no Brasil ainda são incompletos. Isso ocorre pela falta de informações dos casos notificados ou pela não investigação da etiologia da infecção. Não existem dados disponíveis antes de 1994 e deste ano até 1999 há uma considerável subnotificação. De 1999 até 2005 houve significativo aumento no número de casos em virtude de uma melhora no sistema de notificação (Figura 6)

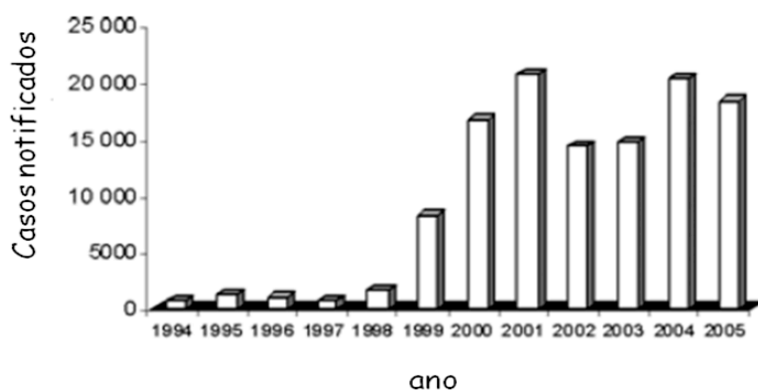


Figura 6 – Número de casos notificados de Hepatite A no Brasil de 1994 a 2005.
 Fonte: Vitral, Souto e Gaspar (2008)

Apesar do Brasil apresentar diferenças regionais quanto a prevalência da infecção, a melhoria no acesso a água tratada e à condições sanitárias adequadas no país como um todo, principalmente nas áreas urbanas, vem provocando uma diminuição no número de casos em crianças, sobretudo aquelas menores de 10 anos. Isto vem ocasionando uma mudança no perfil epidemiológico da infecção, passando de um país de alta para moderada endemicidade (ALMEIDA et al., 2001; CARRILHO; MENDES-CLEMENTE; SILVA, 2005; CLEMENS et al., 2000), o que acompanha a tendência observada em outros países da América Latina (TANAKA, 2000; TAPIA-CONYER et al., 1999). Estudo recente mostrou que mesmo em uma comunidade rural na região Norte (região classicamente com altos níveis de prevalência), os índices de infecção em crianças de até 10 anos não ultrapassaram os 60% (BRAGA et al., 2009). Uma importante característica da infecção pelo HAV é que as crianças são assintomáticas ou revelam apenas sintomas leves, enquanto nos indivíduos adultos a doença se mostra mais severa, com aumento da mortalidade causada por hepatite fulminante (FERREIRA et al., 2008). Esse novo quadro epidemiológico do país traz como consequências um aumento no número de indivíduos adultos susceptíveis, o que pode provocar aumento no número de surtos da doença aliados a uma maior morbidade e mortalidade (WHEELER et al., 2005; HENDRICKX et al., 2008).

A Organização Mundial de Saúde recomenda que programas de vacinação em massa contra a Hepatite A sejam realizados nos países que apresentem níveis baixos ou moderados de endemicidade (OMS, 2000). Desta forma, a implementação de um programa de vacinação contra o HAV no Brasil mostra-se cada vez mais

necessária (VITRAL; SOUTO; GASPAR, 2008). Diante deste quadro, percebe-se que o controle da Hepatite A passa, de maneira inevitável, pela educação em saúde, melhoria nas condições sanitárias e um eficiente programa de imunização (OMS, 2000).

1.8 Vacinação contra o HAV

No início da década de 90 foram desenvolvidas as primeiras vacinas contra a infecção pelo HAV, oferecendo assim um método específico de proteção contra o vírus (WASLEY; FIORE; BELL, 2006). As mais utilizadas são as vacinas inativadas, porém também existe uma vacina do vírus atenuado. As vacinas inativadas são inicialmente preparadas a partir da adaptação de uma cepa do HAV ao crescimento em um tipo particular de célula. A vacina HAVRIX® (Glaxo Smith Kline) utiliza a cepa HM175, enquanto a VAQTA® (Merck & Co.,Inc) usa a CR326F e ambas crescem o vírus em células MRC-5, derivadas de fibroblasto humano. Após essa fase, as células são lisadas e o vírus é concentrado/purificado por filtração e cromatografia, sendo posteriormente inativado quimicamente com formaldeído e adsorvido em alumínio como adjuvante. As vacinas citadas são administradas em duas doses e disponíveis em formulações pediátricas e para adultos (BELL, 2002).

Estudos mostram que essas vacinas são eficazes, imunogênicas e induzem a formação de anticorpos neutralizantes que permanecem no indivíduo, em níveis protetores, pelo mínimo de até dez anos em adultos. Estima-se, a partir de modelos matemáticos da cinética de diminuição dos anticorpos, que a proteção pode persistir por até 20 anos (ABARCA et al., 2007; ANDRE et al., 1992; HOKE et al., 1992; INNIS et al., 1994; RENDI-WAGNER et al., 2007).

A vacina atenuada foi desenvolvida na China, utilizando a cepa H2, a qual foi submetida a várias passagens em células de macaco e posteriormente adaptada para o crescimento em cultura de fibroblasto pulmonar humano (KMB17) (MAO et al., 1989; 1997). Milhões de chineses já receberam essa vacina, que tem sido reportada como imunogênica e eficaz, entretanto o risco de potencial reversão para a virulência tem restringido seu uso somente para aquele país (PEREIRA; GONÇALVES, 2003).

1.9 Vacinas de DNA: Características gerais

As vacinas de DNA ou vacinas recombinantes representam uma das mais novas estratégias de vacinação, sendo alvo de várias pesquisas no campo dos imunobiológicos. A ciência por trás dessa nova estratégia, porém, começou ainda na metade do século passado (ABDULHAQQ; WEINER, 2008). Os primeiros estudos envolveram a inoculação de DNA de células tumorais de camundongo em animais saudáveis da mesma espécie, resultando na indução da neoplasia nestes últimos (ITO, 1961; STASNEY et al., 1955). Durante a década de 80 foi demonstrado, em vários modelos animais, a expressão *in vivo* dos genes que codificam o hormônio do crescimento e insulina (BENVENISTY; RESHEF, 1986). Nos anos 90 foi comprovado que moléculas de DNA codificando antígenos de tumores ou de patógenos poderiam gerar resposta imune humoral e celular, iniciando assim uma série de estudos no campo desta nova tecnologia na produção de vacinas (KUTZLER; WEINER, 2008).

As vacinas genéticas, como também são chamadas, são constituídas na sua forma mais básica pelo gene que codifica o antígeno de interesse, cuja expressão é dirigida por um promotor ativo em células de mamíferos (ex. um forte promotor viral), por um terminador da transcrição e por um gene de resistência a determinado antibiótico para a seleção durante a produção em bactéria (LIU, 2003).

Os mecanismos pelos quais as vacinas de DNA induzem imunidade antígeno-específica ainda estão sob intensas investigações, existindo um modelo idealizado até o presente. De maneira geral, o plasmídeo contendo o gene de interesse é inserido no organismo pela pele (via intradérmica) ou por via intramuscular (IM). As células residentes locais, como miócitos e queratinócitos, mas também células apresentadoras de antígenos (APCs), como as células dendríticas, são então transfectadas com o plasmídeo. Utilizando a maquinaria celular, o plasmídeo produz os antígenos exógenos que serão utilizados principalmente pelas APCs para apresentação ao sistema imune através do MHC de classe I e II. As APCs migram para os linfonodos onde apresentam os antígenos às células T. Esta interação promove a ativação e expansão clonal de células T CD4⁺ e células T citotóxicas (CTLs), bem como de células B e produção de anticorpos (ABDULHAQQ; WEINER, 2008; DONNELLY; WAHREN; LIU, 2005; KUTZLER; WEINER, 2008) (Figura 7).

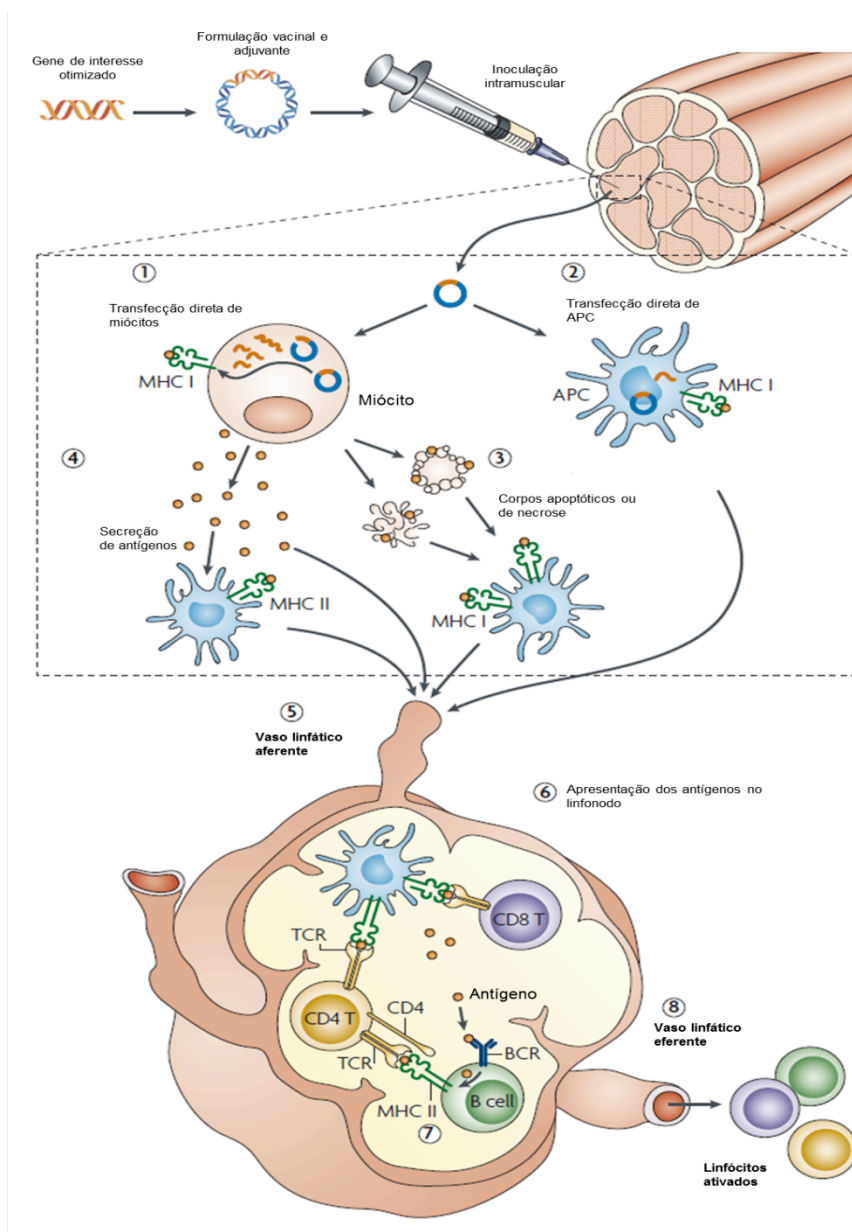


Figura 7 – Visão geral da indução da imunidade celular e humoral pela vacina de DNA.

Fonte: Kutzler e Weiner (2008). Nota: O gene de interesse é inserido dentro do vetor de expressão, o qual é então inoculado no organismo pela via intramuscular. (1) O plasmídeo transfecado entra no núcleo de miócitos e (2) células apresentadoras de antígenos (APC) residentes. (3) e (4) Os antígenos produzidos no interior da célula e aqueles endocitados são processados pelas APCs, e os peptídeos gerados ligam-se às moléculas de MHC de classe I e II, respectivamente. (5) As APCs carreando o antígeno, dirigem-se para o linfonodo onde (6) apresentam-os às células T. (7) Em resposta ao complexo peptídeo-MHC e aos sinais coestimulatórios, as células T CD4 auxiliares secretam citocinas necessárias para a ativação de células B bem como de células T CD8. Os antígenos também podem ser capturados pelas imunoglobulinas presentes na superfie das células B, que apresentam às células T CD4, promovendo a indução de uma efetiva reposta de célula B. (8) Os Linfócitos ativados deixam o linfonodo pelo vaso linfático eferente e a partir daí funcionam como um sistema de vigilância no caso de uma possível infecção com agente contendo o antígeno gerador da resposta imune.

As vacinas de DNA têm potenciais vantagens em relação às vacinas tradicionais. Elas são inerentemente mais seguras uma vez que não possuem o risco de reverter para forma virulenta como as produzidas a partir de vírus inativado/atenuado, diminuindo também a probabilidade de efeitos colaterais. Os plasmídeos são moléculas relativamente simples e altamente estáveis, o que facilita seu transporte e armazenamento (não necessitam de armazenamento a 4°C). Essas características combinadas com o fato de que essas moléculas também são fáceis de manipular e possuem baixo custo de produção, as tornam ideais para a produção em massa e distribuição em países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento. Outra vantagem é que a produção da proteína exógena pela célula hospedeira permite que o antígeno se monte de maneira conformacional (nativa), sendo então melhor reconhecido pelo sistema imune e gerando uma resposta mais eficiente. As vacinas de DNA também são capazes de abrigar vários genes inseridos em fase, nos casos em que mais de um antígeno seja necessário na indução da resposta imune (ABDULHAQQ; WEINER, 2008; KUTZLER; WEINER, 2008).

Questões referentes a segurança das vacinas de DNA vem sendo constantemente discutidas e analisadas. A primeira preocupação está relacionada a possibilidade de integração ao DNA celular. Uma das hipóteses levantadas é que a vacina integrada poderia causar mutagêneses insercionais e instabilidade cromossômicas através de quebras e rearranjos no DNA humano (KUTZLER; WEINER, 2008). Estudos pré-clínicos e clínicos não mostram níveis relevantes de integração ao DNA da célula e quando isto ocorre apresenta-se com uma magnitude abaixo da frequência de mutações espontâneas (KURTH, 1995; LEDWITH et al., 2000; MANAM et al., 2000; PAL et al., 2006; TEMIN, 1990). Outro ponto é o desenvolvimento de autoimunidade induzida pelas vacinas de DNA, com o aparecimento de anticorpos anti-nuclear ou anti-DNA. Participantes das pesquisas clínicas são acompanhados quanto ao aparecimento de sinais e sintomas bem como de marcadores laboratoriais relacionados com autoimunidade. Estudos em primatas não-humanos e em humanos não detectaram aumento desses anticorpos e até o momento não há evidências que indiquem a associação entre autoimunidade e vacinas de DNA (BAGARAZZI et al., 1997; KLINMAN et al., 2000; MACGREGOR et al., 2000). Uma terceira preocupação é que o DNA utilizado na imunização seja transferido para bactérias, que então tornam-se resistentes ao antibiótico utilizado como marcador de seleção do plasmídeo durante sua produção em larga escala.

Entretanto, os genes de resistência contidos nos plasmídeos vacinais codificam para antibióticos não utilizados no tratamento de infecções em humanos, como a canamicina. Além disso, estratégias que não usam seleção por antibióticos também estão sendo testadas (CRANENBURGH et al., 2001; GARMORY et al., 2005; KUTZLER; WEINER, 2008; MAIRHOFER et al., 2007). É importante considerar que tanto a União Européia como a *Food and Drug Administration* (FDA), nos Estados Unidos, tem adotado medidas para a regulação do uso das vacinas de DNA, principalmente nos aspectos relacionados a sua segurança (MINOR, 1995; NICHOLS et al., 1995; ROBERTSON; CICHUTEK, 2000; ROBERTSON; GRIFFITHS, 2006).

Apesar do grande impacto que este tipo de tecnologia poderá trazer, as vacinas de DNA ainda necessitam de aperfeiçoamentos, uma vez que mesmo apresentando bons resultados em cobaias, elas ainda não foram capazes de induzir imunogenicidade satisfatória em primatas não-humanos e em humanos. Sendo assim, torna-se claro que para desencadear uma resposta imune mais robusta, é crucial promover a maximização na expressão dos antígenos. Para tanto, algumas estratégias podem ser utilizadas, as quais podemos citar: otimização dos elementos transcricionais, otimização da própria sequência antigênica, aumento da imunogenicidade através da formulação vacinal e administração conjunta de plasmídeo codificando imunomoduladores ou citocinas (KUTZLER; WEINER, 2008).

Atualmente quatro vacinas de DNA estão licenciadas para uso veterinário, sendo duas para prevenção de doença infecciosa e outras duas com função terapêutica (DAVIDSON et al., 2005;). Essas vacinas são fundamentais para validação dessa nova plataforma tecnológica e ilustram seu potencial para uso comercial (KUTZLER; WEINER, 2008).

1.10 Modelo proposto para uma nova vacina contra o HAV

As vacinas existentes contra a Hepatite A mostram-se eficazes na indução da resposta imune protetora, contudo elas possuem algumas desvantagens concernentes à sua própria natureza e forma de produção. Dentre elas estão: o alto custo final, produção em quantidades limitadas, dificuldades quanto ao transporte e

armazenamento (4°C) e possibilidade de reversão para a virulência ou possibilidade de efeitos colaterais graves (ABDULHAQQ; WEINER, 2008; LIU, 2003). Dentre estas desvantagens, o alto custo desse tipo de vacina é o principal fator limitante para implantação de um programa de vacinação em massa no Brasil e em países subdesenvolvidos e/ou em desenvolvimento (VITRAL; GASPAR; SOUTO, 2006).

Diante disso, este trabalho pretendeu construir, otimizar e avaliar a expressão de um protótipo vacinal, baseado em DNA, contra a infecção pelo HAV, iniciando assim, os estudos de desenvolvimento de uma vacina de DNA capaz de ter a mesma ou melhor eficácia que as vacinas tradicionais, porém com um custo menor, maior estabilidade e sem os riscos decorrentes da administração de vacinas com o vírus completo. Esse protótipo foi construído com base na estrutura genômica do HAV, no mecanismo de processamento da poliproteína viral e nos modelos de desenvolvimento de vacina de DNA para outros vírus da família *Picornaviridae*.

As iniciativas existentes para o desenvolvimento de uma vacina de DNA para o controle da infecção pelo FMDV (*Foot and Mouth Disease Virus*), o vírus da Febre Aftosa, demonstram a viabilidade de utilizar as mesmas estratégias para a construção de uma vacina contra o HAV pois ambos pertencem a mesma família e possuem, desta forma, uma estrutura biológica muito semelhante. As vacinas de DNA contra FMDV baseiam-se na construção de vetores que codificam as proteínas do capsídeo viral, proteases virais e moléculas adjuvantes (XIAO et al., 2007; WONG et al., 2000; 2002). Embora se mostrem capazes de gerar resposta imune protetora em animais vacinados, as vacinas contra o FMDV ainda necessitam de aperfeiçoamentos para uma formulação final eficaz (BEARD et al., 1999; CEDILLO-BARRON et al., 2001; MINGXIAO et al., 2007; WONG et al., 2002).

O protótipo vacinal contra o HAV foi construído a partir das sequências que codificam as proteínas estruturais (VPs e 2A), bem como a protease 3C. Essa construção irá produzir uma poliproteína truncada que será processada pela atividade de 3C, gerando uma VLP, que não constitui a partícula viral infecciosa pois não contém o RNA viral, porém tem o potencial de produzir uma resposta imune contra o vírus. A importância da formação da VLP está no fato de que embora sejam imunogênicas, as proteínas estruturais do vírus, isoladamente, não induzem anticorpos protetores. A formação destes depende dos epítomos conformacionais, que surgem após a montagem da estrutura do capsídeo (HOLLINGER; EMERSON, 2001).

A vacina apresentada aqui tem alguns aprimoramentos com relação às vacinas genéticas contra FMDV, o que deve potencializar consideravelmente sua capacidade de induzir uma resposta imune mais robusta e duradoura: 1- Fusão com a região N-terminal da Proteína de Associação à Membrana Lisossomal (LAMP) (CHEN et al, 1985); 2- Otimização de códons para a expressão em procariotos e eucariotos.

A proteção contra a infecção pelo HAV depende principalmente da geração de uma boa resposta imune humoral através dos anticorpos que neutralizem o vírus. Para a produção desses anticorpos é necessário que os antígenos sejam apresentados às células T CD4⁺ auxiliares pelas moléculas de MHC de classe II presentes nas Células Apresentadoras de Antígeno (APC). Os antígenos apresentados por essa via são aqueles normalmente endocitados ou fagocitados pelas APCs. Apesar das vacinas de DNA poderem ativar a via MHC II (como dito anteriormente), isso pode não acontecer de forma eficiente uma vez que os antígenos das vacinas de DNA são normalmente sintetizados dentro da célula, ocorrendo sua apresentação majoritariamente via MHC de classe I, que gera uma resposta de célula T CD8⁺ citotóxicas. (RAVIPRAKASH et al., 2001). Além disso, a mudança de classe de anticorpos, a expansão clonal de células B e T antígeno específicas, a formação de células de memória e a própria ativação de células T CD8⁺ são decorrentes das citocinas e moléculas co-estimulatórias liberadas pelas células T CD4⁺ auxiliares (KAECH; WHERRY; AHMED, 2002). Diante do exposto, observa-se que secreção dos antígenos vacinais é de fundamental importância para o estímulo do sistema imune. A via de evasão celular do HAV é dependente do RNA viral e dessa forma, os antígenos codificados pela vacina de DNA, aqui proposta, não podem ser liberados da célula pelo seu mecanismo natural e, portanto, possivelmente não serão endocitados pelas APCs para a apresentação via MHC II, com prejuízo para a formação dos anticorpos neutralizantes. Para aumentar os níveis de secreção dos antígenos virais, os mesmos foram fusionados à região N-terminal da Proteína de Associação a Membrana Lisossomal. LAMP é uma proteína que se liga à membrana externa do lisossomo, através de sua sequência carboxi-terminal YXXØ, presente numa cauda citoplasmática de 11 aminoácidos (GUARNIERI et al., 1993; ROHRER et al., 1996; OBERMULLER et al., 2002). O tráfego intracelular de LAMP inclui compartimentos multilaminares especializados de Células Apresentadoras de Antígenos (APCs) imaturas, chamados MIIC e CIIV,

onde ocorre o processamento e formação dos complexos antigênicos peptídeos-MHC II (KLEIJMEERET al., 1997; DRAKE et al., 1999; TURLEY et al., 2000). A constatação da co-localização das moléculas LAMP e MHC II permite sua utilização como suporte para antígenos quiméricos, contendo as sequências alvos de LAMP, visando o direcionamento do processamento antigênico para o compartimento MHC II. Apenas a região N-terminal foi utilizada para permitir o direcionamento da síntese dos antígenos de HAV para dentro do lúmen do Retículo Endoplasmático (RE) e consequentemente o processamento e a secreção dos mesmos via complexo de Golgi. Vários estudos mostram bons resultados na utilização de LAMP para aumentar a eficiência de secreção/apresentação antigênica de formulações vacinais (ANWAR et al., 2005; ARRUDA et al., 2006; CHIKHLIKAR, et al., 2004; DE ARRUDA et al., 2004; MARQUES et al., 2003; RAVIPRAKASH et al., 2001).

Outro aprimoramento foi o desenvolvimento de genes sintéticos códon-otimizados com objetivo de aumentar os níveis de expressão de antígenos virais, em bactérias e em células eucarióticas. Essa estratégia é essencial em virtude da grande diferença entre os *codon usages* do HAV e de células humanas, ou seja, as concentrações de alguns tRNA específicos (presentes nas células humanas) são insuficientes para promover a tradução ótima do RNA viral (que utiliza outro “pool” de tRNA específicos). Para contornar este problema é possível otimizar a seqüência de DNA viral, substituindo os códons virais por códons de células humanas, sem alterar a seqüência final de aminoácidos da proteína codificada. A otimização de seqüências de DNA pode ser realizada através da utilização de algoritmos genéticos, pelos quais é possível desenhar seqüências sintéticas de DNA compostas apenas pelos códons preferencialmente mais utilizados por células eucarióticas ou bactérias. A manutenção de códons raros na seqüência alvo geralmente leva à uma tradução sub-ótima ou erros de tradução. Através do processo de otimização, esses códons raros podem ser completamente substituídos (KOTSOPOULOU et al., 2000; DONG; NILSSON; KURLAND, 1996; ZHOU et al., 1999). Além disso, outras características tais como conteúdo de GC (SEMON; MOUCHIROUD; DURET, 2005), sítios internos de restrição, motivos repetitivos de DNA (GURVICH et al., 2005) e estruturas secundárias do mRNA (DALLMANN; DUNN, 1994; LEE et al., 1987; PARKIN; CHAMORRO; VARMUS, 1992), podem ser alterados e equilibrados para permitir elevados níveis de expressão protéica (BURGESS-BROWN, 2008).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Construir e avaliar a expressão, em cultura de célula, de protótipos vacinais, baseados em DNA, contra o vírus da Hepatite A.

2.2 Objetivos específicos

- a) Construir vetores vacinais contra o HAV, com base nas sequências de DNA que codificam apenas as proteínas do capsídeo, a proteína 2A e protease 3C (poliproteína truncada);
- b) Otimizar a sequência codificadora do antígeno vacinal, a poliproteína truncada, para aumentar a eficiência de expressão da mesma em células eucarióticas;
- c) Otimizar as sequências que codificam as proteínas do capsídeo VP1, VP3 e protease 3C, para a expressão das respectivas proteínas de fusão em sistemas bacterianos;
- d) Expressar, purificar e inocular as proteínas VP1, VP3 e 3C em coelhos para a obtenção de anticorpos policlonais específicos;
- e) Realizar ensaios de *Western-blot* para avaliar a eficiência de produção dos anticorpos obtidos;
- f) Avaliar a expressão da região N-terminal da proteína LAMP, através de imunofluorescência, nas células transfectadas com a construção codificando esta região;
- g) Transfectar células 293 humanas com as construções vacinais otimizadas para a expressão em células eucarióticas e avaliar a eficiência de expressão da vacina de DNA, por imunofluorescência e *Western-blot*, utilizando os anticorpos obtidos contra as proteínas VP1, VP3 e 3C;

- h) Avaliar a eficiência de processamento da poliproteína truncada, pela protease viral 3C, através de ensaios de *Western-blot* utilizando extratos de células eucarióticas transfectadas com o vetor vacinal e os anticorpos obtidos contra as proteínas VP1, VP3 e 3C.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Cultivo de células e vírus

Células HEK-293 (ATCC®) e FRhK-4 (gentilmente cedida pela Dra. Vanessa de Paula – Instituto Oswaldo Cruz) foram crescidas em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagles's Medium*). Células BHK-21 foram crescidas em MEM (*Modified Eagles's Medium*). Os meios utilizados foram suplementados com 10% de soro fetal bovino (Gibco®), 1% de L-glutamina 2 mM (Gibco®) e 1% de penicilina/estreptomicina (Invitrogen®). As células foram mantidas em estufa a 37°C com 5% de CO₂.

A cepa brasileira HAF-203 do vírus da Hepatite A (também gentilmente cedida pela Dra. Vanessa de Paula – Instituto Oswaldo Cruz) foi propagada em células FRhK-4, como descrito por Gaspar e outros (1993), servindo como controle positivo da expressão da poliproteína truncada nos ensaios de imunofluorescência e *Western-blot*.

3.2 Montagem da sequência vacinal

A sequência vacinal foi determinada com base naquelas que codificam as proteínas estruturais (VP1-4 e 2A) e a protease 3C, sendo obtidas a partir da cepa HM175 (GenBank acesso: M14707), isolada de um surto ocorrido na Austrália (COHEN et al., 1987) (Figura 8). Denominamos esta sequência de poliproteína truncada do HAV (HAV-PTRUNC), uma vez que foram removidas todas as regiões que codificam para as proteínas responsáveis pela replicação viral (2B, 2C, 3A, 3B e 3D). Foram adicionadas ainda sequências que codificam aminoácidos extras que têm a função de mimetizar os sítios que são naturalmente clivados pela 3C e também sequências espaçadoras, e diversos sítios de restrição, visando a correta maturação das proteínas individuais, assim como as estratégias de clonagem.

Após a região que codifica as VPs e a proteína 2A, foi adicionada uma sequência que codifica os seis primeiros aminoácidos de 2B (Bloco I). A sequência que codifica a protease 3C é flanqueada na sua região 5' por aquela que codifica os últimos seis aminoácidos da proteína 3B e na sua região 3' pela que codifica os seis primeiros aminoácidos da proteína 3D (Bloco II) (Figura 8A). Estes dois blocos foram unidos por uma região espaçadora S que codifica uma sequência de aminoácidos glicina/prolina (GPGPG), considerada não-imunogênica (LIVINGSTON et al., 2002). Esta região S tem a finalidade de separar dois sítios consecutivos para a protease 3C, o que poderia levar a uma baixa eficiência de atividade de clivagem, pela enzima, devido a um possível impedimento alostérico. Estes dois blocos foram conectados gerando a construção vacinal HAV-PTRUNC (Figura 8B), que por sua vez é flanqueada por uma sequência 5' contendo os sítios de restrição para as enzimas *NheI* e *XhoI* e por uma sequência 3' contendo os sítios de restrição para *EcoRI* e *KpnI*. Na região 5' foi ainda adicionada uma sequência Kozak para aumentar a eficiência de tradução, em consenso com o códon ATG de iniciação, enquanto na região 3' foi adicionado um códon de terminação (STOP) da tradução (Figura 8C). Com base no processamento da poliproteína do HAV, descrito anteriormente, a sequência de HAV-PTRUNC preserva todos os sinais biológicos para seu processamento, através da autoclivagem da proteína 3C, e consequente clivagem/conversão de todo o restante da poliproteína truncada em proteínas individuais, possibilitando a formação do capsídeo viral.

3.3 Otimização e estratégias de clonagem da sequência da poliproteína truncada

A sequência de HAV-PTRUNC foi analisada e otimizada através do programa LETO 1.0 (Entelechon®). Este programa utiliza um algoritmo genético capaz de alterar os códons de uma determinada sequência sem alterar a sequência de aminoácidos codificados por ela. Por meio de mutações pontuais silenciosas, as diferenças entre os *codon usages* do HAV e de humanos foram minimizados para aumentar os níveis de expressão da proteína viral nas células 293 humanas. Outros parâmetros também foram otimizados como: estrutura secundária do mRNA,

distribuição do conteúdo de GC, motivos repetitivos de DNA, sítios de restrição e sítios críticos de *splicing*. As regiões que flanqueiam HAV-PTRUNC, contendo os sítios de clonagem e sequências sinais de iniciação e término da tradução, foram bloqueadas, não sofrendo qualquer alteração durante o processo de otimização.

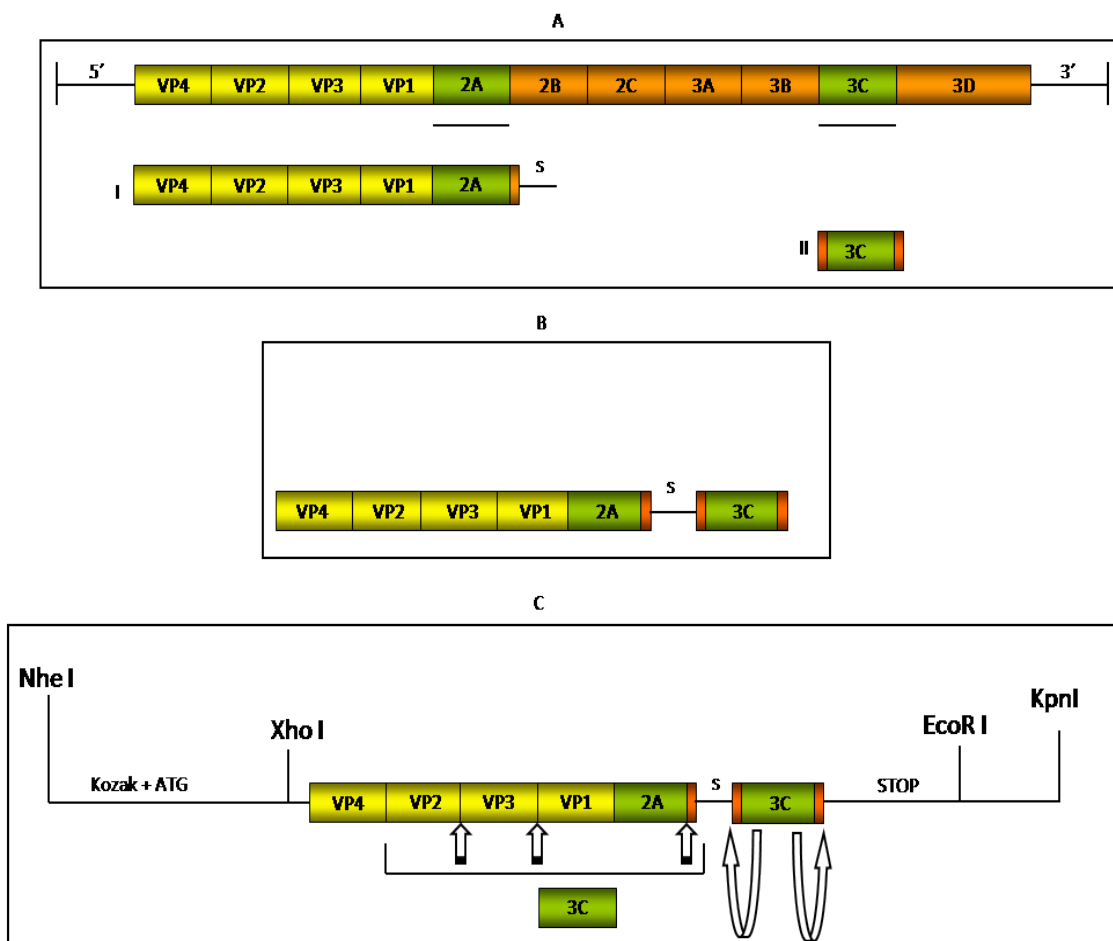


Figura 8 – Modelo de construção da sequência da vacina de DNA contra o HAV, baseada apenas nas proteínas estruturais (VP1-4) e proteínas 2A e 3C do vírus.

Fonte: Dados da pesquisa. Nota: (A) A partir do genoma do vírus, foram selecionadas duas regiões específicas: uma sequência que codifica as proteínas estruturais, VP1-4 e a proteína 2A em fase com as sequências que codificam os primeiros aminoácidos da proteína 2B e com a região espaçadora (S) que codifica os aminoácidos GPGPG (3') – Bloco I; uma sequência que codifica a protease 3C, em fase com as sequências que codificam os últimos aminoácidos da proteína 3B (5') e os primeiros aminoácidos da proteína 3D (3') – Bloco II. (B) Estes blocos foram unidos, *in silico*, gerando a sequência vacinal que denominamos de HAV-PTRUNC. (C) Foram ainda adicionadas sequências flanqueadoras para permitir as estratégias de clonagem e de expressão. Na extremidade 5' foi adicionada uma sequência Kozak em fase com o códon ATG de iniciação da tradução, flanqueada pelos sítios NheI e XhoI. Na extremidade 3' foi adicionada uma sequência de parada (Stop códon), flanqueada pelo sítio de restrição KpnI e EcoRI. Este cassete de expressão foi otimizado para a expressão em células eucarióticas e desenhado para que seja capaz de se autoprocessar, principalmente pela atividade da protease 3C.

A sequência otimizada de HAV-PTRUNC para a expressão em células eucarióticas, HAV-PTRUNC_{OPT}, foi enviada para a síntese comercial (Geneart®) e em seguida foi subclonada no vetor de expressão eucariótica p43.2. A partir do vetor comercial, contendo a sequência HAV-PTRUNC_{OPT}, foram geradas duas construções vacinais: uma contendo apenas HAV-PTRUNC_{OPT} e outra contendo HAV-PTRUNC_{OPT} fusionada à região N-terminal da proteína LAMP. Para a construção do primeiro plasmídeo, o vetor comercial foi clivado com as enzimas *NheI* e *KpnI*, e o fragmento excisado foi então subclonado nos mesmos sítios do vetor p43.2 gerando o plasmídeo p43.2_HAV-PTRUNC_{OPT}. Nesta construção foram preservadas as sequências de iniciação (Kozak + ATG) e terminação (STOP códon) da tradução. Para a fusão de HAV-PTRUNC_{OPT} com a região N-terminal de LAMP, o vetor comercial foi clivado com as enzimas *XhoI* e *KpnI*, e o fragmento excisado também subclonado nos mesmos sítios do vetor p43.2. Como consequência da clivagem do vetor comercial com a enzima *XhoI*, as sequências de iniciação (Kozak + ATG) foram removidas. Por outro lado, a clivagem do vetor p43.2 com *XhoI* preserva a região N-terminal de LAMP (já em contexto com Kozak + ATG) presente neste vetor, gerando a construção p43.2_N-hLAMP_HAV-PTRUNC_{OPT}.

3.4 Otimização e estratégias de clonagem das sequências de VP1, VP3 e 3C para expressão das respectivas proteínas de fusão em bactérias

Para avaliar a eficiência de expressão e processamento de HAV-PTRUNC_{OPT}, as proteínas VP1, VP3 e 3C foram expressas em bactérias visando a produção de anticorpos policlonais específicos contra as mesmas. As proteínas VP1 e VP3 foram escolhidas pois são os principais alvos para a produção de anticorpos contra o HAV, enquanto a protease 3C foi selecionada para detectar se a mesma é capaz de se autoclivar da poliproteína. As sequências que codificam estas proteínas foram também analisadas, e otimizadas, utilizando o algoritmo genético do programa LETO 1.0 (Entelechon®). Ao contrário da poliproteína, que foi otimizada para a expressão em células eucarióticas, as proteínas VP1, VP3 e 3C foram otimizadas para a expressão em bactérias. Desta forma, os códons foram substituídos por aqueles

preferencialmente usados pela bactéria *E. coli*, visando aumentar os níveis de expressão das proteínas recombinantes.

As seqüências otimizadas para a expressão em bactérias (VP1_{OPT}, VP3_{OPT}, e 3C_{OPT}) também foram enviadas para a síntese comercial (Geneart®) e em seguida foram subclonadas no vetor comercial pMal_c4X (New England Biolabs®). As três seqüências foram flanqueadas por dois sítios múltiplos de clonagem: 5' (*BamH I*, *EcoR I* e *XbaI*) e 3' (*Hind III*, *Not I* e *Xho I*), permitindo a construção dos respectivos vetores bacterianos pMal_c4X_VP1_{OPT}, pMal_c4X_VP3_{OPT} e pMal_c4X_3C_{OPT} (Figura 9).

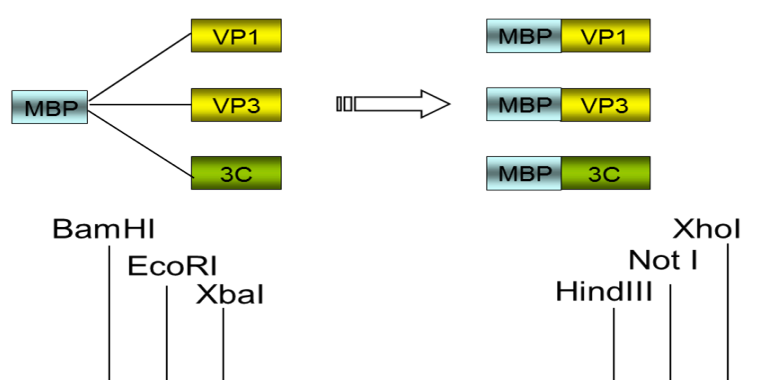


Figura 9 - Construção dos vetores de expressão em bactéria.

Fonte: Dados da pesquisa. Nota: Os vetores comerciais foram clivados e os fragmentos digeridos foram clonados, nos mesmos sítios, do vetor pMal_c4X (New England Biolabs®) gerando as construções pMal_c4X_VP1_{OPT}, pMal_c4X_VP3_{OPT} e pMal_c4X_3C_{OPT}. As proteínas do HAV foram expressas fusionadas a Proteína de Ligação a Maltose (MBP), viabilizando a purificação das mesmas em resina de amilose.

3.5 Construção dos vetores vacinais p43.2_HAV-PTRUNC_{OPT} e p43.2_hN-LAMP_HAV-PTRUNC_{OPT} e dos vetores de expressão em bactéria pMal_c4X_VP1_{OPT}, pMal_c4X_VP3_{OPT} e pMal_c4X_3C_{OPT}

3.5.1 Preparação dos vetores comerciais contendo os genes otimizados

As seqüência otimizada de HAV-PTRUNC foi sintetizada comercialmente (GeneArt®) e nos enviada já clonada no vetor comercial pMA-RQ_HAV-PTRUNC_{OPT}. As seqüências das proteínas VP1, VP3 e 3C também foram sintetizadas e enviadas nos vetores comerciais pMA_VP1_{OPT}, pMA_VP3_{OPT},

pMA_3C_{OPT}. Todos os plasmídeos foram utilizados para transformar bactérias competentes *E. coli* K12TB1 (New England Biolabs®). As reações de transformação foram realizadas para um volume final de 80 µl, contendo: 50 µl de células competentes, 25 µl de tampão de transformação (MgCl₂ 5 mM; Tris-HCl 5 mM pH 7.4) e 0,1µg de cada DNA plasmideal. A reação de transformação foi incubada durante 30 minutos no gelo, sendo em seguida submetida a choque térmico a 37°C por cinco minutos, e esfriada novamente no gelo. As bactérias foram semeadas em placa contendo meio LB sólido, com Ampicilina (AMP) na concentração final de 50 µg/mL. Colônias isoladas em cada placa foram inoculadas em 2 mL de meio LB líquido, contendo Ampicilina (50 µg/mL), e crescidas durante aproximadamente 15 horas a 37°C. Em seguida, 1,5 ml de cada cultura foram centrifugados a 13.200 rpm por cinco minutos para a obtenção de sedimento bacteriano e a partir deste foi realizada a extração de DNA, em pequena escala, utilizando o kit QIAprep® spin miniprep (Qiagen®), de acordo com as recomendações do fabricante. As “minipreps” foram submetidas a reações de digestão visando a confirmação da identidade dos genes otimizados. Foram utilizados tanto os sítios para as clonagens nos vetores de expressão, provocando a liberação dos fragmentos, como também sítios internos de restrição. As reações de digestão foram realizadas para um volume final de 10µl contendo: 6,5 µl de água Milli-Q, 1X tampão de digestão, 0,1 µg de cada DNA e as respectivas enzimas: 10U de *Xba I*, 10U de *Hind III*, 20U de *NdeI*, 10U de *NcoI*, 10U *SpeI*, 5U de *NheI*, 5U de *KpnI*, 10U de *XhoI*, 10U de *EcoRI* e 20U de *PstI* (New England Biolabs). Os produtos da digestão foram migrados em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio, e observados sob luz ultravioleta com o auxílio do transiluminador. A identidade de cada sequência foi analisada através do padrão de bandas gerado em cada digestão.

3.5.2 Subclonagem de VP1_{OPT}, VP3_{OPT}, e 3C_{OPT} no vetor pMal_c4X de expressão bacteriana

Após a confirmação da identidade dos genes de VP1, VP3 e 3C, os mesmos foram digeridos em maior escala. Cada reação de digestão foi realizada para um volume final de 50 µl, contendo 1X tampão de digestão, 2,5 µg de cada DNA e 50 U

das enzimas *Xba*I e *Hind*III (New England Biolabs®). Os fragmentos relativos a cada gene foram excisados do gel de agarose 1% e purificados utilizando o kit comercial QIAEX II Gel Extraction Kit (Qiagen®), de acordo com as recomendações do fabricante.

Os genes purificados foram subclonados no vetor pMAL-c4X, em fase com o gene *malE* de *E. coli*, que codifica para a proteína de ligação a maltose (MBP) visando à expressão das proteínas de fusão MBP-VP1_{OPT}, MBP-VP3_{OPT} e MBP-3C_{OPT} em bactérias. As reações de ligação entre o vetor previamente quantificado e os genes otimizados foram realizadas utilizando duas quantidades diferentes dos fragmentos (20 ng e 100 ng), mantendo uma concentração definida do vetor (100ng/reação). O volume final da reação foi de 10µl em ambos os casos, contendo 1 µl de 10 X Ligase Buffer, 400U de T4 DNA Ligase (New England Biolabs®) e água Milli-Q em quantidade suficiente para 10 µl finais. Uma reação apenas com o vetor linearizado, ou seja, sem os fragmentos referentes aos genes sintéticos, foi utilizada como controle negativo da reação. As reações de ligação foram incubadas a 16°C durante aproximadamente 20 horas e em seguida foram utilizadas para a transformação de células competentes, visando à confirmação das clonagens. As transformações foram realizadas em um volume final de 80 µl contendo: 50 µl de bactérias competentes, 25 µl de tampão de transformação e 5 µl de cada produto de ligação. O procedimento foi realizado como descrito na seção 3.5.1. As bactérias transformadas foram semeadas em placa com meio sólido LB/AMP (50 µg/ml) e incubadas à 37°C, durante aproximadamente 15 horas. Com o objetivo de confirmar as subclonagens dos genes otimizados, no vetor pMAL-c4X, foram selecionadas colônias isoladas provenientes de cada ligação para preparação de DNA plasmidial, utilizando o kit QIAprep spin Miniprep (Qiagen®). A identidade de cada gene foi analisada através de provas de digestão utilizando as enzimas *Xba*I e *Hind*III (New England Biolabs®), além das enzimas com especificidade para sítios internos de restrição. As reações de digestão foram realizadas à 37°C durante 4 horas e os produtos das mesmas foram fracionados em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio.

3.5.3 Subclonagem de HAV-PTRUNC_{OPT} no vetor p43.2.

Após a confirmação da identidade de HAV-PTRUNC_{OPT}, o plasmídeo sintético também foi digerido em maior escala. Cada reação de digestão foi realizada para um volume final de 50 µl, contendo 1X tampão de digestão, 2,5 µg do DNA e 50 U das enzimas *NheI*, *KpnI* e *XhoI* (New England Biolabs®). Os fragmentos foram excisados do gel 1% de agarose e purificados utilizando o kit comercial QIAEX II Gel Extraction Kit (Qiagen®), de acordo com as recomendações do fabricante.

Para a construção do plasmídeo p43.2_HAV-PTRUNC_{OPT}, o vetor p43.2_HIVhumanLAMP/Gag (CHIKHLIKAR et al., 2004) e o plasmídeo sintético (pMA-RQ_HAV-PTRUNC_{OPT} - Geneart®) foram digeridos com as enzimas *NheI* e *KpnI* (New England Biolabs®), enquanto que para a construção do plasmídeo p43.2_N-hLAMP_HAV-PTRUNC_{OPT}, a digestão foi feita com as enzimas *XhoI* e *KpnI*. As reações de ligação, transformação bacteriana e preparação do DNA plasmideal foram realizadas como descritas na seção 3.5.1 e 3.5.2.

Com o objetivo de confirmar a clonagem dos fragmentos no vetor p43.2, foram realizadas provas de digestão com os pares de enzimas *NheI/KpnI* e *XhoI/KpnI* (utilizadas para a clonagem) e com a enzima *PstI* (utilizada para verificar a identidade de cada inserto, através de padrões gerados por sítios internos de restrição). As reações de digestão foram realizadas à 37°C durante 4 horas e os produtos das mesmas foram fracionados em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio.

3.6 Expressão das proteínas recombinantes MBP-VP1_{OPT}, MBP-VP3_{OPT} e MBP-3C_{OPT} em bactérias.

Para verificar a expressão das proteínas individuais recombinantes, células competentes *E.coli* K12TB1 foram transformadas com os vetores pMal_c4X_VP1_{OPT}, pMal_c4X_VP3_{OPT} e pMal_c4X_3C_{OPT}. O vetor pMal_c4x intacto foi usado como controle positivo da expressão uma vez que ele codifica a proteína MBP fusionada a α -complementação da proteína β -galactosidase. Após o crescimento bacteriano, foi

escolhido um clone isolado de cada transformação e inoculado em 2 ml de LB/AMP. A cultura foi crescida durante três horas a 37°C e após esse tempo foi adicionado o indutor de expressão IsoPropil-beta-DTioGalactopiranosídeo (IPTG) para a concentração final de 0,5 mM no meio de cultura. A indução foi realizada à 37°C durante 4 horas e em seguida as alíquotas foram centrifugadas por 5 minutos a 13.200 rpm, e os precipitados foram ressuspensos em 100 µL de tampão 2X Laemmli desnaturante. Após fervura à 100°C, por 5 minutos, 10 µL de cada alíquota foram migrados em gel SDS-PAGE 12,5% e corados com Azul de Comassie (Sigma®).

3.7 Expressão em larga escala e purificação das proteínas recombinantes

Uma vez confirmada a expressão de todas as proteínas em pequena escala, as mesmas foram então, submetidas a indução da expressão em larga escala. As bactérias já transformadas com os vetores de expressão foram inoculadas em 500 ml de meio LB/AMP. As proteínas foram induzidas com 0.5 mM final de IPTG e as bactérias, expressando as mesmas, foram coletadas por centrifugação a 5.000 rpm à 4°C por 20 minutos. As bactérias foram ressuspensas em tampão de coluna (Tris-HCl 20 mM pH 7.4, NaCl 200 mM, EDTA 1 mM, β-mercaptoetanol 10 mM, suplementado com Inibidor de Protease - Roche®) e em seguida foram sonicadas através de 6 pulsos de 30s, com intervalos de 1min e amplitude de 50, para liberação das proteínas citoplasmáticas. Os extratos bacterianos sonicados foram centrifugados a 10.000 rpm, à 4°C por 30 minutos, e o sobrenadante, contendo o extrato protéico total, foi utilizado para a purificação

As proteínas recombinantes foram isoladas por meio de um único passo de cromatografia, através da ligação da MBP à uma coluna contendo matriz de amilose. As colunas contendo 2,5 mL de resina de amilose (New England Biolabs®), foram equilibradas com 200 mL de tampão de coluna antes de serem incubadas com os sobrenadantes das bactérias sonicadas. A fração contendo as proteínas que não se ligaram à resina foi coletada e mantida à -20°C. Após lavagem com aproximadamente 150 mL de tampão de coluna, as proteínas de fusão foram eluídas da resina com 20 mL de tampão de coluna contendo 10mM de maltose livre. Foram

coletadas alíquotas de 1,5mL num fluxo de aproximadamente 0,5 mL/min, e uma análise preliminar da quantidade da proteína recombinante presente em cada alíquota coletada foi determinada através do Reagente de Bradford. Placas de 96 poços foram utilizadas para adição de 10 µl de cada fração coletada a 190 µl de reagente de Bradford.

3.8 Digestão das proteínas de fusão MBP-VP1_{OPT}, MBP-VP3_{OPT} e MBP-3C_{OPT} com o fator Xa para a remoção da proteína MBP.

O vetor pMal-c4X possui um sítio de clivagem para uma protease denominada Fator Xa, localizada imediatamente antes do Sítio Múltiplo de Clonagem (MCS), permitindo, desta forma, que a MBP seja separada das proteínas VP1_{OPT}, VP3_{OPT} e 3C_{OPT} após a purificação. Para a digestão com o Fator Xa, as proteínas recombinantes foram incubadas com a protease à 4°C, por 72 horas, na proporção de 1:100 (peso/peso) de Fator Xa/proteína recombinante. As digestões foram verificadas em gel de poliacrilamida 12,5% e as proteínas coradas por Azul de Coomassie (Sigma®). Após as digestões, as proteínas recombinantes foram quantificadas em gel de poliacrilamida, utilizando como padrão uma curva com quantidades pré-estabelecidas de BSA. A concentração de cada proteína foi calculada a partir da intensidade de cada banda, comparada a intensidade das bandas de BSA, utilizando o programa Kodak Digital Science 1D Image Analysis Software (Kodak®).

3.9 Imunização de coelho para obtenção de anticorpos policlonais contra VP1_{OPT}, VP3_{OPT} e 3C_{OPT}.

Para a produção dos anticorpos policlonais específicos contra as proteínas recombinantes, foram utilizados coelhos brancos saudáveis, com cerca de 3 meses de idade, mantidos no biotério central do CPqAM/FIOCRUZ. Antes da primeira imunização foram coletados cerca de 5 ml de sangue (punção na orelha) para a

obtenção de soro pré-imune. Estas amostras foram conservadas à temperatura ambiente por 1 hora e, posteriormente, centrifugadas à 3.000 rpm por 10 minutos para servirem como controle pré-imune. Para a primeira imunização, aproximadamente 150 µg das proteínas VP1_{OPT}, VP3_{OPT} e 3C_{OPT} foram fracionadas por eletroforese em gel 12,5% de poliacrilamida. Após a migração eletroforética, o gel foi corado com Azul de Coomassie (Sigma®) e descorado para posterior excisão das bandas correspondentes às proteínas recombinantes, utilizando um bisturi estéril. Os fragmentos protéicos foram macerados em 600 µL de tampão PBS 1X (0,15 M Tampão salina fosfato pH 7,2) e 300 µL de adjuvante de Freud completo (Sigma®). Os macerados foram injetados nos coelhos, via subcutânea, em quatro ou mais pontos. A segunda, terceira e quarta imunizações foram realizadas 15, 30 e 45 dias, respectivamente, após a primeira imunização, seguindo o mesmo protocolo da primeira, com exceção do adjuvante de Freud que, nessas imunizações, foi utilizado na sua forma incompleta (Sigma®). Sete dias após a quarta imunização, os coelhos foram sacrificados através de punção cardíaca. O sangue coletado foi mantido à temperatura ambiente por uma hora e, posteriormente, em geladeira por mais 16 horas. Em seguida, esse sangue foi centrifugado à 3.000 rpm por 10 minutos, e os soros obtidos foram aliquotados e mantidos à -80°C até o momento do uso.

3.10 Imunoadsorção e avaliação dos anticorpos produzidos contra as proteínas recombinantes.

Aproximadamente 20 µg de cada proteína recombinante foram migrados em gel de poliacrilamida 12,5% e transferidos para uma membrana de nitrocelulose (Millipore®). Esta foi corada com solução Ponceau 0,2% / TCA 1% e descorada em água. A banda correspondente à proteína recombinante foi excisada da membrana com bisturi estéril, cortada em pequenos pedaços, e os fragmentos foram lavados 3 vezes com PBS 1X (10 minutos cada lavagem) sob agitação. Em seguida, esses fragmentos foram bloqueados à 4°C, durante 30 minutos, com solução de leite 5% / Tween 0,05% em PBS 1X. A solução de bloqueio foi removida, os fragmentos da membrana foram rapidamente lavados com PBS 1X e incubados com os soros dos coelhos acrescidos de PBS 1X na proporção de 1:1, à 4°C e durante 48 horas sob

agitação. Após este passo, o sobrenadante foi removido e os fragmentos lavados três vezes com 1 mL de PBS 1X (10 minutos cada) sob agitação. Os anticorpos foram eluídos com 200 µL de solução contendo Glicina-HCl 0,1M, pH 2,5, à temperatura ambiente, por exatos 5 minutos. Em seguida, o pH foi neutralizado com a adição de 20 µL de Tris-HCl 1M, pH 8,8. A solução foi transferida para outro tubo e foi adicionado 200µL de PBS 1X. Os anticorpos foram aliquotados e guardados à -80°C até o momento de uso.

Os anticorpos purificados foram avaliados através de ensaios de *Western-blot* contra as proteínas recombinantes. Estas foram submetidas a eletroforese em gel SDS-PAGE e transferidas para membrana de nitrocelulose. Após o bloqueio das membranas com solução de leite 5% em PBS 1X / Tween 0,05%, elas foram incubadas com os anticorpos policlonais obtidos, na diluição de 1:500, em solução de leite 1% em PBS 1X / Tween 0,05%, uma hora sob agitação, e lavadas 3X (10 minutos cada) em PBS 1X/ Tween 0,05%. Em seguida, as membranas foram incubadas com o anticorpo secundário (1:5000) anti-IgG de coelho conjugado à peroxidase (Jackson ImmunoResearch®), uma hora sob agitação, lavadas três vezes e reveladas por quimiluminescência utilizando kit de ECL (Amersham®)

3.11 Transfecção de células BHK-21 com o plasmídeo p43.2_hN-LAMP_HAV-PTRUNC_{OPT}.

Células BHK-21 foram transfectadas com vetor p43.2_hN-LAMP_HAV-PTRUNC_{OPT} visando a co-expressão da região N-terminal da proteína LAMP, para servir como um indicador da expressão da poliproteína truncada, bem como avaliar se a mesma estava sendo direcionada ao retículo endoplasmático para posterior secreção. As células BHK-21 foram utilizadas para evitar reação cruzada com o LAMP endógeno, uma vez que a molécula LAMP de Hamster não é reconhecida pelo anticorpo anti-LAMP humano, ou seja, apenas a expressão da proteína de fusão com hLAMP pode ser reconhecida neste sistema.

Além do plasmídeo p43.2_hN-LAMP_HAV-PTRUNC_{OPT} também foram utilizados o vetor p43.2_HIVhumanLAMP/Gag (CHIKHLIKAR et al., 2004), que contém as seqüências N-terminal e C-terminal de LAMP, fusionadas ao gene GAG do

HIV, sendo portanto, utilizado como controle positivo da expressão. Já o vetor p43.2 “vazio”, ou seja, plasmídeo sem nenhum domínio de LAMP, foi usado como controle negativo. As transfecções foram realizadas utilizando o kit “SuperFect Transfection Reagent” (Qiagen®), de acordo com as recomendações do fabricante. Placas de seis poços contendo quatro lamínulas/poço foram cultivadas com 4×10^5 células, por 24 horas, e no dia seguinte foram incubadas com meio de cultivo contendo 10% soro fetal bovino, 4 µg de DNA e 10 µl do reagente “SuperFect”. Após 48 horas, foi realizado ensaio de imunofluorescência para a detecção do domínio de fusão N-terminal de LAMP.

3.12 Análise da expressão da proteína LAMP por imunofluorescência

Após 48 horas da transfecção, as lamínulas contendo as células transfectadas foram retiradas da placa e lavadas com solução de PBS 1X e em seguida fixadas em metanol 100% a -20°C durante cinco minutos. As lamínulas foram fixadas em uma lâmina de microscópio e logo em seguida incubadas com o anticorpo primário anti-hLAMP, (gentilmente cedido pelo Dr. Eduardo Nascimento – Universidade de Pittsburgh) que detecta a porção N-terminal da proteína, na diluição de 1:50, durante uma hora. Em seguida a lâmina foi lavada com PBS 1X e incubada com o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo, produzido em cabra e conjugado a marca de fluorescência FITC (Sigma®), diluído 1:100, durante uma hora. Após essa etapa, a lâmina foi lavada com PBS 1X, montada com glicerol tamponado e selada por outra lamínula com esmalte. A microscopia de fluorescência foi realizada utilizando o microscópio Leica DMI 4000B. Os campos de captura foram escolhidos de acordo com a morfologia e dispersão das células.

3.13 Transfecção de células HEK-293

Células HEK-293 foram transfectadas com os plasmídeos p43.2_HAV-PTRUNC_{OPT} e p43.2_hN-LAMP_HAV-PTRUNC_{OPT} utilizando o kit PolyFect®

TransfectionReagent (QIAGEN®), de acordo com as recomendações do fabricante. O plasmídeo p43.2 “vazio” também foi utilizado nos experimentos de transfecção para servir como controle negativo da expressão. Placas de seis poços foram cultivadas com 6×10^5 células/poço durante 24 horas e no dia seguinte foram incubadas com meio de cultivo contendo 10% de soro fetal bovino, 4 μg de DNA e 8 μl de PolyFect. Após 48 horas foram realizados os ensaios de imunofluorescência e *Western-blot* para a detecção das proteínas virais.

Como controle da eficiência da transfecção, as células HEK-293 também foram transfectadas com o plasmídeo repórter pCMV_ β -gal nas mesma quantidade utilizada para os demais. Após 48 horas, as células foram lavadas em PBS 1X e fixadas em solução glutaraldeído 0,2% / PBS 1X. Em seguida foram incubadas em um volume final de 1ml de uma solução contendo 20 mg de X-Gal; ferriclamida de potássio 0,005M; ferrocianida de potássio 0,005M; MgCl_2 0,002M em PBS 1X, para o desenvolvimento de coloração pela atividade da enzima β -galactosidase.

3.14 Análise da expressão da poliproteína truncada.

3.14.1 Imunofluorescência

Após 48 horas da transfecção, as lamínulas contendo as células transfectadas, foram retiradas da placa e lavadas com solução de PBS 1X e em seguida fixadas em 100% metanol a -20°C durante cinco minutos. As lamínulas foram fixadas em uma lâmina de microscópio e logo em seguida incubadas com os anticorpos policlonais anti-VP1, anti-VP3 e anti-3C produzidos em coelho, na diluição de 1:50 em PBS 1X. As células foram incubadas durante uma hora a 37°C e em seguida as lâminas foram lavadas com PBS 1X e incubada com o anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado ao fluorocromo Alexa 488, produzido em cabra, na diluição de 1:100 (Molecular Probes®). Após essa etapa a lâmina foi lavada com PBS 1X, montada com glicerol tamponado e selada por outra lamínula com esmalte. A microscopia de fluorescência foi realizada utilizando o microscópio

Leica DMI 4000B. Os campos de captura foram escolhidos de acordo com a morfologia e dispersão das células.

3.14.2 *Western-blot*

As reações de *Western-blot* foram realizadas utilizando-se os extratos das células transfectadas com o vetor p43.2 e as construções p43.2_HAV-PTRUNC_{OPT} e p43.2_hN-LAMP_HAV-PTRUNC_{OPT}. Como controle positivo da reação, foram utilizados extratos de células FRhK-4 infectadas com HAV. Os extratos celulares foram ressuspensos em tampão 2X Laemmli desnaturante, fracionados em gel SDS-PAGE 12.5% e transferidos para membrana de nitrocelulose (Amersham, England, UK®). Após o bloqueio das membranas em solução de leite 5% em PBS 1X / Tween 0,05%, as membranas foram incubadas com o anticorpos policlonais, na diluição de 1:50, uma hora sob agitação, e lavadas três vezes (10 minutos cada) em PBS 1X / Tween 0,05%. Em seguida, as membranas foram incubadas com anticorpo secundário (1:5.000) anti-IgG de coelho conjugado a peroxidase (Jackson Immuno Research®), uma hora sob agitação, lavadas e reveladas utilizando um kit de ECL (Amersham, England, UK®).

4 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Os procedimentos de imunização de coelhos para a obtenção de anticorpos policlonais foram realizados de acordo com as exigências do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA), de acordo com o protocolo P-0259/05, aprovado por esta comissão (Anexo A).

5 RESULTADOS

5.1 Otimização da sequência da poliproteína truncada do HAV e das proteínas individuais VP1, VP3 e 3C.

As sequências de DNA de HAV-PTRUNC e de VP1, VP3 e 3C foram otimizadas utilizando o algoritmo genético do programa LETO 1.0 (Entelechon®), que realizou as análises das sequências em relação a diversos parâmetros biológicos, tais como: *codon usage*, distribuição do conteúdo de GC, motivos repetitivos de DNA, estrutura secundária do mRNA e outros (Anexo B - Relatórios de otimização da proteína truncada, para expressão em células eucarióticas e de VP1, para expressão em bactérias). Esses parâmetros devem estar no melhor equilíbrio, dentro do possível, para promover uma alta eficiência de expressão do DNA otimizado.

A análise do programa através do seu algoritmo genético demonstrou uma discrepância entre a frequência da maioria dos códons utilizados pelo HAV em relação aos utilizados por células humanas e por *E. coli* para expressar suas respectivas proteínas. A figura 10 ilustra o processo de otimização de *codon usage* de HAV-PTRUNC para expressão em célula de origem humana, mostrando a alteração de códons utilizados para expressar o aminoácido valina. Dos quatro códons possíveis para expressar a valina (GUU, GUC, GUA e GUG), o HAV faz uso dos quatro em frequências similares. Já no organismo alvo (*humanos*), o códon GUG é utilizado com uma frequência bem maior que os demais (quase 60%) e ao mesmo tempo o códon GUA não é utilizado. Desta forma, o códon GUG foi inserido como o mais frequente na sequência otimizada (*optimized*). A barra azul, indicada no gráfico, representa a comparação entre os códons utilizados pelo vírus para expressar a valina, em relação aos possíveis códons utilizados para expressar o mesmo aminoácido em humanos. Quanto maior for a barra, maior é a diferença entre os *codon usage* das espécies comparadas. Após o processo de otimização, ou seja, após a melhor distribuição dos códons para facilitar a expressão em células humanas, o tamanho da barra é reduzido (barra verde) (Figura 10).

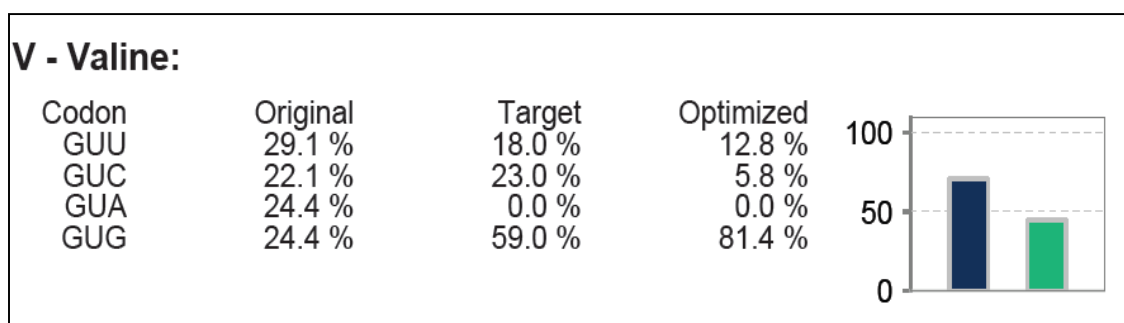


Figura 10 - Otimização de *codon usage*, para o aminoácido valina, visando melhorar a eficiência de expressão da poliproteína truncada do vírus da Hepatite A (HAV-PTRUNC), em células humanas.

Fonte: Dados da pesquisa. Nota: A sequência de HAV-PTRUNC está representada como *original*, onde os quatro códons (GUU, GUC, GUA E GUG) são utilizados com frequências semelhantes (22 a 29%) para expressar o aminoácido valina. Por outro lado, o organismo alvo (*humanos – target*) utiliza o códon GUG em uma frequência bem mais alta que os demais (59%), e também um códon (GUA) que não é utilizado. A sequência otimizada (*optimized*) apresentou, portanto, uma maior frequência para o códon GUG, permitindo que a célula utilize o RNA transportador (tRNA) mais disponível para a tradução do referido aminoácido, o que leva a uma maior eficiência de expressão. As barras indicam a discrepância entre os *codon usage* da sequência original e a alvo (azul – antes da otimização; verde – após a otimização). Além da Valina, todos os outros códons, codificando para os demais aminoácidos, também foram otimizados (Anexo B)

De um modo geral, o tamanho e a quantidade de estruturas secundárias do RNA mensageiro podem causar um efeito negativo na tradução deste último. A presença dessas estruturas podem interferir no processo traducional prejudicando tanto o deslizamento dos ribossomos, ao longo do mRNA, como também o acesso dos anti-códons dos tRNAs aos seus respectivos códons. O processo de otimização também pode contribuir para a redução do número e do comprimento destas estruturas *hairpin-like*, visando aumentar a eficiência da síntese proteica. Segue como exemplo, a otimização da sequência da proteína VP1 (Figura 11). As proteínas VP3 e 3C também tiveram uma significativa redução no número e tamanho das estruturas secundárias (dados não mostrados), enquanto a poliproteína apresentou uma discreta redução (Anexo B).

As sequências foram ainda avaliadas quanto à distribuição do conteúdo de GC, visando à obtenção de estruturas mais estáveis, e quanto à presença de sítios internos de restrição, para permitir as estratégias de subclonagem. Ao fim do processo de otimização, sítios internos de restrição remanescentes foram removidos manualmente e a sequência final obtida foi novamente analisada.

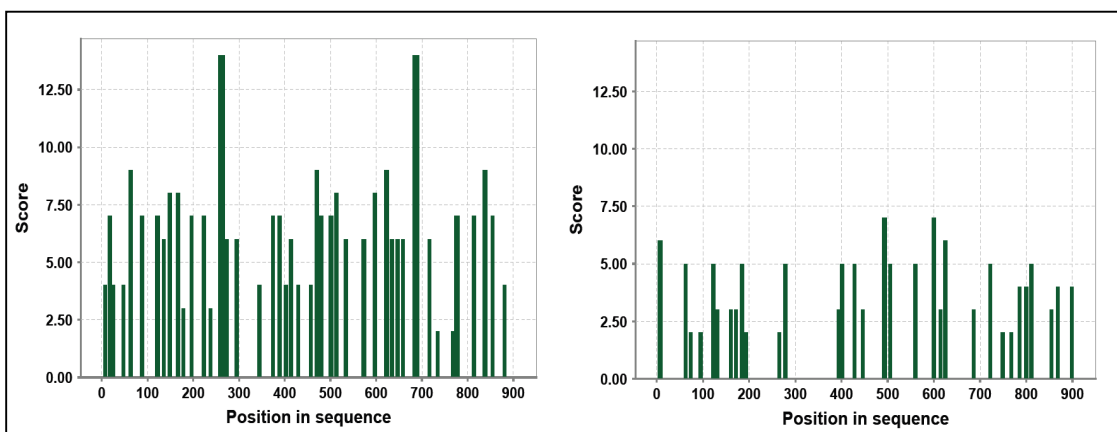


Figura 11 - Otimização da sequência codificante da proteína VP1 do HAV, em relação às estruturas secundárias de seu mRNA.

Fonte: Dados da pesquisa. Nota: O número de hélices presentes na sequência original foi reduzido de 22 para 16 na sequência otimizada. O comprimento médio das hélices foi ainda diminuído de 6.23 para 5.38 após a otimização. É possível observar a remoção de duas estruturas secundárias relativamente grandes (posições 250 e 680), bem como de outras estruturas menores na sequência otimizada.

5.2 Construção dos vetores de expressão pMal_c4X_VP1_{OPT}, pMal_c4X_VP3_{OPT} e pMal_c4X_3C_{OPT}.

5.2.1 Preparo dos genes otimizados e digestão dos vetores comerciais

Os genes otimizados foram enviados para a síntese (Geneart®) e recebidos já clonados, e sequenciados, em vetores comerciais. Estes vetores foram preparados em pequena escala e submetidos à provas de digestão. Além dos sítios a serem utilizados para a clonagem no vetor pMAL-c4X (*Xba I* e *Hind III*), sítios internos de restrição foram utilizados para confirmar a identidade dos fragmentos clonados. Todos os vetores digeridos liberaram os fragmentos de tamanhos esperados, confirmando a identidade de VP1, VP3 e 3C otimizados (Figura 12). Em seguida, os vetores comerciais foram digeridos com *Xba I/Hind III* em maior escala, migrados em gel de agarose 1% e os fragmentos liberados foram purificados visando à clonagem no vetor pMAL-c4X.

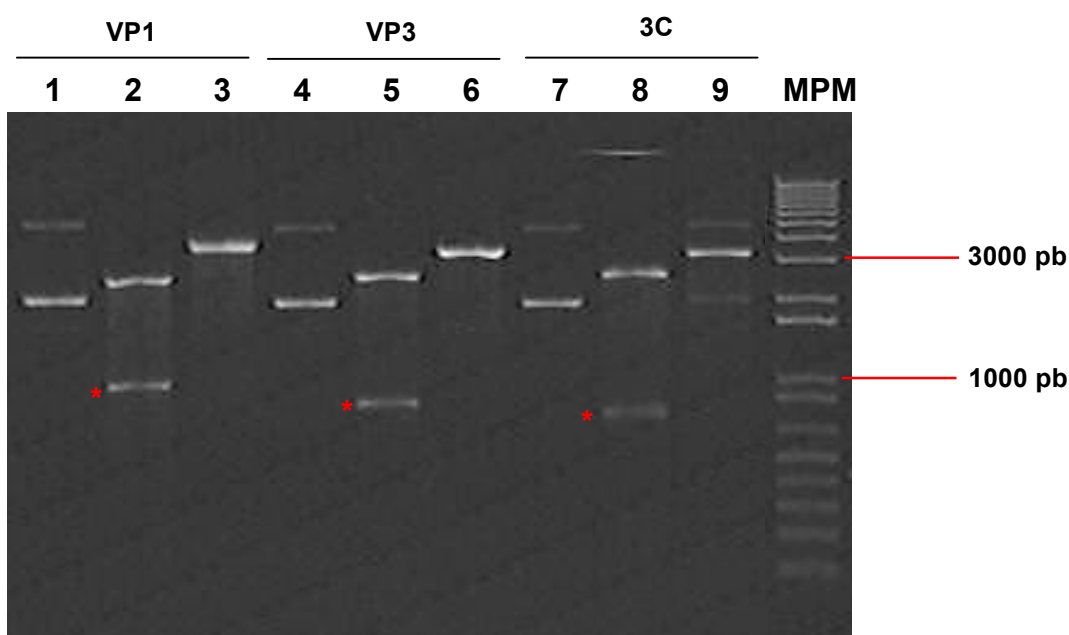


Figura 12 - Digestão dos vetores comerciais contendo os fragmentos otimizados de VP1, VP3 e 3C.

Fonte: Dados da pesquisa. Nota: Cada vetor foi digerido de duas formas diferentes: com as enzimas para clonagem no vetor pMAL-c4X (*Xba I* e *Hind III*) e com uma enzima apresentando especificidade para um sítio interno de restrição. 1 – Vetor não digerido, contendo VP1 (forma superhelicóide). 2 – Digestão com *XbaI/HindIII*, liberando o fragmento de VP1 com 906pb (asterisco vermelho). 3 – Vetor linearizado após digestão com sítio interno de restrição para *NdeI*. 4 – Vetor comercial não digerido, contendo VP3. 5 - Digestão com *XbaI/HindIII*, liberando o fragmento de VP3 com 750 pb (asterisco vermelho). 6 – Vetor linearizado após digestão com sítio interno de restrição para *NcoI*. 7 – Vetor comercial não digerido, contendo 3C. 8 - Digestão com *XbaI/HindIII*, liberando o gene de 3C com 663 pb (asterisco vermelho). 9 – Vetor linearizado após digestão com sítio interno de restrição para *SpeI*. MPM – Marcador de peso molecular 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen®).

5.2.2 Subclonagem das sequências de VP1, VP3 e 3C no vetor de expressão pMal_c4X.

Após a purificação, os fragmentos foram inseridos no vetor pMAL-c4X. As reações de ligação foram utilizadas para transformar bactérias competentes e clones isolados de cada placa foram escolhidos para a preparação de DNA plasmidial. As preparações de DNA foram submetidas à provas de digestão para a confirmação das subclonagens e da identidade dos fragmentos e em seguida foram migradas em gel de agarose 1% (Figura 13). A figura 14 mostra os mapas dos vetores de contendo as sequencias clonadas.

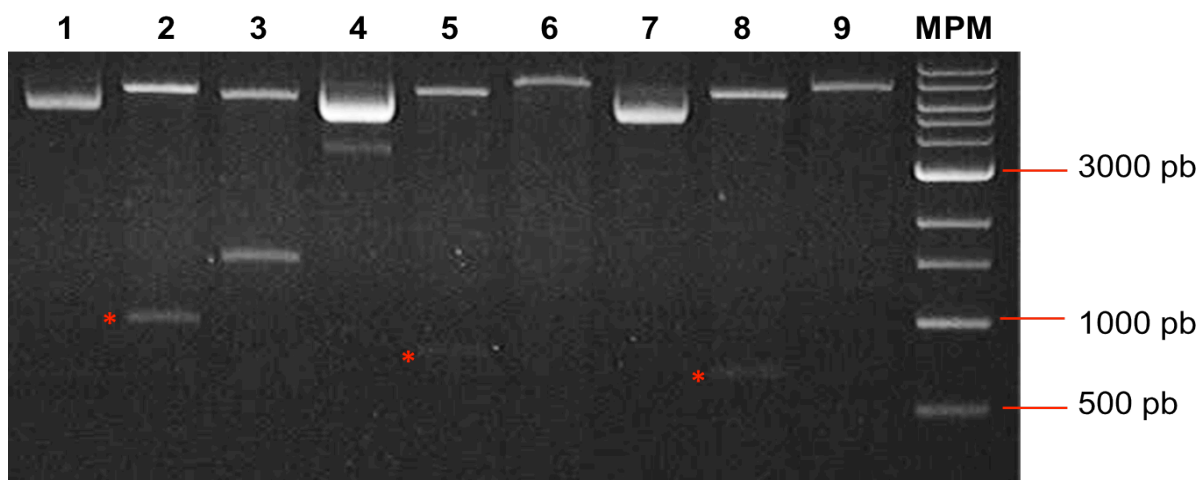


Figura 13 - Digestão das preparações contendo os fragmentos otimizados de VP1, VP3 e 3C clonados no vetor pMal_c4X.

Fonte: Dados da pesquisa. Nota: Para confirmar a clonagem dos fragmentos no vetor pMal_c4X, as amostras foram submetidas a provas de digestão com as enzimas utilizadas para a clonagem e enzimas com sítios internos de restrição. 1 – Construção pMal_c4X_VP1_{OPT} não digerido. 2 – Digestão com *Xba*I/*Hind*III, liberando o fragmento de VP1 com 906pb (asterisco vermelho). 3 – Digestão de pMal_c4X_VP1_{OPT} com *Nde*I. 4 – Construção pMal_c4X_VP3_{OPT} não digerida. 5 - Digestão com *Xba*I/*Hind*III, liberando o fragmento de VP3 com 750 pb (asterisco vermelho). 6 – Digestão de pMal_c4X_VP3_{OPT} com *Nco*I. 7 – Construção pMal_c4X_3C_{OPT} não digerida. 8 - Digestão com *Xba*I/*Hind*III, liberando o gene de 3C com 663 pb (asterisco vermelho). 9 – Digestão de pMal_c4X_3C_{OPT} com *Spe*I. 10 – Marcador de peso molecular 1Kb DNA Ladder (Invitrogen®).

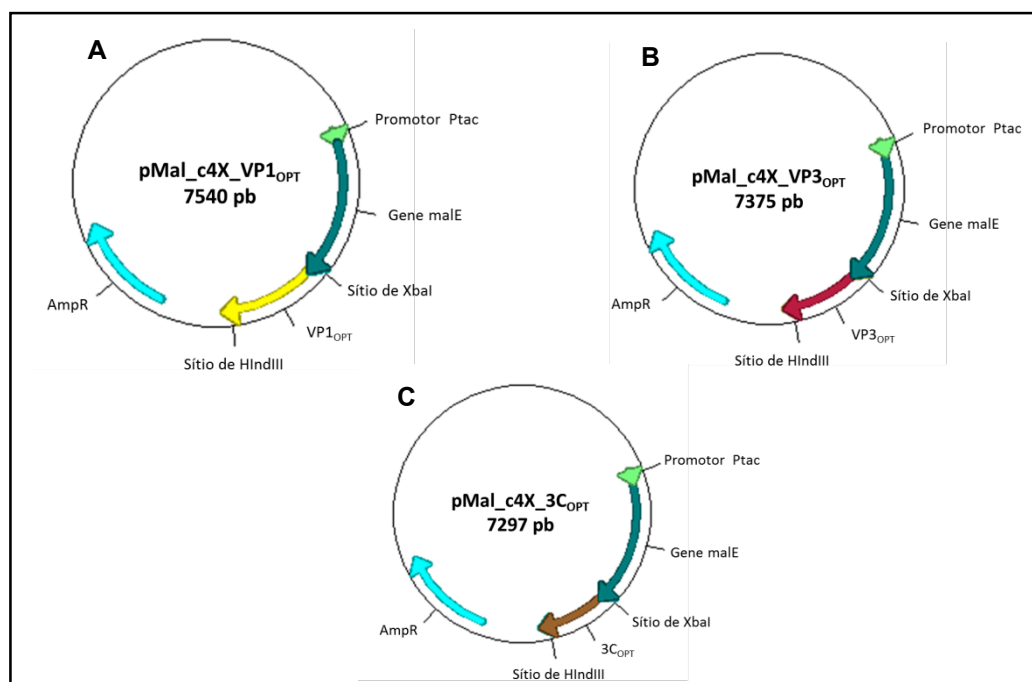


Figura 14 – Representação esquemática das construções contendo as seqüências de VP1, VP3 e 3C, otimizadas, para a expressão em bactéria.

Fonte: Dados da pesquisa. Nota: (A) Plasmídeo pMal_c4X_VP1_{OPT}. (B) Plasmídeo pMal_c4X_VP3_{OPT}. (C) Plasmídeo pMal_c4X_3C_{OPT}. AmpR: Marca de resistência ao antibiótico Ampicilina.

5.3 Expressão das proteínas recombinantes MBP-VP1_{OPT}, MBP-VP3_{OPT} e MBP-3C_{OPT}

As construções pMal_c4X_VP1_{OPT}, pMal_c4X_VP3_{OPT} e pMal_c4X_3C_{OPT} foram utilizadas para transformar bactérias competentes e estas foram inoculadas em 2 ml de meio líquido LB/AMP para a indução da expressão das proteínas de fusão em pequena escala com IPTG. Cada construção foi inoculada em duplicata, sendo que uma não foi induzida (T0) e outra induzida (T4). O vetor pMal_c4X vazio foi utilizado como controle positivo da expressão, uma vez que ele expressa apenas a proteína MBP. Após 4 horas, as alíquotas foram coletadas e centrifugadas. Os precipitados de bactéria foram ressuspensos em tampão desnaturante e os extratos foram fracionados em gel de poliacrilamida 12,5% e visualizados por coloração de Azul de Coomassie. Nas amostras induzidas foi possível observar as bandas correspondentes às proteínas recombinantes: MBP-VP1_{OPT} (76 kDa); MBP-VP3_{OPT} (71 kDa); MBP-3C_{OPT} (67 kDa); e MBP (50kDa) (Figura 15).

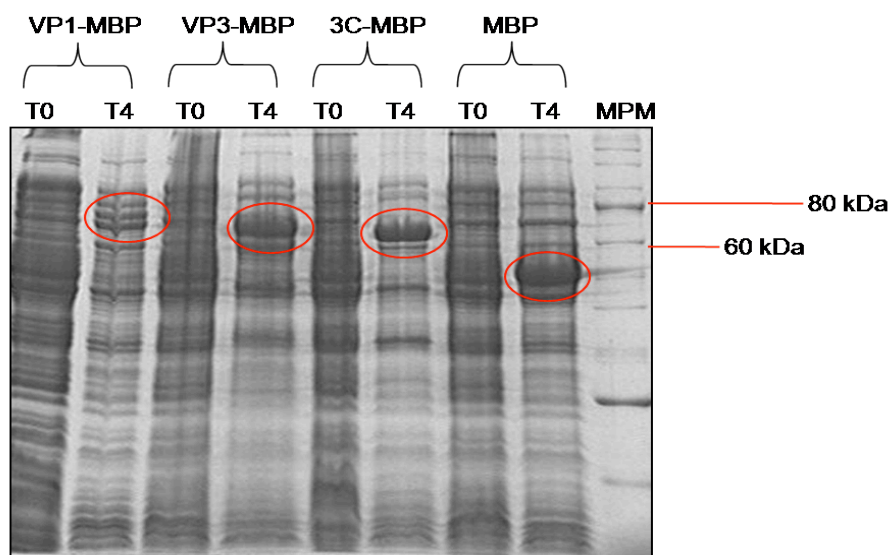


Figura 15 - Expressão em pequena escala das proteínas recombinantes de HAV em sistema bacteriano.

Fonte: Dados da pesquisa. Nota: T0: Amostra não induzida. T4: Amostra induzida (após 4 horas de indução). As bandas circulares correspondem as proteínas recombinantes: MBP-VP1_{OPT} (76 kDa); MBP-VP3_{OPT} (71 kDa); MBP-3C_{OPT} (67 kDa); e MBP (50 kDa). MPM: Marcador de peso molecular Protein Ladder (New England Biolabs®).

5.4 Expressão em larga escala e purificação das proteínas recombinantes MBP-VP1_{OPT}, MBP-VP3_{OPT}, MBP-3C_{OPT}.

Uma vez confirmada a expressão em pequena escala, as bactérias transformadas foram novamente inoculadas em meio de crescimento para indução em larga escala e purificação. Após a indução, as culturas foram ressuspendidas em tampão de coluna e sonicadas (para a liberação das proteínas citoplasmáticas), e o sobrenadante (contendo o extrato protéico total) foi aplicado em coluna de amilose. Após sucessivas lavagens com tampão de coluna, as proteínas recombinantes foram eluídas, em várias frações, com tampão de coluna acrescido de maltose livre. Foram coletadas amostras dos passos da purificação e todas foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 12,5% e visualizadas por coloração com Azul de Coomassie. Todas as proteínas foram expressas e purificadas com sucesso. A purificação da MBP foi utilizada como o controle positivo (Figuras 16-19).

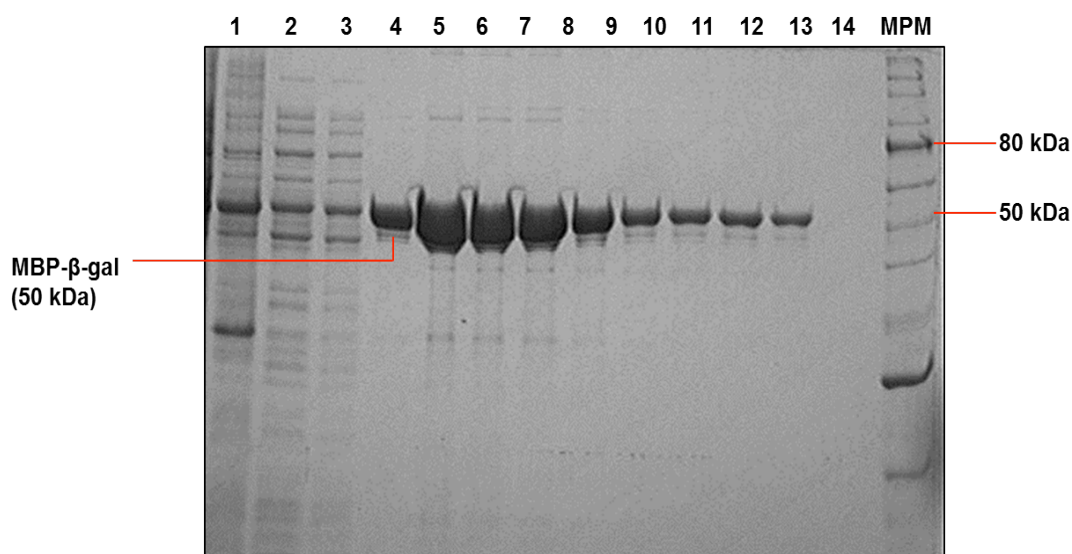


Figura 16 – Purificação da proteína MBP fusionada ao fragmento α da β -galactosidase.
Fonte: Dados da pesquisa. Nota: 1 – Fração contendo precipitado insolúvel após sonicção. 2 – Fração que não se ligou na coluna. 3 – Fração coletada após lavagem da coluna. 4 a 14 – Frações eluídas da coluna. A proteína MBP- β -gal possui cerca de 50 kDa de tamanho. MPM: Marcador de peso molecular Protein Ladder (New England Biolabs®)

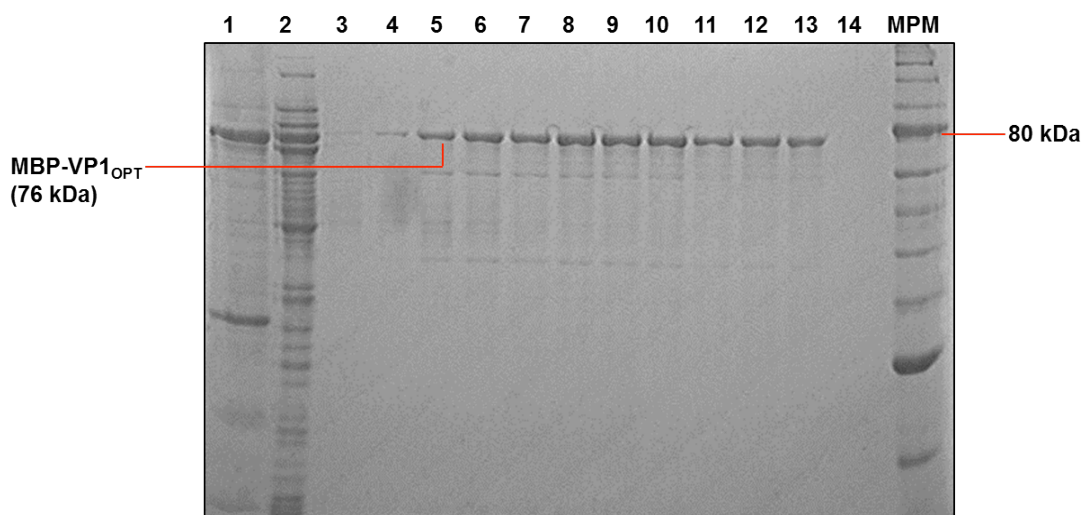


Figura 17 – Purificação da proteína de fusão MBP-VP1_{OPT}.

Fonte: Dados da pesquisa. Nota: 1 – Fração contendo precipitado insolúvel após sonicação. 2 – Fração que não se ligou na coluna. 3 – Fração coletada após lavagem da coluna. 4 a 14 – Frações eluídas da coluna. A proteína MBP-VP1_{OPT} (76 kDa) foi visualizada através de coloração com solução de Azul de Coomassie. A banda de 80 kDa é mostrada como referência. MPM: Marcador de peso molecular Protein Ladder (New England Biolabs®).

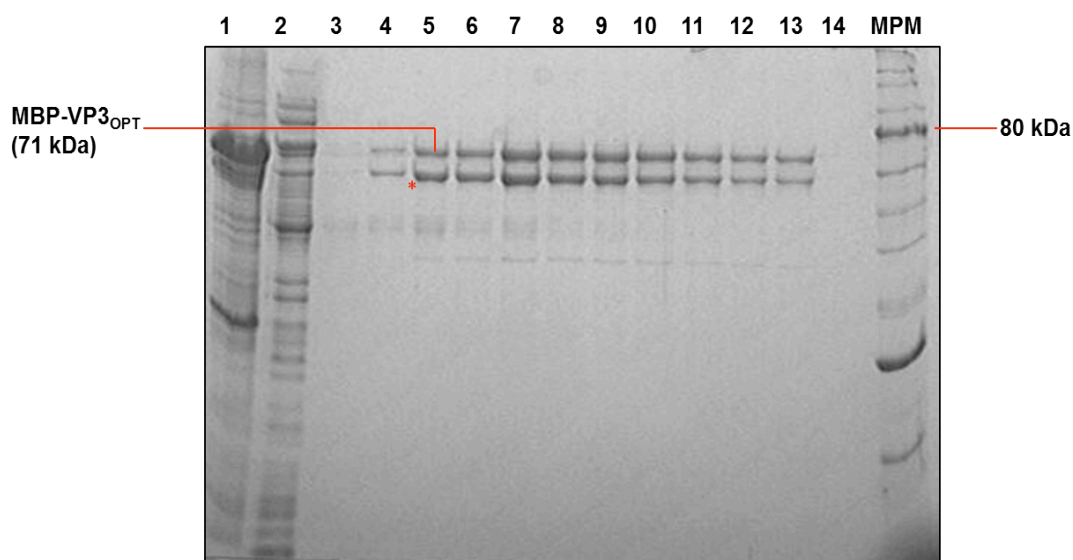


Figura 18 – Purificação da proteína de fusão MBP-VP3_{OPT}.

Fonte: Dados da pesquisa. Nota: 1 – Fração contendo precipitado insolúvel após sonicação. 2 – Fração que não se ligou na coluna. 3 – Fração coletada após lavagem da coluna. 4 a 14 – Frações eluídas da coluna. A proteína MBP-VP3_{OPT} (71 kDa) foi visualizada através da coloração com solução de Azul de Coomassie e aparece em duas bandas como provável resultado de degradação (asterisco vermelho). A banda de 80 kDa é mostrada como referência. MPM: Marcador de peso molecular Protein Ladder (New England Biolabs®).

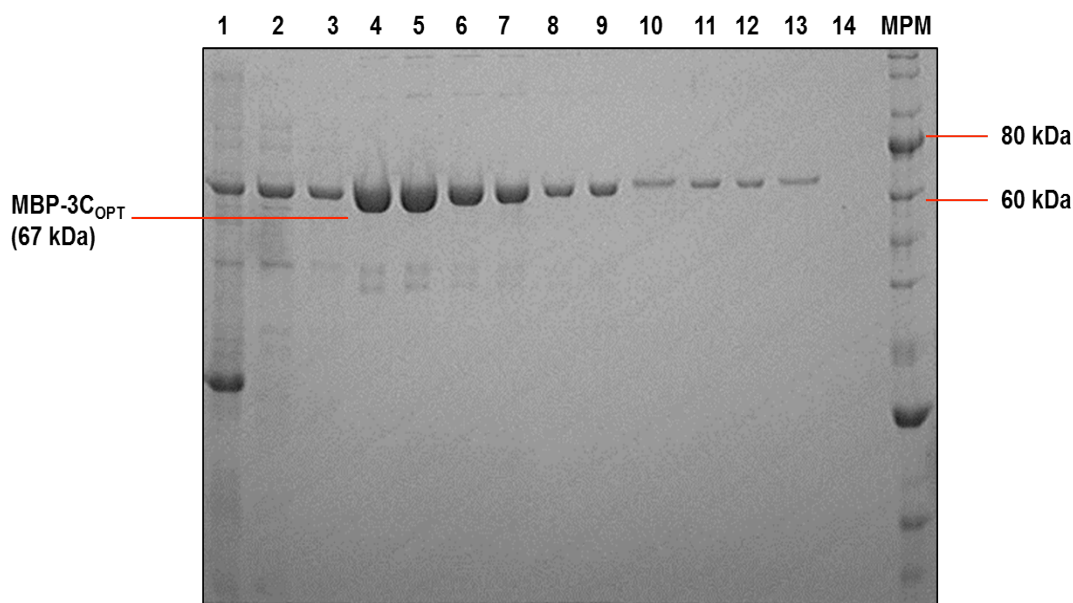


Figura 19 - Purificação da proteína de fusão MBP-3C_{OPT}.

Fonte: Dados da pesquisa. Nota: 1 – Fração contendo precipitado insolúvel após sonicação. 2 – Fração que não se ligou na coluna. 3 – Fração coletada após lavagem da coluna. 4 a 14 – Frações eluídas da coluna. A proteína MBP-3C_{OPT} (67 kDa) foi visualizada através da coloração com solução de Azul de Coomassie. As bandas de 60 e 80 kDa são mostradas como referência. MPM: Marcador de peso molecular Protein Ladder (New England Biolabs®).

5.5 Digestão das proteínas de fusão MBP-VP1_{OPT}, MBP-VP3_{OPT} e MBP-3C_{OPT} com a protease Fator Xa.

O vetor pMAL-c4X possui um sítio de clivagem específico para a protease Fator Xa, a qual cliva após o sítio múltiplo de clonagem e permite a separação de MBP da proteína de interesse. Apesar de todas as proteínas recombinantes terem sido submetidas a digestão com o Fator Xa, apenas MBP-3C foi eficientemente digerida, apresentando o padrão esperado após a digestão com esta protease, uma banda referente à MBP e outra referente à proteína 3C (Figura 20). As proteínas MBP-VP1 e MBP-VP3 tiveram uma baixa eficiência de clivagem, com pouca produção das proteínas individuais VP1 e VP3 (Figuras 21 e 23). Desta forma, decidimos seguir com os experimentos de quantificação de proteína e imunizações de coelhos com a proteína 3C isolada e as proteínas VP1 e VP3 fusionadas a MBP.

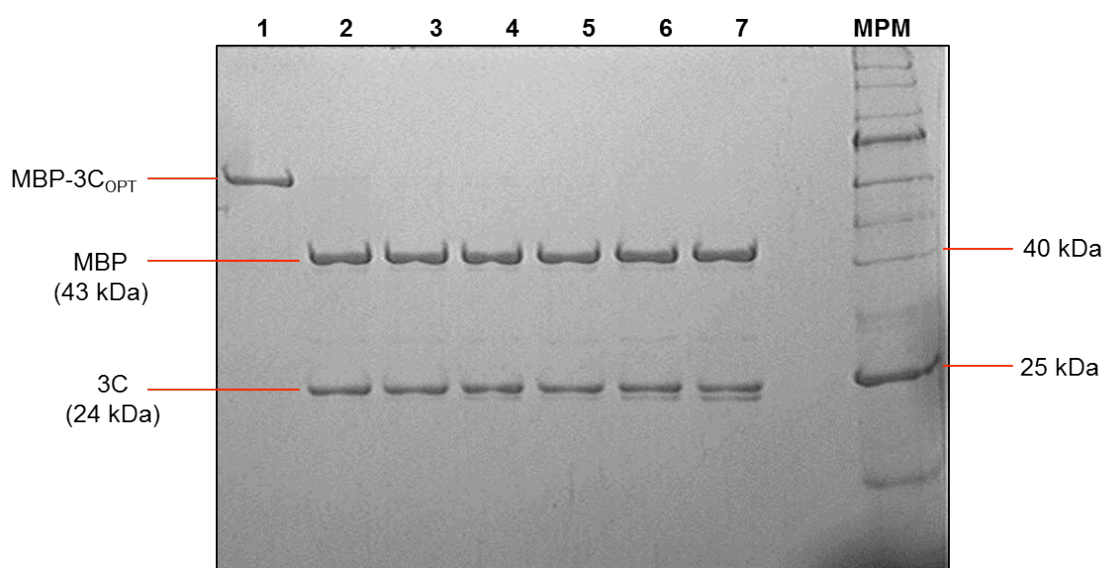


Figura 20 - Clivagem da proteína recombinante MBP-3C_{OPT} com a protease Fator Xa.

Fonte: Dados da pesquisa. Nota: A proteína recombinante MBP-3C_{OPT} foi incubada com a protease Fator Xa, para a remoção de MBP e obtenção do fragmento protéico específico contendo apenas 3C_{OPT} (24kDa). A reação de digestão foi fracionada em gel de poli-acrilamida 12,5% e as proteínas digeridas foram visualizadas por coloração de Azul de Coomassie. O marcador de peso molecular (MPM) utilizado foi o Protein Ladder (New England Biolabs®).

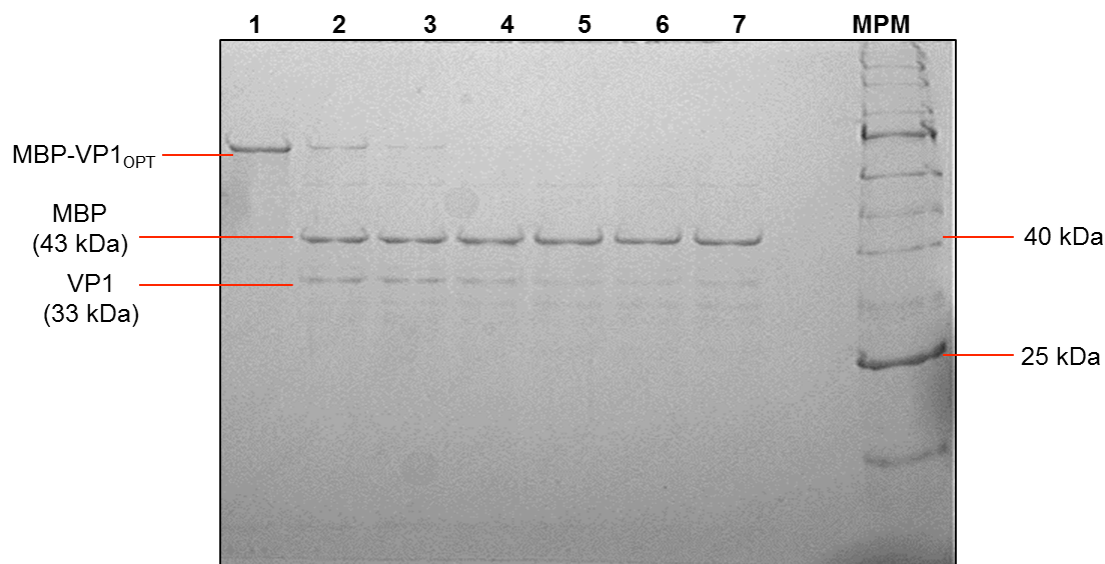


Figura 21 - Clivagem da proteína recombinante MBP-VP1_{OPT} com a protease Fator Xa.

Fonte: Dados da pesquisa. Nota: A proteína recombinante MBP-VP1_{OPT} foi incubada com a protease Fator Xa, para a remoção de MBP e obtenção do fragmento protéico específico contendo apenas VP1_{OPT} (33 kDa). A reação de digestão foi fracionada em gel de 12,5% poli-acrilamida e as proteínas digeridas foram visualizadas por coloração de Azul de Coomassie. O marcador de peso molecular (MPM) utilizado foi o Protein Ladder (New England Biolabs®).

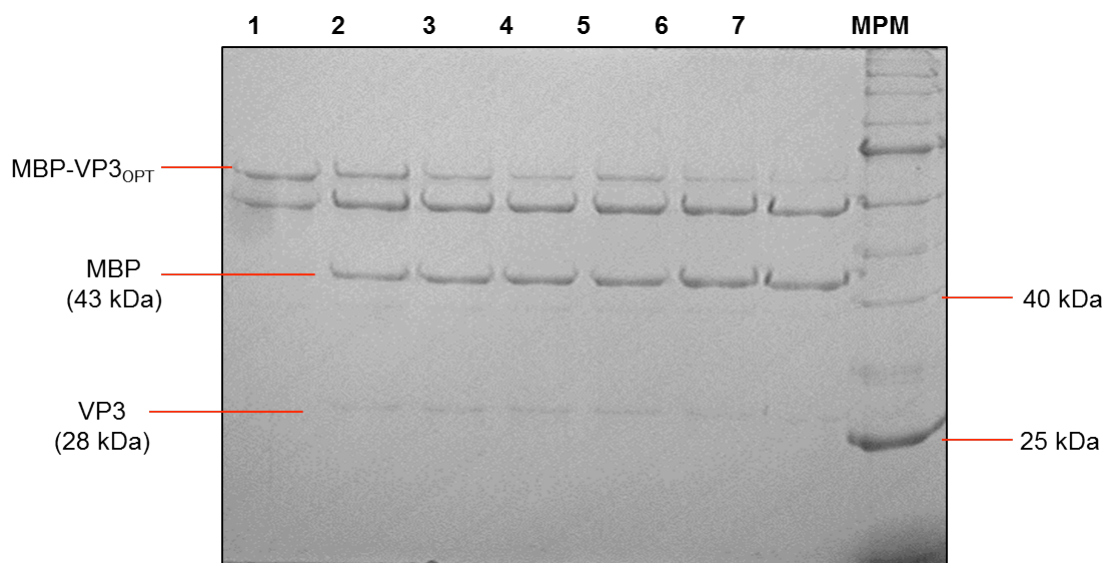


Figura 22 - Clivagem da proteína recombinante MBP-VP3_{OPT} com a protease Fator Xa.

Fonte: Dados da pesquisa. Nota: A proteína recombinante MBP-VP3_{OPT} foi incubada com a protease Fator Xa, para a remoção de MBP e obtenção do fragmento protéico específico contendo apenas VP3_{OPT} (28 kDa). A reação de digestão foi fracionada em gel de poliacrilamida 12,5% e as proteínas digeridas foram visualizadas por coloração de Azul de Coomassie. O marcador de peso molecular (MPM) utilizado foi o Protein Ladder (New England Biolabs®).

5.6 Imunização dos coelhos e imunoabsorção para a obtenção dos anticorpos contra as proteínas recombinantes.

As proteínas purificadas foram quantificadas e utilizadas para imunizar coelhos saudáveis num protocolo que segue quatro pulsos de imunização, com intervalos de 15 dias entre cada pulso. Como as proteínas VP1 e VP3 não foram separadas de forma eficiente da MBP, elas foram utilizadas fusionadas a esta última para a imunização. Foram utilizados cerca de 150 µg/pulso e após quatro pulsos, os coelhos foram sacrificados por punção cardíaca e os soros policlonais foram obtidos a partir do sangue total dos mesmos. Os anticorpos policlonais foram, então, imunoabsorvidos contra as proteínas recombinantes que os geraram e, em seguida, titulados através de ensaios *Western-Blot* (Figuras 23-25). Para aumentar a eficiência de purificação dos anticorpos dirigidos contra VP1 e VP3, ao mesmo tempo diminuindo a interferência de anticorpos anti-MBP, foi realizada primeiramente uma imunoabsorção contra a MBP isolada e em seguida contra as

proteínas do HAV. Os anticorpos gerados foram capazes de reconhecer suas respectivas proteínas, numa sensibilidade de aproximadamente 6ng de proteína recombinante para anti-VP1 (Figura 23); 1,5ng para anti-VP3 (Figura 24) e 25ng para anti-3C (Figura 25).

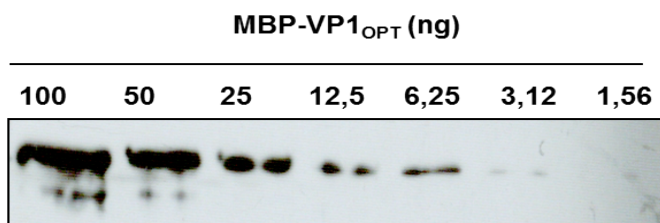


Figura 23 - Titulação do anticorpo anti-VP1_{OPT} para avaliar seu limite de detecção.

Fonte: Dados da pesquisa. Nota: A proteína recombinante MBP-VP1_{OPT} foi aplicada numa diluição seriada para uma quantidade final que variou de 100 a 1,56 ng. As amostras foram fracionadas por eletroforese em gel de poli-acrilamida 12,5% e transferidas para uma membrana de nitrocelulose para a revelação por *Western-blot*. O anticorpo anti-VP1_{OPT} foi capaz de detectar a proteína recombinante que o gerou até a diluição de 6,25ng.

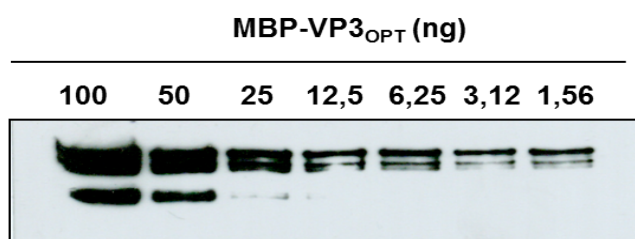


Figura 24 - Titulação do anticorpo anti-VP3_{OPT} para avaliar seu limite de detecção.

Fonte: Dados da pesquisa. Nota: A proteína recombinante MBP-VP3_{OPT} foi aplicada numa diluição seriada para uma quantidade final que variou de 100 a 1,56 ng. As amostras foram fracionadas por eletroforese em gel de poli-acrilamida 12,5% e transferidas para uma membrana de nitrocelulose para a revelação por *Western-blot*. O anticorpo anti-VP3_{OPT} foi capaz de detectar a proteína recombinante que o gerou até a diluição de 1,56ng.

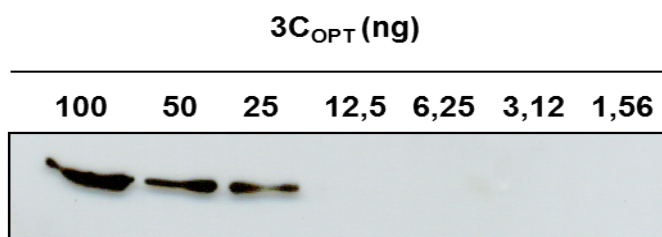


Figura 25 - Titulação do anticorpo anti-3C_{OPT} para avaliar seu limite de detecção.

Fonte: Dados da pesquisa. Nota: A proteína recombinante 3C_{OPT} foi aplicada numa diluição seriada para uma quantidade final que variou de 100 a 1,56 ng. As amostras foram fracionadas por eletroforese em gel de poli-acrilamida 12,5% e transferidas para uma membrana de nitrocelulose para a revelação por *Western-blot*. O anticorpo anti-3C_{OPT} foi capaz de detectar a proteína recombinante que o gerou até a diluição de 25ng.

5.7 Construção dos vetores de expressão, vetores vacinais, p43.2_HAV-PTRUNC_{OPT} e p43.2_hN-LAMP_HAV-PTRUNC_{OPT}.

5.7.1 Preparação do gene otimizado e digestão do vetor comercial.

A sequência de HAV-PTRUNC_{OPT} foi enviada para a síntese (Geneart®) e recebida, já clonada, em um vetor comercial. Este vetor foi preparado em pequena escala e submetido a provas de digestão. Para confirmar a identidade da sequência, foram utilizados os sítios para a clonagem no vetor p43.2 (fusionado e não-fusionado a LAMP) e um sítio interno de restrição. A digestão do plasmídeo liberou os fragmentos de tamanhos esperados, confirmando a identidade de HAV-PTRUNC otimizado (Figura 26). Em seguida, os vetores comerciais foram digeridos com os pares de enzimas *NheI/KpnI* e *XhoI/KpnI* em maior escala, migrados em gel 1% de agarose e os fragmentos liberados foram purificados para a clonagem no vetor p43.2

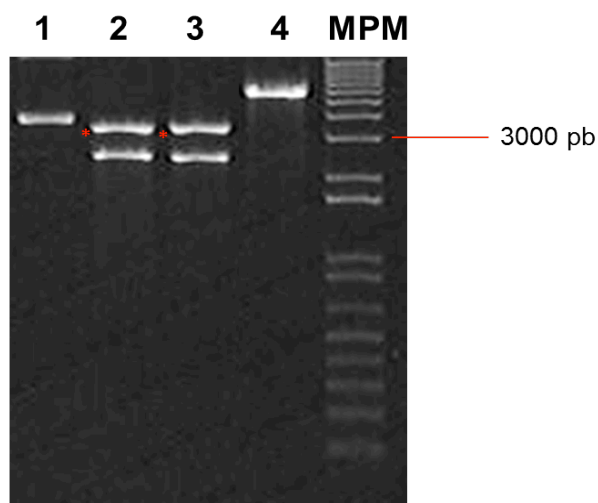


Figura 26 - Digestão do vetor comercial contendo o fragmento otimizado de HAV-PTRUNC.

Fonte: Dados da pesquisa. Nota: O vetor comercial foi digerido com as enzimas para a clonagem do fragmento no vetor p43.2 (*NheI/KpnI* e *XhoI/KpnI*) e com uma enzima apresentando especificidade para um sítio interno de restrição (*PstI*). 1 – Vetor comercial não digerido, contendo a sequência de HAV-PTRUNC. 2 – Digestão com *XhoI/KpnI*, liberando o fragmento de HAV-PTRUNC com 3252 pb (asterisco vermelho) 3 – Digestão com *NheI/KpnI* liberando o fragmento de HAV-PTRUNC com 3267 pb (asterisco vermelho). 4 – Vetor linearizado após digestão com sítio interno de restrição para *PstI*. MPM: Marcador de peso molecular 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen®).

5.7.2 Subclonagem da sequência de HAV-PTRUNC no vetor de expressão p43.2.

Após a purificação, o fragmento codificando para HAV-PTRUNC foi inserido no vetor p43.2 para a construção dos plasmídeos p43.2_HAV-PTRUNC_{OPT} e p43.2_hN-LAMP_HAV-PTRUNC_{OPT}. As reações de ligação foram utilizadas para transformar bactérias competentes e clones isolados de cada placa foram utilizados para a preparação de DNA plasmidial. As preparações de DNA foram submetidas à provas de digestão para a confirmação das subclonagens e da identidade dos fragmentos. As reações de digestão foram migradas em gel de agarose 1% (Figura 27 e 28). A figura 29 mostra os mapas dos vetores contendo as sequencias clonadas.

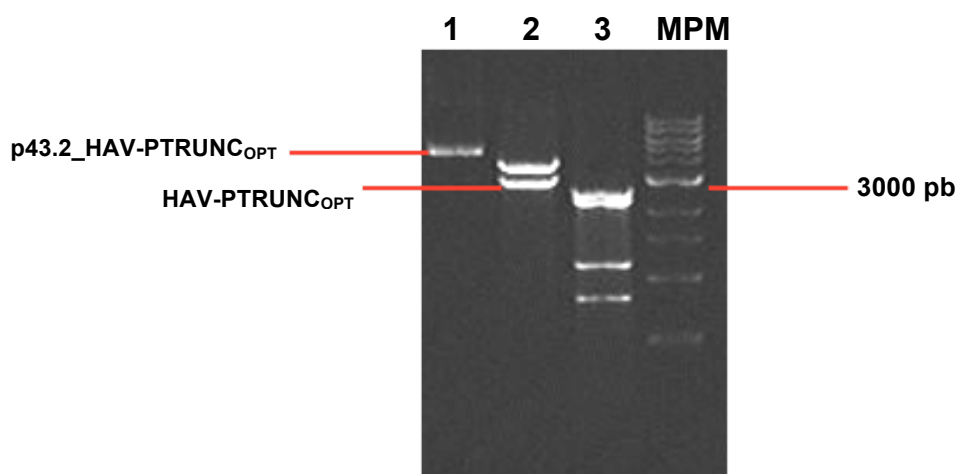


Figura 27 – Digestão para confirmação da clonagem de HAV-PTRUNC vetor p43.2.

Fonte: Dados da pesquisa. Nota: 1 – Vetor p43.2_HAV-PTRUNC_{OPT} não digerido (7759pb). 2 – Digestão com *NheI/KpnI* (fragmento de 3252 pb). 3 – Digestão com *PstI* para sítio interno de restrição. MPM: Marcador de peso molecular 1Kb DNA Ladder (Invitrogen®).

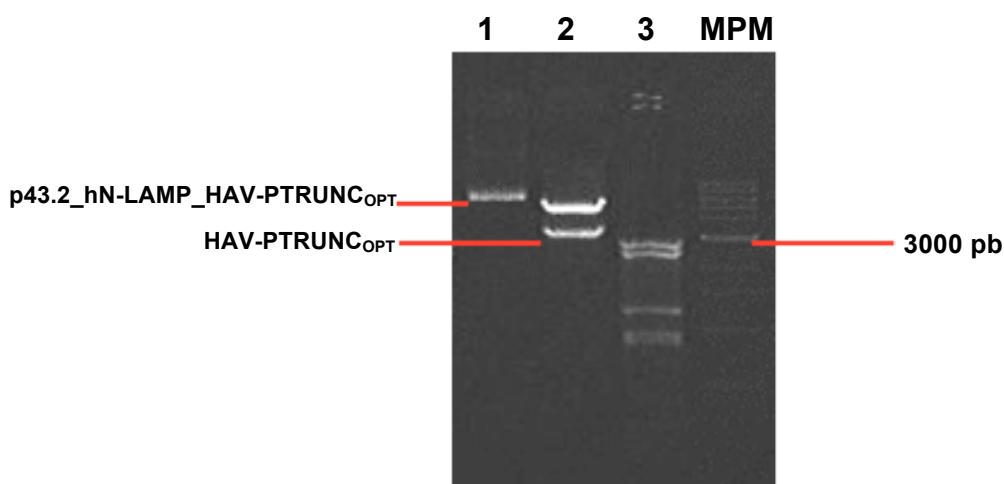


Figura 28 – Digestão para confirmação da clonagem de HAV-PTRUNC fusionado a região N terminal de LAMP no vetor p43.2.

Fonte: Dados da pesquisa. Nota: 1 – Vetor p43.2_hN-LAMP_HAV-PTRUNC_{OPT} não digerido (8890 pb). 2 – Digestão com *XhoI/KpnI* (fragmento de 3267 pb). 3 – Digestão com *PstI* para sítio interno de restrição. MPM: Marcador de peso molecular 1Kb DNA Ladder (Invitrogen®).

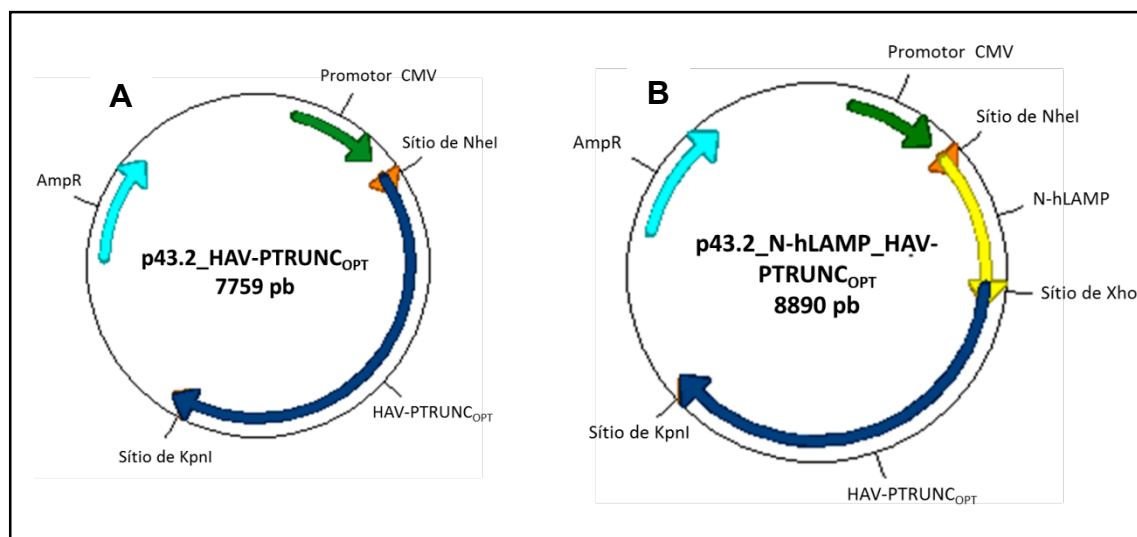


Figura 29 – Representação esquemática dos vetores vacinais.

Fonte: Dados da pesquisa. Nota: (A) Plasmídeo p43.2_HAV-PTRUNC_{OPT}. (B) Plasmídeo p43.2_hN-LAMP_HAV-PTRUNC_{OPT}. AmpR – Marca de resistência a ampicilina.

5.8 Transfecção de células BHK-21 com o plasmídeo p43.2_hN-LAMP_HAV-PTRUNC_{OPT} e análise da expressão, para a detecção da região N-terminal da proteína LAMP.

Após a confirmação das clonagens, o plasmídeo p43.2_hN-LAMP_HAV-PTRUNC_{OPT} foi utilizado para transfectar células BHK-21 com o objetivo de avaliar a

expressão da proteína LAMP e assim também, servir como um indicador da expressão da poliproteína truncada. A expressão de LAMP foi avaliada através de ensaio de imunofluorescência, e foi observada emissão de fluorescência nas células transfectadas com p43.2_hN-LAMP_HAV-PTRUNC_{OPT} (Figura 30).

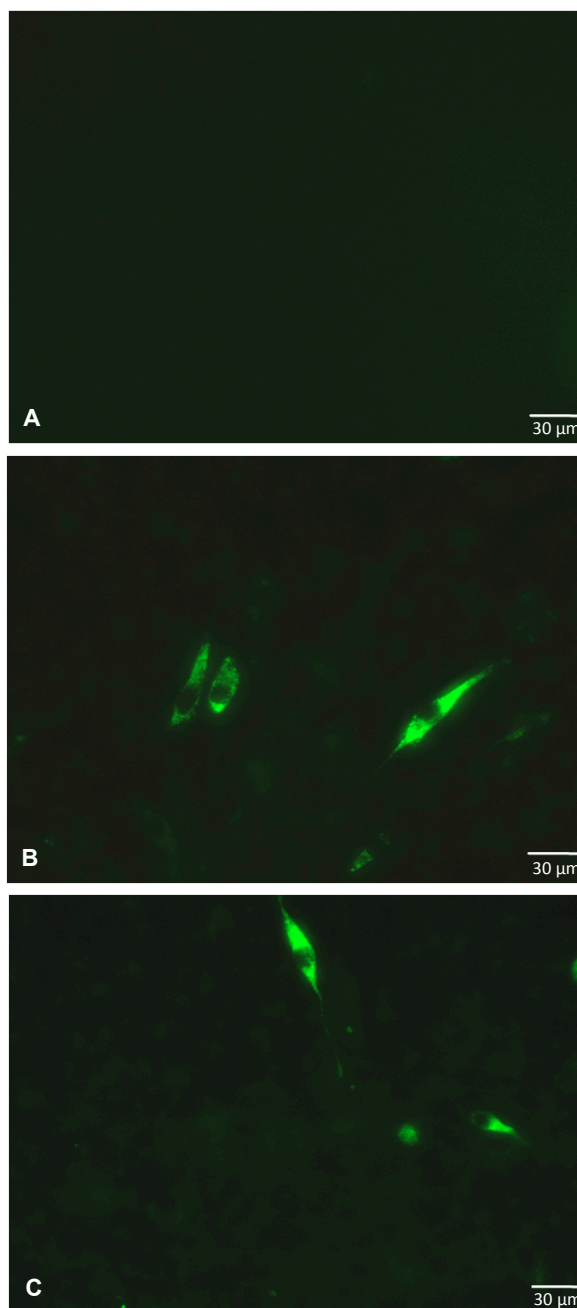


Figura 30 – Imunofluorescência de células BHK-21 transfectadas com a construção p43.2_hN-LAMP_HAV-PTRUNC_{OPT}, mostrando a expressão da região N-terminal de LAMP.

Fonte: Dados da pesquisa. Nota: (A) Célula transfectadas com o plasmídeo p43.2 “vazio”, usado como controle negativo. (B) Células transfectadas com a construção vacinal p43.2_hN-LAMP_HAV-PTRUNC_{OPT}, onde é possível observar a emissão de fluorescência, pela detecção de N-LAMP. (C) Células transfectadas com o plasmídeo p43.2_HIV_human_LAMP/Gag, usado como controle da expressão de LAMP.

5.9 Transfecção de células HEK-293 com as construções p43.2_HAV-PTRUNC_{OPT} e p43.2_hN-LAMP_HAV-PTRUNC_{OPT} e análise da expressão nas células transfectadas.

Após a detecção da expressão de LAMP, as duas construções foram utilizadas para transfectar células humanas HEK-293, visando a expressão transiente da poliproteína truncada e das proteínas individuais processadas. Para avaliar a eficiência de expressão, as células foram primeiramente transfectadas com o plasmídeo repórter pCMV- β -gal, contendo o gene da β -galactosidase. A eficiência de transfecção foi avaliada através de uma reação de coloração, sendo considerada relativamente baixa, com aproximadamente de 40% das células expressando β -gal (dados não mostrados). Apesar da baixa eficiência de expressão do gene repórter, decidimos preparar extratos celulares para avaliar a expressão das nossas construções através de ensaios de imunofluorescência e *Western-blot*.

5.9.1 Análise da expressão por Imunofluorescência

Para avaliar a expressão de HAV-PTRUNC_{OPT}, através de imunofluorescência, células 293 humanas foram transfectadas com as construções p43.2_HAV-PTRUNC_{OPT} e p43.2_hN-LAMP_HAV-PTRUNC_{OPT}. Apesar da baixa eficiência de transfecção, foi possível detectar a poliproteína truncada na construção p43.2_hN-LAMP_HAV-PTRUNC_{OPT}, utilizando os anticorpos produzidos em coelho. Todos os três anticorpos tiveram sucesso em detectar as proteínas VP1, VP3 e 3C, presentes em HAV-PTRUNC_{OPT} fusionado à região N-terminal de LAMP. Além disso, as células infectadas com o vírus também exibiram fluorescência marcante quando foram incubadas com os três anticorpos (Figura 31). Já nas células transfectadas com p43.2_HAV-PTRUNC_{OPT}, não foi observada fluorescência, independente do anticorpo utilizado.

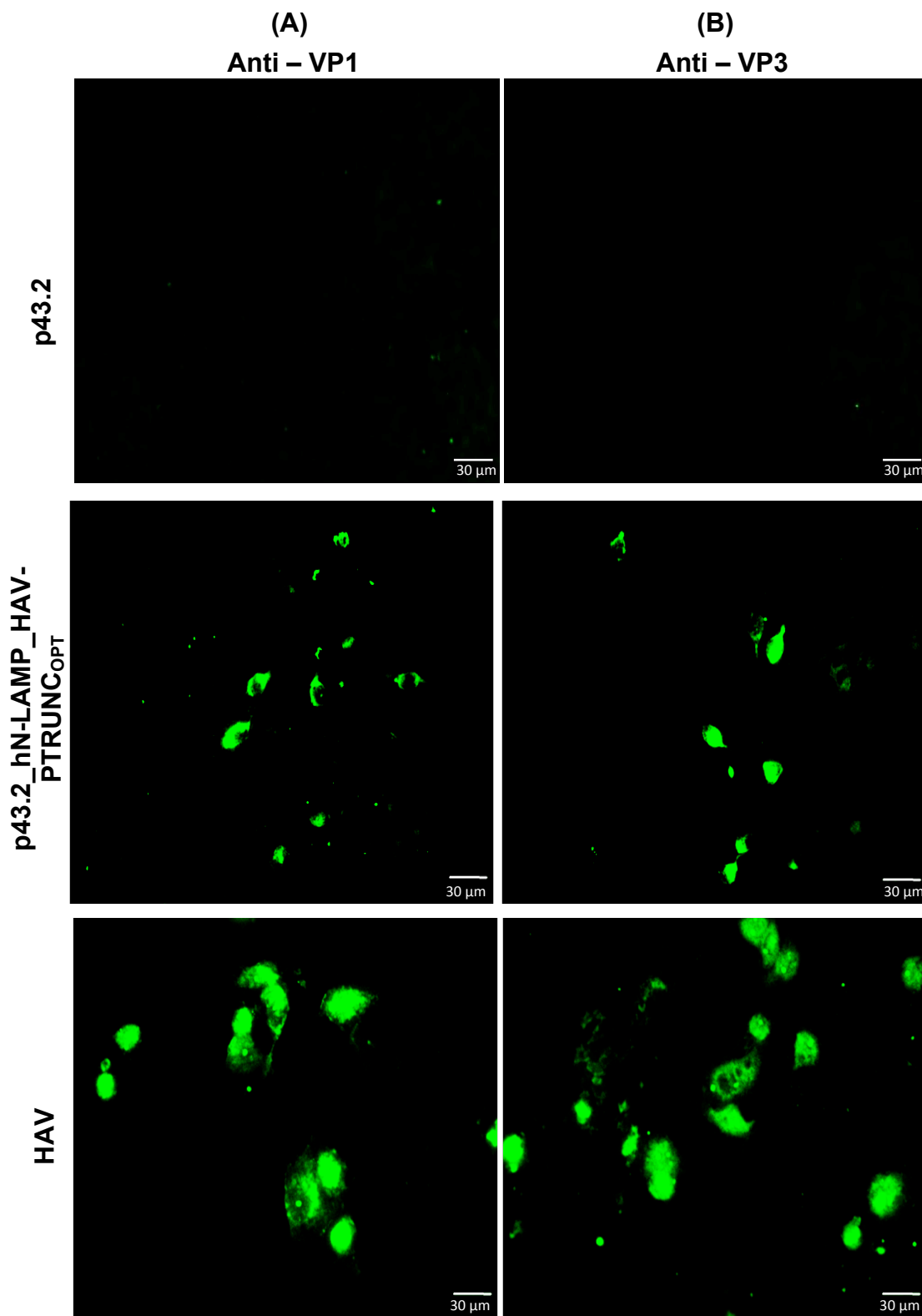


Figura 31 - Imunofluorescência de células HEK-293 transfetadas com a construção p43.2_hN-LAMP_HAV-PTRUNC_{OPT}, mostrando a expressão da poliproteína truncada.

Fonte: Dados das pesquisa. Nota: A análise deste ensaio mostrou que a poliproteína truncada foi detectada com sucesso, utilizando os anticorpos policlonais produzidos em coelho contra as proteínas estruturais VP1/VP3 e contra a protease 3C. Os anticorpos também detectaram eficientemente as proteínas nas células infectadas com o vírus. (A) Imunofluorescência utilizando o anticorpo anti-VP1. (B) Imunofluorescência utilizando o anticorpo anti-VP3. (C) Imunofluorescência utilizando o anticorpo anti-3C.

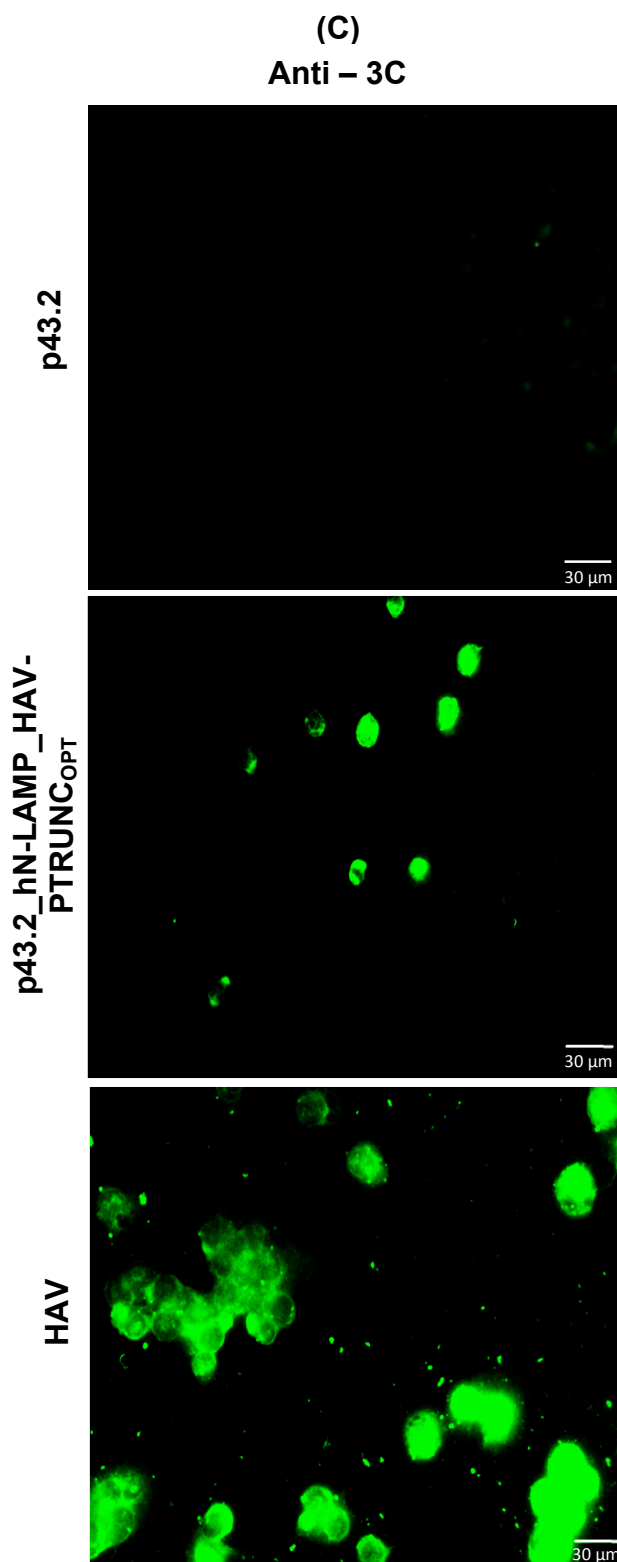


Figura 31 - Imunofluorescência de células HEK-293 transfectadas com a construção p43.2_hN-LAMP_HAV-PTRUNC_{OPT}, mostrando a expressão da poliproteína truncada.

Fonte: Dados das pesquisa. Nota: A análise deste ensaio mostrou que a poliproteína truncada foi detectada com sucesso, utilizando os anticorpos policlonais produzidos em coelho contra as proteínas estruturais VP1/VP3 e a contra a protease 3C. Os anticorpos também detectaram eficientemente as proteínas nas células infectadas com o vírus. (A) Imunofluorescência utilizando o anticorpo anti-VP1. (B) Imunofluorescência utilizando o anticorpo anti-VP3. (C) Imunofluorescência utilizando o anticorpo anti-3C.

5.9.2 Detecção das proteínas por *Western-blot*

Para avaliar se as construções p43.2_HAV-PTRUNC_{OPT} e p43.2_hN-LAMP_HAV-PTRUNC_{OPT} eram capazes de expressar níveis detectáveis da poliproteína, ou das proteínas individuais processadas, por *Western-blot*, extratos de células humanas 293 foram preparados 48 horas após a transfecção. Estes extratos foram fracionados em gel SDS-PAGE e transferidos para membrana de nitrocelulose. Para a detecção da poliproteína, foram utilizados os três anticorpos policlonais produzidos em coelho. Como controle negativo foram utilizadas células transfectadas com o vetor p43.2 “vazio”. Já o controle positivo consistiu de um extrato de células FRhK-4 infectadas com o vírus da Hepatite A. Provavelmente devido a baixa eficiência de transfecção, não foi possível detectar a expressão das construções vacinais nos extratos celulares, apenas o extrato celular infectado pelo vírus foi detectado (dados não mostrado).

6 DISCUSSÃO

No final do ano de 2007 foi realizado o primeiro encontro global para tratar da infecção pelo vírus da Hepatite A como uma doença prevenível por vacinação. O evento foi organizado por diversos órgãos internacionais de saúde como o Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC), Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS) e Organização Mundial de Saúde (OMS). Este encontro reuniu pesquisadores e profissionais de saúde de vários países, que discutiram principalmente sobre a mudança, em nível mundial, na epidemiologia da doença e também sobre as estratégias de vacinação necessárias para prevenir a infecção a partir do seu atual quadro epidemiológico. Um dos resultados deste encontro foi a produção de um conjunto de artigos que ilustra a situação de alguns países em relação a esses dois aspectos cruciais (HENDRICKX et al., 2008).

Pode-se destacar, como exemplo, os casos de Israel e da Argentina após a implantarem seus respectivos programas de vacinação contra a Hepatite A. A melhoria nas condições sócio econômicas em Israel no final do século passado levou a uma baixa exposição ao vírus em infantes, e como consequência uma reduzida prevalência de anticorpos em crianças e adolescentes. Como resultado, a faixa de maior incidência da doença na população judaica passou de 1 a 4 anos para 5 a 9 anos, sendo que nesta última faixa a razão casos clínicos/assintomáticos é consideravelmente maior. Desta forma, houve um aumento no número de casos de Hepatite A aguda naquele país (DAGAN et al., 2005). Em 1999, Israel torna-se o primeiro país a introduzir a vacina inativada contra a Hepatite A no seu programa nacional de vacinação. Cinco anos depois, a incidência média caiu de 50,4 para 2,3 casos/100.000 habitantes e o número de surtos em creches e escolas caiu de 10 para 2 por ano (CHODICK et al., 2008; DAGAN et al., 2005). No seu período pré-vacinação, a Argentina possuía as seguintes características em relação à infecção pelo HAV: moderada endemicidade (grande proporção de adultos jovens susceptíveis); alta incidência da doença (172 casos/100.000 habitantes em 2004) em virtude de grandes surtos; e alta mortalidade por Hepatite Fulminante causada pelo HAV (cerca de 30%). Após a introdução da vacina em 2005, houve uma redução de aproximadamente 83% na incidência, sem o aparecimento de surtos, e

diminuição de 80% no número de casos com necessidade de hospitalização (GENTILE, 2008; VACCHINO, 2008). A situação desses dois países mostra o grande impacto causado pela adoção da imunização como medida de controle da infecção pelo HAV.

Neste mesmo encontro, o contexto da Hepatite A no Brasil é retratado por Vitral, Souto e Gaspar (2008), no qual é reportada uma diminuição na soroprevalência da infecção (menos indivíduos apresentam anticorpos anti-HAV) aliada a um aumento no número de surtos e epidemias. Isso mostra que o país passa por uma fase de transição epidemiológica (alta para moderada endemicidade) e que crianças e adultos jovens estão menos protegidos da infecção. Os autores reforçam a necessidade de medidas preventivas para o controle da infecção, que incluem um programa de vacinação universal e melhores condições sanitárias nas regiões mais pobres do país.

Até o momento, a vacina contra Hepatite A não faz parte do Programa Nacional de Imunizações (PNI) e, portanto não está incluída no calendário básico de vacinação infantil, principalmente devido ao seu alto custo (VITRAL; GASPAR; SOUTRO, 2006). A vacina disponível no Brasil é oferecida pelo Centro de Referências em Imunobiológicos Especiais (CRIE) para pessoas com risco de adquirir Hepatite A aguda grave, especialmente aquelas portadoras de hepatopatias crônicas (BRASIL, 2005).

Diante da necessidade da vacinação contra Hepatite A no Brasil e da presença de alguns inconvenientes relacionados à vacina atual, de vírus inativado, este trabalho teve como proposta a construção e avaliação da expressão de um protótipo vacinal visando o desenvolvimento futuro de uma vacina de DNA capaz de combater a infecção pelo HAV e que possa servir como alternativa para a vacina de uso corrente, complementando sua ação ou mesmo substituindo-a. Além disso, este estudo também envolveu a produção de proteínas recombinantes e anticorpos contra proteínas virais, fundamentais na avaliação da expressão do protótipo vacinal e que também vem sendo utilizados no desenvolvimento de um kit de diagnóstico para a infecção por HAV (trabalho em colaboração Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ).

A estratégia utilizada neste trabalho para a construção da sequência de HAV-PTRUNC teve como base o desenvolvimento de vacinas de DNA para outros vírus da família *Picornaviridae*, em virtude da semelhança na organização do genoma e

no mecanismo de processamento da poliproteína viral. Um dos principais vírus utilizados como modelo foi o FMDV, causador da febre aftosa, a qual promove elevada morbidade em vários animais de criação (GRUBMAN; BAXTI, 2004). Em um estudo publicado por Cedillo-Barrón e outros (2001), foi descrita a construção de uma vacina de DNA contra o FMDV contendo a sequência do precursor das proteínas estruturais (P1-2A), e as sequências da protease 3C e da polimerase 3D. Da maneira análoga ao objetivo do nosso trabalho, a intenção desta construção de FMDV foi permitir a formação do capsídeo viral, a partir do processamento realizado pela protease 3C. A RNA polimerase 3D foi também inserida pois, neste vírus, esta proteína tem a capacidade estimular células T CD4+ e aumentar a eficiência da resposta imune celular, a qual tem importante papel no combate a esta infecção. A expressão em células foi confirmada através de imunofluorescência, utilizando um anticorpo monoclonal contra a proteína VP1 e também por meio de Western-blot, no qual foi utilizado um soro hiperimune de cobaias. Animais imunizados desenvolveram anticorpos neutralizantes, no entanto, os estudos de desafio mostraram uma proteção parcial contra o vírus.

Yao e outros (2008) compararam a expressão e a resposta imune gerada por duas vacinas genéticas contra o FMDV. Uma delas foi construída semelhante à HAV-PTRUNC, com a sequência das proteínas estruturais e protease 3C (P1_2A_3C), enquanto a outra foi construída a partir de uma região altamente imunogênica, que codifica múltiplos epítomos das proteínas do capsídeo. O precursor P1_2A teve sua expressão e processamento observados nas células transfectadas e os animais, imunizados com P1_2A_3C, apresentaram níveis de anticorpos mais altos do que aqueles que receberam a vacina constituída de epítomos. Além disso, os animais foram inteiramente protegidos quando a primeira vacina foi administrada, usando um vetor viral, enquanto aquela última ofereceu apenas proteção parcial. Esses resultados indicam a importância das estruturas antigênicas conformacionais presentes nas VLPs, provavelmente geradas a partir da construção P1_2A_3C, para a indução da resposta imune protetora. Além disso, estes resultados corroboram que o sítio imunodominante dos picornavírus, dentre eles o vírus da Hepatite A, é formada a partir da sobreposição das proteínas estruturais VP1, VP3 e VP0.

O vírus da encefalomiocardite (EMCV) também representa outro patógeno de grande importância veterinária, por infectar animais de importância econômica de

diversas espécies. Os suínos formam o grupo mais afetado pela doença, pois desenvolvem miocardite severa e podem ser acometidos por morte súbita (BILLINIS et al,1999). O trabalho realizado por Chen e outros (2008), relata a avaliação de duas vacinas de DNA contra o EMCV, sendo uma formada apenas pela sequência do precursor P1 e a outra pelo cassete P1_2A_3C, com as duas utilizando um adenovírus defectivo como vetor viral. Ambas foram capazes de expressar VP1 em células BHK-21, através de ensaios de marcação com imuno-peroxidase. Nos ensaios de *Western-blot*, a partir de células 293 transfectadas com as construções, foi observada a banda correspondente a VP1 apenas na vacina contendo a protease 3C, demonstrando que esta proteína é essencial para o processamento de P1 e formação das proteínas individuais do capsídeo. Camundongos imunizados com a P1_2A_3C exibiram maiores títulos de anticorpos neutralizantes e tiveram 100% de proteção frente ao desafio viral, enquanto aqueles vacinados com P1 apresentaram cerca de 70% de proteção.

Seguindo esta mesma linha de pesquisa com EMCV, Jeoung e outros (2010) não apenas avaliaram a expressão da sequência vacinal P1_2A_3C (neste caso inserida em outro vetor de expressão), como também investigaram se essa construção era capaz de formar as VLPs, provavelmente envolvidas na indução da resposta imune. A partir do sobrenadante das células transfectadas com o plasmídeo vacinal, foram observados, por meio de microscopia eletrônica de transmissão, estruturas com o formato esférico e tamanho de aproximadamente 30 nm de diâmetro, correspondendo às partículas do capsídeo viral.

Apesar da vacina de DNA contra o HAV proposta neste estudo ter sido baseada nos exemplos de FMDV e EMCV, em virtude dos resultados promissores com as vacinas usadas contra esses dois agentes, outros picornavírus de importância médica também vêm sendo alvo para construção de vacinas que utilizam a tecnologia de DNA recombinante. Um deles é o Coxsackievírus B3 (CVB3), que induz miocardite aguda/crônica em crianças e jovens, e não existe vacina disponível contra a infecção. Kim e outros (2005), imunizaram camundongos com plasmídeos recombinantes que codificavam isoladamente as proteínas VP1 e VP3 do capsídeo. Os animais não produziram anticorpos neutralizantes, porém houve uma significativa melhora nos sinais clínicos e alguns tiveram um considerável aumento na sobrevida, em relação ao grupo controle.

Outro importante vírus ligado a saúde pública, e pertencente a mesma família do HAV, é o Enterovírus 71 (EV71). Este vírus vem sendo implicado como causa de surtos de meningite asséptica, em crianças. Recentemente, Chung e outros (2008) relataram a produção de VLPs de EV71, produzidas em células de inseto, infectadas com baculovírus expressando as sequências P1 e 3C_3D. As VLPs induziram imunidade robusta e duradoura nos animais imunizados. Apesar de não serem utilizadas diretamente como vacina, as sequências de P1 e 3C_3D foram capazes de produzir as proteínas, que se organizaram para formar o capsídeo, sendo este também o objetivo da nossa construção vacinal contendo HAV-PTRUNC.

Descrevemos neste trabalho, a construção e a análise da expressão em células de origem humana, de um cassete de expressão contendo apenas as sequências das proteínas formadoras do capsídeo (P1_2A) e da protease (3C) do vírus da Hepatite A. Até o momento não há registro na literatura relatando um modelo para expressão, processamento e maturação das proteínas antigênicas do HAV, de forma semelhante em termos estruturais e funcionais como foi aqui proposto. Outros estudos demonstraram a produção de partículas subvirais, como pentâmeros e VLPs, em bactérias (SÁNCHEZ et al., 2003) e em células de inseto (ROSEN; STAPLETON; MCLINDEN, 1993). Contudo, esses trabalhos utilizaram plasmídeos codificando ou a sequência inteira da poliproteína viral (apenas sem as NTRs), ou sem a região P2. Na elaboração da nossa sequência vacinal, com a exceção de 3C, não inserimos qualquer outra sequência das proteínas não-estruturais, pelas seguintes razões: evitar qualquer possibilidade de replicação viral e formação de partícula infecciosa, e construir uma sequência com o menor tamanho possível, facilitando as estratégias de clonagem e a expressão, mas potencialmente capaz de formar as estruturas antigênicas do HAV.

Neste trabalho foi ainda realizada a otimização da sequência de HAV-PTRUNC, visando uma melhor expressão nas células transfectadas com os protótipos vacinais. Até o momento, ainda não foi descrito na literatura a otimização de sequências do HAV, porém acreditamos que essa seja uma estratégia fundamental para se obter um bom nível de expressão, desta construção vacinal, em virtude das características de biológicas do HAV. Como foi descrito anteriormente, o HAV possui diferenças marcantes quando comparado aos outros vírus de sua família, principalmente no que se refere ao ciclo de replicação e mais precisamente ao processo de tradução. A presença de um IRES com uma baixa eficiência em

dirigir a tradução e ausência de proteínas que promovam a inibição da síntese proteica celular, estão entre as principais diferenças. Além destas, existe uma que foi o principal alvo para a otimização: o *codon usage*. O HAV utiliza vários códons raros em relação aos utilizados pelas células humanas, sendo seu conjunto de códons considerado como complementar ao desta última, ou seja, nunca adotando como abundantes códons aqueles também abundantes na célula hospedeira. Essa disparidade é interpretada como uma estratégia para evitar, o máximo possível, a competição pelos tRNAs na ausência de um mecanismo preciso de inibição da síntese proteica da célula (SÁNCHEZ; BOSCH; PINTÓ, 2003b). Juntos, todos esses aspectos contribuem para uma baixa taxa de replicação e produção de partículas virais. Grupos altamente conservados de códons raros estão presentes especialmente na região do capsídeo, o que pode explicar a baixa variabilidade antigênica do HAV, uma vez que só existe um sorotipo conhecido (PINTÓ et al, 2010). Considerado que a maior parte de HAV-PTTRUNC é formada pelas proteínas do capsídeo, podemos dizer que a otimização da nossa sequência foi de extrema importância para a obtenção da expressão das proteínas do HAV, nas condições realizadas.

A otimização e expressão das proteínas individuais VP1, VP3 e 3C, e a obtenção de anticorpos policlonais específicos contra as mesmas, também podem ser consideradas etapas de grande importância neste trabalho, pois os antígenos e anticorpos produzidos foram fundamentais no processo de avaliação da eficiência de expressão do protótipo vacinal. As sequências das três proteínas também foram otimizadas utilizando o algoritmo genético do programa Leto 1.0 (Entelechon®), onde foi observada uma grande diferença entre as sequências virais e bacterianas, em relação aos diversos parâmetros biológicos analisados. Após a otimização, pode-se notar, principalmente, uma significativa redução na diferença entre os *codon usages*, e uma diminuição no número de estruturas secundárias do mRNA, além de outros parâmetros (Anexo B). Acreditamos que esse processo refletiu de forma positiva nos níveis de expressão das proteínas recombinantes, uma vez que foi conseguido um rendimento médio de 50 mg/litro de cultura. Baptista e outros (2006) também utilizaram um sistema bacteriano para expressar a proteína VP1 de HAV, porém não-otimizada, e obtiveram um rendimento de significativamente menor de 2mg/litro de cultura. Da mesma forma que em nosso estudo, a proteína

recombinante foi utilizada para imunizar coelhos e o soro policlonal foi capaz de reconhecer os antígenos virais, produzidos em cultura de célula.

A sequência de HAV-PTRUNC_{OPT} foi clonada com sucesso no vetor de expressão eucariótico p43.2, fusionado e não-fusionado a região N-terminal de LAMP, como demonstrado pelas provas de digestão. Células BHK-21 transfectadas com a construção p43.2_N-hLAMP_HAV-PTRUNC exibiram fluorescência, após serem incubadas com anticorpo anti-LAMP. A expressão da região N-terminal de LAMP foi de suma importância na avaliação inicial desta construção, pois indicou o provável direcionamento da síntese das proteínas virais para o retículo endoplasmático, para a posterior secreção. Um dos principais objetivos nos estudos com vacinas de DNA envolvendo LAMP é a construção de plasmídeos vacinais expressando a região carbóxi-terminal desta proteína, para que os antígenos sejam direcionados aos compartimentos envolvidos na apresentação via MHC II (ARRUDA et al., 2006; MARQUES et al., 2003). É importante destacar que em nosso trabalho foi utilizada apenas a região N-terminal de LAMP para que os antígenos processados sejam secretados da célula, mimetizando a via de evasão natural do HAV.

Após a transfecção de células HEK-293 com a construção p43.2_N-hLAMP_HAV-PTRUNC_{OPT} foi possível observar a expressão, através de imunofluorescência, das proteínas VP1, VP3 e 3C, utilizando os anticorpos policlonais produzidos em coelho. A detecção dessas três proteínas mostra que essa construção vacinal foi eficientemente capaz de produzir a poliproteína truncada do HAV. Também foram detectadas as proteínas virais nas células infectadas com vírus como controle. Um aspecto de interesse é que os anticorpos produzidos contra as proteínas desnaturadas, ou seja, na forma linear, foram capazes de reconhecer as proteínas na sua estrutura conformacional, já que esta organização é preservada nas células preparadas para imunofluorescência. Utilizando a técnica de Dot-blot, Baptista e outros (2006) mostraram que um anticorpo policlonal contra a proteína VP1, produzido em coelho, também foi capaz de reconhecer o vírus propagado em célula. Muito antes, Ping e outros (1988) e Stapleton e Lemon (1987) demonstraram que anticorpos dirigidos contra as proteínas individuais VP1 e VP3 recombinantes, podem reconhecer as proteínas quando elas estão formando o capsídeo viral, assumindo que tanto VP1 como VP3 possuem seus próprios epítomos.

Não foi possível observar a expressão da poliproteína truncada na construção não-fusionada à região N-terminal de LAMP. Colocamos como hipótese uma possível instabilidade de HAV-PTRUNC e sua conseqüente degradação, podendo a protease 3C ser considerada como um fator chave dessa instabilidade. Estudos mostram que a protease 3C de HAV, e também de outros picornavírus, nas suas formas isoladas ou ligadas a seus precursores, são substratos para uma rápida e seletiva degradação, *in vitro*, pelo sistema ubiquitina/proteossomo 26S (GLADDING et al., 1997; LAWSON et al., 1994; 1998; LOSICK et al., 2003). Losick e outros (2003) reportaram uma rápida degradação, *in vitro*, de 3C e da polimerase 3D de HAV. Os autores mostraram que a 3C possui uma seqüência de 10 aminoácidos, que serve como sinal para sua destruição e, que é reconhecida pela ligase E3 da ubiquitina. Os complexos 3ABC e 3CD foram reconhecidos como substratos para a proteólise, o que mostra a influência tanto de 3C como de 3D para a degradação de seus precursores. Schlax e outros (2007) isolaram células de fibroblasto de camundongo estavelmente transfectadas com um plasmídeo expressando a protease 3C de HAV, e determinaram que esta proteína também está sujeita a degradação *in vivo* pelo sistema ubiquitina/proteossomo 26S. Segundo os mesmos autores, a associação com outras proteínas, ou a compartimentalização, podem seqüestrar a protease 3C da maquinaria de ubiquitinização e evitar sua degradação. Diante disso, consideramos que essa seja uma possível explicação para a detecção da expressão da poliproteína truncada apenas quando esta foi fusionada a N-LAMP, pois todo o complexo protéico foi direcionado para o retículo endoplasmático celular, ficando assim protegido de uma possível proteólise.

A expressão e o processamento da poliproteína não foram visualizados por *Western-blot*. O não reconhecimento de HAV-PTRUNC por esta técnica pode estar relacionado a uma baixa eficiência de transfecção das células 293, o que leva a uma pequena quantidade da proteína viral presente no extrato celular. Estudos prévios que avaliaram, também através de *Western-blot*, a expressão e o processamento das proteínas do capsídeo, utilizando o vírus completo ou seqüências truncadas do genoma viral, fizeram uso da técnica de imunoprecipitação para a detecção das respectivas proteínas (JIA; EHRENFELD; SUMMERS, 1991; JURGENSEN et al., 1993; PINTÓ et al., 2002). Em virtude do curto período de tempo para a realização deste trabalho, não foi possível a obtenção de resultados seguros utilizando a técnica de imunoprecipitação. No momento esta técnica encontra-se em fase de

padronização e acreditamos que após ajustadas as condições experimentais, poderemos visualizar a expressão e o processamento da poliproteína truncada nos ensaios de *Western-blot*.

A observação da expressão em células 293, da poliproteína truncada fusionada à N-LAMP indica que essa construção pode ser funcional como uma possível vacina de DNA contra HAV e, portanto, será utilizada na imunização de animais experimentais para a avaliação da resposta imune. O protótipo vacinal será testado em primatas não-humanos, que representam, até o momento, o único modelo experimental ideal para o estudo da infecção pelo HAV e conseqüentemente para análise da imunogenicidade das vacinas contra o vírus. A partir da colaboração com o Laboratório de Desenvolvimento Tecnológico em Virologia – IOC/FIOCRUZ, os ensaios pré-clínicos em primatas serão realizados utilizando os animais mantidos no Centro de Criação de Animais de Laboratório – CECAL/FIOCRUZ. As respostas vacinais serão avaliadas através de testes de neutralização com o soro imune dos macacos e também a partir da capacidade de proteção frente ao desafio com o HAV. As pesquisas com esse protótipo vacinal poderão servir de base para a elaboração de uma vacina de DNA contra a Hepatite A, a qual permanece como uma doença que ainda afeta considerável parte da população brasileira. Além disso, e como consequência, a produção desta vacina de DNA também permitirá a inclusão desta nova tecnologia no âmbito da produção de imunobiológicos e outros insumos para a saúde, auxiliando no desenvolvimento de vacinas contra demais agentes de importância para a saúde pública do país.

7 CONCLUSÕES

- a) Tanto as sequências das construções vacinais, como das proteínas individuais, foram otimizadas e demonstraram importantes modificações que favoreceram a expressão nos seus respectivos sistemas
- b) As sequências de VP1, VP3 e 3C foram clonadas no vetor de expressão bacteriano e as proteínas foram expressas e purificadas em quantidades satisfatórias.
- c) A imunização de coelhos produziu anticorpos policlonais que reconheceram especificamente as proteínas recombinantes, por *Western-blot*.
- d) Os anticorpos foram capazes também de detectar as proteínas do vírus e a poliproteína truncada, mostrando que podem reconhecer as proteínas também na sua estrutura conformacional.
- e) A construção vacinal contendo a região N-terminal de LAMP demonstrou expressar a poliproteína truncada nas células 293, o que não ocorreu com a construção não fusionada a LAMP, indicando que esta última pode ter uma função protetora ou de promover a estabilidade da poliproteína.

REFERÊNCIAS

ABARCA, K. et al. Immunogenicity, safety and interchangeability of two inactivated hepatitis A vaccine in Chilean children. *International Journal of Infectious Disease*, Hamilton, v. 12, n. 3, p. 270-277, nov. 2007.

ABDULHAQQ, S. A.; WEINER, D. B. DNA vaccines: developing new strategies to enhance immune responses. *Immunologic Research*, Basel, v. 42, n. 1-3, p. 219–232. Out. 2008

ALMEIDA, L.M. et al. The epidemiology of hepatitis A in Rio de Janeiro: environmental and domestic risk factors. *Epidemiology and Infection*, Cambridge, v. 127, n. 2, p. 327-333, out. 2001.

ANDERSON, D. A.; ROSS, B. C. Morphogenesis of hepatitis A virus: isolation and characterization of subviral particles. *Journal of Virology*, Washington, v. 64, n. 11, p. 5284-5289, nov. 1990.

ANDRE, F. E. et al. Clinical assessment of the safety and efficacy of an inactivated hepatitis A vaccine: rationale and summary of findings. *Vaccine*, Kidlington, v. 10, suppl. 1, p. S160–S168, 1992.

ANWAR, A. et al. West Nile premembrane-envelope genetic vaccine encoded as a chimera containing the transmembrane and cytoplasmic domains of a lysosome-associated membrane protein: increased cellular concentration of the transgene product, targeting to the MHC II compartment, and enhanced neutralizing antibody response. *Virology*, New York, v. 332, n. 1, p. 66-77, fev. 2005.

ARRUDA, L. B. et al. Dendritic cell-lysosomal-associated membrane protein (LAMP) and LAMP-1-HIV-1 gag chimeras have distinct cellular trafficking pathways and prime T and B cell responses to a diverse repertoire of epitopes. *Journal of Immunology*, Baltimore, v. 177, n. 4, p. 2265-2275, ago. 2006.

ASHER, L.V. et al. Pathogenesis of hepatitis A in orally inoculated owl monkeys (*Aotus trivirgatus*). *Journal of Medical Virology*, New York, v. 47, n. 3, p. 260-268, nov. 1995.

BAGARAZZI, M. L. et al. Safety and immunogenicity of intramuscular and intravaginal delivery of HIV-1 DNA constructs to infant chimpanzees. *Journal of Medical Primatology*, Basel, v. 26, n. 1-2, p. 27–33, fev./abr. 1997.

BAPTISTA, M. L. et al. Genetic variability of hepatitis A virus strain HAF-203 isolated in Brazil and expression of the VP1 gene in *Escherichia coli*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 101, n. 7, p. 759-766, nov. 2006.

BEARD, C. et al. Development of DNA vaccines for foot-and-mouth disease, evaluation of vaccines encoding replicates and non-replicates nucleic acids in swine. *Journal of Biotechnology*, Amsterdam, v. 73, n. 2-3, p. 243-249, ago. 1999.

BELL, B. P. Hepatitis A vaccine. *Seminars in Pediatric Infectious Diseases*, Philadelphia, v. 13, n. 3, p. 165-173, jul. 2002.

BENVENISTY, N.; RESHEF, L. Direct introduction of genes into rats and expression of the genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of The United States of America*, Washington, v. 83, n. 24, p. 9551-9555, dez. 1986

BILLINIS, C. et al. Persistence of encephalomyocarditis virus (EMCV) infection in piglets. *Veterinary Microbiology*, Amsterdam, v. 70, n. 3-4, p. 171-177, dez. 1999

BISHOP, N. E.; ANDERSON, D. A. RNA-dependent cleavage of VP0 capsid protein in provirions of hepatitis A virus. *Virology*, New York, v. 197, n. 2, p. 616-23, dez. 1993.

BLUMMER, G. Infectious jaundice in the United States. *JAMA*, Chicago, v. 81, n. 5, p. 353-358. ago. 1923.

BOGGS, J. D. et al. Viral hepatitis: Clinical and tissue culture studies. *JAMA*, Chicago, v. 214, n. 6, p. 1041-1046. nov. 1970.

BORMAN, A. M. et al. eIF4G and its proteolytic cleavage products: effect on initiation of protein synthesis from capped, uncapped, and IRES-containing mRNAs. *RNA*, New York, v. 3, n. 2, p. 186-196, fev. 1997.

BRAGA, W. S. et al. Prevalence of hepatitis A virus infection: the paradoxical example of isolated communities in the western Brazilian Amazon region. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, Brasília, v. 42, n. 3, p. 277-278, maio/jun. 2009.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. *Hepatites virais: o Brasil está atento*. Brasília, 2005. 40 p. (Série B. Textos Básicos de Saúde).

BURGESS-BROWN, N. A. et al. Codon optimization can improve expression of human genes in *Escherichia coli*: A multi-gene study. *Protein Expression and Purification*, San Diego, v. 59, n. 1, p. 94-102, maio 2008.

CARRILHO, F. J.; MENDES-CLEMENTE, C.; SILVA, L. C. Epidemiology of hepatitis A and E virus infection in Brazil. *Gastroenterología y hepatología*, Barcelona, v. 28, n. 3, p. 118-125, mar. 2005.

CEDILLO-BARRÓN, L. et al. Induction of a protective response in swine vaccinated with DNA encoding foot-and-mouth disease virus empty capsid proteins and the 3D RNA polymerase. *Journal of General Virology*, London, v. 82, n. 7, p. 1713-1724, jul. 2001.

CHEN, J. W. et al. Identification of two lysosomal membrane glycoproteins. *Journal of Cell Biology*, New York, v. 101, n. 1, p. 85-95, jul. 1985.

CHEN, Z. Protective immune response in mice vaccinated with a recombinant adenovirus containing capsid precursor polypeptide P1, nonstructural protein 2A and 3C protease genes (P12A3C) ofencephalomyocarditis virus. *Vaccine*, Kidlington, v. 26, p. 573—580, jan. 2008.

CHIKHLIKAR, P. et al. Inverted terminal repeat sequences of adeno-associated virus enhance the antibody and CD8(+) responses to a HIV-1 p55Gag/LAMP DNA vaccine chimera. *Virology*, New York, v. 323, n. 2, p. 220-232, jun. 2004.

CHODICK, G. et al. Long-term trends in hepatitis A incidence following the inclusion of Hepatitis A vaccine in the routine nationwide immunization program. *Journal of Viral Hepatitis*, Oxford, v. 15, suppl. 2, p. 62–65, out. 2008.

CHUNG, Y. C. et al. Immunization with virus-like particles of enterovirus 71 elicits potent immune responses and protects mice against lethal challenge. *Vaccine*, Kidlington, v. 26, n. 15, p. 1855—1862, mar. 2008.

CLEMENS, S. A. C. et al. Soroprevalência para hepatite A e B em quatro centros no Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, Brasilia, v. 33 n. 1, p. 1-10, jan./fev. 2000.

COCKAYNE, E. A. Catarrhal jaundice, sporadic and epidemic, and its relation to acute yellow atrophy of the liver. *Quarterly journal of medicine*, Oxford, v. 6, p. 1–28. 1912

COHEN, J. I. et al. Complete nucleotide sequence of an attenuated hepatitis A virus: comparison with wild-type virus. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America*, Washington, v. 84, n. 2, p. 2497-2501, abr. 1987.

COHEN, J.I.; FEINSTONE, M.; PURCELL, R.H. Hepatitis A virus infection in a chimpanzee: Duration of viremia and detection of virus in saliva and throat swabs. *Journal of Infectious Disease*, Chicago, v. 160, n. 5, p. 887–890, nov. 1989.

COHEN, J. I. et al. Analysis of deletion mutants indicates that 2A polypeptide of hepatitis A virus participates in virion morphogenesis. *Journal of Virology*, Washington, v. 76, n. 15, p. 7495-7505, ago. 2002.

COSTA-MATTIOLI, M. et al. Genetic variability of hepatitis A virus. *Journal of General Virology*, London, v. 84, p. 3191-3201, set. 2003.

COURSAGET, P. et al. Etiology of acute sporadic hepatitis in adults in Senegal and Tunisia. *Scandinavian journal of infectious diseases*, Stockholm, v.27, n. 1, p. 9-11, 1995.

CRANENBURGH, R. M. et al. *Escherichia coli* strains that allow antibiotic-free plasmid selection and maintenance by repressor titration. *Nucleic Acids Research*, Londres, v. 29, n. 1, p. E26, mar. 2001.

CUTHBERT, J. A. Hepatitis A: Old and New. *Clinical Microbiology Reviews*, Washington, v. 14, n. 1, p. 38-58, jan. 2001.

DAGAN, R. et al. Incidence of hepatitis A in Israel following universal immunization of toddlers. *JAMA*, Chicago, v. 294, n. 2, p. 202-210, jul, 2005.

DALLMANN, H. G.; DUNN, S. D. Translation through an uncDC mRNA secondary structure governs the level of uncC expression in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, Washington, v. 176, n. 5, p. 1242-1250, mar. 1994.

DAVIDSON, A. H. et al. Immunologic responses to West Nile virus in vaccinated and clinically affected horses. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, Chicago, v. 226, n. 2, p. 240-245, jan. 2005.

DE ARRUDA, L. B. et al. DNA vaccine encoding human immunodeficiency virus Gag, targeted to the major histocompatibility complex II compartment by lysosomal associated membrane protein, elicits enhanced long-term memory response. *Immunology*, Oxford, v. 112, n. 1, p. 126-133, maio 2004.

DENTINGER, C.M. Emerging infections: hepatitis A. *American Journal of Nursing*, New York, v. 109, n. 8, p. 29-33, ago. 2009

DONG, H.; NILSSON, L.; KURLAND, C. G. Co-variation of tRNA abundance and codon usage in *Escherichia coli* at different growth rates. *Journal of Molecular Biology*, Londres, v. 260, n. 5, p. 649-663, ago. 1996.

DONNELLY, J. J.; WAHREN, B.; LIU, M. A. Challenges DNA Vaccines: Progress and Challenges. *Journal of Immunology*, Baltimore, v. 175, n. 2, p.633-639, jul. 2005.

DRAKE, J. R. et al. Involvement of MIIC-like late endosomes in B cell receptor-mediated antigen processing in murine B cells. *Journal of Immunology*, Baltimore, v.162, n.2, p.1150-1155, jan. 1999.

FEINSTONE, S. M.; KAPIKIAN, A. Z.; PURCELL, R. H. Hepatitis A: Detection by immune electron microscopy of a viruslike antigen associated with acute illness. *Science*, Washington, v. 182, n. 116, p. 1026-1028, dez. 1973.

FERREIRA, C. T. et al. Hepatitis A acute liver failure: follow up of paediatric patients in southern Brazil. *Journal of viral hepatitis*, Oxford, v. 15, suppl. 2, p. 66-68, out. 2008.

FERREIRA, C. T.; PRETTO, F. M. Hepatite pelo vírus A. In: MATTOS, A. A.; DANTAS, W. (Ed.). *Compêndio de Hepatologia*, 2 ed. São Paulo: Fundo Editorial BYK, 1995. 518 p. p. 459-470.

FLEISCHER, B. et al. Clonal analysis of infiltrating T lymphocytes in liver tissue in viral hepatitis A. *Immunology*, Oxford, v. 69, n. 1, p. 14-19, jan. 1990.

- GARMORY, H. S. et al. Antibiotic-free plasmid stabilization by operator-repressor titration for vaccine delivery by using live *Salmonella enterica* Serovar typhimurium. *Infection and Immunity*, Washington, v. 73, n. 4, p.2005–2011, abr. 2005.
- GASPAR, et al. Fast growth of a Brazilian hepatitis A virus (HAF-203) in a primate cell line. *Brazilian Journal of medical and biological research*, Ribeirão Preto, v. 26, n. 2, p. 203-206, fev. 1993.
- GAUSS-MULLER, V.; DEINHARDT, F. Effect of hepatitis A virus infection on cell metabolism in vitro. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, Malden, v. 175, n. 1, p. 10-15, jan. 1984.
- GENTILE, A. The need for an evidence-based decision-making process with regard to control of hepatitis A. *Journal of Viral Hepatitis*, Oxford, v. 15, suppl. 2, p.16-21, out. 2008.
- GLADDING, R. L. et al. Evaluation of the susceptibility of the 3C proteases of hepatitis A virus and poliovirus to degradation by the ubiquitin-mediated proteolytic system. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, New York, v. 238, n. 1, p. 119-125, set. 1997.
- GRUBMAN, M. J.; BAXTI, B. Foot-and-mouth disease. *Clinical Microbiology Reviews*, Washington, v. 17, n. 2, p. 465-493, abr. 2004.
- GUARNIERI, F. G. et al. The motif Tyr-X-X-hydrophobic residue mediates lysosomal membrane targeting of lysosome-associated membrane protein 1. *Journal of Biological Chemistry*, Oxford, v.268, n. 3, p.1941-1946, jan. 1993.
- GURVICH, O. L. et al. Expression levels influence ribosomal frameshifting at the tandem rare arginine codons AGG_AGG and AGA_AGA in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, Washington, v. 187, n. 12, p. 4023-4032, jun. 2005.
- HAVENS, W. P. Jr. The etiology of infectious hepatitis. *JAMA*, Chicago, v. 134, n. 8, p. 653–655, jun. 1947.
- HAVENS W. P. Jr. Viral hepatitis. *Postgraduate Medical Journal*, Oxford, v. 39, p. 212–223. abr. 1963.
- HENDRICKX, G. et al. Has the time come to control hepatitis A globally? Matching prevention to the changing epidemiology. *Journal of viral hepatitis*, Oxford, v. 15, suppl. 2, p. 1-15, out. 2008.
- HOKE, C.H. et al. Hepatitis A in the US Army: epidemiology and vaccine development. *Vaccine*, Kidlington, v. 10, suppl. 1, p. S75-S79, 1992.
- HOLLINGER, F. B.; DIENSTAG, J. L.; SWENSON, P. D. Hepatitis viruses. In: BALOWS, A.; HAUSLER, W. J. JR; HERRMANN, K. L. et al. (Ed.), *Manual of Clinical Microbiology*. 5. ed. Washington: American Society for Microbiology, 1991. 1364 p. p. 959–983.

- HOLLINGER, F. B.; EMERSON, S. U. Hepatitis A virus. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. (Ed.), *Fields virology*. 4. ed. New York: Lippincott Williams & Wilkins, 2001. 3280 p. p. 799–840.
- INNIS, B. L. et al. Protection against hepatitis A by an inactivated vaccine. *JAMA*, Chicago, v. 271, n. 17, p. 1328–1334, maio 1994.
- ITO, Y. Heat-resistance of the tumorigenic nucleic acid of Shopepapillomatosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of The United States of America*, Washington, v. 47, n. 12, p. 1897–900, dez. 1961.
- JACKSON, R. J. Proteins involved in the function of picornavirus Internal Ribosome Entry sites. In: SEMLER, B. L.; WIMMER, E. (Ed.), *Molecular Biology of Picornaviruses*. 1. ed. Washington: ASM Press, 2002. 502 p. p. 171–186.
- JACOBSEN, K. H.; KOOPMAN, J. S. Declining hepatitis A seroprevalence: a global review and analysis. *Epidemiology and Infection*, Cambridge, v. 132, n. 6, p. 1005–1022, dez. 2004.
- JACOBSEN, K. H.; WIERSMA, S. T. Hepatitis A virus seroprevalence by age and world region, 1990 and 2005. *Vaccine*, Kidlington, v. 28, n. 41, p. 6653–6657, set. 2010.
- JECHT, M.; PROBST, C.; GAUSS-MÜLLER, V. Membrane permeability induced by hepatitis A virus proteins 2B and 2BC and proteolytic processing of HAV 2BC. *Virology*, New York, v. 252, n. 1, p. 218–227, dez. 1998.
- JEOUNG, H. Y. et al. Immune responses and expression of the virus-like particle antigen of the porcine encephalomyocarditis virus. , Londres, v. 89, n. 2, p. 295–300, out. 2010.
- JIA, X. Y.; EHRENFELD, E.; SUMMERS, D. F.J. Proteolytic activity of hepatitis A virus 3C protein. *Virology*, New York, v. 65, n. 5, p. 2595–2600, maio 1991.
- JURGENSEN, D. Cell-free translation and proteolytic processing of the hepatitis A virus polyprotein. *Journal of General Virology*, New York, v. 74, pt. 4, p. 677–683, abr. 1993.
- KAECH, S. M.; WHERRY, E. J.; AHMED, R. Effector and memory T-cell differentiation: implications for vaccine development. *Nature reviews – Immunology*, Londres, v. 2, n. 4, p. 251–262, abr. 2002.
- KAPLAN, G. et al. Identification of a surface glycoprotein on African green monkey kidney cells as a receptor for hepatitis A virus. *Embo Journal*, Oxford, v. 15, n. 16, p. 4282–4296 , abr. 1996.
- KIM, J. Y. et al Immunogenicity of a DNA vaccine for coxsackievirus B3 in mice: protective effects of capsid proteins against viral challenge. *Vaccine*, Kidlington, v. 23, n. 14, p. 1672–1679, fev. 2005.

- KLEIJMEER, M. J. et al. Major histocompatibility complex class II compartments in human and mouse B lymphoblasts represent conventional endocytic compartments. *Journal of Cell Biology*, New York, v. 139, n.3, p.639-649, nov. 1997.
- KLINMAN, D. M. et al. DNA vaccines: capacity to induce auto-immunity and tolerance. *Development Biology*, Basel, v. 104, p.45-51, 2000.
- KOTSOPOULOU, E. et al. A Rev-independent human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-based vector that exploits a codon-optimized HIV-1 gag-pol gene. *Journal of Virology*, Washington, v. 74, n. 10, p. 4839-4852, maio 2000.
- KURTH, R. Risk potential of the chromosomal insertion of foreign DNA. *Annals of the New York Academy of Sciences*, New York, v.772, p. 140-151, nov. 1995.
- KUTZLER, M. A.; WEINER, D. B. DNA vaccines: ready for prime time? *Nature Reviews - Genetics*, Londres, v. 9, n. 10, p. 776-788, out. 2008.
- KRUGMAN, S.; GILES, J. P., HAMMOND, J. Infectious hepatitis: Evidence for two distinctive clinical epidemiological and immunological types of infection. *JAMA*, Chicago, v. 200, n. 5, p. 365-373, abr. 1967.
- LABRECQUE, F. D. et al. Recombinant hepatitis A virus antigen: improved production and utility in diagnostic immunoassays. *Journal of Clinical Microbiology*, Washington, v.36, n. 7, p. 2014-2018, jul. 1998.
- LAWSON, T. G. et al. The encephalomyocarditis virus 3C protease is a substrate for the ubiquitin-mediated proteolytic system. *Journal of Biological Chemistry*, Baltimore, v. 269, n. 45, p. 28429-28435, nov. 1994.
- LEDWITH, B. J. et al. Plasmid DNA vaccines: investigation of integration into host cellular DNA following intramuscular injection in mice. *Intervirology*, Basel, v. 43, p. 258-272, 2000.
- LEE, N. et al. Modification of mRNA secondary structure and alteration of the expression of human interferon alpha 1 in *Escherichia coli*. *Gene*, Amsterdam, v. 58, n. 1, p. 77-86, 1987.
- LEMON, S. M.; BINN, L. N. Antigenic relatedness of two strains of hepatitis A virus determined by cross-neutralization. *Infection and immunity*, Washington, v. 42, n. 1, p. 418-420, out. 1983.
- LEMON, S. M. et al. Antigenic and Genetic Variation in Cytopathic Hepatitis A Virus Variants Arising during Persistent Infection: Evidence for Genetic Recombination. *Journal of virology*, Washington, v. 65, n. 4, p.2056-2065, abr. 1991.
- LEMON, S. M. et al. Genetic, antigenic and biological differences between strains of hepatitis A virus. *Vaccine*, Kidlington, v. 10, suppl. 1, p. S40-S44, 1992.

- LEMON, S. M.; ROBERTSON, B. H. Current perspectives in the virology and molecular biology of hepatitis A virus. *Seminars in virology*, London, v.4, n. 5, p. 285–295, out. 1993.
- LEMON, S. M.; SHAPIRO, C. N. The value of immunization against hepatitis A. *Infectious Agents Disease*, New York, v. 3, n. 1, p. 38–49, fev. 1994.
- LEMON, S. M. Type A viral hepatitis: epidemiology, diagnosis, and Prevention. *Clinical Chemistry*, New York, v.43, n. 8(B), p. 1494–1499, ago. 1997.
- LIU, M. A. DNA vaccines: a review. *Journal of Internal Medicine*, Oxford, v. 253, n. 4, p. 502–410, abr. 2003.
- LIVINGSTON, et al. A rational strategy to design multiepitope immunogens based on multiple Th lymphocyte epitopes. *Journal of Immunology*, Baltimore, v. 168, n. 11, p. 5499–5506, jun. 2002.
- LOSICK, V. P. et al. Signals in hepatitis A virus P3 region proteins recognized by the ubiquitin-mediated proteolytic system. *Virology*, Oxford, v. 309, n. 2, p. 306–319, maio 2003.
- MACCALLUM, F. O. Homologous serum jaundice. *Lancet*, Londres, v. 2, p. 691–692, 1947.
- MACGREGOR, R. R. et al. Safety and immune responses to a DNA-based human immunodeficiency virus (HIV) type I env/rev vaccine in HIV-infected recipients: follow up data. *Journal of Infectious Disease*, Orlando, v. 181, n. 1, p. 406, jan. 2000.
- MCDONALD, S. Acute yellow atrophy of the liver. *Edinburgh Medical Journal*, Edinburgh, v. 1, p. 83–88, 1908.
- MAIER, K. et al. Human gamma interferon production by cytotoxic T lymphocytes sensitized during hepatitis A virus infection. *Journal of virology*, Washington, v. 62, n. 10, p. 3756–3763, out. 1988.
- MAIRHOFER, J. et al. A novel antibiotic free plasmid selection system: advances in safe and efficient DNA therapy. *Journal of Biotechnology*, Amsterdam, v. 3, n. 1, p. 83–89, jan. 2007.
- MANAM, S. et al. Plasmid DNA vaccines: tissue distribution and effects of DNA sequence, adjuvants and delivery method on integration into host DNA. *Intervirology*, Basel, v.43, n. 4–6, p. 273–281, 2000.
- MAO, J. S. et al. Primary study of attenuated live hepatitis A vaccine (H2 strain) in humans. *Journal of Infectious Disease*, Chicago, v. 159, n. 4, p. 621–624, abr. 1989.
- MAO, J. S. et al. Further evaluation of the safety and protective efficacy of live attenuated hepatitis A vaccine (H2-strain) in humans. *Vaccine*, Kidlington, v. 15, n. 9, p. 944–947, jun. 1997.

MARQUES, E. T. et al. HIV-1 p55Gag encoded in the lysosome-associated membrane protein-1 as a DNA plasmid vaccine chimera is highly expressed, traffics to the major histocompatibility class II compartment, and elicits enhanced immune responses. *Journal of Biological Chemistry*, Baltimore, v. 278, n. 39, p. 37926-37936, set. 2003.

MARTIN, A. et al. Identification and site-directed mutagenesis of the primary (2A/2B) cleavage site of the hepatitis A virus polyprotein: Functional impact on the infectivity of HAV RNA transcripts. *Virology*, New York, v. 213, n. 1, p. 213-222, out. 1995.

MARTIN, A. et al. Maturation of the hepatitis A virus capsid protein VP1 is not dependent on processing by the 3Cpro proteinase. *Journal of virology*, Washington, v. 73, n. 8, p. 6220-6227, ago. 1999.

MARTIN, A.; LEMON, S. M. Hepatitis A virus: from discovery to vaccines. *Hepatology*, Baltimore, v. 43, n. 2, suppl. 1, p. S164-172, fev. 2006.

MINGXIAO, M. et al. Immunogenicity of plasmids encoding P12A and 3C of FMDV and swine IL-18. *Antiviral Research*, Amsterdam, v. 76, n. 1, p. 59-67, out. 2007.

MINOR, P.D. Picornaviridae. In: FRANCKI, R.I.B., FAUQUET, C.M., KNUDSON, D.L., BROWN, F. (Ed.), *Classification and Nomenclature of Viruses: Fifth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses* (Archives of Virology, Supplementum 2. 1. ed. Wien: Springer-Verlag, 1991. 450 p. p. 320-326.

MINOR, P. D. Regulatory issues in the use of DNA vaccines. *Annals of the New York Academy of Sciences*, New York, v. 772, p. 170-177, nov. 1995.

NAINAN, O. V. et al. Diagnosis of Hepatitis A Virus Infection: a Molecular Approach. *Clinical Microbiology Reviews*, Washington, v. 19, n. 1, p. 63-79, jan. 2006.

NICHOLS, W. W. et al. Potential DNA vaccine integration into host cell genome. *Annals of the New York Academy of Sciences*, New York, v. 772, p. 30-39, nov. 1995.

OBERMULLER, S. et al. The tyrosine motifs of Lamp 1 and LAP determine their direct and indirect targeting to lysosomes. *Journal of Cell Science*, Londres, v. 115, n. 1, p. 185-194, jan. 2002.

O'GRADY, J. Management of acute and fulminant hepatitis A. *Vaccine*, Kidlington, v. 10, suppl. 1, p. S21-S23, 1992.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Hepatitis A vaccines: WHO position paper. *Weekly epidemiological Record*, Geneva, v. 75, n. 5, p. 37-44, fev. 2000.

PAL, R. et al. Definitive toxicology and biodistribution study of a polyvalent DNA prime/protein boost human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) vaccine in rabbits. *Vaccine*, Kidlington, v.24, n. 8, p. 1225-1234, fev. 2006.

PARKIN, N. T.; CHAMORRO, M.; VARMUS, H. E. Human immunodeficiency virus type 1 gag-pol frameshifting is dependent on downstream mRNA secondary structure: demonstration by expression in vivo. *Journal of Virology*, Washington, v. 66, n. 8, p. 5147-5151, ago. 1992.

PAUL, A. V. et al. The entire nucleotide sequence of the genome of human hepatitis A virus (isolate MBB). *Virus research*, Amsterdam, v. 88, n. 2, p. 153–171, ago. 1987

PEREIRA, F. E. L.; GONÇALVES, C. S. Hepatite A. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. Brasília, v. 36, n. 3, p. 387-400, maio/jun. 2003.

PING, L. H. et al. Identification of an immunodominant antigenic site involving the capsid protein VP3 of hepatitis A virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of The United States of America*, Washington, v. 85, n. 21, p. 8281–8285, nov. 1988.

PING, L. H.; LEMON, S. M. Antigenic structure of human hepatitis A virus defined by analysis of escape mutants selected against murine monoclonal antibodies. *Journal of Virology*, Washington, v.66, n. 6, p. 2208–2216, abr. 1992.

PINTÓ, R. M. et al. Hepatitis A virus polyprotein processing by *Escherichia coli* proteases. *Journal of General Virology*, Londres, v. 83, pt. 2, p. 359–368, fev. 2002.

PINTÓ, R. M. et al. Codon usage and replicative strategies of hepatitis A virus. *Virus Research*, Amsterdam, v. 127, n. 2, p. 158-163, ago. 2007.

PINTÓ, R.M. et al. Hepatitis A Virus: State of the Art. *Food and Environmental Virology*, New York, v. 2, n. 3, p. 127-135, set. 2010.

PROBST, C.; JECHT, M.; GAUSS-MULLER, V. Intrinsic signals for the assembly of hepatitis A virus particles. *The Journal of Biological Chemistry*, Bethesda, v. 274, n. 8, p. 4527-4531, fev. 1999.

PROVOST, P. J.; HILLEMANN, M. R. Propagation of human hepatitis A virus in cell culture in vitro. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, Malden, v. 160, n. 2, p. 213–221, fev. 1979.

PURCELL, R. H.; EMERSON, S. U. Animal models of hepatitis A and E. *Institute of Laboratory Animal Resources (ILAR) Journal*, Washington, v. 42, n. 2, p. 161-177, 2001.

RAVIPRAKASH, K. et al. Synergistic neutralizing antibody response to a dengue virus type 2 DNA vaccine by incorporation of lysosome-associated membrane protein sequences and use of plasmid expressing GM-CSF. *Virology*, New York, v. 290, n. 1, p. 74-82, nov. 2001.

RENDI-WAGNER, P. et al. Persistence of seroprotection 10 years after primary hepatitis A vaccination in an unselected study population. *Vaccine*, Kidlington, v. 25, n. 5, p. 927-931, jan. 2007.

ROBERTSON, B. H. Viral hepatitis and primates: historical and molecular analysis of human and non-human primate hepatitis A, B and the GB-related viruses. *Journal of Viral Hepatitis*, Oxford, v. 8, n. 4, p. 233-242, jul. 2001.

ROBERTSON, J. S.; CICHUTEK, K. European Union guidance on the quality, safety and efficacy of DNA vaccines and regulatory requirements. *Developmental Biology*, Basel, v. 104, p.53–56, 2000.

ROBERTSON, J. S.; GRIFFITHS, E. Assuring the quality, safety, and efficacy of DNA vaccines. *Methods in Molecular Medicine*.v,127, p. 363–374, 2006.

ROHRER, J. et al. The targeting of Lamp1 to lysosomes is dependent on the spacing of its cytoplasmic tail tyrosine sorting motif relative to the membrane. *Journal of Cell Biology*, New York, v.132, n.4,p.565-576, fev. 1996.

ROSEN, E.; STAPLETON, J. T.; MCLINDEN, J. Synthesis of immunogenic hepatitis A virus particles by recombinant baculoviruses. *Vaccine*, Kidlington, v. 11, n. 7, p. 706-712, 1993.

SÁNCHEZ, G. et al. Antigenic hepatitis A virus structures may be produced in *Escherichia coli*. *Applied and environmental microbiology*, Washington, v. 69, n. 3, p. 1840-1843, mar. 2003.

SANCHEZ, G.; BOSCH, A.; PINTÓ, R. M. Genome variability and capsid structural constraints of hepatitis A virus. *Journal of virology*, Washington, v. 77, n. 1, p. 452–459, jan. 2003b.

SCHIFF, E. R. Atypical clinical manifestations of hepatitis A. *Vaccine*, Kidlington, v. 10, suppl. 1, p. S18–S20, 1992.

SCHLAX, P. E. et al. Degradation of the encephalomyocarditis virus and hepatitis A virus 3C proteases by the ubiquitin/26S proteasome system in vivo. *Virology*, Oxford, v. 360, n. 2, p. 350-363, abr. 2007.

SEMON, M.; MOUCHIROUD, D.; DURET, L. Relationship between gene expression and GC-content in mammals: statistical significance and biological relevance. *Human Molecular Genetics*, Oxford, v. 14, n. 3, p. 421-427, fev. 2005

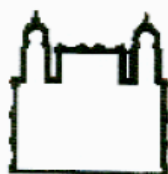
SILBERSTEIN, E.; KONDURU, K.; KAPLAN, G. G. The interaction of hepatitis A virus (HAV) with soluble forms of its cellular receptor 1 (HAVCR1) share the physiological requirements of infectivity in cell culture. *Virology Journal*, London, v. 27, n. 6, p. 175, out. 2009.

STAPLETON, J. T.; LEMON, S. M. Neutralization escape mutants define a dominant immunogenic neutralization site on hepatitis A virus. *Journal of Virology*, Washington, v. 61, n.2, p. 491-498, fev. 1987.

STAPLETON, J. T. et al. The role of secretory immunity in hepatitis A virusinfection. *Journal of infectious diseases*, Chicago, v. 163, n. 1, p. 7–11, jan. 1991.

- STASNEY, J. et al. The production of neoplasms by the injection of chromatin fractions. *Acta Unio Internationalis Contra Cancrum*. v.11, n. 6., p. 715–720, 1955.
- TANAKA, J. Hepatitis A shifting epidemiology in Latin America. *Vaccine*, Kidlington, v. 18, suppl. 1, p. S57-S60, fev. 2000.
- TAPIA-CONYER, R. et al. Hepatitis A in Latin America: a changing epidemiologic pattern. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, Baltimore, v. 61, n. 5, p. 825-299, nov. 1999.
- TAYLOR, G.M. et al. In situ hybridization studies in hepatitis A infection. *Hepatology*, Baltimore, v. 16, n. 3, p. 642–648, set. 1992.
- TEMIN, H. M. Overview of biological effects of addition of DNA molecules to cells. *Journal of Medical Virology*, New York, v.31, n. 1, p. 13–17, mar. 1990.
- TOTSUKA, A.; MORITSUGU, Y. Hepatitis A virus proteins. *Intervirology*, Basel, v. 42, n. 2-3, p. 63-68, 1999.
- TSAI, J. F. et al. Increased IgM class circulating immunocomplexes in acute hepatitis A virus infection. *Clinical immunology and immunopathology*, New York, v. 78, n. 3, p. 291–295, mar. 1996.
- TSEGA, E. et al. Hepatitis A, B, and delta infection in Ethiopia: a serologic survey with demographic data. *American Journal of epidemiology*, Baltimore, v. 123, n. 2, p. 344-351, fev. 1986.
- TURLEY, S. J. et al. Transport of peptide-MHC class II complexes in developing dendritic cells. *Science*, Washignton, v.288, n.5465, p.522-527, abr. 2000.
- VACCHINO, M. N. Incidence of Hepatitis A in Argentina after vaccination. *Journal of Viral Hepatitis*, Oxford, v. 15, suppl. 2, p. 47–50, out. 2008.
- VALLBRACHT, A. et al. Persistent infection of human fibroblasts by hepatitis A virus. *Journal of General Virology*, London, v. 65, p. 609-615, nov. 1984.
- VITRAL, C.L.; GASPAR, A.M.C.; SOUTO, F.J. Epidemiological pattern and mortality rates for hepatitis A in Brazil, 1980-2002 - A Review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 101, n. 2, p. 119-127, mar. 2006.
- VITRAL, C. L.; SOUTO, F. J.; GASPAR, A. M. C. Changing epidemiology of hepatitis A in Brazil: reassessing immunization policy. *Journal of Viral Hepatitis*, Oxford, v. 15, suppl. 2, p. 22-25, out. 2008.
- WANG, C. H. et al. Immune response to hepatitis A virus capsid proteins after infection. *Journal of Clinical Microbiology*, Washington, v. 34, n. 3, p. 707-713. mar. 1996.

- WASLEY, A.; FIORE, A.; BELL, B. P. Hepatitis A in the era of vaccination. *Epidemiologic Reviews*, Baltimore, v. 28, p. 101-111, jun. 2006.
- WHEELER, C. et al. An outbreak of hepatitis A associated with green onions. *New England Journal of Medicine*, Boston, v. 353, p. 890-897, set. 2005.
- WHETTER, L. E. et al. Low efficiency of the 5' non-translated region of hepatitis A virus RNA in directing cap-independent translation in permissive monkey kidney cells. *Journal of virology*, Washington, v. 68, n. 8, p. 5253-5263, ago. 1994.
- WONG, H. T., et al. Plasmids encoding foot-and-mouth disease virus VP1 epitopes elicited immune responses in mice and swine and protected swine against viral infection. *Virology*, New York, v. 278, n. (1), p. 27-35, dez. 2000.
- WONG, H. T. et al. A DNA vaccine against foot-and-mouth disease elicits an immune response in swine which is enhanced by co-administration with interleukin-2. *Vaccine*. Kidlington, v. 20, n. 21/22, p. 2641-2647, jun. 2002.
- XIAO, C. et al. Enhanced protective efficacy and reduced viral load of foot-and-mouth disease DNA vaccine with co-stimulatory molecules as the molecular adjuvants. *Antiviral Research*, Amsterdam, v. 76, n. 1, p. 11-20, out. 2007.
- YAO, Q. et al. Comparison of immune response to different foot-and-mouth disease genetically engineered vaccines in guinea pigs. *Journal of Virological Methods*, Amsterdam, v. 147, n.1, p. 43-150, jan. 2008.
- ZAHN, J.; VALLBRACHT, A.; FLEHMIG, B. Hepatitis A virus in cell culture. V. Neutralizing antibodies against hepatitis A virus. *Medical microbiology and immunology*, Berlin, v. 173, n. 1, p. 9-17. 1984
- ZHANG, H. et al. An infectious cDNA clone of a cytopathic hepatitis A virus: genomic regions associated with rapid replication and cytopathic effect. *Virology*, New York, v. 212, n. 2, p. 686-697, out. 1995.
- ZHOU, J. et al. Papillomavirus capsid protein expression level depends on the match between codon usage and tRNA availability. *Journal of Virology*, Washington, v. 73, n. 6, p. 4972-4982, jun. 1999.
- ZUCKERMAN, A. J. The history of viral hepatitis from antiquity to the present. In: DEINHARDT, F.; DEINHARDT, J. (Ed.), *Viral hepatitis: Laboratory and Clinical Science*, ed. New York: Marcel Dekker, 1983. p. p. 3-32.

ANEXO A – Carta de aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA)

MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
VICE-PRESIDÊNCIA DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA

Rio de Janeiro, 12 de setembro de 2006.

CARTA Nº 115-06/CEUA-FIOCRUZ

Dr. Ernesto T. A. Marques Júnior
Rua Moraes Rego s/nº - Cidade Universitária

Referência: Protocolo P-0259/05

Prezado Dr. Ernesto,

Temos o prazer de informar-lhe que seu projeto intitulado “Programa de descoberta de epitopos de células T e produção de anticorpos em larga escala”, foi considerado APROVADO pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-Fiocruz).

O certificado de licença é encaminhado em anexo.

Obrigado por submeter seu projeto a CEUA-Fiocruz.

Cordialmente,

Octavio Augusto França Presgrave
Coordenador da CEUA
Fiocruz

ANEXO B – Relatórios de otimização



Optimization report

Created with Leto 1.0

1 General Information:

Gene: VP1_HAV_Bac
 Optimization requested by:
 Date: Mar 17, 2009
 Operator: rdhalia
 Target organism: Escherichia coli_cut_off_50%
 Optimization iteration: 1
 Length: 959 bp

1.1 Sequence

Below the original sequence and optimized sequence are listed, labelled with 'Org.' and 'Opt.' respectively. Where both are identical, the original sequence contains dots instead of nucleotides ('.'). Where the original sequence was locked against editing, it contains underscores ('_'). The names of the restriction enzymes start at the first nucleotide after the restriction cut in the forward strand.

```

      5    10    15    20    25    30    35    40    45    50
ORF:                                     M  V  G  D  D  S  G  G  F
Org: _____ ... ..G ... ..T ...
Opt: GGATC CGTCG ACGAA TTCTC TAGA ATG GTA GGT GAC GAT TCC GGA GGG TTT
      SallI  EcoRI

      55    60    65    70    75    80    85    90    95
ORF: S  T  T  V  S  T  E  Q  N  V  P  D  P  Q  V  G
Org: ..T ... ..A AG. ..A ..G ... ..T ... ..C ... ..T ..A ... ..T
Opt: AGC ACT ACG GTG TCC ACC GAA CAA AAC GTG CCT GAT CCC CAG GTC GGA

     100   105   110   115   120   125   130   135   140   145
ORF: I  T  T  M  K  D  L  K  G  K  A  N  R  G  K  M
Org: ... ..C ..T ... ..G ... ..T ..G ..C ..G ... ..C ..G ..T ... ..
Opt: ATA ACG ACA ATG AAA GAT CTG AAA GGG AAA GCG AAT CGT GGC AAA ATG

```

```

150 155 160 165 170 175 180 185 190 195
ORF: D V S G V Q A P V G A I T T I E
Org: ... .. TCG ..G ..G ... ..T ... ..G ..A ... ..C ..T ..T ..G
Opt: GAC GTG AGT GGC GTT CAG GCA CCG GTA GGT GCT ATC ACT ACC ATC GAA

200 205 210 215 220 225 230 235 240
ORF: D P V L A K K V P E T F P E L K
Org: ..C ..T ..A ... ..G ..A ..G ..G ..T ... ..C ... ..G ..G ..T ...
Opt: GAT CCG GTT TTG GCT AAG AAA GTT CCA GAA ACT TTT CCA GAA CTA AAG

245 250 255 260 265 270 275 280 285 290
ORF: P G E S R H T S D H M S I Y K F
Org: ..A ..T ..A AGT C.. ... ..G AGC ..C ... ..T ... ..C
Opt: CCT GGC GAG TCC AGA CAT ACC TCA GAT CAT ATG AGT ATC TAC AAG TTT

295 300 305 310 315 320 325 330 335
ORF: M G R S H F L C T F T F N S N N
Org: ... ..G ..G ... ..C AGT ..T ..T
Opt: ATG GGT CGT AGC CAC TTT CTC TGC ACG TTC ACC TTC AAT TCC AAC AAC

340 345 350 355 360 365 370 375 380 385
ORF: K E Y T F P I T L S S T S N P P
Org: ... ..A ..C ..A ... ..A ..C ..G C.. AGT ..T ..G ..C ... ..G ..G
Opt: AAA GAG TAT ACG TTT CCG ATA ACC TTA TCA AGC ACT TCG AAT CCT CCA

390 395 400 405 410 415 420 425 430 435
ORF: H G L P S T L R W F F N L F Q L
Org: ... ..T ..A ... TCG ... T.. A.A ... ... ..T.A ..T ..G ..G
Opt: CAT GGC CTT CCG AGT ACA CTG CGC TGG TTC TTT AAT CTG TTC CAA CTC

440 445 450 455 460 465 470 475 480
ORF: Y R G P L D L T I I I T G A T D
Org: ..C C.. ..C ..A T.A ... C.. ..A ... ..C ..C ..A ... ..T ..G ..T
Opt: TAT AGA GGT CCG CTG GAT TTG ACC ATC ATT ATT ACC GGT GCG ACA GAC

485 490 495 500 505 510 515 520 525 530
ORF: V D G M A W F T P V G L A V D T
Org: ..G ... ..A ... ..G ... ..T ..G ... ... T.. ..A ..G ..C ..T
Opt: GTT GAC GGG ATG GCC TGG TTT ACA CCC GTC GGT CTG GCT GTC GAT ACC

535 540 545 550 555 560 565 570 575
ORF: P W V E K E S A L S I D Y K T A
Org: ..C ... ..A ..A ... ..A ..T ... T.G ..T ... ..T ..T ... ..T ..G
Opt: CCT TGG GTG GAG AAA GAG TCA GCG CTT AGC ATC GAC TAC AAA ACA GCA

```

580 585 590 595 600 605 610 615 620 625
 ORF: L G A V R F N T R R T G N I Q I
 Org: T.A ..C ..T ..A A.. ..T ..C ..C A.G ..A ..GCA
 Opt: CTG GGT GCC GTT CGA TTC AAT ACA CGT CGC ACA GGC AAT ATT CAG ATT

630 635 640 645 650 655 660 665 670 675
 ORF: R L P W Y S Y L Y A V S G A L D
 Org: A.AC AGC ... T.. ..T ..G ..A TC. ..C ..G C.T ..C
 Opt: CGC CTT CCG TGG TAT TCA TAT CTA TAC GCA GTT AGC GGA GCC TTA GAT

680 685 690 695 700 705 710 715 720
 ORF: G L G D K T D S T F G L V S I Q
 Org: ..A ..A ..TG ..C ..T TCG ..A ..C ..G ..T ..A AGCA
 Opt: GGC CTG GGA GAC AAA ACG GAC AGT ACT TTT GGT CTG GTG TCG ATA CAG

725 730 735 740 745 750 755 760 765 770
 ORF: I A N Y N H S D E Y L S F S C Y
 Org: ..C ..T ..TT ..T TCA ..CC.C TCG ..C TC. ..C ...
 Opt: ATT GCC AAC TAC AAC CAC ACG GAT GAA TAC TTA AGT TTT AGT TGT TAT

775 780 785 790 795 800 805 810 815
 ORF: L S V T E Q S E F Y F P R A P L
 Org:T ..T ..C ..G ..A AGT ..ATC C.CG
 Opt: CTG AGC GTG ACT GAA CAG TCG GAG TTC TAC TTT CCT AGG GCA CCG CTG

820 825 830 835 840 845 850 855 860 865
 ORF: N S N A M L S T E S M M S R I A
 Org: ..T ..C ..C ..T ... C.T TCA ..C ... AGT AGCG
 Opt: AAC TCT AAT GCG ATG TTG AGT ACG GAA TCA ATG ATG TCA AGG ATT GCT

870 875 880 885 890 895 900 905 910 915
 ORF: A G D L E S S V D D P R S E E D
 Org:C ..C C..A ..AC ..C ..CT ..GC
 Opt: GCA GGG GAT TTG GAA TCT TCT GTA GAT GAT CCA CGG TCC GAA GAG GAT

920 925 930 935 940 945 950 955
 ORF: K R F E !
 Org: ... A.A ..C ..A _____
 Opt: AAG CGG TTT GAG TGA TAAAA GCTTC TCGAG GCGGC CGCGA GCTC

HindIII XhoI NotI

1.1.1 Restriction table

Enzyme	Recognition	Frequency	Positions
EcoRI	g'aatt_c	1	12
HindIII	a'agct_t	1	933
NotI	gc'ggcc_gc	1	945
Sall	g'tcga_c	1	6
XhoI	c'tcga_g	1	939

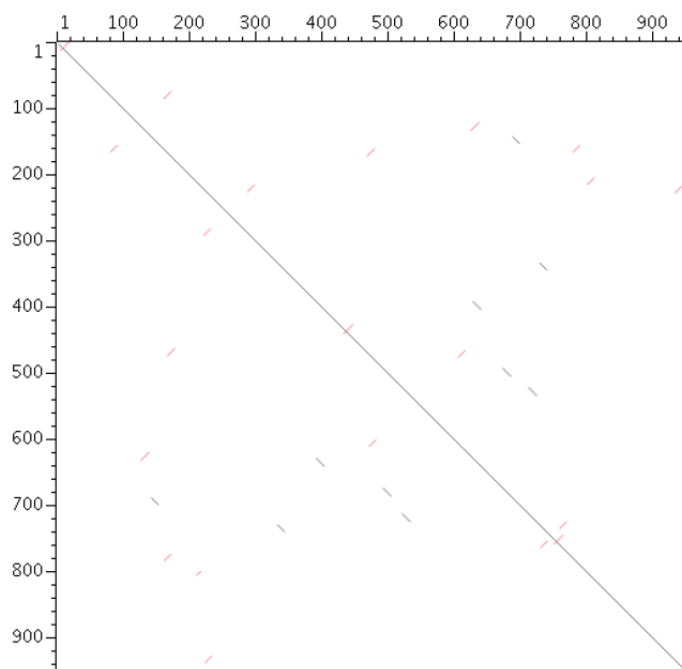
1.1.2 Enzymes that cut five or fewer times

Enzyme	Recognition	Frequency	Positions
EcoRI	g'aatt_c	1	12
HindIII	a'agct_t	1	933
NotI	gc'ggcc_gc	1	945
Sall	g'tcga_c	1	6
XhoI	c'tcga_g	1	939

1.1.3 Enzymes that do not cut

EcoRV, KpnI, NheI

1.2 Dotplot



1.3 ORFs

The gene was optimized using the following ORF(s). Please note that sequence positions are given relative to the continuous DNA sequence defined by all ORFs:

ORF: 25-930

2 Optimized parameters

2.1 Codon tandem repeats

Number of codon tandem repeats:

Original sequence: 8

Optimized sequence: 5

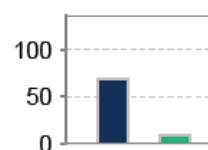
Position	Number of repeats
[309]	2
[438]	2
[825]	2
[858]	2
[867]	2

2.2 Codon Usage

This is a comparison of the codon frequency of the original sequence vs. the optimized sequence. As a reference, the codon usage of the target organism is included. The charts indicate the sum of the deviation from the target codon usage, for the original and the optimized sequence. Lower bars indicate a better match with the target codon usage.

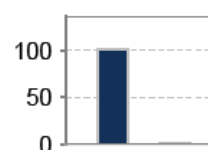
2.2.1 A - Alanine:

Codon	Original	Target	Optimized
GCU	35.3 %	22.0 %	23.5 %
GCC	0.0 %	25.0 %	23.5 %
GCA	17.6 %	27.0 %	29.4 %
GCG	47.1 %	26.0 %	23.5 %



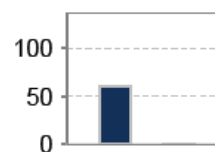
2.2.2 C - Cysteine:

Codon	Original	Target	Optimized
UGU	0.0 %	51.0 %	50.0 %
UGC	100.0 %	49.0 %	50.0 %

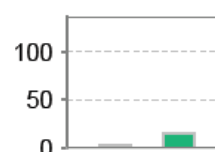


2.2.3 D - Aspartic acid:

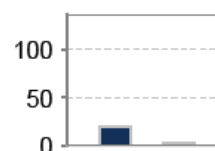
Codon	Original	Target	Optimized
GAU	35.0 %	65.0 %	65.0 %
GAC	65.0 %	35.0 %	35.0 %

**2.2.4 E - Glutamic acid:**

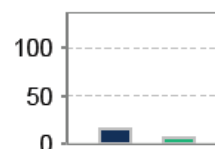
Codon	Original	Target	Optimized
GAA	62.5 %	64.0 %	56.2 %
GAG	37.5 %	36.0 %	43.8 %

**2.2.5 F - Phenylalanine:**

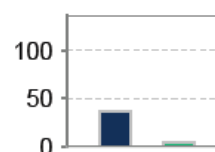
Codon	Original	Target	Optimized
UUU	52.9 %	63.0 %	64.7 %
UUC	47.1 %	37.0 %	35.3 %

**2.2.6 G - Glycine:**

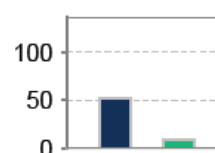
Codon	Original	Target	Optimized
GGU	40.9 %	33.0 %	36.4 %
GGC	27.3 %	29.0 %	27.3 %
GGA	18.2 %	19.0 %	18.2 %
GGG	13.6 %	19.0 %	18.2 %

**2.2.7 H - Histidine:**

Codon	Original	Target	Optimized
CAU	80.0 %	62.0 %	60.0 %
CAC	20.0 %	38.0 %	40.0 %

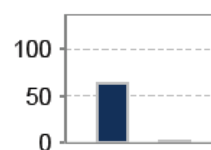
**2.2.8 I - Isoleucine:**

Codon	Original	Target	Optimized
AUU	21.4 %	47.0 %	42.9 %
AUC	57.1 %	31.0 %	35.7 %
AUA	21.4 %	22.0 %	21.4 %

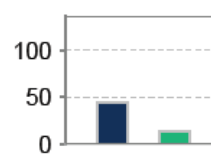


2.2.9 K - Lysine:

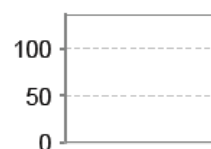
Codon	Original	Target	Optimized
AAA	38.5 %	70.0 %	69.2 %
AAG	61.5 %	30.0 %	30.8 %

**2.2.10 L - Leucine:**

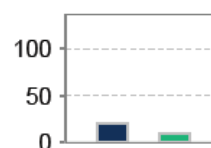
Codon	Original	Target	Optimized
UUA	16.7 %	17.0 %	12.5 %
UUG	16.7 %	13.0 %	16.7 %
CUU	25.0 %	14.0 %	12.5 %
CUC	8.3 %	9.0 %	8.3 %
CUA	12.5 %	5.0 %	8.3 %
CUG	20.8 %	42.0 %	41.7 %

**2.2.11 M - Methionine:**

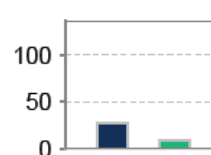
Codon	Original	Target	Optimized
AUG	100.0 %	100.0 %	100.0 %

**2.2.12 N - Asparagine:**

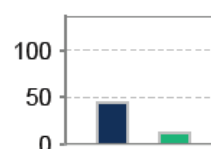
Codon	Original	Target	Optimized
AAU	69.2 %	59.0 %	53.8 %
AAC	30.8 %	41.0 %	46.2 %

**2.2.13 P - Proline:**

Codon	Original	Target	Optimized
CCU	16.7 %	24.0 %	27.8 %
CCC	27.8 %	15.0 %	11.1 %
CCA	16.7 %	23.0 %	22.2 %
CCG	38.9 %	38.0 %	38.9 %

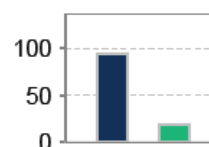
**2.2.14 Q - Glutamine:**

Codon	Original	Target	Optimized
CAA	57.1 %	35.0 %	28.6 %
CAG	42.9 %	65.0 %	71.4 %

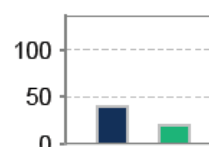


2.2.15 R - Arginine:

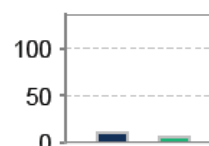
Codon	Original	Target	Optimized
CGU	0.0 %	29.0 %	23.1 %
CGC	7.7 %	26.0 %	23.1 %
CGA	23.1 %	8.0 %	7.7 %
CGG	23.1 %	14.0 %	15.4 %
AGA	30.8 %	13.0 %	15.4 %
AGG	15.4 %	10.0 %	15.4 %

**2.2.16 S - Serine:**

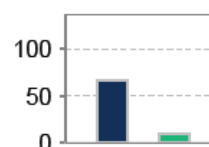
Codon	Original	Target	Optimized
UCU	9.7 %	18.0 %	9.7 %
UCC	9.7 %	13.0 %	16.1 %
UCA	12.9 %	18.0 %	19.4 %
UCG	16.1 %	11.0 %	9.7 %
AGU	32.3 %	18.0 %	22.6 %
AGC	19.4 %	22.0 %	22.6 %

**2.2.17 T - Threonine:**

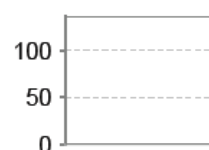
Codon	Original	Target	Optimized
ACU	22.2 %	21.0 %	22.2 %
ACC	25.9 %	31.0 %	29.6 %
ACA	25.9 %	24.0 %	25.9 %
ACG	25.9 %	24.0 %	22.2 %

**2.2.18 V - Valine:**

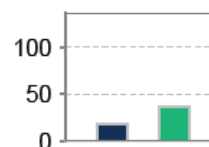
Codon	Original	Target	Optimized
GUU	5.6 %	31.0 %	33.3 %
GUC	11.1 %	19.0 %	16.7 %
GUA	44.4 %	19.0 %	16.7 %
GUG	38.9 %	31.0 %	33.3 %

**2.2.19 W - Tryptophan:**

Codon	Original	Target	Optimized
UGG	100.0 %	100.0 %	100.0 %

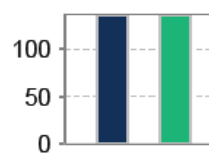
**2.2.20 Y - Tyrosine:**

Codon	Original	Target	Optimized
UAU	54.5 %	64.0 %	45.5 %
UAC	45.5 %	36.0 %	54.5 %



2.2.21 ! - Stop:

Codon	Original	Target	Optimized
UAA	0.0 %	58.0 %	0.0 %
UGA	100.0 %	32.0 %	100.0 %
UAG	0.0 %	10.0 %	0.0 %

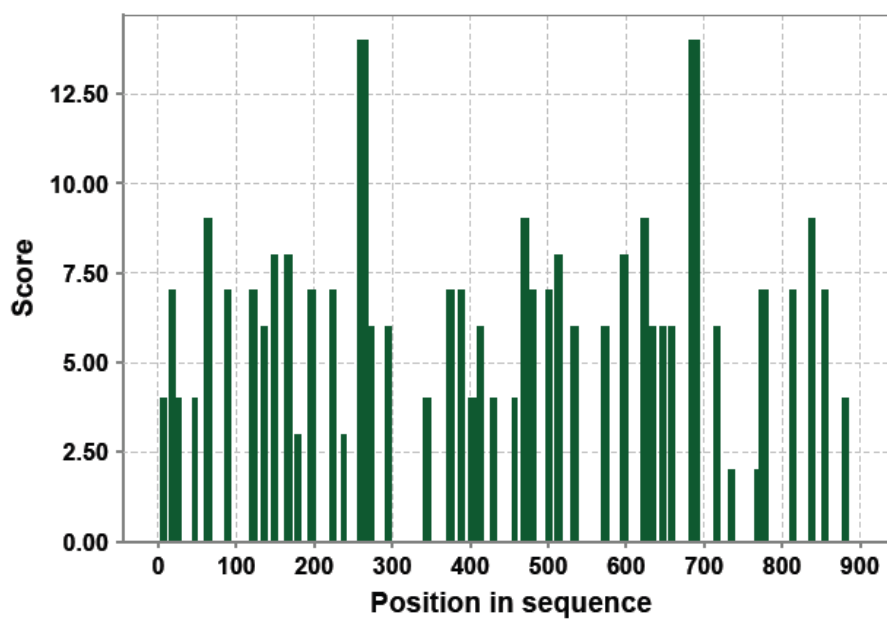


2.3 Secondary structure

In general, an extended secondary structure of the mRNA can interfere with the translation process. Therefore, the gene optimization tries to reduce the number and length of potential hairpin loops.

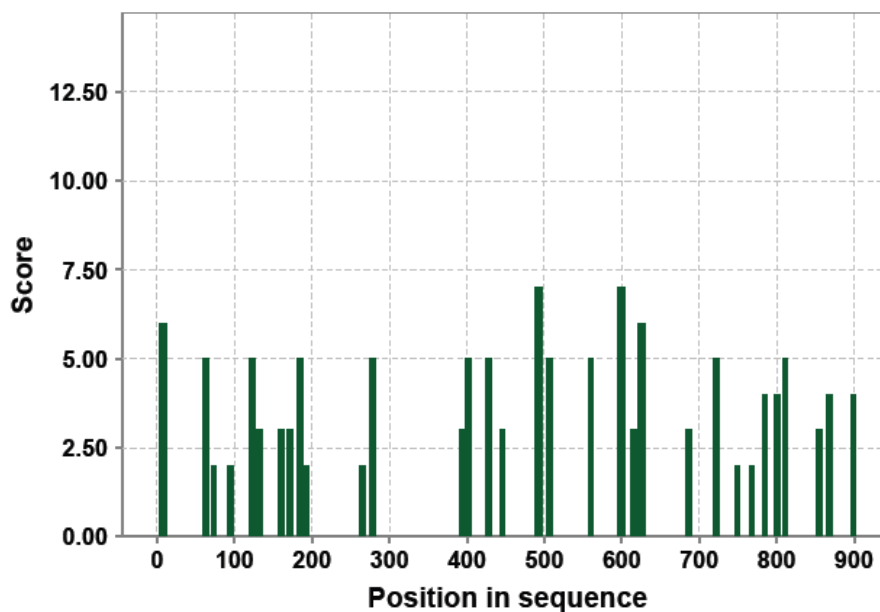
2.3.1 Original sequence

Number of helices	22
Average helix length	6.23
Maximum helix length	11
Average helix score	6.41



2.3.2 Optimized sequence

Number of helices	16
Average helix length	5.38
Maximum helix length	7
Average helix score	4.00



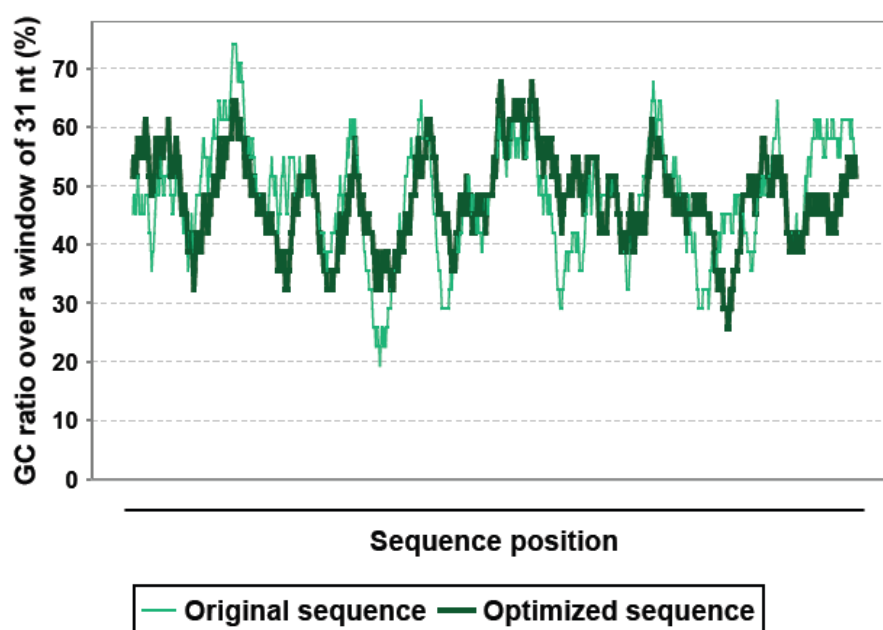
2.4 GC distribution

GC ratio over a window of 31 nt:

Original sequence: 48.01% (19.35% - 74.19%)

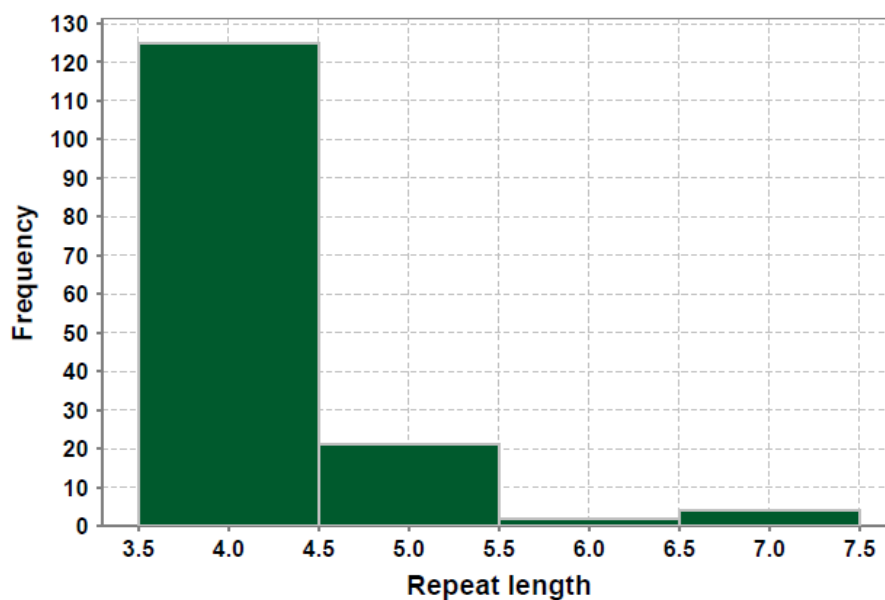
Optimized sequence: 47.90% (25.81% - 67.74%)

The number indicate the average GC content. The values in brackets indicate the interval containing 95% of all nucleotides if the GC content is averaged over a window of 11 nucleotides.



2.5 Long range repeats

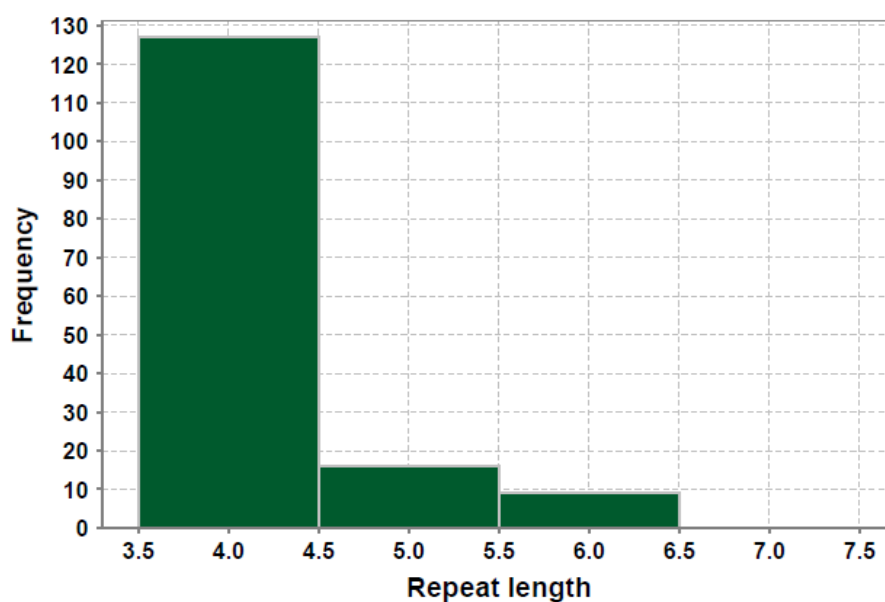
2.5.1 Original sequence



Number of repeats: 152

Longest repetitive sequence: 7 bases

2.5.2 Optimized sequence



Number of repeats: 152

Longest repetitive sequence: 6 bases



Optimization report

Created with Leto 1.0

1 General Information:

Gene: Poliproteína_truncada_Hav_Euk
 Optimization requested by:
 Date: Apr 3, 2009
 Operator: rdhalia
 Target organism: Homo sapiens Cut_off 50%
 Optimization iteration: 1
 Length: 3279 bp

1.1 Sequence

Below the original sequence and optimized sequence are listed, labelled with 'Org:' and 'Opt:' respectively. Where both are identical, the original sequence contains dots instead of nucleotides ('.'). Where the original sequence was locked against editing, it contains underscores ('_'). The names of the restriction enzymes start at the first nucleotide after the restriction cut in the forward strand.

```

      5    10    15    20    25    30    35    40    45    50
ORF:                M  E  L  E  M  N  M  S  R  Q  G  I
Org:  _____  ... ..T ... TCT ... ..A ..C ...
Opt:  GTCGA CGCTA GCACC ATG GAA CTC GAG ATG AAC ATG AGC CGA CAG GGA ATC
      NcoI      XhoI
  
```

```

      55    60    65    70    75    80    85    90    95
ORF:  F  Q  T  V  G  S  G  L  D  H  I  L  S  L  A  D
Org:  ..T ... ..T ..T ... ..T ... T.A ... ..T ..C ..C TCA T.. ... ..C
Opt:  TTC CAA ACC GTG GGC AGC GGA CTG GAC CAC ATA CTG AGC CTG GCT GAT
  
```

```

     100   105   110   115   120   125   130   135   140   145
ORF:  I  E  E  E  Q  M  I  Q  S  V  D  R  T  A  V  T
Org:  ..T ..A ..A ... ..T ... ..T ..G ..T A.A ..A ..A ..T ..T
Opt:  ATC GAG GAG GAA CAG ATG ATC CAG AGC GTT GAC CGG ACT GCT GTG ACA
  
```

```

      150   155   160   165   170   175   180   185   190   195
ORF:  G  A  S  Y  F  T  S  V  D  Q  S  S  V  H  T  A
Org:  ..C ... ..T ..T ..C ..G TCA ..A ... ..A ... TCA ..T ..T ..A ..A
Opt:  GGA GCC AGC TAC TTT ACA AGC GTG GAC CAG AGC AGC GTC CAC ACT GCT

```

```

      200   205   210   215   220   225   230   235   240
ORF:  E  V  G  S  H  Q  V  E  P  L  R  T  S  V  D  K
Org:  ... ..A ..G TCG ..T ..A ..C ..G ..T ..T ..G ... TCG ..T ... ..G
Opt:  GAG GTG GGC AGC CAC CAG GTG GAA CCG CTG AGA ACT AGC GTG GAC AAA

```

```

      245   250   255   260   265   270   275   280   285   290
ORF:  P  G  S  K  K  T  Q  G  E  K  F  F  L  I  H  S
Org:  ..T ..G TCT ... ..G ..G ..A ..A ..G ..A ... ..C ... ..T
Opt:  CCA GGC AGC AAG AAA ACC CAG GGT GAA AAG TTC TTT CTG ATA CAC AGC

```

```

      295   300   305   310   315   320   325   330   335
ORF:  A  D  W  L  T  T  H  A  L  F  H  E  V  A  K  L
Org:  ... ..T ..G ..T ... ..C T.A ... ..T ... ..T ..A ... T.A
Opt:  GCC GAC TGG CTG ACT ACC CAT GCG CTG TTT CAC GAG GTG GCC AAG CTG

```

```

      340   345   350   355   360   365   370   375   380   385
ORF:  D  V  V  K  L  L  Y  N  E  Q  F  A  V  Q  G  L
Org:  ..C ..T ..T ..A T.. ..A ... ..C ..A ..T ..G ..A ..T
Opt:  GAT GTG GTG AAG CTG CTG TAC AAC GAA CAG TTT GCC GTC CAA GGC CTG

```

```

      390   395   400   405   410   415   420   425   430   435
ORF:  L  R  Y  H  T  Y  A  R  F  G  I  E  I  Q  V  Q
Org:  ... ..G ..C ..T ... ..A ..A ... ..A ... ..A ... ..T ...
Opt:  CTG CGC TAT CAC ACC TAC GCC AGG TTC GGA ATT GAG ATT CAA GTG CAG

```

```

      440   445   450   455   460   465   470   475   480
ORF:  I  N  P  T  P  F  Q  Q  G  G  L  I  C  A  M  V
Org:  ... ..T ..C ..T ... ..A ... ..A ..T T.. ..A ... ..G ... ..A
Opt:  ATC AAC CCA ACC CCT TTC CAG CAG GGC GGC CTG ATC TGC GCC ATG GTT

```

NcoI

```

      485   490   495   500   505   510   515   520   525   530
ORF:  P  G  D  Q  S  Y  G  S  I  A  S  L  T  V  Y  P
Org:  ..T ..G ..C ..A TCT ... ..T ... ..G TCT ... ..G ..T ..C ..C
Opt:  CCA GGT GAT CAG AGC TAC GGT AGC ATA GCA AGC CTG ACA GTG TAT CCA

```



```

      535   540   545   550   555   560   565   570   575
ORF:  H   G   L   L   N   C   N   I   N   N   V   V   R   I   K   V
Org:  ..T ... ..A ..T ..C ... ..T ... ..T ... ..T ..A C.T ..A ... ..G
Opt:  CAC GGA CTG CTG AAT TGC AAC ATC AAC AAC GTG GTG AGG ATC AAG GTC

      580   585   590   595   600   605   610   615   620   625
ORF:  P   F   I   Y   T   R   G   A   Y   H   F   K   D   P   Q   Y
Org:  ..C ... ... ..T ... C.C ... ..G ... ..T ... ... ..C ..A ... ..C
Opt:  CCT TTC ATC TAC ACG AGG GGC GCC TAC CAC TTC AAG GAT CCC CAG TAT

      630   635   640   645   650   655   660   665   670   675
ORF:  P   V   W   E   L   T   I   R   V   W   S   E   L   N   I   G
Org:  ..G ... ... ..G ..A ... ..T ..A ..C ... TCA ..A ... ... ..A
Opt:  CCA GTG TGG GAA CTG ACG ATC AGG GTG TGG AGT GAG CTG AAC ATC GGG

      680   685   690   695   700   705   710   715   720
ORF:  T   G   T   S   A   Y   T   S   L   N   V   L   A   R   F   T
Org:  ..G ..T ... ..T ... ... ..T TCA T.A ... ..T T.. ..T ... ..T ..C
Opt:  ACA GGC ACA AGC GCC TAC ACA AGC CTG AAT GTG CTG GCC AGG TTC ACA

      725   730   735   740   745   750   755   760   765   770
ORF:  D   L   E   L   H   G   L   T   P   L   S   T   Q   M   M   R
Org:  ... ..A ..C ... C.T ... ..A ... ..T ..G C.C ... ..A ... ... C.A
Opt:  GAC CTG GAA CTG CAT GGA CTG ACG CCC TTG AGC ACC CAG ATG ATG AGG

      775   780   785   790   795   800   805   810   815
ORF:  N   E   F   R   V   S   T   T   E   N   V   V   N   L   S   N
Org:  ... ..A ..T A.G ..C ..C ... ... ..C ..C ... ... ..T ...
Opt:  AAC GAG TTC CGT GTG AGT ACC ACT GAG AAT GTG GTG AAC CTG AGC AAC

      820   825   830   835   840   845   850   855   860   865
ORF:  Y   E   D   A   R   A   K   M   S   F   A   L   D   Q   E   D
Org:  ... ..A ..C ... C.T ... ..A ... ..T ..C ... ..T ... ...
Opt:  TAC GAG GAT GCA AGA GCA AAG ATG AGC TTT GCG CTG GAC CAG GAG GAC

      870   875   880   885   890   895   900   905   910   915
ORF:  W   K   S   D   P   S   Q   G   G   G   I   K   I   T   H   F
Org:  ... ..G ... ... ..TCT ..A ... ..G ..T ..T ... ... ..G ..T ..C
Opt:  TGG AAA TCT GAC CCC AGC CAG GGG GGC GGC ATC AAG ATT ACA CAC TTT

      920   925   930   935   940   945   950   955   960
ORF:  T   T   W   T   S   I   P   T   L   A   A   Q   F   P   F   N
Org:  ... ... ..G AGC ..A ..G ..T ..T ... ..A ..A ..C ... ..T ...
Opt:  ACA ACC TGG ACA TCA ATC CCT ACC CTG GCT GCG CAG TTT CCT TTC AAC

```

```

          965    970    975    980    985    990    995    1000    1005    1010
ORF:  A  S  D  S  V  G  Q  Q  I  K  V  I  P  V  D  P
Org:  ..G TCG ... ..C ..T ..C ..A ..A ... ..A ... ..A ..A ..C ..C ..A
Opt:  GCC AGT GAC AGT GTG GGG CAG CAG ATC AAG GTG ATC CCC GTG GAT CCC

```

```

          1015    1020    1025    1030    1035    1040    1045    1050    1055
ORF:  Y  F  F  Q  M  T  N  T  N  P  D  Q  K  C  I  T
Org:  ... ..T ... ..A ... ..C ... ..T ... ..T ... ..T ... ..T ..A ..A
Opt:  TAC TTC TTT CAG ATG ACT AAC ACC AAT CCA GAT CAG AAG TGC ATC ACC

```

```

          1060    1065    1070    1075    1080    1085    1090    1095    1100    1105
ORF:  A  L  A  S  I  C  Q  M  F  C  F  W  R  G  D  L
Org:  ..A ..G ..A TCC ..T ... ..T ... ..T ... ..T ... ..T ... ..T ...
Opt:  GCC CTT GCC AGT ATC TGT CAG ATG TTC TGT TTC TGG AGG GGT GAC CTG

```

```

          1110    1115    1120    1125    1130    1135    1140    1145    1150    1155
ORF:  V  F  D  F  Q  V  F  P  T  K  Y  H  S  G  R  L
Org:  ... ..T ..T ... ..A ..T ... ..G ..A ..T ... ..A ..G T..
Opt:  GTC TTC GAC TTC CAG GTG TTC CCG ACC AAG TAC CAC AGC GGG AGA CTG

```

```

          1160    1165    1170    1175    1180    1185    1190    1195    1200
ORF:  L  F  C  F  V  P  G  N  E  L  I  D  V  S  G  I
Org:  T.A ... ..A ..C ..A ..C ..G ... ..T ..T ..A ..T ... ..T
Opt:  CTG TTC TGC TTT GTG CCA GGG AAT GAA CTG ATC GAC GTG AGC GGC ATC

```

```

          1205    1210    1215    1220    1225    1230    1235    1240    1245    1250
ORF:  T  L  K  Q  A  T  T  A  P  C  A  V  M  D  I  T
Org:  ..C T.A ... ..T ..G ..C ... ..G ... ..T ... ..T ... ..T ... ..C
Opt:  ACG CTG AAG CAA GCA ACA ACT GCA CCC TGT GCT GTT ATG GAT ATC ACT

```

```

          1255    1260    1265    1270    1275    1280    1285    1290    1295
ORF:  G  V  Q  S  T  L  R  F  R  V  P  W  I  S  D  T
Org:  ..G ..C ..G AG. ... T.. ..G ..T C.T ... ..G ... ..C TC. ..T ..G
Opt:  GGC GTG CAA TCT ACA CTG CGC TTC AGA GTT CCT TGG ATT AGC GAC ACC

```

```

          1300    1305    1310    1315    1320    1325    1330    1335    1340    1345
ORF:  P  Y  R  V  N  R  Y  T  K  S  A  H  Q  K  G  E
Org:  ..G ..T C.C ..C ..T A.G ..T ..T ... TCG ..C ..T ..G ... ..G ..A
Opt:  CCA TAC AGG GTG AAC CGT TAC ACC AAA AGC GCA CAC CAA AAG GGA GAG

```

```

          1350    1355    1360    1365    1370    1375    1380    1385    1390    1395
ORF:  Y  T  A  I  G  K  L  I  V  Y  C  Y  N  R  L  T
Org:  ... ..A ... ..T ..A ..C ..T ..A ..T ... ..T C.T T.A ..C
Opt:  TAC ACC GCT ATC GGG AAG CTG ATA GTT TAC TGT TAC AAC AGA CTG ACA

```

1400 1405 1410 1415 1420 1425 1430 1435 1440
 ORF: S P S N V A S H V R V N V Y L S
 Org: TCT ..A TCTT ... TCT ..T ..C C.ACT
 Opt: AGC CCT AGC AAC GTG GCC AGC CAC GTG AGG GTG AAC GTG TAT CTG AGC

1445 1450 1455 1460 1465 1470 1475 1480 1485 1490
 ORF: A I N L E C F A P L Y H A M D V
 Org:T ..T ..A ..A ..TG ..G ..C ..CTC
 Opt: GCT ATC AAC CTG GAG TGC TTC GCT CCC CTG TAT CAC GCC ATG GAT GTG

NcoI

1495 1500 1505 1510 1515 1520 1525 1530 1535
 ORF: T T Q V G D D S G G F S T T V S
 Org:GA ..T TCGT ..TT ..G ..A ...
 Opt: ACA ACC CAA GTG GGA GAC GAT AGC GGA GGA TTC AGT ACA ACC GTG AGC

1540 1545 1550 1555 1560 1565 1570 1575 1580 1585
 ORF: T E Q N V P D P Q V G I T T M K
 Org: ..AA T ..T ..A ..C ..T T ..TG
 Opt: ACC GAG CAG AAT GTG CCC GAC CCC CAG GTG GGC ATA ACC ACC ATG AAA

1590 1595 1600 1605 1610 1615 1620 1625 1630 1635
 ORF: D L K G K A N R G K M D V S G V
 Org:TG ..G ..C C..A TCG ..G ..G
 Opt: GAT CTG AAG GGC AAA GCC AAT AGG GGT AAG ATG GAC GTG AGC GGT GTT

1640 1645 1650 1655 1660 1665 1670 1675 1680
 ORF: Q A P V G A I T T I E D P V L A
 Org:T ..GCTC ..T ..A T.. ..G
 Opt: CAG GCA CCA GTG GGA GCT ATC ACT ACT ATC GAG GAT CCA GTT CTG GCC

1685 1690 1695 1700 1705 1710 1715 1720 1725 1730
 ORF: K K V P E T F P E L K P G E S R
 Org: ..A ..G ..G ..T ..AT ..GTA ..TT C.A
 Opt: AAG AAA GTT CCC GAG ACC TTC CCC GAG CTG AAG CCC GGC GAA AGC AGG

1735 1740 1745 1750 1755 1760 1765 1770 1775
 ORF: H T S D H M S I Y K F M G R S H
 Org: ..T ..GT ... AGT ..TG C..
 Opt: CAC ACC AGC GAC CAC ATG TCA ATC TAC AAG TTC ATG GGC AGG AGC CAC

1780 1785 1790 1795 1800 1805 1810 1815 1820 1825
 ORF: F L C T F T F N S N N K E Y T F
 Org:CGA AGT ..T ..TA ..T
 Opt: TTT CTG TGC ACT TTC ACG TTC AAC TCC AAC AAC AAA GAA TAC ACT TTC

1830 1835 1840 1845 1850 1855 1860 1865 1870 1875
 ORF: P I T L S S T S N P P H G L P S
 Org: ..A ..C ..G ..A ..T ..T ..G TC.G ..GT ..A ..G ..G
 Opt: CCC ATA ACA CTG AGC AGC ACT AGC AAT CCC CCC CAT GGA CTG CCA TCA

NcoI

1880 1885 1890 1895 1900 1905 1910 1915 1920
 ORF: T L R W F F N L F Q L Y R G P L
 Org: ..A T.G A.AT ..T T.A C.A ..C ..A ..A
 Opt: ACT CTC CGC TGG TTC TTC AAC CTG TTT CAG CTG TAC AGG GGT CCC TTG

1925 1930 1935 1940 1945 1950 1955 1960 1965 1970
 ORF: D L T I I I T G A T D V D G M A
 Org:AA ..T ..TTAG
 Opt: GAT CTG ACT ATC ATC ATC ACT GGC GCC ACG GAC GTG GAC GGC ATG GCC

1975 1980 1985 1990 1995 2000 2005 2010 2015
 ORF: W F T P V G L A V D T P W V E K
 Org:TG ..C ..T T.G ..AT ..CA ..A ...
 Opt: TGG TTC ACT CCC GTG GGC CTT GCG GTG GAC ACA CCG TGG GTG GAG AAA

2020 2025 2030 2035 2040 2045 2050 2055 2060 2065
 ORF: E S A L S I D Y K T A L G A V R
 Org:G T.G ..T ..C ..T ..T ..AG T.A ..C ..T ..A ...
 Opt: GAA TCT GCC CTT AGC ATA GAC TAC AAG ACT GCC CTG GGA GCC GTG AGA

2070 2075 2080 2085 2090 2095 2100 2105 2110 2115
 ORF: F N T R R T G N I Q I R L P W Y
 Org: ..TC ..G ..A ..GT ..CA ..A ..TT
 Opt: TTC AAC ACG AGA CGG ACA GGC AAC ATA CAG ATC AGG CTG CCC TGG TAC

2120 2125 2130 2135 2140 2145 2150 2155 2160
 ORF: S Y L Y A V S G A L D G L G D K
 Org: ..C ..T T.A ..T ..G ..A TC. ..C ..G ..TA ..T
 Opt: AGT TAC CTG TAC GCA GTT AGC GGA GCC CTG GAC GGA CTG GGA GAC AAG

```

      2600   2605   2610   2615   2620   2625   2630   2635   2640
ORF:  E   I   A   G   L   V   R   K   N   L   V   Q   F   G   V   G
Org:  ..A ..A ..G ..T ..C ... C.A ..A ... T.A ..A ... ..T ..G
Opt:  GAG ATC GCT GGC CTG GTG AGG AAG AAC CTG GTT CAG TTC GGG GTG GGT

```

```

      2645   2650   2655   2660   2665   2670   2675   2680   2685   2690
ORF:  E   K   N   G   C   V   R   W   V   M   N   A   L   G   V   K
Org:  ... ..A ... ..A ..C ..C A.. ... ..A ..A ..A ..T ...
Opt:  GAA AAG AAC GGC TGT GTG CGG TGG GTG ATG AAC GCT CTG GGG GTG AAG

```

```

      2695   2700   2705   2710   2715   2720   2725   2730   2735
ORF:  D   D   W   L   L   V   P   S   H   A   Y   K   F   E   K   D
Org:  ..T ... ..C T.A ..C ..T AG. ... ..A ... ..T ... ..T
Opt:  GAC GAC TGG CTG CTG GTG CCC TCT CAC GCC TAC AAG TTC GAG AAA GAC

```

```

      2740   2745   2750   2755   2760   2765   2770   2775   2780   2785
ORF:  Y   E   M   M   E   F   Y   F   N   R   G   G   T   Y   Y   S
Org:  ... ..G ... ..T ..T ..C C.. ..T ... ..T ... ..T ...
Opt:  TAC GAA ATG ATG GAG TTC TAC TTC AAT AGG GGC GGG ACC TAC TAC AGC

```

```

      2790   2795   2800   2805   2810   2815   2820   2825   2830   2835
ORF:  I   S   A   G   N   V   V   I   Q   S   L   D   V   G   F   Q
Org:  ..T TCG ..C ... ..C ... ..T ..G TCT T.A ..C ... ..G ..C ..G
Opt:  ATC AGT GCA GGG AAT GTG GTG ATC CAA AGC CTG GAT GTC GGC TTT CAA

```

```

      2840   2845   2850   2855   2860   2865   2870   2875   2880
ORF:  D   V   V   L   M   K   V   P   T   I   P   K   F   R   D   I
Org:  ..C ..T ..C T.A ... ..G ..C ..C ... ..T ... ..T ...
Opt:  GAT GTG GTG CTG ATG AAA GTT CCG ACT ATC CCG AAG TTC AGA GAC ATT

```

```

      2885   2890   2895   2900   2905   2910   2915   2920   2925   2930
ORF:  T   Q   H   F   I   K   K   G   D   V   P   R   A   L   N   R
Org:  ..G ..A ... ..T ... ..A ..G ..G ... ..T ... ..C ..A ..A ..C C.C
Opt:  ACA CAG CAC TTC ATC AAG AAA GGC GAC GTG CCC CGT GCC CTG AAT AGG

```

```

      2935   2940   2945   2950   2955   2960   2965   2970   2975
ORF:  L   A   T   L   V   T   T   V   N   G   T   P   M   L   I   S
Org:  ..C ..T ..A T.A ..T ..G ..G ... ..T ..C ... ..T.. ... ..T
Opt:  CTG GCG ACC CTG GTG ACA ACA GTG AAC GGA ACG CCC ATG CTG ATC AGC

```

```

      2980   2985   2990   2995   3000   3005   3010   3015   3020   3025
ORF:  E   G   P   L   K   M   E   E   K   A   T   Y   V   H   K   K
Org:  ..G ... ..G ..T ... ..G ..A ..T ..T ... ..T ... ..T ...
Opt:  GAA GGT CCC CTC AAG ATG GAA GAA AAG GCG ACC TAC GTG CAC AAG AAG

```

```

3030 3035 3040 3045 3050 3055 3060 3065 3070 3075
ORF: N D G T T V D L T V D Q A W R G
Org: ... ..G ... ..A ... ..T ..G ..A ..T ..A ... .. C.A ..T
Opt: AAC GAC GGC ACC ACC GTG GAT CTG ACA GTG GAC CAG GCC TGG AGG GGC

```

```

3080 3085 3090 3095 3100 3105 3110 3115 3120
ORF: K G E G L P G M C G G A L V S S
Org: ..G ... ..C T.A ..A ..G ... ..T ... .. T.A ..T TCG ...
Opt: AAA GGA GAG GGA CTG CCG GGC ATG TGC GGT GGT GCA CTG GTG AGT TCC

```

```

3125 3130 3135 3140 3145 3150 3155 3160 3165 3170
ORF: N Q S I Q N A I L G I H V A G G
Org: ..C ..A TCG ..C ..A ..T ..G ..A ..C ..T ..C ..T ..C ..T ..T ..C
Opt: AAT CAG AGC ATA CAG AAC GCT ATC CTG GGG ATT CAC GTG GCG GGG GGT

```

```

3175 3180 3185 3190 3195 3200 3205 3210 3215
ORF: N S I L V A K L V T Q E M F Q N
Org: ... TCT ... ..A ..A ..A ..A ..T ..T ... ..A ... ..A ...
Opt: AAC AGC ATC CTG GTG GCC AAG CTG GTG ACG CAA GAG ATG TTC CAG AAC

```

```

3220 3225 3230 3235 3240 3245 3250 3255 3260 3265
ORF: I D K K I E S Q R I M K V E E F
Org: ... ..T ... ..A ..G TCT ... C.. ..A ... ..A ___ ___
Opt: ATA GAC AAG AAG ATC GAA AGC CAG AGG ATC ATG AAA GTG GAG GAA TTC

```

```

3270 3275
ORF: !
Org: ___ ___ ___
Opt: TGA TAAGG TACC

```

1.1.1 Restriction table

Enzyme	Recognition	Frequency	Positions
NcoI	c'catg_g	4	13, 475, 1480, 1859
XhoI	c'tcga_g	1	21

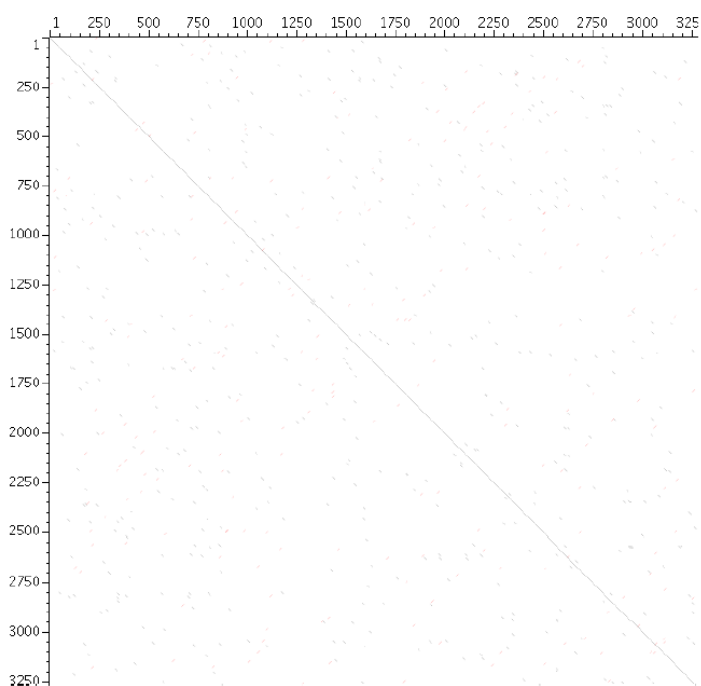
1.1.2 Enzymes that cut five or fewer times

Enzyme	Recognition	Frequency	Positions
NcoI	c'catg_g	4	13, 475, 1480, 1859
XhoI	c'tcga_g	1	21

1.1.3 Enzymes that do not cut

HindIII, NdeI, NotI, SacII, SpeI

1.2 Dotplot



1.3 ORFs

The gene was optimized using the following ORF(s). Please note that sequence positions are given relative to the continuous DNA sequence defined by all ORFs:

ORF: 16-3270

2 Optimized parameters

2.1 Codon tandem repeats

Number of codon tandem repeats:

Original sequence: 25

Optimized sequence: 39

Position	Number of repeats
[87]	2
[162]	2

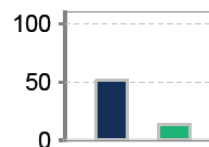
[327]	2
[336]	2
[369]	2
[438]	2
[444]	2
[522]	2
[540]	2
[546]	2
[747]	2
[786]	2
[876]	2
[966]	2
[1137]	2
[1500]	2
[1560]	2
[1641]	2
[1791]	2
[1824]	2
[1839]	2
[1872]	2
[1917]	3
[2307]	2
[2340]	2
[2349]	2
[2484]	3
[2676]	2
[2685]	2
[2730]	2
[2763]	2
[2787]	2
[2823]	2
[2931]	2
[2982]	2
[3006]	2
[3021]	2
[3087]	2
[3210]	2

2.2 Codon Usage

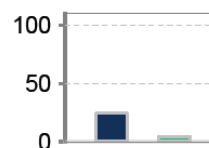
This is a comparison of the codon frequency of the original sequence vs. the optimized sequence. As a reference, the codon usage of the target organism is included. The charts indicate the sum of the deviation from the target codon usage, for the original and the optimized sequence. Lower bars indicate a better match with the target codon usage.

2.2.1 A - Alanine:

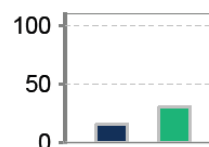
Codon	Original	Target	Optimized
GCU	25.8 %	26.0 %	21.0 %
GCC	14.5 %	40.0 %	46.8 %
GCA	32.3 %	22.0 %	21.0 %
GCG	27.4 %	12.0 %	11.3 %

**2.2.2 C - Cysteine:**

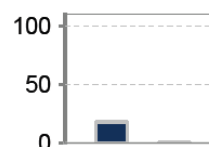
Codon	Original	Target	Optimized
UGU	57.1 %	45.0 %	42.9 %
UGC	42.9 %	55.0 %	57.1 %

**2.2.3 D - Aspartic acid:**

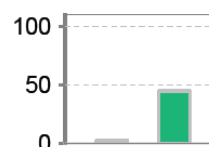
Codon	Original	Target	Optimized
GAU	38.2 %	46.0 %	30.9 %
GAC	61.8 %	54.0 %	69.1 %

**2.2.4 E - Glutamic acid:**

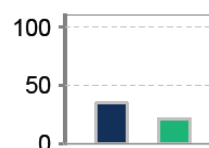
Codon	Original	Target	Optimized
GAA	50.9 %	42.0 %	42.1 %
GAG	49.1 %	58.0 %	57.9 %

**2.2.5 F - Phenylalanine:**

Codon	Original	Target	Optimized
UUU	47.3 %	46.0 %	23.6 %
UUC	52.7 %	54.0 %	76.4 %

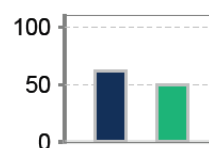
**2.2.6 G - Glycine:**

Codon	Original	Target	Optimized
GGU	33.3 %	16.0 %	16.7 %
GGC	20.5 %	33.0 %	39.7 %
GGA	20.5 %	25.0 %	28.2 %
GGG	25.6 %	26.0 %	15.4 %

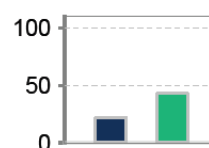


2.2.7 H - Histidine:

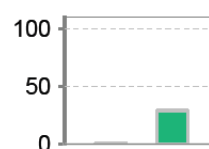
Codon	Original	Target	Optimized
CAU	72.0 %	41.0 %	16.0 %
CAC	28.0 %	59.0 %	84.0 %

**2.2.8 I - Isoleucine:**

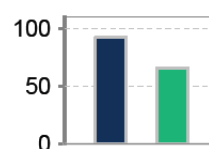
Codon	Original	Target	Optimized
AUU	27.1 %	35.0 %	13.6 %
AUC	44.1 %	47.0 %	67.8 %
AUA	28.8 %	18.0 %	18.6 %

**2.2.9 K - Lysine:**

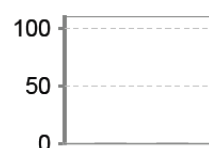
Codon	Original	Target	Optimized
AAA	42.9 %	43.0 %	28.6 %
AAG	57.1 %	57.0 %	71.4 %

**2.2.10 L - Leucine:**

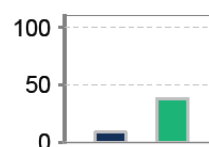
Codon	Original	Target	Optimized
UUA	22.2 %	0.0 %	0.0 %
UUG	15.6 %	12.0 %	3.3 %
CUU	20.0 %	13.0 %	4.4 %
CUC	12.2 %	19.0 %	3.3 %
CUA	13.3 %	0.0 %	0.0 %
CUG	16.7 %	56.0 %	88.9 %

**2.2.11 M - Methionine:**

Codon	Original	Target	Optimized
AUG	100.0 %	100.0 %	100.0 %

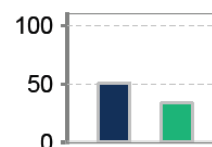
**2.2.12 N - Asparagine:**

Codon	Original	Target	Optimized
AAU	41.7 %	46.0 %	27.1 %
AAC	58.3 %	54.0 %	72.9 %

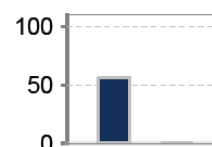


2.2.13 P - Proline:

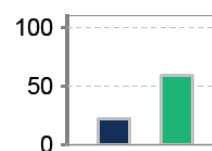
Codon	Original	Target	Optimized
CCU	21.8 %	28.0 %	16.4 %
CCC	25.5 %	32.0 %	47.3 %
CCA	14.5 %	27.0 %	21.8 %
CCG	38.2 %	13.0 %	14.5 %

**2.2.14 Q - Glutamine:**

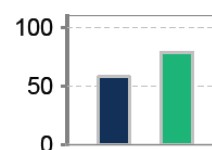
Codon	Original	Target	Optimized
CAA	54.0 %	26.0 %	26.0 %
CAG	46.0 %	74.0 %	74.0 %

**2.2.15 R - Arginine:**

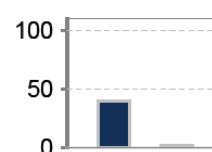
Codon	Original	Target	Optimized
CGU	11.1 %	8.0 %	6.7 %
CGC	15.6 %	18.0 %	8.9 %
CGA	17.8 %	10.0 %	4.4 %
CGG	17.8 %	20.0 %	6.7 %
AGA	20.0 %	21.0 %	26.7 %
AGG	17.8 %	23.0 %	46.7 %

**2.2.16 S - Serine:**

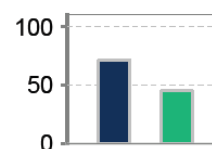
Codon	Original	Target	Optimized
UCU	17.9 %	18.0 %	4.8 %
UCC	8.3 %	21.0 %	3.6 %
UCA	11.9 %	15.0 %	8.3 %
UCG	14.3 %	0.0 %	0.0 %
AGU	28.6 %	14.0 %	11.9 %
AGC	19.0 %	32.0 %	71.4 %

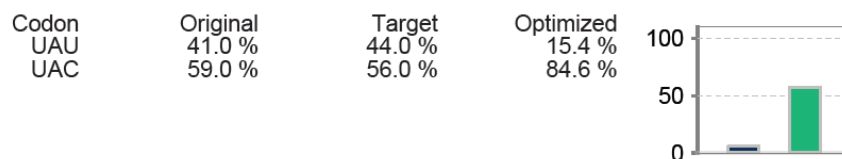
**2.2.17 T - Threonine:**

Codon	Original	Target	Optimized
ACU	22.0 %	24.0 %	24.4 %
ACC	25.6 %	35.0 %	35.4 %
ACA	19.5 %	28.0 %	28.0 %
ACG	32.9 %	13.0 %	12.2 %

**2.2.18 V - Valine:**

Codon	Original	Target	Optimized
GUU	29.1 %	18.0 %	12.8 %
GUC	22.1 %	23.0 %	5.8 %
GUA	24.4 %	0.0 %	0.0 %
GUG	24.4 %	59.0 %	81.4 %

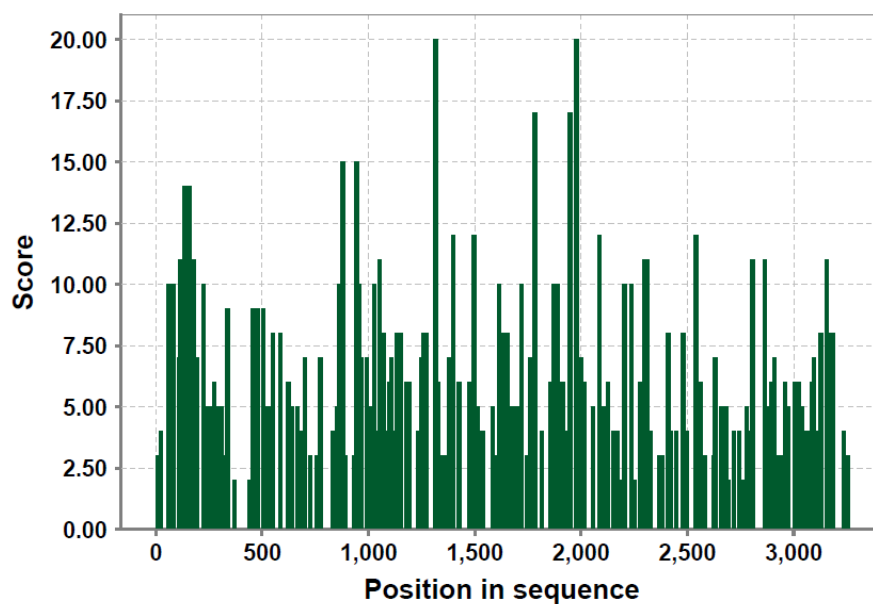


2.2.19 W - Tryptophan:**2.2.20 Y - Tyrosine:****2.2.21 ! - Stop:****2.3 Secondary structure**

In general, an extended secondary structure of the mRNA can interfere with the translation process. Therefore, the gene optimization tries to reduce the number and length of potential hairpin loops.

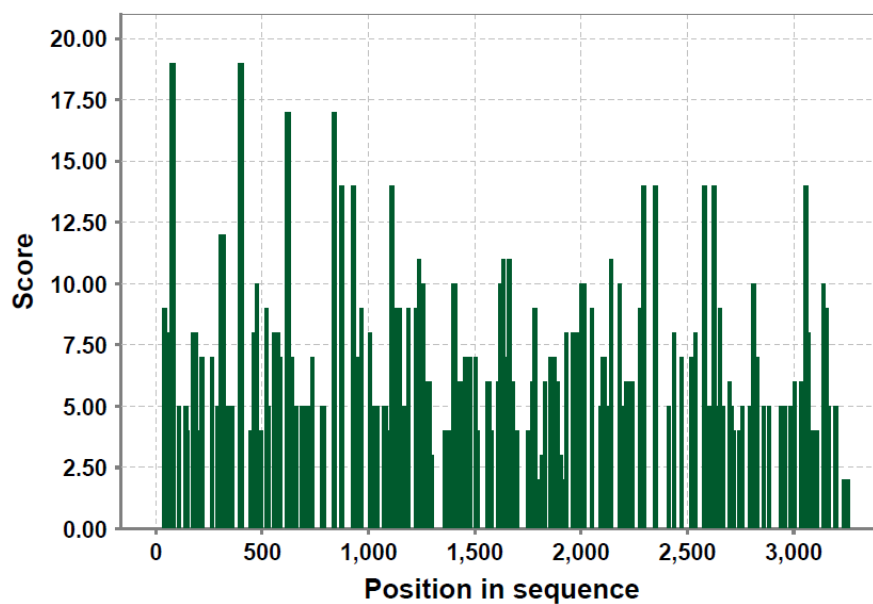
2.3.1 Original sequence

Number of helices	80
Average helix length	6.36
Maximum helix length	11
Average helix score	6.59



2.3.2 Optimized sequence

Number of helices	78
Average helix length	6.26
Maximum helix length	11
Average helix score	7.03



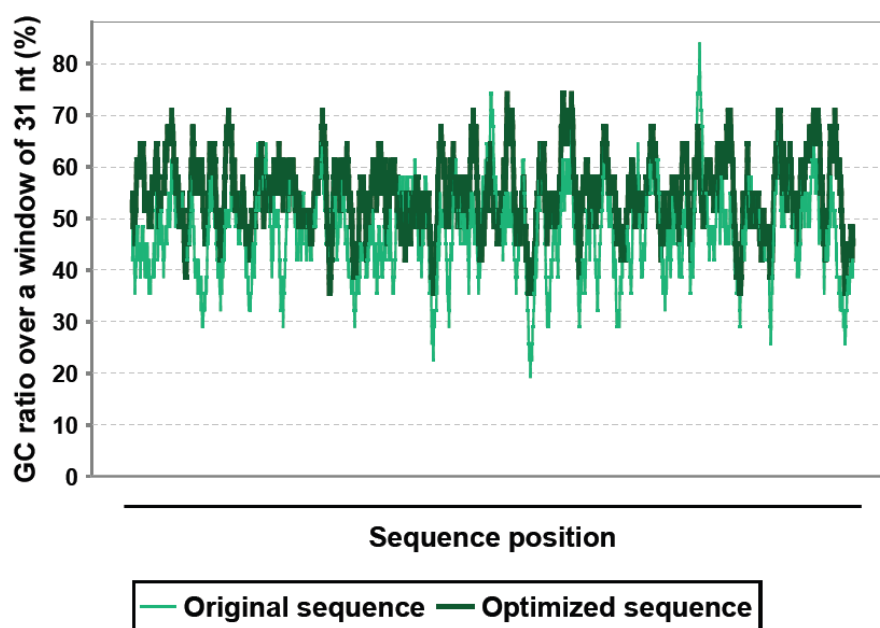
2.4 GC distribution

GC ratio over a window of 31 nt:

Original sequence: 47.62% (19.35% - 83.87%)

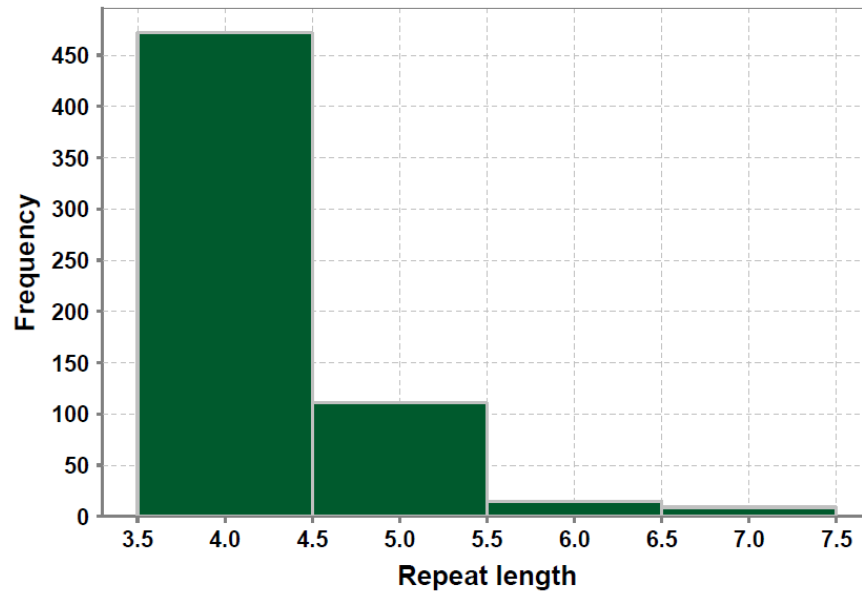
Optimized sequence: 54.59% (35.48% - 74.19%)

The number indicate the average GC content. The values in brackets indicate the interval containing 95% of all nucleotides if the GC content is averaged over a window of 11 nucleotides.



2.5 Long range repeats

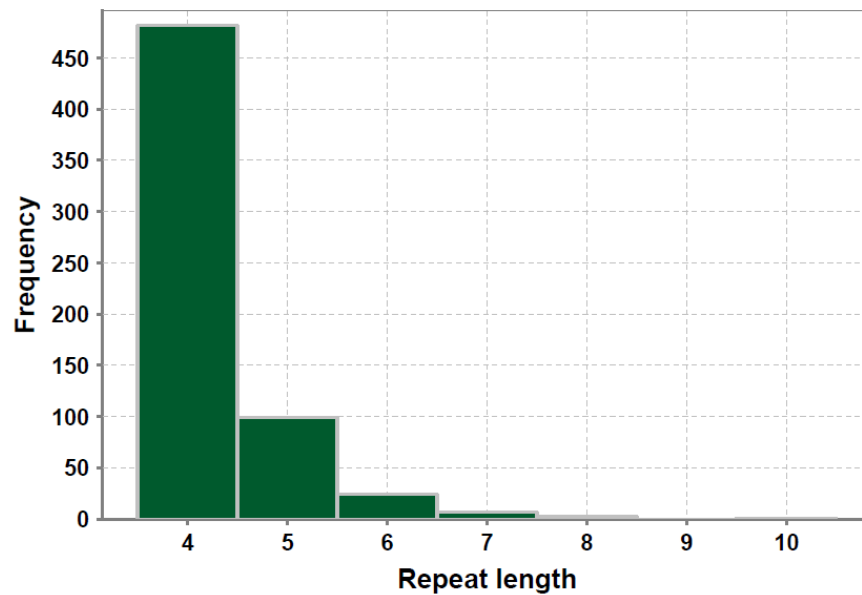
2.5.1 Original sequence



Number of repeats: 607

Longest repetitive sequence: 7 bases

2.5.2 Optimized sequence



Number of repeats: 616

Longest repetitive sequence: 10 bases

2.6 Secondary ORFs

During the optimization, secondary ORFs were removed. These are ORFs in the second or third frame or on the opposite strand. The removal was done by inserting stop codons by silent mutagenesis, or by changing start codons. The optimization tries to avoid secondary ORFs with more than 50 nucleotides.

2.6.1 Original sequence:

Number of secondary ORFs: 70
 Total length of sec. ORFs: 1213
 Number of ORFs with >50nt: 6

2.6.2 Optimized sequence:

Number of secondary ORFs: 55
 Total length of sec. ORFs: 1372
 Number of ORFs with >50nt: 3

2.7 Restriction sites

The table lists the unwanted restriction sites contained in the sequence, as well as their positions.

Enzyme	Positions in original sequence	Positions in optimized sequence
EcoRI	3	1
KpnI	3	0
NheI	0	0
Sall	3	0
XhoI	1	1

2.8 Cryptic splice sites

The following table shows possible splice sites in the specified sequence. The score is relative to the range between the best-scoring and worst-scoring splice sites in the training set.

2.8.1 Splice sites in original sequence

Type	Position	Relevance
Acceptor	51	Possible
Acceptor	117	Possible
Acceptor	352	Likely
Acceptor	699	Possible
Acceptor	1105	Likely
Acceptor	1299	Possible
Acceptor	1621	Possible
Acceptor	1788	Likely
Acceptor	1799	Possible
Acceptor	1928	Possible
Acceptor	2232	Likely
Acceptor	2400	Possible
Acceptor	2669	Likely
Acceptor	2818	Possible

Donor	149	Possible
Donor	183	Likely
Donor	465	Likely
Donor	561	Likely
Donor	701	Likely
Donor	768	Likely
Donor	1107	Likely
Donor	1246	Possible
Donor	1301	Possible
Donor	1518	Likely
Donor	1629	Very likely
Donor	1705	Likely
Donor	1968	Very likely
Donor	2169	Likely
Donor	2248	Possible
Donor	2346	Possible
Donor	2434	Likely
Donor	2450	Possible
Donor	2622	Likely
Donor	2711	Likely
Donor	2808	Likely
Donor	2838	Possible
Donor	2962	Possible
Donor	2968	Likely
Donor	3000	Possible
Donor	3058	Likely

2.8.2 Splice sites in optimized sequence

Type	Position	Relevance
Donor	183	Likely
Donor	198	Possible
Donor	395	Likely
Donor	546	Possible
Donor	978	Likely
Donor	1107	Likely
Donor	1176	Likely
Donor	2096	Likely
Donor	2169	Likely
Donor	2430	Likely
Donor	2595	Likely
Donor	2711	Likely