JACQUELINE MAZZUCHELLI DE SOUZA

**Clonagem e expressão do gene E6
do Papilomavírus Bovino do tipo 1**

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação Interunidades em
Biotecnologia USP/Instituto
Butantan/IPT, para obtenção do
Título de Mestre em Biotecnologia.

São Paulo
2013

JACQUELINE MAZZUCHELLI DE SOUZA

**CLONAGEM E EXPRESSÃO DO GENE E6
DO PAPILOMAVÍRUS BOVINO DO TIPO 1**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientadora: Dra. Rita de Cássia Stocco

Versão original.

São Paulo
2013

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Souza, Jacqueline Mazzuchelli de.

Clonagem e expressão do gene E6 do Papilomavírus bovino Tipo 1 /
Jacqueline Mazzuchelli de Souza. -- São Paulo, 2013.

Orientadora: Profa. Dra. Rita de Cassia Stocco.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de
Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em
Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan. Área de concentração:
Biotecnologia. Linha de pesquisa: Estudos sobre estrutura e função dos
Papilomavírus bovinos.

Versão do título para o inglês: Cloning and expression of bovine
Papillomavirus Type 1 E6 gene.

1. Oncologia veterinária 2. Bovinos 3. *Papovaviridae* 4. Oncoproteínas
5. Clonagem 6. Bioinformática I. Stocco, Profa. Dra. Rita de Cassia II.
Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa
de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto
Butantan III. Título.

ICB/SBIB075/2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Candidato(a): Jacqueline Mazzuchelli de Souza.

Título da Dissertação: Clonagem e expressão do gene E6 do Papilomavírus bovino
Tipo 1.

Orientador(a): Profa. Dra. Rita de Cassia Stocco.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../....., considerou

☐ **Aprovado(a)**

☐ **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO BUTANTAN

Av. Vital Brazil, 1500, CEP 05503-900, São Paulo, SP, Brazil
Telefone: (55) (011) 2627-9585 - Fax: (55) (011) 2627-9505
ceuaib@butantan.gov.br

São Paulo, 12 de novembro de 2012.

Protocolo: I-986/12

Dra. Rita de Cássia Stocco
Laboratório de Genética
Instituto Butantan

Referente Projeto: "Clonagem e Expressão do gene E6 do Papilomavírus Bovino tipo 1 e 2".

A Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan (CEUAIB) informa que o projeto acima referido é isento de análise por parte desta Comissão, pois não faz uso de animais vertebrados em sua execução.

Cordialmente,

Dr. Marcelo Larami Santoro
Coordenador da CEUAIB

A todos que me incentivaram, trouxeram-me paz e me fizeram sorrir.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela paz e às energias superiores que nos guiam.

Aos meus tios, Solange e Geraldo, pelo amor, cuidado, atenção e torcida. Às minhas “primas-irmãs” Adriana e Amanda, as quais, mesmo à distância, cuidaram de mim, mais do que eu mesma.

Às minhas famílias, mineira e prudentina, pelo incentivo e momentos de alegria.

À minha orientadora, Dra Rita, pela oportunidade, amizade, ensinamentos e por todos os momentos de amparo.

Ao meu co-orientador, Dr Rodrigo (Rods), por toda ajuda, ensinamento, paciência e amizade. Pela ajuda quando precisei que pelo menos segurasse minha mão.

À doce Carol Sabino por toda sua competência e calma, principalmente nos meus momentos de desespero.

Ao Dr Willy Beçak, pela inspiração.

À Dra Claudia Thompson, À Juliana Borges e ao Laboratório Nacional de Computação Científica, por me acolherem em Petrópolis e pela ajuda em Bioinformática, dando muito mais peso a esse trabalho.

Ao Dr Ronaldo Zucatelli e ao Dalton, por disponibilizarem o laboratório e pela ajuda.

À Dra Maria José e à Dra Adriana por não me deixarem desistir;

Ao Renato Ruiz, por todos os ensinamentos, amizade e por me ajudar profissional e pessoalmente;

A todos do laboratório e agregados, em especial: *Will*, pela diversão garantida; *Thati*, pela amizade e inúmeras vezes que me ouviu; *Dra Sueli*, pela atenção e torcida; *Rodrigo Araldi*, sempre disposto a ajudar e ouvir; *Fer Franzin*, pelas risadas e cafés; *Carla*, pelos momentos de desabafo; *Nara*, por me fazer chorar de rir; *Dona Zezinha*, pela competência e cumplicidade; *Oilita*, pelos ensinamentos; *Ivoni*, pelo trabalho indispensável ao bom funcionamento do laboratório; *Rosi*, pela torcida para que as coisas sempre melhorem; *Dilce*, pela ajuda em vários momentos; *Oilita*, pelo aprendizado e conversas, *Olga*, pela auxílio e *Gabi* pelas conversas no café.

Às minhas eternas amigas de Maria da Fé, pela segurança em saber que, mesmo longe, estavam sempre comigo.

Aos amigos de Alfenas, pelos raros, mas necessários mini-encontros. Ao Renato Gaiga por estar sempre presente, de alguma forma.

À minha amiga Cintia (Pitty), pelos bons momentos e cumplicidade. À Marina, pelo aprendizado. À Lola, por me ouvir mais que muita gente.

Aos amigos do Butantan e agregados, pelas festas, viagens, encontros e mensagens divertidas no celular.

Ao meu amigo Rodrigo Teixeira, pelos dois anos de turismo por São Paulo e conversas filosóficas.

A todos os amigos do teatro, os quais dão muito mais brilho à minha vida.

À CAPES pelo apoio financeiro e ao Instituto Butantan por permitir que esse trabalho fosse realizado.

“A dúvida é autora das insônias mais cruéis.”

Nelson Rodrigues

RESUMO

MAZZUCHELLI-DE-SOUZA, J. **Clonagem e expressão do gene E6 do Papilomavírus Bovino do tipo 1**. 2013. 130 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Atualmente, são descritos 13 tipos de Papilomavírus Bovino (BPV). O tipo 1 (BPV-1) causa fibropapilomas em seu hospedeiro natural (bovinos) e sarcóide em equinos. A papilomatose bovina se caracteriza por lesões na pele e mucosa (verrugas) associadas à expressão de oncoproteínas virais, principalmente E6 e E7. A expressão dessas oncoproteínas em sistema recombinante e sua purificação se torna atraente para estudo, pois possibilita a obtenção de insumos biotecnológicos, como anticorpos e vacinas. Como a melhor forma de prevenção ainda é a intensificação dos controles gerais de manejo há a necessidade do desenvolvimento de novas tecnologias vacinais e de diagnóstico. Dessa forma, os objetivos deste projeto foram a clonagem e expressão do gene E6 do BPV-1, obtendo a proteína alvo e analisar *in silico* a proteína recombinante E6 do BPV-1. Iniciadores foram sintetizados e utilizados para a amplificação do gene de interesse (E6-1). O amplificado foi purificado e ligado ao vetor de clonagem pCR4-TOPO, sendo clonado em *E. coli* DH5 α . Subsequentemente, foram realizadas a digestão, a ligação do inserto no vetor de expressão pET-28a(+) e subclonagem em *E. coli* BL21 (DE). Os plasmídeos foram purificados e sequenciados. Foram realizadas a indução da expressão gênica e lise celular para a obtenção da proteína recombinante, a qual foi submetida à eletroforese SDS-PAGE e “Western blot”. Foram realizadas análises *in silico* das sequências gênica e proteica. A sequência amplificada apresentou o tamanho esperado. A clonagem e a matriz correta de leitura foram confirmadas por sequenciamento. As análises *in silico* apontaram as mutações nas sequências gênica e proteica E6-1 em relação às sequências depositadas no banco de dados. Por homologia, foi realizada a predição tridimensional da estrutura da proteína recombinante. Através de ferramentas de bioinformática foram apontadas as regiões conservadas, antigênicas e as regiões potencialmente capazes de realizar ligações cátion- π . A microscopia eletrônica mostrou a formação de corpúsculos de inclusão. Foram obtidas proteínas purificadas com aproximadamente 15 kDa. Logo, a proteína recombinante E6 do BPV-1 foi obtida e purificada com sucesso possibilitando, juntamente com sua análise por bioinformática, o início de novos experimentos e estudos mais detalhados. Por fim, é visada a obtenção de produtos vacinais e diagnósticos.

Palavras-chave: Oncologia Veterinária. Bovinos. Papovaviridae. Oncoproteínas. Clonagem. Bioinformática.

ABSTRACT

MAZZUCHELLI-DE-SOUZA, J. **Cloning and expression of Bovine Papillomavirus type 1 E6 gene**. 2013. 130 p. Masters thesis (Biotechnology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Currently, 13 types of Bovine Papillomavirus (BPV) are described. Type 1 (BPV-1) causes fibropapillomas in its natural host (cattle) and sarcoid in equines. Bovine papillomatosis is characterized by mucosal and skin lesions (warts) associated with the expression of viral oncoproteins, E6 and E7 particularly. The expression of these oncoproteins in recombinant system and its purification becomes attractive to study because it enables the development of biotechnological inputs, such as antibodies and vaccines. As the best form of prevention is still intensifying general controls management developing of new vaccine and diagnostics technologies is necessary. Thus, the aim of this project was cloning and expression of BPV-1 E6 gene, obtaining and analyzing *in silico* BPV-1 E6 recombinant protein. Primers were synthesized and used to amplify the gene of interest (E6-1). Amplicon was purified, linked to cloning vector pCR4-TOPO and cloned into *E. coli* DH5 α . Thereafter, plasmid digestion was performed, insert was linked to expression vector pET-28a (+) and sub cloning into *E. coli* BL21 (DE). Plasmids were purified and sequenced. Induction of gene expression and cell lyses were performed to obtain the recombinant protein which was subjected to SDS-PAGE and Western blot. *In silico* analysis of gene and protein sequences were performed. The amplified sequence showed the expected size. Cloning and correct reading frame were confirmed by sequencing. *In silico* analysis showed mutations in E6-1 gene and protein sequences when there were compared to sequences available in current database. By homology, the prediction of three-dimensional structure of the recombinant protein was performed. Through bioinformatics tools conserved, antigenic and cation- π interaction regions were identified. Electron microscopy showed the inclusion bodies formation. Purified proteins were obtained with approximately 15 kDa. Therefore, BPV-1 E6 recombinant protein was obtained and successfully purified enabling with its analysis by bioinformatic new experiments and more detailed studies. Finally, it is aimed to obtain vaccine products and diagnostics.

Keywords: Veterinary Oncology. Bovines. Papovaviridae. Oncoproteins. Cloning. Bioinformatics.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Modelo estrutural do papilomavírus bovino.	25
Figura 2 - Representação diagramática da infecção do tecido epitelial estratificado por papilomavírus.	26
Figura 3 - Papilomatose bovina.	33
Figura 4 - Representação linear do genoma de BPV-1.	35
Figura 5 - Representação esquemática da proteína E6 de HPV-16.	37
Figura 6 - Abordagens da vacina terapêutica contra o HPV.	38
Figura 7 - Ângulos de torção da cadeia proteica principal.	41
Figura 8 - Mapa do plasmídeo pCR®4-TOPO®, Invitrogen.	49
Figura 9 - Mapa do plasmídeo pET-28a(+), Novagen.	50
Figura 10 - Amplificação e purificação do gene E6-1.	58
Figura 11 - Digestão plasmidial para liberação e purificação do inserto.	59
Figura 12 - Sequências nucleotídica e proteica de E6-1 recombinante.	60
Figura 13 - Microscopia eletrônica comparando bactérias <i>E. coli</i> BL21 (DE) não induzidas e induzidas por IPTG, transformadas com plasmídeo pET-28a, sem o gene de interesse (E6-1).	61
Figura 14 - Microscopia eletrônica comparando bactérias <i>E. coli</i> BL21 (DE3) transformadas com plasmídeo contendo o gene de interesse (E6-1/pET-28a), não induzidas e induzidas por IPTG.	62
Figura 15 - Indução da expressão da proteína E6-1 recombinante.	63
Figura 16 - SDS-PAGE da segunda purificação da proteína E6-1 recombinante após a diálise.	64
Figura 17 - Alinhamento entre as sequências nucleotídicas dos genes E6-1 recombinante e E6-1 referência (<i>accession number</i> X02346).	65

Figura 18 - Alinhamento entre as sequências de aminoácidos das proteínas E6-1 recombinante e E6-1 referência (<i>PDB codes</i> 3PY7).	66
Figura 19 - Gráfico de Ramachandran das correlações entre os ângulos phi (ϕ) e psi (ψ) do modelo 2, resultante da modelagem molecular comparativa por homologia	70
Figura 20 - Gráfico da análise do VERIFY-3D mostrando a confiabilidade dos modelos para a proteína E6-1 recombinante	72
Figura 21 - Gráfico da análise do VERIFY-3D para o modelo escolhido (modelo 2) da proteína E6-1 recombinante	72
Figura 22 - Estrutura tridimensional <i>in silico</i> das proteínas E6-1.	73
Figura 23 - Diagrama da topologia da proteína E6-1 recombinante e sequência correspondente.	74
Figura 24 - Mapa da superfície molecular, colorida de acordo com o potencial eletrostático.	75
Figura 25 - Gráfico da antigenicidade das proteínas E6-1, gerado a partir das sequências de aminoácidos.	76
Figura 26 - Comparação entre a sequência da proteína E6-1 recombinante e as proteínas E6 existentes.	77
Figura 27 - Identificação e localização dos aminoácidos cisteína (CXXC), regiões conservadas propensas à ligação de átomos de zinco.	78
Figura 28 - Identificação e localização dos aminoácidos com capacidade para ligações cátion- π	79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Mutações entre as sequências de nucleotídeos e de aminoácidos de E6-1. As mutações estão indicadas em vermelho.	67
Tabela 2 - Estatísticas do gráfico de Ramachandran.	68
Tabela 3 - Resultados do gráfico de Ramachandran para cada resíduo de aminoácido. O número de resíduos que se encontra em regiões desfavoráveis está indicado para cada tipo de aminoácido.	69
Tabela 4 - Análise dos modelos gerados para a proteína E6 de BPV-1 recombinante pelo programa PROCHECK - planaridade de ligações, distorções angulares e Fator-G.....	71
Tabela 5 - Resultados da análise através do software VERIFY-3D.....	72
Tabela 6 - Pares de aminoácidos capazes de realizar interação cátion- π . Os pares encontrados na proteína E6-1 recombinante e aqueles com valores energeticamente significantes estão apontados.....	78
Tabela 7 - Aminoácidos relacionados à formação de pares cátion- π . O posicionamento na proteína E6-1 e os valores energéticos significantes estão indicados.....	79

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

aa – aminoácido

bar – unidade de pressão

BL21 (DE) – linhagem de bactéria *E. coli*

BPV – “Bovine Papillomavirus” ou Papilomavírus Bovino

CBP – “CREB-Binding Protein”

CEGH-USP – Centro de Estudos do Genoma Humano - Universidade de São Paulo

CLT – linfócito T citotóxico

DAB – diaminobenzidina

DH5 α – linhagem de bactéria *E. coli*

Dlg1 – “*Drosophila* disc large tumor suppressor”

DNA – ácido desoxirribonucleico

E – “early”

E6-1 – gene ou proteína do papilomavírus bovino do tipo 1

E6AP – “E6-associated protein”

g – gravidade

h – hora

há – hectare

HEC – hematúria enzoótica crônica

HPV – “Human Papillomavirus ou Papilomavírus Humano

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IPTG – isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside

IRF-3 – “Interferon regulatory factor 3”

ISH – *in situ* “hybridization”

Kb – kilobase

kDa – quilodalton

L – “late”

LB – Luria Bertani

LCR – “Long Control Region”

mA – miliampere

MAML1 – “Mastermind-like protein 1”

MDIC – Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio

MHC – “Major histocompatibility complex”

MHC-I – “Major histocompatibility complex class 1”

min – minuto

mL – mililitros

NaCl – cloreto de sódio

ng – nanograma

NMR – “Nuclear magnetic resonance” ou ressonância magnética nuclear

NOTCH – proteína transmembrana

nt – nucleotide

OD – densidade óptica

ORF - open reading frame

p300 – proteína regulatória

p53 – proteína citoplasmática supressora de tumor de massa molecular 53 kDa

pAT153 – plasmídeo de clonagem

pb – pares de base

PCR – “Polymerase Chain Reaction”

PCR4-TOPO – plasmídeo para clonagem, Invitrogen

PMSF – phenylmethanesulfonylfluoride

pRB – proteína de susceptibilidade ao retinoblastoma supressora de tumor

PSD95 – “post synaptic density protein”

PV – papilomavírus

PBS – solução salina tamponada com fosfato

PBST – solução salina tamponada com fosfato contendo tween

RMSD – Root Mean Square Derivation ou desvio padrão médio quadrático

s – segundo

SDS-PAGE – sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis

TEV protease – protease encontrada no “Tobacco Etch Vírus”

T-helper – linfócitos T auxiliares

TP53 – gene supressor tumoral codificante da proteína p53

TrisHCl – Tris hidrocloreto ou Tris(hydroxymethyl)aminomethane hydrochloride

UA – unidade animal

V – volts

VLP – “Virus Like Particle”

zo-1 – “zonula occludens-1 protein”

μL – microlitro

μM – micromolar

°C – grau Celsius

LISTA DE SÍMBOLOS

Nome	Abreviatura	Símbolo	Códon
Alanina	Ala	A	GCT, GCC, GCA, GCG
Asparagina	Asn	N	AAT, AAC
Aspartato	Asp	D	GAT, GAC
Arginina	Arg	R	CGT, CGC, CGA, CGG, AGA, AGG
Cisteína	Cys, Cis	C	TGT, TGC
Fenilalanina	Phe, Fen	F	TTT, TTC
Glicina	Gly, Gli	G	GGT, GGC, GGA, GGG
Glutamato	Glu	E	GAA, GAG
Glutamina	Gln	Q	CAA, CAG
Histidina	His	H	CAT, CAC
Isoleucina	Ile	I	ATT, ATC, ATA
Leucina	Leu	L	CTT, CTC, CTA, CTG, TTA, TTG
Lisina	Lys, Lis	K	AAA, AAG
Metionina	Met	M	ATG
Prolina	Pro	P	CCT, CCC, CCA, CCG
Serina	Ser	S	TCT, TCC, TCA, TCG, AGT, AGC
Tirosina	Tyr, Tir	Y	TAT, TAC
Treonina	Thr, The	T	ACT, ACC, ACA, ACG
Triptofano	Trp, Tri	W	TGG
Valina	Val	V	GTT, GTC, GTA, GTG
Códon de parada	*	Stop	TAA, TAG, TGA

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
2 REVISÃO DA LITERATURA	23
2.1 Papilomavírus (PV)	24
2.2 Infecção	25
2.3 Classificação	27
2.4 Diagnóstico	28
2.5 Proteínas virais	30
2.6 Aspectos clínicos dos BPVs e abordagens terapêuticas tradicionais	32
2.7 BPV-1 e E6	34
2.8 Vacina	37
2.9 Bioinformática	39
3 OBJETIVOS	44
3.1 Objetivo Geral	45
3.2 Objetivos Específicos	45
4 MATERIAL E MÉTODOS	46
4.1 Amplificação do gene E6 de BPV-1	47
4.2 Purificação do gene E6 de BPV-1 amplificado	47
4.3 Ligação, clonagem e purificação plasmidial	47
4.4 Digestão dos plasmídeos E6-1/TOPO 4.0 e purificação do inserto	48
4.5 Ligação, subclonagem e purificação do DNA plasmidial	49
4.6 Transformação bacteriana com pET28a(+)	50
4.7 Indução da expressão proteica	51
4.7.1 Cultura bacteriana e indução	51
4.7.2 SDS-PAGE	51
4.7.3 Western blot	51
4.7.4 Microscopia eletrônica	52
4.7.5 Escalonamento	52
4.8 Purificação proteica	52
4.8.1 Primeira purificação	52
4.8.2 Diálise	53
4.8.3 Segunda purificação	53
4.9 Bioinformática	54

4.9.1 Alinhamento	54
4.9.2 Modelagem estrutural.....	54
4.9.3 Validação	55
4.9.4 Topologia.....	55
4.9.5 Potencial eletrostático.....	55
4.9.6 Antigenicidade	56
4.9.7 Regiões conservadas.....	56
5 RESULTADOS	57
5.1 Amplificação e purificação do gene E6 de BPV-1	58
5.2 Ligação, clonagem e subclonagem do gene E6-1.....	58
5.2.1 Clonagem	58
5.2.2 Subclonagem	59
5.3 Expressão proteica	60
5.3.1 Microscopia eletrônica	60
5.3.2 SDS-PAGE e Western blot.....	62
5.4 Purificação proteica	63
5.4.1 Primeira purificação	63
5.4.2 Diálise e segunda purificação	63
5.5 Análise por bioinformática	64
5.5.1 Sequenciamento, alinhamento e matriz de identidade	64
5.5.2 Modelagem estrutural.....	67
5.5.3 Validação	67
5.5.4 Modelo final.....	73
5.5.5 Topologia.....	74
5.5.6 Potencial eletrostático	74
5.5.7 Antigenicidade	75
5.5.8 Regiões conservadas.....	76
6 DISCUSSÃO	80
7 CONCLUSÕES	89
REFERÊNCIAS	90
APÊNDICE - Artigo submetido.....	110

1 INTRODUÇÃO

De acordo com o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA), o rebanho bovino brasileiro deverá alcançar quase 210 milhões de cabeças até o final de 2013, o que representa um aumento de 3%. Esse aumento se dará principalmente devido ao suporte financeiro do Governo para a reconstrução do rebanho bovino, melhoramento genético, renovação das pastagens e preços sustentados do gado (BEEFPOINT, 2012). Atualmente, a produção pecuária de bovinos é partilhada principalmente pelo Centro-Oeste, Sudeste e Sul, cabendo ao Nordeste o predomínio sobre as criações de caprinos e muares (RURAL CENTRO, 2011).

Segundo dados do Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior (MDIC), o Brasil é o segundo maior produtor mundial de carne bovina (9,9 milhões de toneladas/2008), superado apenas pelos Estados Unidos (11,9 milhões de toneladas/2008). Os dados do MDIC consolidam o Brasil como maior exportador de carne bovina no mundo, sendo que no Estado de São Paulo a carne bovina representou o sexto produto mais exportado no 1º quadrimestre de 2009 (MDIC, 2011). Porém, o país apresenta baixos índices de desempenho zootécnico quando comparado aos países desenvolvidos. O USDA prevê um aumento de 20% nas exportações de gado em 2013 devido principalmente à maior exportação à Venezuela e aos preços competitivos do gado no Brasil (BEEFPOINT, 2012).

O Brasil é o terceiro maior produtor de leite do mundo, com 33,2 milhões de toneladas métricas (valor convertido de litro para quilo – um litro é igual a 1,033 kg), ficando atrás apenas dos Estados Unidos e da Índia. De acordo com o levantamento realizado pelo IBGE, em 2011 a produção brasileira sofreu um aumento de 4,5% em relação a 2010 (RANKBRASIL, 2012; RURAL CENTRO, 2012). No Brasil, a produção de leite cresce 5% ao ano em média, com um rebanho de aproximadamente 41 milhões de animais. A produção leiteira no Brasil está espalhada por todos os estados e tem à frente Minas Gerais, responsável por 27% do total (ANUÁRIO DA PECUÁRIA NACIONAL, 2011).

O setor de peles e couros fechou 2010 com 356,2 mil toneladas exportadas, o que gerou receita de US\$ 1,74 bilhão. Os principais estados exportadores no País são Rio Grande do Sul e São Paulo, com participação de 24,6% e 22,4%, respectivamente. Porém, apenas 8,5% do couro brasileiro produzido são de “1ª linha”, o que acarreta uma perda de US\$ 1 bilhão ao ano. Os principais fatores de depreciação são os ectoparasitas, manejo inadequado, dermatites e a papilomatose, sendo que o couro de um animal acometido pela doença é depreciado (ANUÁRIO DA PECUÁRIA NACIONAL, 2011; REVISTA TERRA VIVA, 2008).

A papilomatose bovina é uma enfermidade infecto-contagiosa crônica, desenvolvida pela infecção do Papilomavírus Bovino (BPV), de caráter tumoral benigna e natureza fibroepitelial, caracterizando-se por apresentar lesões localizadas na pele e mucosa, sendo conhecidos popularmente por verruga ou “figueira” dos bovinos, apresentando diferentes morfologias (pedunculada, plana, grão de arroz e couve-flor) na região do úbere, mucosa e epitélios de revestimento (SANTIN; BRITO, 2004). Devido à falta de manejo adequado, de medidas de prevenção e controle efetivos, o BPV e as doenças correlacionadas apresentam-se disseminados no rebanho bovino nacional. O caráter persistente da infecção viral leva a um elevado nível de incidência da doença, gerando consideráveis prejuízos financeiros, já que os animais infectados apresentam, principalmente, lesões no couro e redução na produção de leite. A papilomatose está relacionada ao surgimento de infecções secundárias de origem bacteriana ou parasitárias, como miíases, relacionadas a índices elevados de morbidade.

Há uma grande variedade de estudos sobre vacinas profiláticas e terapêuticas contra o Papilomavírus Humano (HPV), pertencente à mesma família do BPV (*Papillomaviridae*), o qual apresenta grande relevância na área da saúde humana por sua associação a vários tipos de tumores, principalmente o de colo de útero (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2012). As vacinas terapêuticas experimentais são baseadas na indução de imunidade celular contra células expressando antígenos virais, visando à regressão de lesões associadas (PAHEL et al., 1993). Os procedimentos desenvolvidos têm sido a base para estudos sobre estratégias vacinais relativas ao BPV.

A obtenção de proteínas recombinantes em laboratório permite seu estudo detalhado, tanto estrutural quando imunogênico, além da possibilidade da produção de insumos, tais como anticorpos e até mesmo vacinas. Os anticorpos podem ser utilizados tanto em pesquisa básica como na identificação de expressão de oncoproteínas em cultivos celulares e testes de imunodiagnóstico.

A clonagem em vetores bacterianos para a expressão e purificação de proteínas apresenta vantagens como a grande quantidade de biomassa gerada, baixo custo relativo e rapidez, servindo a diferentes propósitos. Porém, para que se chegue a um produto final a partir da proteína estudada, muitos testes deverão ser realizados, como normalmente ocorre antes que um produto seja definitivamente lançado no mercado. Mas nenhuma etapa poderá ocorrer sem que antes se obtenha o produto básico - a proteína.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Papilomavírus (PV)

Os papilomavírus (PVs) pertencem à família *Papillomaviridae*, a qual é constituída por 16 gêneros, com mais de uma centena de tipos virais descritos. Na sua quase totalidade são vírus espécie-específicos, sendo que sua nomenclatura é dada de acordo com o hospedeiro, incluindo uma ou duas letras antes da sigla PV e posteriormente o tipo. Por exemplo, BPV-4 refere-se ao papiloma vírus bovino tipo 4 (SUNDBERG, 1987; SUNDBERG et al., 1997).

Os PVs se constituem em vírus com genoma de DNA circular dupla fita não segmentado, cópia única e com tamanho variando entre 5300 e 8000 nucleotídeos (ICTV, 2010). Este genoma é dividido em duas regiões - a região denominada LCR (“long control region” ou região de controle principal), sendo uma região de regulação contendo o “ori” viral (ponto de origem da replicação do genoma), com elementos *cis*-regulatórios necessários para a replicação e transcrição do DNA do vírus e a região contendo as ORFs (“open reading frames” ou matrizes de leitura aberta), sendo esta subdividida em regiões precoce (“early” ou E) e tardia (“late” ou L). A região de transcrição precoce codifica genes para proteínas não estruturais e a região de transcrição tardia codifica genes para proteínas do capsídeo (BORZACCHIELLO; ROPERTO, 2008; CAMPO, 2002; COLEMAN, 2007; NASIR et al., 2007; PEREIRA; HITZEROTH; RYBICK, 2009; STANLEY; PETT, 2007).

A região E é transcrita primariamente logo após a infecção celular pelo vírus, estando seus transcritos relacionados à replicação, transcrição e transformação celular, designadas E1-E8, dependendo do tipo viral. A região L expressa mais tardiamente as proteínas responsáveis pela formação do capsídeo viral, L1 e L2. A proteína L1 possui peso molecular de 54-58 kDa, sendo arranjada em 72 pentâmeros e com capacidade de se auto organizar em VLPs (“vírus like particles”) (FREITAS et al., 2007; VILLA et al., 2005). A proteína L2, com peso molecular de 68-76 kDa, possui cerca de 469 aminoácidos e se liga ao DNA viral, favorecendo a encapsidação. As proteínas L atuam em conjunto na ligação viral aos receptores celulares (Figura 1) (LIU et al., 1997; TOMITA et al., 2007b; TRUS et al., 1997). Os tipos BPV-3, -4 e -12 supostamente possuem região codificadora para a proteína L3, mas sua função ainda é desconhecida (CAMPO, 2002; PATEL; SMITH; CAMPO, 1987; TERA; DESALLE; BURK, 2002).

Figura 1 - Modelo estrutural do papilomavírus bovino.

Em destaque, pentômeros de L1 (vermelho) e de L2 (verde) e DNA central (indicado pela seta vermelha).

Fonte: Modificada de Liu et al. (1997) e Trus et al. (1997) por Melo, 2009.

2.2 Infecção

Diferentes tipos de PVs estão associados a lesões hiperplásicas - epiteliais cutâneas, mucocutâneas e mucosas, podendo ocasionar uma variedade de proliferações benignas como verrugas (papilomas), neoplasias intra-epiteliais anogenitais, papilomas nas regiões da orofaringe e esofaringe e infecções na conjuntiva (CARR; GYORFI, 2000; revisado em ZUR HAUSEN, 2000; ZUR HAUSEN, 1996).

Durante o início da indução dos papilomas, através de microlesões no epitélio, os vírus entram em contato com as células da membrana basal, colocando o genoma viral em contato com o genoma da célula hospedeira. As células da membrana basal apresentam DNA viral com baixo número de cópias e na forma episomal. Após a divisão celular na camada basal, as células descendentes são impelidas em direção à camada de queratinócitos para-basais, sendo que um subconjunto destas células, sob a influência dos oncogenes virais, não consegue se diferenciar, entrando novamente no ciclo celular. Consequentemente, o DNA viral é amplificado, elevando seu número de cópias (CHOW; BROKER, 1994; STUBENRAUCH; LAIMINS, 1999). As células com DNA viral amplificado se multiplicam e se movem cada vez mais para o interior do epitélio estratificado. Os queratinócitos supra-basais contendo o genoma viral amplificado expressam as proteínas tardias estruturais. Finalmente, o DNA viral é encapsulado e novas partículas virais se desprendem na camada mais superficial. Logo, as

células sofrem alterações de duas formas principais - inicialmente inibindo a diferenciação, de modo que a amplificação do genoma viral possa prosseguir; e posteriormente permitindo a diferenciação, formando um epitélio que sirva de barreira para o hospedeiro, permitindo a expressão de proteínas do capsídeo viral. A liberação de novos vírus ocorre no epitélio diferenciado queratinizado (BRIMER et al., 2012; DOORBAR, 2005) (Figura 2).

Figura 2 - Representação diagramática da infecção do tecido epitelial estratificado por papilomavírus.

Os diferentes estágios do ciclo viral com seu respectivo padrão de expressão gênica estão representados.

Fonte: Modificada de Doorbar (2005) por Melo (2009) e pela autora.

Infecções por PVs geralmente desencadeiam uma resposta imune no hospedeiro, levando, normalmente, à regressão da doença (BORZACCHIELLO; ROPERTO, 2008). No entanto, em alguns casos, as proliferações papilomatosas induzidas por alguns tipos virais específicos podem vir a se tornar lesões malignas (tumores malignos) (DE VILLIERS et al., 2004). Esta progressão está frequentemente associada a co-fatores (LEAL et al., 2003).

Três matrizes de leitura aberta, denominadas E5, E6 e E7 codificam proteínas que estimulam a proliferação celular, inibem a apoptose e modulam a diferenciação dos queratinócitos de diferentes formas. Um exemplo - a proteína E6 interage com um grande número de proteínas celulares através da interação das hélices anfipáticas dessas proteínas celulares, muitas vezes contendo a sequência LXXLL (CHEN et al., 1998; ELSTON; NAPHTHINE; DOORBAR, 1998; VANDE POL; BROWN; TURNER, 1998).

Especificamente, a proteína E6 é capaz de se associar indiretamente à proteína p53, a qual é responsável pela regulação da passagem da fase G1 para S e da fase G2 para M, no ciclo celular. A proteína viral E6 recruta a proteína celular E6AP, que funciona como uma ubiquitina-ligase para o complexo contendo p53. Este recrutamento resulta na ubiquitinação de p53 seguido de sua rápida degradação (NORONHA et al., 1999). Logo, sem a proteína p53, a célula perde de reparar possíveis danos no DNA, passando a divisão celular a ocorrer sem reparo. Consequentemente, aumenta-se a frequência das mutações, dos rearranjos cromossômicos e das aneuploidias. O acúmulo de eventos mutacionais é a causa subjacente ao desenvolvimento de um fenótipo neoplásico, resultando no câncer (GRIFFITHS et al., 2008; KEHMEIER et al., 2002; STUBENRAUCH; LAIMINS, 1999; VOUSDEN, 1993).

2.3 Classificação

A ORF (“open reading frame” ou matriz de leitura aberta) L1 é a mais conservada do genoma e, por este motivo, é utilizada na identificação de novos tipos de PVs. Diferenças acima de 10% entre duas sequências de DNA da ORF de L1 definem um novo tipo de PV. Diferenças entre 2% e 10% identificam um novo subtipo viral, enquanto que a definição de uma nova variante se dá com menos de 2% de divergências entre as sequências de L1 (DE VILLIERS et al., 2004).

Estão descritos treze tipos de papilomavírus bovino (BPVs) que de acordo com as similaridades das sequências nucleotídicas do gene L1 estão divididos em três gêneros - *Xi-Papillomavirus* (BPV-3, BPV-4, BPV-6, BPV-9, BPV-10, BPV-11 e BPV-12), que causam lesões epiteliotrópicas; *Delta-Papillomavirus* (BPV-1, BPV-2 e BPV-13), causadores de fibropapilomas, e *Epsilon-Papillomavirus* (BPV-5 e BPV-8), que causam fibropapilomas cutâneos e papilomas localizados. Diferindo dos outros BPVs, o BPV-7 não apresenta similaridades que permitam enquadrá-lo em um dos três gêneros previamente descritos, sendo classificado à parte (ANTONSSON; HANSSON, 2002; BORZACCHIELLO; ROPERTO, 2008; DE VILLIERS et al., 2004; HATAMA; KIYOKO; TORU, 2008; HATAMA et al.,

2011; LUNARDI et al., 2013; OGAWA et al., 2007; TOMITA et al., 2007b; ZHU et al., 2012).

Paralelamente aos treze tipos atualmente descritos, uma série de “supostos” tipos tem sido continuamente descrita na literatura. Acompanhando os trabalhos publicados na área de diagnóstico e classificação de papilomavírus, é possível observar diversos autores se utilizam de primers genéricos para a construção de filogenias baseadas na análise de segmentos amplificados de L1 (HATAMA; KIYOKO; TORU, 2008; MAEDA et al., 2007; OGAWA et al., 2004). Até o momento, 14 supostos tipos de BPV, BAA2 ao -4, BAPV-3 ao -5, BAPV-7 ao -10, BAPV11MY, BPV/BR-UEL2, -3, e -5, foram detectados em verrugas cutâneas e pele normal (ANTONSSON; HANSON, 2002; CLAUS et al., 2008; OGAWA et al.; 2004).

A utilização do par de primers FAP59/64 foi transposta, com sucesso, no processo de identificação de tipos de papilomavírus em outras espécies de animais, incluindo bovinos. Em bovinos, uma das primeiras descrições de supostos novos tipos virais através desta metodologia foi publicada em 2002 (ANTONSSON; HANSSON, 2002).

Ogawa et al. (2004) relatam a investigação da prevalência do papilomavírus bovino (BPV) tanto em lesões como em tecido saudável, comparando a eficiência do conjunto de primers genéricos MY09/11 e FAP59/64 na detecção de tipos e supostos tipos de BPV, bem como a sua alocação filogenética. Como em outros trabalhos da área, os autores citam as diretrizes delineadas pelo Comitê de Nomenclatura para o Papilomavírus (14th International Papillomavirus Conference, Quebec City, Quebec, Canada). Explicitamente é indicado que - “The isolated novel sequences were called putative new PV types instead of PV types, since PCR products represent only a part of the L1 gene (ANTONSSON; HANSSON, 2002; DE VILLIERS, 2004)”.

2.4 Diagnóstico

Os primeiros diagnósticos de infecções por PVs foram baseados nos achados histológicos das lesões e nas alterações da morfologia celular devido à dificuldade para o isolamento viral *in vitro* (WOSIACKI et al., 2005). Entretanto, com a utilização em larga escala de técnicas de biologia molecular, principalmente com as aplicações da reação em cadeia da polimerase (PCR), foi possível estabelecer um novo padrão para a identificação viral. A PCR possui alta sensibilidade e especificidade, além da facilidade de utilização para detecção de qualquer sequência genética conhecida, sem requerer o cultivo viral. Trata-se de

uma técnica bastante sensível, capaz de detectar uma única cópia do genoma por célula (SHAMANIN; DELIUS; DE VILLIERS, 1994).

Técnicas de hibridização como o “Southern blot” e hibridização *in situ* (ISH) também são utilizadas na detecção dos PVs, como, por exemplo, na detecção de BPV-2 em sangue periférico e tecidos do trato reprodutivo e do BPV-1 em verrugas, sangue e plasma, sendo detectado também no sangue de bezerros recém-nascidos, o que indica uma possível transmissão vertical (CARVALHO et al., 2003; DINIZ et al., 2009; FREITAS et al., 2003; JELÍNEK; TACHEZY, 2005; LINDSEY et al., 2009; ROPERTO et al., 2008; STOCCO DOS SANTOS et al., 1998; WOSIACKI et al., 2002).

Estudos comparando animais infectados e não infectados revelaram uma frequência de aberrações cromossômicas aumentada nos infectados em linfócitos de sangue periférico, sendo que estas aberrações também foram verificadas em animais assintomáticos, indicando que sua ocorrência é anterior ao aparecimento de lesões características da papilomatose (WALTER-MOURA et al., 1988). Trabalhos mostraram que animais positivos para os tipos - 1, -2 e -4 revelaram alta frequência de aberrações cromossômicas em linfócitos de sangue periférico quando comparados aos animais controle (MELO et al., 2011; STOCCO DOS SANTOS et al., 1993; STOCCO DOS SANTOS et al., 1998; YAGUIU et al., 2008).

Diversos iniciadores genéricos têm sido utilizados para detecção geral de sequências de DNA viral. O par de iniciadores FAP59/FAP64 (FORSLUND et al., 1999) foi desenhado para amplificação de regiões conservadas do gene de L1 de HPV, detectando este vírus em tumores cutâneos ou tecido normal. Posteriormente, foi possível utilizar estes iniciadores em vários primatas, sendo identificados supostos novos tipos em tecido cutâneo. Com os iniciadores FAP59/FAP64 foi possível, em vários trabalhos, detectar o BPV em tecido cutâneo e “swabs” de tetos saudáveis (ANTOSSON; HANSSON, 2002; CAMPOS et al., 2008; CLAUS et al., 2007; JELÍNEK; TACHEZY, 2005; MAEDA et al., 2007; OGAWA et al., 2004).

Além dos iniciadores genéricos, podem ser utilizados marcadores para tipos específicos de BPV, sendo utilizadas sequências particulares de alguns desses tipos. Iniciadores específicos para BPV-2 foram utilizados na detecção de sequências desse tipo viral no trato reprodutivo e em gametas (CARVALHO et al., 2003). Campos et al. (2008) detectaram três tipos de BPV (1, 2 e 4) em sangue, verruga e cultura primária de tecido a partir do emprego de iniciadores específicos para os tipos virais mencionados. A detecção de BPV com iniciadores específicos foi realizada em vários tipos de amostras biológicas como verrugas, sangue periférico, plasma, gametas, esperma, placenta, líquido amniótico, leite,

colostro (FREITAS et al., 2007; LINDSEY et al., 2009; STOCCO DOS SANTOS et al., 1998), além da identificação de BPV em sarcóides equinos (BOGAERT et al., 2005; NASIR; REID, 1999).

2.5 Proteínas virais

A correlação entre as infecções por PVs e os processos tumorais está associada à expressão de oncoproteínas virais. Estas atuam na alteração das funções dos genes supressores de tumores e das proteínas de controle do ciclo celular, podendo induzir alterações na cromatina da célula hospedeira (STEWART; BACCHETTI, 1991).

Os genes E1 e E2 expressam proteínas regulatórias que modulam a transcrição e replicação viral (BAKER; HOWLEY, 1987), ativando ou reprimindo promotores virais (HAM et al., 1991). O padrão da expressão dos genes virais é dependente da expressão das proteínas virais E1 e E2 que permitem a manutenção do DNA viral na forma episomal e facilitam a correta segregação dos genomas durante a divisão celular (WILSON et al., 2002; YOU et al., 2004). Em baixos níveis, a E2 ativa a transcrição viral, enquanto que em altas concentrações, a transcrição é reprimida (HEDGE, 2002).

A proteína codificada pelo gene E4 associa-se com a rede de queratina celular, provocando sua desestabilização, auxiliando, assim, a liberação das partículas virais (DOORBAR, 2005). A proteína E4 é formada pelo processamento alternativo de transcritos do gene E1, formando transcritos E1/E4, sendo expressa durante o ciclo do BPV, em maior grau nas camadas suprabasais diferenciadas do epitélio (DOORBAR et al., 1991; ROBERTS et al., 1997). Já a proteína E5 é uma proteína hidrofóbica de membrana, expressa nos estágios iniciais da infecção viral, capaz de transformar fibroblastos de rato e queratinócitos humanos (LEECHANACHAI et al., 1992; LEPTAK et al., 1991). Sua expressão modifica a resposta celular a fatores de crescimento e bloqueia a expressão na superfície de moléculas do MHC (BRAVO; CRUSIUS; ALONSO, 2005), estando também associada ao processo de malignização dos queratinócitos em conjunto com a proteína E7 (BOUVARD et al., 1994).

A proteína E5 do BPV é uma proteína bem caracterizada, servindo como modelo para estudos da E5 do HPV. É uma oncoproteína com apenas 44 aminoácidos no BPV-1 e 42 no BPV-4. Particularmente em relação à proteína E5 do BPV-1 é relatado um alto potencial oncogênico, associado ao aparecimento de diferentes formas de tumores malignos, mostrando também ser a porção transcrita a partir da região gênica próxima à extremidade 3' essencial à

transformação celular *in vitro* (BURKHARDT; DIMAIO; SCHLEGEL, 1987; PENNIE et al., 1993; SCHILLER et al., 1986; SCHLEGEL et al., 1986)

A primeira evidência indireta que E6 fosse oncogenicidade veio a partir de estudos sobre os tumores derivados de células do colo do útero humano e linhagens celulares derivadas destas, onde E6 foi encontrada expressa e mantida muitos anos após os eventos iniciais da transformação (ANDROPHY et al., 1987; BANKS et al., 1987; SCHWARZ et al., 1985). Os produtos dos genes E6 e E7 são essenciais no processo de transformação e imortalização celular (RIVOIRE et al., 2001). Estudos realizados em diferentes linhagens celulares de câncer cervical, infectadas com HPV-16, mostraram a expressão somente das ORFs E6 e E7, especulando-se que a fusão das proteínas E6-E7 seja importante para a progressão maligna (BAKER et al., 1987). É sugerido que os genes E6 e E7 têm uma atuação sinérgica no processo de indução da imortalização de queratinócitos humanos genitais, apesar de ser demonstrado que em algumas células, como diferentes tipos de células epiteliais mamárias, estas proteínas podem atuar separadamente (WAZER et al., 1995).

A proteína E7, codificada pelo gene E7 de BPV-1, possui 127 aa e coopera com as proteínas E5 e E6 na transformação celular. Em células naturalmente infectadas, a presença da proteína E7 de BPV-1 é observada tanto no núcleo como no citoplasma de células da camada basal. Quanto ao tecido, a proteína E7 se encontra presente nas primeiras camadas do epitélio escamoso sendo que, especificamente, a E7 de BPV-4 é observada em todas as camadas do papiloma e em todos os estágios. A proteína E7, entre outras funções, liga-se à forma hipofosforilada da proteína pRb, resultando na inativação desta última e permitindo, portanto, a progressão para a fase S do ciclo celular (HERWIG; STRAUSS, 1997; JONES; MÜNGER, 1996).

Resumidamente, a proteína E6 inativa a proteína supressora de tumor p53, facilitando sua degradação (MÜNGER; HOWLEY, 2002). A perda de atividade da proteína p53 resulta no crescimento celular desregulado e instabilidade genômica, características de células imortalizadas (HARTWELL, 1992). Outros estudos mostraram que a oncoproteína E6 do BPV-1 pode causar transformação celular independentemente da degradação da proteína p53, porém os mecanismos envolvidos ainda não foram totalmente esclarecidos. Foi demonstrado que E6 de BPV-1 interage com CBP/p300. Essa interação resulta na inibição do co-fator de transcrição necessário ao funcionamento da p53 (ZIMMERMANN et al., 2000).

Normalmente, células diferenciadas conseguem se replicar de 50 a 60 vezes, sendo que a cada divisão celular são perdidos aproximadamente 100 pares de base dos telômeros. O

DNA telomérico é composto por cerca de 100 a 1000 repetições da sequência TTAGGG e tem como função proteger os cromossomos contra quebras. Com o gene da telomerase inativado na maioria das células somáticas, os telômeros ficam muito curtos, sinalizando para a parada das divisões celulares (AHMED; TOLLEFSBOL, 2001). Por outro lado, a imortalização das células por meio da ação de proteínas com atividade telomérica ocorreria em 85% a 90% das células cancerígenas. A proteína E6, além de reprimir ação da p53, também apresenta atividade de telomerase (KISSELJOV, 2000; SCULLY, 2002).

2.6 Aspectos clínicos dos BPVs e abordagens terapêuticas tradicionais

A papilomatose (Figura 3) é uma enfermidade infecto-contagiosa crônica, decorrente da infecção pelo BPV, de caráter tumoral benigna e natureza fibroepitelial, caracterizando-se por apresentar lesões localizadas na pele e mucosa. De caráter cosmopolita, é popularmente identificada por verruga ou “figueira” dos bovinos. Essas verrugas podem apresentar diferentes morfologias na região dos tetos, mucosa e epitélios de revestimento (BORZACCHIELLO; ROPERTO, 2008; MURO; BOTTURA; PICCININ, 2008).

Os principais agravantes clínicos, decorrentes da infecção pelo BPV são - desenvolvimento de verrugas no úbere e genitais, depreciação do couro e hemorragias (CAMPO, 2006; MURO; BOTTURA; PICCININ, 2008). É possível observar o desenvolvimento de afecções secundárias graves como o “caraguatá” (câncer do trato digestório superior, em bovinos infectados pelo BPV-4) que pode levar o animal à morte (ROPERTO et al., 2008).

Figura 3 - Papilomatose bovina.

A - bezerro da raça Simental apresentando lesões na pele da face e barbela; **B** - bovino da raça Holandesa apresentando lesões no úbere e tetos.

Fonte: **A** - a autora, **B** - Modificada de Diniz et al. (2009).

É relatado que a interação entre infecções por tipos específicos do papilomavírus bovino com co-fatores ambientais pode desencadear a formação de tumores internos no hospedeiro. Um exemplo dessa interação, possibilitando a formação de tumores malignos, é a associação da infecção por BPV-2 – e menos frequentemente do BPV-1 – concomitantemente com a ingestão continuada da samambaia *Pteridium aquilinum* (CAMPO, 2006), encontrada em pastagens pobres, ocasionando o surgimento da doença conhecida como Hematúria Enzoótica Crônica (HEC), expressão clínica da presença de múltiplos tumores na bexiga urinária que levam à hematúria intermitente, anemia e ao emagrecimento progressivo do animal (DURÃO et al., 1995; OLSON et al., 1965; POLACK, 1990).

Dentre os tratamentos existentes hoje no mercado, a remoção cirúrgica muitas vezes é empregada sendo, porém, um processo traumático, ao qual só deveriam ser submetidos animais com pequena quantidade de papilomas. Há também o uso de vacinas autógenas, isto é, preparadas com tecidos dos papilomas do próprio rebanho que receberá a vacina. Porém, os resultados apresentam inúmeras variações, mesmo quando realizados em animais de um mesmo rebanho. A vacina é mais eficaz quando se faz repetidas aplicações, mas o resultado depende da fase em que as lesões se encontram. Os produtos injetáveis à base de clorobutanol atuam sobre alguns tipos de papiloma e algumas vezes, quando associados com outros tratamentos, apresentam melhor resultado. Outro procedimento que vem sendo empregado para tentar controlar a doença é a auto-hemoterapia, sendo que para este procedimento retira-se sangue da veia jugular externa ou da veia caudal, sem anticoagulante e, em seguida, o sangue é aplicado via intramuscular profunda. Esta técnica baseia-se na tentativa de

desencadear um estímulo de defesa no organismo do animal, levando a eliminação da enfermidade. A técnica tem sido amplamente aplicada, porém sua eficácia é questionada (EMBRAPA, 2008).

2.7 BPV-1 e E6

O BPV-1 é o tipo de BPV mais estudado, sendo amplamente usado como modelo para estudos de infecção e persistência do HPV (SCHILLER; VASS; LOWY, 1984). Causa fibropapilomas em seu hospedeiro natural (bovinos) e sarcóide em equinos, o tipo mais comum de câncer epitelial em equinos no mundo (JACKSON, 1936; PASCOE; SUMMERS, 1981; RAGLAND; KEOWN; SPENCER, 1970). O sarcóide equino, causado por BPV-1 e mais raramente pelo BPV-2 (AMTMANN; MULLER; SAUER, 1980; NASIR; REID, 1999), representa o único caso documentado de infecção por PV em uma espécie que não seu hospedeiro natural (GORMAN, 1985; LANCASTER; THEILIN; OLSON, 1979). O sarcóide equino tem recorrência elevada, podendo estar associada à invasão pelos fibroblastos transformados do sarcóide, permitindo que essas células se infiltrem no tecido saudável circundante (YUAN et al., 2010; YUAN et al., 2011). O DNA do BPV também tem sido detectado em tecidos distantes das lesões (CARR et al., 2001), sendo a recorrência do tumor mais frequente em margens cirúrgicas positivas para o DNA de BPV (MARTENS et al., 2001).

Quando a infecção na pele por BPV causa a transformação das células epiteliais, a lesão é definida como papilomatose e, quando causa a transformação dos fibroblastos dermais e acantose epitelial, a lesão é então definida como fibropapiloma. Papilomas e fibropapilomas podem se localizar em diferentes locais do corpo do animal (CAMPO, 1995).

O BPV-1 possui um genoma de aproximadamente 8000 pb, assim como o BPV-2, -5 e -8, diferentemente do genoma dos tipos BPV-3, -4, -6, -7, -9 e 10 os quais são constituídos de 7300 pb aproximadamente. Diferentemente dos quatro primeiros tipos virais citados e do BPV-7, os tipos BPV-3, -4, -6, -9 e 10 não apresentam a proteína E6, uma característica dos *Xi-Papillomavirus* (CAMPO, 2006; HATAMA; KIYOKO; TORU, 2008; OGAWA et al., 2007; PENNIE et al., 1993; TOMITA et al., 2007a). O BPV-1, tal como BPV-2, apresenta as ORFs E6 e E7 na região precoce (E) do genoma, enquanto a ORF E5 está localizada na região entre os genes precoces (E) e tardios (L) (SCHILLER et al., 1986) (Figura 4).

Figura 4 - Representação linear do genoma de BPV-1.

As principais funções de cada região gênica ou de seus produtos estão apontadas.

Fonte: Modificada de Campo (2006) por Diniz (2009).

Para determinar quais ORFs codificam os genes do BPV-1, os quais são responsáveis pela transformação de culturas celulares por indução, foi examinado o potencial transformador de um grande número de mutantes de um único sítio do genoma do BPV. Os resultados mostraram que um dos genes identificados seria codificado pela ORF E6 (SCHILLER; VASS; LOWY, 1984). No BPV-1, o gene E6 codifica uma oncoproteína de 137 aminoácidos (aa) que atua como um ativador transcricional (DANOS et al., 1983; JACKSON; CAMPO, 1991).

A proteína viral E6 completa o papel de E7 no processo de transformação celular, prevenindo a apoptose celular em resposta à entrada não programada na fase S induzida por E7 (DOORBAR, 2005). A proteína E6 do BPV-1 se liga ao motivo ácido (LXXLL) de várias proteínas, sendo que essa interação proteína-proteína pode regular a motilidade, adesão celular e a expressão gênica (TUMBARELO et al., 2002). Entre os exemplos estão as ligações ao complexo adaptador AP1 (TONG et al., 1998) e à paxilina, componente das adesões focais; a interação com a paxilina é necessária para a transformação celular pela E6 do BPV-1 e, *in vivo*, a competição com os motivos LXXLL pode bloquear a transformação causada pela E6 (BOHL et al., 2000; TONG; HOWLEY, 1997; VANDE POL; BROWN; TURNER, 1998; WADE; BRIMER; VANDE POL, 2008).

O fator de transcrição IRF-3 é responsável por promover a produção de interferons importantes para o desenvolvimento de respostas imune inatas antivirais (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2012). A proteína E6 do HPV-16 se liga ao motivo LXXLL no IRF-3

levando à inativação de seu transcrito, o que proporciona ao vírus um meio para contornar a resposta imune antiviral de uma célula infectada por HPV-16 (RONCO et al., 1998). Também pode se ligar à E3 ubiquitina ligase E6-AP (HUIBREGTSE; SCHEFFNER; HOWLEY, 1993a), sendo que o complexo formado pela E6-AP e E6-16 interage com a proteína p53, acionando assim a atividade ubiquitina ligase da E6-AP e a degradação da p53 pelo proteossoma (HUIBREGTSE; SCHEFFNER; HOWLEY, 1991; HUIBREGTSE; SCHEFFNER; HOWLEY, 1993a; HUIBREGTSE; SCHEFFNER; HOWLEY, 1993b; SCHEFFNER et al., 1990; SCHEFFNER et al., 1993; SCHEFFNER; HUIBREGTSE; HOWLEY, 1994).

Existem evidências de que a proteína E6 inativa o complexo CBP/p300, um regulador transcricional que controla várias respostas celulares, entre elas a ativação do gene TP53 (ZIMMERMANN et al., 2000). Foi encontrada associação entre as oncoproteínas E6 dos vírus cutâneos HPV-1, HPV-8 e BPV-1 e o co-ativador da proteína NOTCH, o MAML1, comprovando que a proteína E6 do BPV reprime a transcrição de NOTCH, consequentemente atrasando a diferenciação de queratinócitos (BRIMER et al., 2012). Além destes, outros ligantes à proteína E6 já foram descritos (revisado em ZUR HAUSEN, 2000).

Estudo recente mostrou que a proteína E6 do HPV induz a expressão do fator de iniciação da tradução eucariótica 4E (eIF4E), o qual é sabidamente superexpresso em câncer cervical. A regulação de eIF4E por E6 influencia significativamente a proliferação celular, o ciclo celular, a migração e a apoptose (WANG et al., 2013).

Um domínio PDZ é um domínio estrutural, com cerca de 80-90 aminoácidos, encontrado em proteínas sinalizadoras de bactérias, leveduras, plantas e animais (BOXUS et al., 2008; PONTING, 1997). Estes domínios ajudam na ancoragem de proteínas transmembrana ao citosqueleto, na adesão célula-célula e a organizar os complexos de sinalização (RANGANATHAN; ROSS, 1997). PDZ é um acrônimo que combina as primeiras letras de três proteínas - “post synaptic density protein” (PSD95), “*Drosophila* disc large tumor supressor” (Dlg1) e “zonula occludens-1 protein” (zo-1), as quais tiveram o domínio descrito pela primeira vez (KENNEDY, 1995). Foi demonstrado que a E6 do HPV interage e leva à degradação de proteínas contendo o domínio PDZ. A associação de E6 a essas proteínas parece ter um papel importante no ciclo viral do HPV. Além disso, essa ligação leva ao processo de carcinogênese, pois algumas dessas proteínas contendo o domínio PDZ podem atuar como proteínas supressoras de tumor (HEBNER; LAIMINS, 2006; THOMAS et al., 2002). Os principais motivos ligantes da oncoproteína E6 de HPV-16 estão demonstrados na figura 5.

Figura 5 - Representação esquemática da proteína E6 de HPV-16.

Estrutura esquemática em rosa da proteína E6 de HPV-16, com 151 aminoácidos, evidenciando suas principais regiões de ligação e seus ligantes. Em cinza, representação dos átomos de zinco (Zn) que se ligam a regiões conservadas ricas em cisteína (C).

Fonte: Modificada de Klingelutz e Roman (2012) pela autora.

2.8 Vacina

As primeiras vacinas para BPV foram baseadas em extratos obtidos a partir de macerados de verrugas e, mais tarde, de vírus purificados (JARRETT et al., 1990a; JARRETT et al., 1990b; OLSON; SKIDMORE, 1959; OLSON et al., 1960; SHOPE, 1937). Há diversas metodologias para a purificação de BPV, todas baseadas em ultracentrifugação em gradientes de cloreto de cério ou de sacarose (BUCK et al., 2004; FAVRE et al., 1975; LARSEN; STORGAARD; FEY, 1987; LIU et al., 1997).

Dentre as diferentes possibilidades de vacinação, encontram-se - vacina autógena, vacina a partir do extrato verrugas maceradas, vacinas utilizando vírus purificados, proteínas recombinantes expressas, por exemplo, em sistema bacteriano e vacinas baseadas em VLPs (Revisado por NICHOLLS; STANLEY; 2000).

Várias vacinas terapêuticas visam à interação de células apresentadoras de antígenos, assim como as células dendríticas (CDs), gerando a imunidade mediada por células para a eliminação da infecção. A forma de vacinação pode influenciar o processamento do antígeno, a apresentação dos epítomos e a subsequente resposta imune celular gerada. Na via do MHC classe I, o antígeno presente no citossol é quebrado em pedaços menores via proteossoma, sendo carregado pelas moléculas do MHC classe I no retículo endoplasmático (RE) e enviado para a superfície da célula para apresentação às células T CD8+. Na via de apresentação de MHC classe II, o antígeno exógeno é endocitado em vesículas, carregado pelas moléculas

MHC de classe II dentro do compartimento endossomal/lisossomal e enviado para a superfície celular para apresentação às células T CD4 +. Vacinas baseadas em RNA, em vetores bacterianos e em vetores virais têm como objetivo levar o antígeno até o citossol para a apresentação via MHC I às células T CD8+. Vacinas baseadas em proteínas podem carrear proteínas exógenas e ativar células T helper CD4+ (Figura 6) (MA et al., 2010).

Figura 6 - Abordagens da vacina terapêutica contra o HPV.

Ag - antígeno; MHC - complexo principal de histocompatibilidade; RE - retículo endoplasmático.
Fonte: Modificada de Ma et al. (2010) pela autora.

As vacinas terapêuticas são baseadas na indução de imunidade celular contra células expressando antígenos virais, visando à regressão de lesões associadas ao HPV. As proteínas não estruturais E6 e E7 são alvos da maioria dessas vacinas, uma vez que são proteínas constantemente expressas em células de tumores associados ao papilomavírus (MANTOVANI; BANKS, 2001; MÜNGER et al., 2001).

As vacinas profiláticas são baseadas na indução de anticorpos neutralizantes capazes de prevenir a infecção pelo HPV. Para isso, os antígenos utilizados baseiam-se nas proteínas estruturais do capsídio viral, L1 e L2, inclusive fusionadas. O desenvolvimento de uma vacina

tradicional baseada no vírus inativado ou atenuado não foi ainda possível em parte devido à falta de sistemas que permitam a obtenção de grandes quantidades de partículas virais, pois o BPV não é cultivável (FAVRE et al., 1975; JARRET et al., 1991; LOWY; SCHILLER, 2006).

As VLPs (“virus like particles”) de L1 constituem-se em uma alternativa para a produção de vacinas profiláticas, sendo capazes de induzir a formação de anticorpos neutralizantes sistêmicos e de mucosa, além de induzir imunidade celular em animais imunizados (LIU et al., 1998). Anticorpos neutralizantes foram produzidos pela vacinação com a proteína L1 de BPV-1 (CAMPO, 1997). Experiências com bezerros imunizados contra BPV-6 mostraram que os mesmos não ficaram imunes a BPV-1, sendo que a imunização profilática para uma gama de PVs é tipo específica (JARRETT et al., 1990b).

As oncoproteínas E6 e E7 são alvos para abordagens vacinais terapêuticas, pois a integração do DNA viral ao cromossomo do hospedeiro interrompe os genes E1/E2, os quais regulam a expressão das oncoproteínas, resultando no aumento dos níveis das proteínas E6 e E7 (CRISH et al., 2000; DURST et al., 1992; FAVRE; RAMOZ; ORTH, 1997; VON KNEBEL DOEBERITZ et al., 1994).

Em relação à resposta imune, a vacinação terapêutica visa induzir elevada resposta através das células CTL e T-helper contra os antígenos do HPV, tais como as oncoproteínas E6 e E7. Tais oncoproteínas contêm epítomos que são processados e apresentados pelas moléculas MHC classe I. Foi demonstrado que as MHC-I restringiram epítomos de proteínas E6 e E7 do HPV-16 e 18, sintetizados endogenamente. Por essas razões, as proteínas E6 e E7 e seus peptídeos têm sido amplamente utilizados em ensaios clínicos na tentativa de tratamento de cânceres causados por HPV (RUDOLF et al., 2001; STELLER et al., 1998).

2.9 Bioinformática

A bioinformática, termo encontrado na literatura a partir do início dos anos 1990, surgiu da necessidade de recursos cada vez mais especializados e modernos para a manipulação e análise computacional dos dados biológicos, como sequenciamentos de DNA, expressão de genes, análise de proteínas e interações moleculares. Desse modo, passou-se a utilizar métodos estatísticos capazes de analisar grandes quantidades de dados biológicos, de prever funções dos genes e a demonstrar relações entre genes e proteínas. Bioinformática é a análise da informação biológica utilizando a ciência da computação (COLARES, 2005).

A determinação experimental da estrutura de proteínas é um processo difícil, caro e requer tempo. O distanciamento entre uma sequência de aminoácidos conhecida e sua estrutura proteica correspondente aumenta rapidamente (MONEY et al., 2011). Como exemplo, até maio de 2011, comparados aos 15 milhões de sequências proteicas depositadas no banco de dados UniProt (The Universal Protein Resource, 2008 - UniProtKB/TrEMBL), apenas aproximadamente 68 mil estruturas estavam depositadas no banco de dados proteico (Protein Data Bank) (BERMAN et al., 2000). Cerca de 98% dessas sequências proteicas depositadas derivam da tradução de aminoácidos a partir de bancos de dados nucleicos (EMBL-Bank/GenBank/DBJ databases) (UNIPROT, 2008). A modelagem computacional representa uma forma segura de resolver essa lacuna.

Um modelo estrutural *in silico* pode ser gerado com um elevado grau de confiança baseado em uma proteína homóloga, ou seja, com identidade superior a 25% (ALTSCHUL et al., 1990; MONEY et al., 2011). O MODELLER é o programa mais usado em modelagem molecular de estruturas tridimensionais de proteínas (MARTI-RENO et al., 2000). As estruturas tridimensionais geradas na modelagem molecular comparativa por homologia devem ser validadas para que se obtenha um modelo confiável. A validação é uma etapa essencial, que pode ser executada em diferentes níveis de organização estrutural, utilizando-se programas específicos.

O programa PROCHECK (LASKOWSKI et al., 1993) analisa a estereoquímica da estrutura, verificando e avaliando o ambiente de cada resíduo de aminoácido e da estrutura global, como os ângulos formados entre eles e suas distorções, as ligações entre os resíduos e a planaridade. A cadeia principal de um peptídeo possui três ângulos de torção chamados ômega (ω), phi (ϕ) e psi (ψ), sendo estes dois últimos os maiores responsáveis por determinar a conformação de um polipeptídeo. O grau de rotação na ligação entre os átomos de nitrogênio e carbono α da cadeia principal é chamado phi e a rotação na ligação entre o carbono α e o carbono do grupo carbonila é chamado psi, sendo que esses ângulos phi e psi possuem livre rotação (Figura 7). A ligação entre os átomos de nitrogênio e carbono do grupo carbonila é chamado ômega, sendo que os átomos envolvidos nessa ligação encontram-se no mesmo plano ($\omega=180^\circ$ trans ou 0° cis) (BRANDEN; TOOZE, 1998). Um aminoácido em uma cadeia peptídica não pode apresentar qualquer valor para os ângulos ϕ e ψ . Certas combinações não são acessíveis devido ao impedimento estérico. As faixas permitidas de ϕ x ψ podem ser previstas e visualizadas em diagramas de contorno estérico chamados de gráficos de Ramachandran, sendo o gráfico útil por definir os resíduos que se encontram nas regiões energeticamente mais favoráveis e desfavoráveis, orientando a avaliação da qualidade de

modelos teóricos ou experimentais de proteínas (RAMACHANDRAN; RAMAKRISHNAN; SASISEKHARAN, 1963).

Figura 7 - Ângulos de torção da cadeia proteica principal.

ω - ômega, ϕ - phi, ψ - psi; C - átomo de carbono; H - átomo de hidrogênio; N - átomo de nitrogênio; O - átomo de oxigênio; Cα em vermelho - carbono alfa; em verde - átomos do grupo carbonila; em azul - átomos do grupo amina.

Fonte: <http://www.chembio.uoguelph.ca/educmat/phy456/456lec01.htm>, modificada pela autora.

Já o programa VERIFY-3D (LÜTHY; BOWIE; EISENBERG, 1992) avalia a coerência da estrutura molde com a sequência gerada, por meio do perfil 3D, onde a posição de cada resíduo do modelo 3D é caracterizada pelo seu ambiente químico. O ambiente dos resíduos é definido por três parâmetros - a área do resíduo que está voltada para o interior da proteína, a área coberta por átomos polares e a estrutura secundária. O perfil obtido para cada resíduo é comparado estatisticamente com a preferência de cada um dos 20 aminoácidos por um determinado ambiente. O método baseia-se no fato de que modelos de proteínas com estrutura 3D adequada têm pontuações (“scores”) maiores do que os modelos com estrutura 3D inadequada, com referência a uma matriz elaborada a partir de uma análise estatística envolvendo as estruturas proteicas do PDB (BOWIE; LÜTHY; EISENBERG, 1991; LUTHY;

BOWIE, 1991; LÜTHY; BOWIE; EISENBERG, 1992). Por fim, a média de todos os fatores analisados é considerada, sendo representada pelo Fator-G (ENGH; HUBER, 1991).

O parâmetro mais comum calculado entre duas estruturas proteicas, como a estrutura modelada e a que serviu como molde, é o desvio médio quadrático (RMSD). Seu valor pode ser calculado em função de todos os átomos das proteínas ou em função de algum subconjunto de átomos. Para calcular valores de RMSD significativos, as duas estruturas em consideração devem, primeiramente, ser sobrepostas (NAPOLI, 2003).

Diversas análises sobre a proteína podem ser realizadas após a determinação do modelo estrutural. Por exemplo, o potencial eletrostático mostra graficamente a distribuição das cargas positivas e negativas, sendo este tipo de representação de superfície útil para discutir interfaces de uma proteína e suas regiões de sítio ativo. O potencial eletrostático é uma força não covalente, de atração entre grupos de aminoácidos de cargas opostas. Tais interações representam forças estabilizadoras da estrutura de uma proteína (REGO et al., 2012; WEINER et al., 1982; XIONG, 2006).

Outra análise relevante é a identificação dos átomos capazes de realizar interações cátion- π . As interações cátion- π nas estruturas proteicas são definidas e avaliadas através de um critério baseado em energia, visando selecionar os pares com valores significantes. Foi demonstrado que, quando um aminoácido com cadeia lateral catiônica (Lys ou Arg) está próximo a um aminoácido com cadeia lateral aromática (Phe, Tyr, ou Trp), a geometria favorece a interação cátion- π , sendo a cadeia de arginina mais favorável do que a de lisina para essa interação. O aminoácido histidina pode participar da interação, ora como cátion, ora como π , dependendo de seu estado de protonação (GALLIVAN; DOUGHERTY, 1999).

Na ausência de uma estrutura experimental, programas computacionais para a geração *in silico* de modelos tridimensionais proteicos e na avaliação dos mesmos têm auxiliado cada vez mais pesquisas em diversas áreas, como a biomolecular, a biotecnologia e a pesquisa biomédica.

Visando aumentar a compreensão das diferenças biológicas entre os vírus HPV e contribuir com os estudos sobre a sua infectividade e patogenicidade, Daf e colaboradores, a partir de sequências genômicas completas depositadas no Nacional Centre for Biotechnology Information (NCBI), utilizaram ferramentas de bioinformática para realizar uma análise filogenética rigorosa e aprofundada das proteínas E6 e E7, baseada na variação genômica desses vírus humanos. Os mesmos autores citam, ainda, a importância de estudos sobre as proteínas E6 e E7, especialmente de suas estruturas tridimensionais, no “design” de drogas e vacinas (DAF et al., 2010).

A partir da análise *in silico* do gene E6 de papilomavírus aviário, foi demonstrada a possível duplicação dos domínios CXXC de ligação aos átomos de zinco, de relevante importância evolutiva (VAN DOORLAER et al., 2009). A associação de técnicas experimentais e de análises por bioinformática apontaram os mecanismos moleculares pelos quais a proteína E6 de diferentes HPVs pode reconhecer especificamente e competir pelos domínios PDZ de supressores tumorais celulares no processo de transformação celular e oncogênese (ZHANG et al., 2007).

Como até 2013 as estruturas de proteínas E6 e E7 determinadas por cristalografia, baseadas nestas proteínas completas, não estavam disponíveis, Kumar e colaboradores, utilizando a bioinformática, realizaram a predição estrutural e validação das proteínas E6 e E7 de 50 diferentes tipos de HPV, sendo a modelagem da estrutura tridimensional de cada proteína baseada em homologia. O trabalho realizado teve como objetivo comparar e explorar as variações estruturais destas oncoproteínas para futuramente estudarem essas diferenças e aplicarem no desenvolvimento de medicamentos e vacinas (KUMAR et al., 2012). A partir desse tipo de análise e da determinação da estrutura tridimensional completa por cristalografia das proteínas E6 de BPV-1 e HPV-16 em 2013 (ZANIER et al., 2013) a avaliação *in silico* por comparação estrutural preditiva foi facilitada, ampliando esse tipo de estudo.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Tendo em vista a importância da proteína E6 como agente oncogênico, o presente trabalho teve por objetivo clonar e expressar o gene E6 do Papilomavírus Bovino do tipo 1, visando a purificação da proteína E6 e seu estudo e caracterização para a obtenção de insumos biotecnológicos.

3.2 Objetivos específicos

- Amplificar, clonar e expressar o gene E6 do BPV-1;
- Purificar a proteína recombinante E6 do BPV-1;
- Analisar *in silico* o gene e a proteína E6 do BPV-1.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Amplificação do gene E6 de BPV-1

Os iniciadores foram desenhados a partir da sequência genômica completa do BPV-1 depositada no GenBank (GENBANK, 2008) (*accession number* X02346) sendo, respectivamente, os iniciadores senso e antissenso -

5'-GAAAACCTGTATTTTCAGGGCTAGGACCTGAAACCTTTTGC-3' e

5'-GGCCTCGAGCTGCAGGTGAATCATCCAAG-3',

onde as letras sublinhadas indicam os nucleotídeos correspondentes à sequência de aminoácidos para ação da TEV protease e as letras em *itálico* sublinhadas o sítio de restrição para a enzima *XhoI*.

Os iniciadores foram usados na reação de PCR para a amplificação do gene E6, sendo o DNA genômico do BPV-1 previamente clonado no vetor pAT153 usado como molde (CAMPO; COGGINS, 1982).

As reações de amplificação foram preparadas para um volume total de 25 µL, sendo 12,5 µL de Kit PCR Master Mix Promega (Promega Biotecnologia do Brasil São Paulo, S.P., Brasil), 0,75 µL de cada iniciador (10 µM), 200 ng/µL da amostra de DNA e 9 µL, em média, de água (Nuclease Free-water), disponibilizada no kit "Master Mix".

A amplificação foi realizada a 95 °C por 4 min; 30 ciclos a 95 °C por 1 min, 50 °C por 30 s e 72 °C por 1 min; alongamento final a 72 °C por 5 min para completar a reação.

4.2 Purificação do gene E6 de BPV-1 amplificado

O gene E6-1 amplificado foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1% corado com GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain Biotium (Uniscience do Brasil, São Paulo, S.P., Brasil) cortado do gel com auxílio de bisturi e purificado com o kit Invisorb® Fragment Clean Up Invitex (Strattec Molecular, Berlin, Germany).

4.3 Ligação, clonagem e purificação plasmidial

O gene amplificado foi sequenciado no Centro de Estudos do Genoma Humano (CEGH – USP), analisado para confirmação da sequência e então ligado ao vetor de clonagem pCR4-TOPO Invitrogen (Life Technologies do Brasil Ltda, São Paulo, S.P., Brasil) (Figura 8), de acordo com as instruções do fabricante.

Células quimiocompetentes DH5 α foram transformadas com a ligação (E6-1/ pCR4-TOPO) por choque térmico. Os clones foram selecionados em placas contendo LB ágar e ampicilina (50 $\mu\text{g/mL}$). As colônias foram transferidas para tubos contendo meio LB e ampicilina (50 $\mu\text{g/mL}$) e cresceram por 16 h a 37 °C sob agitação. Os plasmídeos foram purificados com uso do kit WIZARD Mini Prep Purification (Promega).

Os plasmídeos purificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 0,8% para verificação da integridade.

4.4 Digestão dos plasmídeos E6-1/pCR4-TOPO e purificação do inserto

Os plasmídeos purificados foram submetidos à digestão com as enzimas *XhoI* e posteriormente com *EcoRI*. Foram adicionados 5 μL (42,7 ng/ μL) de plasmídeo E6-1/pCR4-TOPO, tampão específico 1X, BSA 1X, *XhoI* 1U e água até o volume final de 20 μL . A reação ocorreu a 37 °C por 4 h e 80 °C por 15 min para inativação da enzima. Posteriormente foram adicionados a enzima *EcoRI* HF 1 U, tampão específico 1X e água até o volume final de 30 μL . A reação ocorreu a 37 °C por 4 h e 65 °C por 20 min para inativação da enzima.

A reação de digestão foi submetida à eletroforese em gel de agarose 1% corado com GelRed™. Após confirmação, foram realizadas novas digestões, totalizando 120 μL para purificação do inserto. O volume total foi submetido à eletroforese e a banda referente ao inserto recortada do gel com auxílio de bisturi e purificada com o kit Invisorb® Fragment Clean Up (Invitex). O inserto purificado foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1% corado com GelRed™ para confirmação da sua presença.

Figura 8 - Mapa do plasmídeo pCR®4-TOPO®, Invitrogen.

A região de ligação do inserto está evidenciada em preto.

4.5 Ligação, subclonagem e purificação do DNA plasmidial

Os insertos purificados foram ligados ao vetor de expressão pET-28a(+) vector, Novagen (Novagen Genética Ltda., Itapira, S.P., Brasil) (Figura 9), previamente digerido com as enzimas *Xho*I e *Eco*RI. Foram utilizados aproximadamente 29 ng/μL de plasmídeo, 87 ng/μL do inserto e enzima T4 DNA ligase (Invitrogen) 1 U. A reação de ligação ocorreu a 16 °C por 16 h. Células quimiocompetentes *E. coli* BL21 (DE3) foram transformadas com o plasmídeo recombinante (E6-1/pET-28a) por choque térmico. Os clones foram selecionados em placas contendo LB ágar e canamicina (50 μg/mL). As colônias foram transferidas para tubos contendo 4 mL meio LB e canamicina (50 μg/mL) e multiplicaram por 16 h a 37 °C sob agitação, sendo 3 mL utilizados para extração do DNA plasmidial. Cinco colônias (A a E) foram selecionadas, sendo os plasmídeos purificados com uso do kit WIZARD Mini Prep Purification (Promega) e submetidos à eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com GelRed™. Para confirmação da clonagem e verificação da matriz de leitura, os plasmídeos foram sequenciados no Centro de Estudos do Genoma Humano (CEGH – USP), sendo

utilizados os iniciadores sintetizados para amplificação do gene E6-1 e os iniciadores para o plasmídeo (T7), totalizando quatro reações. Para confirmação, as reações foram repetidas e as sequências foram analisadas por sobreposição. Após o sequenciamento, foram selecionadas duas colônias (D e E).

Figura 9 - Mapa do plasmídeo pET-28a(+), Novagen.

Os sítios para as enzimas de restrição utilizadas para a ligação do inserto estão evidenciados em vermelho.

4.6 Transformação bacteriana com pET28a(+)

Como controle negativo para microscopia eletrônica, bactérias *E coli* BL21 (DE3) quimiocompetentes foram transformadas com plasmídeos pET-28a(+), não ligados ao gene de

interesse (E6 de BPV-1), por choque térmico, seguindo o mesmo protocolo para transformação.

4.7 Indução da expressão proteica

4.7.1 Cultura bacteriana e indução

Células transformadas (500 uL) foram transferidas para tubos contendo 10 mL de LB e canamicina (50 µg/mL) e multiplicaram sob agitação a 37 °C até atingirem a fase log (OD₆₀₀ = 0.6). Aproximadamente 2 mL foram retirados (fração não induzida) e aos 8 mL restantes foi acrescentado IPTG a uma concentração final de 1 mM/mL. A indução ocorreu por 4 h a 37 °C.

4.7.2 SDS-PAGE

Tanto a fração não induzida (2 mL) quanto a induzida (8 mL) foram centrifugadas, ressuspendidas em 50 µL e 2 mL respectivamente e 20 µL de cada foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 17% a 40 V para confirmação da indução. Os géis foram corados com Azul de Coomassie ou Page Blue™ Protein Staining Solution Fermentas (Thermo Fisher Scientific Inc., Suwaane, G.A., USA).

4.7.3 Western blot

As proteínas E6-1 recombinantes foram separadas por SDS-PAGE 17% e transferidas para membrana de nitrocelulose, 150 mA por 16h. A membrana foi bloqueada com solução PBS com leite desnatado 5%. Foram feitas três lavagens de 5 min cada com solução PBS contendo Tween 20 0,05% (PBST). A membrana foi incubada por 2 h com o anticorpo Anti-His Monoclonal Antibody GE (General Electric Company, Berlin, Germany) (1 -3000) a temperatura ambiente. Foram feitas 3 lavagens de 5 min cada com solução PBS contendo Tween 20 0,05% (PBST). A membrana foi incubada por 1 h com o anticorpo Goat Anti-Mouse IgG Horseradish Peroxidase (GE) (1 -2000) a temperatura ambiente. As bandas foram visualizadas pela reação com diaminobenzidina (DAB) na presença de peróxido de hidrogênio ou por TMB (tetrametilbenzidina) Membrane Peroxidase Substrate KPL (KPL, Inc. Gaithersburg, Maryland, USA). A reação foi finalizada com água destilada.

4.7.4 Microscopia eletrônica

Bactérias *E coli* BL21 transformadas com o plasmídeo recombinante (E6-1/pET-28a) foram transferidas para tubos contendo 3 mL de LB e canamicina (50 µg/mL) e multiplicaram sob agitação a 37 °C até atingirem a fase log (OD600 = 0.6). Aproximadamente 1 mL foi retirado (não induzido) e nos 2 mL restantes foi acrescentado IPTG a uma concentração final de 1 mM/mL. A indução ocorreu por 4h a 37 °C. A mesma metodologia foi aplicada às bactérias *E coli* BL21 transformadas com o plasmídeo pET-28a, porém sem o gene de interesse recombinante (E6 de BPV-1), servindo como controle.

As frações induzidas e não induzidas foram centrifugadas, ressuspendidas em aproximadamente 1 mL de glutaraldeído cada e então encaminhadas ao laboratório do Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento, no Instituto de Ciências Biomédicas – ICB II, onde foram preparadas para análise por microscopia eletrônica para verificação da expressão e da formação de corpúsculos de inclusão.

A observação e o registro em imagens foram realizados no Laboratório de Biologia Celular do Instituto Butantan, utilizando Microscópio Eletrônico de Transmissão LEO 906E.

4.7.5 Escalonamento

Células transformadas (500 µL) foram transferidas para dois frascos contendo 500 mL de LB e canamicina (50 µg/mL) cada e multiplicaram sob agitação a 37 °C até atingirem a fase log (OD600 = 0.6). Foi acrescentado IPTG a uma concentração final de 1 mM/mL. A indução ocorreu por 4 h a 37 °C. O volume final foi separado em quatro recipientes contendo 250 mL cada, os quais foram ultracentrifugados a 10.000 g por 30 min a 4 °C.

4.8 Purificação proteica

4.8.1 Primeira purificação

Para a purificação das proteínas recombinantes, o pellet bacteriano foi ressuspendido em TrisHCl 20 mM e NaCl 500 mM, pH 8.0, suplementado com inibidor de protease (PMSF 2 mM concentração final) em um volume final de 30 mL. O volume total foi submetido à *French Press* (1000 bar), no laboratório de Biotecnologia do Instituto Butantan.

O lisado celular foi centrifugado a 6.000 g por 60 min a 4 °C. O pellet foi ressuspensão em TrisHCl 20 mM e NaCl 500 mM, ureia 8 M, imidazol 50 mM, pH 8.0, volume final 25 mL, mantido sob agitação por 16 h a 4 °C.

As proteínas recombinantes (E6-1) contendo a cauda de histidina (6xHis) foram purificadas na coluna Ni Sepharose 6 Fast Flow (GE Healthcare). Aproximadamente 5 mL de resina foram centrifugados em tubo falcon para retirada do etanol. Foram adicionados 5 mL de água ultrapura e após a homogeneização foi realizada nova centrifugação, sendo esse procedimento repetido. Foram adicionados 5 mL de tampão de equilíbrio (TrisHCl 20 mM e NaCl 500 mM, ureia 8 M, imidazol 50 mM, pH 8.0), homogeneizado e centrifugado por 2x. O sobrenadante clarificado foi então adicionado à resina e ambos mantidos em homogeneização por 4h a 4 °C. A resina contendo a solução proteica foi transferida para uma coluna de purificação e a passagem do fluxo foi realizada por gravidade. Foi adicionado tampão de lavagem (TrisHCl 20 mM e NaCl 500 mM, ureia 8 M, imidazol 100 mM, pH 8.0) e realizado o monitoramento pelo método de Bradford (1976) até cessar o fluxo de proteínas não específicas. Foi então adicionado o tampão de eluição (TrisHCl 20 mM e NaCl 500 mM, ureia 8 M, imidazol 500 mM, pH 8.0) e novamente realizado o monitoramento por Bradford, desta vez das proteínas de interesse eluídas.

4.8.2 Diálise

Para retirada do imidazol visando uma segunda purificação e da ureia para o “refolding” proteico, foram utilizados cassetes para diálise (Slide-A-Lyzer® Dialysis Cassette – Thermo Scientific). Aproximadamente 10 mL de solução proteica foram dialisados em 2 litros de solução TrisHCl 20 mM e NaCl 500 mM, pH 8.0, por 8 horas a 4 °C. Foram realizadas duas trocas de tampão.

4.8.3 Segunda purificação

As proteínas recombinantes (E6-1) dialisadas foram repurificadas na coluna Ni Sepharose 6 Fast Flow (GE Healthcare). A concentração de imidazol nos tampões foi alterada para testes. Foram adicionados 2 mL de tampão de equilíbrio (TrisHCl 20 mM e NaCl 500 mM, imidazol 1 mM, pH 8.0) à coluna, sendo o tampão e a resina homogeneizados e centrifugados por 2x. O sobrenadante clarificado foi adicionado à resina e ambos mantidos em homogeneização por 4 h a 4 °C. A resina contendo a solução proteica foi transferida para

uma coluna de purificação e a passagem foi realizada por gravidade. Foi adicionado tampão de lavagem (TrisHCl 20 mM e NaCl 500 mM, imidazol 10 mM, pH 8.0). Foi então adicionado o tampão de eluição (TrisHCl 20 mM e NaCl 500 mM, imidazol 250 mM, pH 8.0) e realizado o monitoramento por Bradford até cessar a saída de proteínas.

4.9 Bioinformática

4.9.1 Alinhamento

A sequência de nucleotídeos gerada pelo sequenciamento foi traduzida em aminoácidos pelo programa BioEdit 7.1.3.0 (BioEdit Sequence Alignment Editor; Hall, 1999). As sequências recombinantes do gene E6 de BPV-1 e da proteína correspondente foram alinhadas às sequências depositadas no banco de dados GenBank.

Também foram realizados alinhamentos utilizando o programa ClustalW (THOMPSON; HIGGINS; GIBSON, 1994). As sequências foram inspecionadas e as alterações manuais foram feitas quando necessárias utilizando o programa GeneDoc 2.6 (Multiple Sequence Alignment Editor & Shading Utility; NICHOLAS; NICHOLAS, 1997), gerando a sequência da proteína E6-1 recombinante em formato aln.

4.9.2 Modelagem estrutural

A primeira etapa da modelagem molecular comparativa por homologia foi a identificação de uma proteína de estrutura tridimensional conhecida, a ser chamada de molde, com pelo menos 25% de identidade à proteína recombinante E6 de BPV-1. As sequências a serem modeladas, chamadas sequências alvo, foram submetidas ao programa BLASTP (ALTSCHUL et al., 1990; ALTSCHUL et al., 1997), utilizando o banco de dados do Protein Data Bank (PDB), a fim de encontrar o molde mais apropriado para a construção do modelo.

O programa MODELLER6v2 (SALI; BLUNDELL, 1993) foi utilizado para construir modelos de proteínas de acordo com a metodologia de modelagem molecular comparativa por homologia. Posteriormente, o Swiss PDB Viewer – SPDBV 3.7 (GUEx; PEITSCH, 1997) foi utilizado para a visualização das estruturas tridimensionais, geração das superfícies moleculares e potenciais eletrostáticos, bem como para a sobreposição dos moldes e proteínas modeladas a fim de identificar as similaridades e diferenças estruturais.

4.9.3 Validação

Os modelos foram validados, principalmente, através da análise do gráfico de Ramachandran e do score 3D-1D, usando os programas PROCHECK e VERIFY-3D, respectivamente, ambos disponíveis no servidor NIH MBI Laboratory for Structural Genomics and Proteomics (<http://nihserver.mbi.ucla.edu/SAVES/>).

Dentre os resultados obtidos pelo PROCHECK, foram analisados -

- Gráfico de Ramachandran;
- Planaridade de ligação peptídica;
- Distorções angulares;
- Qualidade estereoquímica total (Fator-G).

O programa VERIFY-3D (LÜTHY; BOWIE; EISENBERG, 1992) foi utilizado para avaliar a coerência entre a estrutura gerada e a estrutura molde, de acordo com o ambiente químico dos aminoácidos.

Através do programa SPDBV, utilizando-se o comando “Magic Fit”, foi realizada a sobreposição do modelo final à estrutura proteica molde, sendo também apontados os aminoácidos divergentes. A partir da sobreposição, foi calculado o desvio médio quadrático (RMSD) entre a posição atômica da proteína utilizada como referência e os modelos gerados para a proteína recombinante E6 de BPV-1.

4.9.4 Topologia

A partir do arquivo pdb, o diagrama da topologia da proteína E6-1 recombinante foi gerado utilizando o programa PDBsum (LASKOWSKI, 2009).

4.9.5 Potencial eletrostático

O potencial eletrostático das proteínas E6 de BPV-1 recombinante e referência (3PY7) foi calculado e a superfície molecular foi gerada pelo programa SPDBV, representando graficamente a distribuição das cargas positivas e negativas na superfície das estruturas proteicas. Algoritmos são utilizados para a resolução da equação de Coloumb e Poisson-Boltzmann, os quais permitem uma descrição do campo eletrostático gerado pelas cargas existentes na molécula. A superfície eletrostática da proteína é colorida de acordo com o

potencial eletrostático. Em vermelho encontram-se regiões de potencial negativo, em azul, potenciais positivos e em branco, regiões neutras (SANNER; OLSON; SPEHNER, 1996).

4.9.6 Antigenicidade

Para o estudo da antigenicidade foi utilizado o programa JaMBW Edition 1.1 (bioinformatics.org/JaMBW, TOLDO, 1997), o qual se baseia no valor de hidrofiliidade atribuído a cada aminoácido e posterior cálculo da média ao longo da cadeia polipeptídica (HOOP, WOODS, 1981). Tanto a sequência proteica E6-1 quanto a E6-1 referência foram analisadas. A sequência E6-1 foi analisada de três formas - contendo a cauda de histidina, o sítio TEV e o fragmento correspondente ao plasmídeo pCR4-TOPO; contendo o aminoácido glicina após a digestão virtual com a enzima TEV; e somente a sequência proteica.

4.9.7 Regiões conservadas

Para análise das regiões conservadas da proteína recombinante, a mesma foi comparada a todas as proteínas E6 de PVs já depositadas (consurf.tau.ac.il; ASHKENAZY et al., 2010). O grau de conservação para cada aminoácido foi apontado na sequência linear proteica e na predição da estrutura 3D.

Foram localizados os aminoácidos capazes de realizar ligações cátion- π , sendo calculado o valor do potencial de ligação de cada um deles.

5 RESULTADOS

5.1 Amplificação e purificação do gene E6 de BPV-1

O gene amplificado por PCR apresentou banda no gel com tamanho aproximado de 500 pb. Após a purificação, também foi observada uma banda com aproximadamente 500 pb (Figura 10).

Figura 10 - Amplificação e purificação do gene E6-1.

A - Eletroforese do gene E6-1 recombinante amplificado; M - marcador de peso molecular 100 pb (Fisher BioReagents), 0,5 uL; 1 - gene E6-1 amplificado, 25uL de reação. **B** - Eletroforese da purificação do gene E6-1 recombinante amplificado. M - marcador de peso molecular 100 pb, 1 uL; 1 - gene E6-1 recombinante amplificado, 5 uL. Géis de agarose 1% corados com GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain (Biotium).

5.2 Ligação, clonagem e subclonagem do gene E6-1

5.2.1 Clonagem

A clonagem do plasmídeo contendo o gene de interesse (E6-1/pCR4-TOPO) em bactérias *E. coli* DH5α quimiocompetentes foi comprovada quanto à presença do inserto E6-1 pela dupla digestão com as enzimas *Xho*I e *Eco*RI (Figura 11).

Figura 11 - Digestão plasmidial para liberação e purificação do inserto.

M₁ - Marcador de peso molecular 1 kb (GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder, Fermentas), 0,5 uL; 1 e 3 - plasmídeo recombinado E6-1/pCR4-TOPO sem digerir, 5 uL; 2 e 4 - plasmídeos recombinados E6-1/pCR4-TOPO digeridos com *Xho*I e *Eco*RI, 20 uL de reação; M₂ - marcador de peso molecular 100 bp (Quick-Load® 100 bp DNA Ladder), 1uL. Gel de agarose 0,8% corado com GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain (Biotium).

5.2.2 Subclonagem

A subclonagem dos plasmídeos para expressão contendo o gene de interesse (E6-1/pET-28a) em bactérias quimiocompetentes *E. coli* BL21 (DE3) foi também comprovada pelo sequenciamento (Figura 12) e pela liberação do inserto após a dupla digestão com as enzimas de restrição *Xho*I e *Eco*RI.

Figura 12 - Sequências nucleotídica e proteica de E6-1 recombinante.

ATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCACAGCAGCGGCCTGGTGCCGCGCGGCAGCCATATGGCTAGCAT
 GACTGGTGGACAGCAAATGGGTGCGGGATCCGAATTGCGCCTGAAACCTGTATTTTCAGGGCATGGACC
 TGAAACCTTTTGAAGAACCAATCCATTCTCAGGGTTGGACTGTCTGTGGTGCAGAGAGCCTCTTTCAGAG
 GTTGATGCTTTTAGGTGCATGGTCAAAGACTTTCATGTTGTAATTCGGGAAGGCTGTAGATATGGTGCATGT
 ACCACTTGTCTTGAAACTGTTTAGCTACTGAAAGAAGACTTTGGCAAGGTGTTCCAGTAACAGGTGAGG
 AAGCTGAATTATTGCATGGCAAACACTTGATAGGCTTTGCATAAGATGCTGCTACTGTGGGGGCAAACCTA
 ACAAAAAATGAAAAACATCGGCATGTGCTTTTAAATGAGCCTTTCTGCAAAACCAGAGCTAACATAATTAGA
 GGACGCTGCTACGACTGCTGCAGACATGGTTCAAGGTCCAAATACCCATAG

MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMASMTGGQQMGRGSEFAPENLYFQGM[↓]MDLKPFA[↓]R[↓]TNPFSGLDCLWCREPLS
 EVDAFR[↓]CMVKDFHVVIREGCRYGACTTCL[↓]ENCLATERRLWQGV[↓]PVTGEEAELLHGKTLDR[↓]LCIRCCYCGGKLT[↓]K
 NEK[↓]HRHVL[↓]FNEPFCKTRANIIRGR[↓]CYDCCRHGSR[↓]SKYP*

Legenda:

Sítio *EcoRI*

pET

TOPO

Sítio TEV

E6-1

O sítio da enzima de restrição *EcoRI* e da protease TEV estão indicados pelas setas.

5.3 Expressão proteica

5.3.1 Microscopia eletrônica

De acordo com a microscopia eletrônica, as bactérias utilizadas como controle negativo *E. coli* BL21, transformadas com o plasmídeo pET-28a sem o inserto (E6-1), tanto quando induzidas (Figuras 13A e 13C) quanto não induzidas (Figuras 13B e 13D), não apresentaram corpúsculos de inclusão.

Figura 13 - Microscopia eletrônica comparando bactérias *E. coli* BL21 (DE) não induzidas e induzidas por IPTG, transformadas com plasmídeo pET-28a, sem o gene de interesse (E6-1).

A - bactérias não induzidas, aumento 12.930X; **B** - bactérias induzidas, aumento 16.700X; **C** - bactérias não induzidas, aumento 35.970X; **D** - bactérias induzidas, aumento 27.800X. Microscópio eletrônico de transmissão LEO 906E, Laboratório de Biologia Celular do Instituto Butantan.

Em relação às bactérias *E. coli* BL21 (DE) transformadas com E6-1/pET-28a, a microscopia eletrônica mostrou a presença de corpúsculos de inclusão nas bactérias induzidas (Figuras 14B e 14D), indicando a expressão proteica. Foi observada a ausência desses corpúsculos nas bactérias não induzidas (Figuras 14A e 14C).

Figura 14 - Microscopia eletrônica comparando bactérias *E. coli* BL21 (DE3) transformadas com plasmídeo contendo o gene de interesse (E6-1/pET-28a), não induzidas e induzidas por IPTG.

A - bactérias não induzidas, aumento 12.930X; **B** - bactérias induzidas, aumento 16.700X; **C** - bactérias não induzidas, aumento 35.970X; **D** - bactérias induzidas, aumento 27.800X. Setas - corpúsculos de inclusão. Microscópio eletrônico de transmissão LEO 906E, Laboratório de Biologia Celular do Instituto Butantan.

5.3.2 SDS-PAGE e Western blot

O gel SDS-PAGE a partir da indução da expressão proteica em bactérias *E. coli* BL 21 (DE3) transformadas com o plasmídeo recombinante pET-28a(+) (E6-1/pET-28a) apresentou uma banda com aproximadamente 15 kDa somente nos extratos proteicos das bactérias induzidas (Figura 15A). O Western blot evidenciou as mesmas bandas com 15 kDa. Além destas, bandas em menor quantidade e peso foram reconhecidas pelo anticorpo específico para a cauda de histidina (Figura 15B).

Figura 15 - Indução da expressão da proteína E6-1 recombinante.

A - SDS-PAGE da indução da proteína E6-1 recombinante. M - marcador de peso molecular (Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder – Fermentas); NI_D - colônia D não induzida; I_D - colônia D induzida; NI_E - colônia E não induzida; I_E - colônia E induzida. SDS-PAGE 17% corado com Azul de Coomassie; **B** - Western blot da indução da proteína E6-1 recombinante. M - marcador de peso molecular; NI_D - colônia D não induzida; I_D - colônia D induzida; NI_E - colônia E não induzida; I_E - colônia E induzida.

5.4 Purificação proteica

5.4.1 Primeira purificação

Após a purificação por coluna de afinidade e análise em gel SDS-PAGE, foram observadas bandas com aproximadamente 15 kDa. A concentração proteica, de acordo com o método de Bradford, foi de 2 mg/mL. Porém, foram também observadas bandas inespecíficas com outros tamanhos (imagens não apresentadas), sendo então realizada a diálise e uma nova etapa de purificação em coluna de afinidade de níquel.

5.4.2 Diálise e segunda purificação

Após a diálise e a segunda purificação, a análise por SDS-PAGE apresentou uma banda com aproximadamente 15 kDa bastante evidente e uma outra com aproximadamente 30 kDa, resultantes da primeira fração da eluição. Foi observada uma banda de 15 kDa indicando baixa concentração proteica na segunda fração da eluição (Figura 16). A concentração proteica final, de acordo com o método de Bradford, foi de 0,5 mg/mL.

Figura 16 - SDS-PAGE da segunda purificação da proteína E6-1 recombinante após a diálise.

Gel de poliacrilamida 15% corado com PageBlue™ protein Stain Solution (Fermentas). M - marcador de peso molecular (Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder – Fermentas); 1 - primeira eluição; 2 - segunda eluição.

5.5 Análise por bioinformática

5.5.1 Sequenciamento, alinhamento e matriz de identidade

O sequenciamento mostrou a correta matriz de leitura do gene E6 de BPV-1 em pET-28a(+). A sequência nucleotídica E6-1 foi alinhada às sequências depositadas no GenBank e apresentou maior identidade com *accession number* X02346, a qual passou a ser considerada sequência referência. O alinhamento apontou diferenças entre quatro nucleotídeos (C-T, T-A, G-A e C-T) (Figura 17).

A sequência de aminoácidos da proteína E6-1 recombinante foi alinhada às sequências depositadas no Protein Data Bank utilizando o programa BLASTP, sendo encontrada maior identidade com *PDB codes* 3PY7, a qual passou a ser considerada sequência proteica molde. Foram observadas duas diferenças entre as sequências recombinante e molde (T-S e I-T) (Figura 18).

Figura 17 - Alinhamento entre as sequências nucleotídicas dos genes E6-1 recombinante e E6-1 referência (*accession number* X02346).

```

>lcl|59429
Length=414

Score = 743 bits (402), Expect = 0.0
Identities = 410/414 (99%), Gaps = 0/414 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 1   ATGGACCTGAAACCTTTTGCAAGAACCAATCCATTCTCAGGGTTGGACTGTCTGTGGTGC 60
          |||||
Sbjct 1   ATGGACCTGAAACCTTTTGCAAGAACCAATCCATTCTCAGGGTTGGATTGTCTGTGGTGC 60

Query 61   AGAGAGCCTCTTTCAGAGGTTGATGCTTTTAGGTGCATGGTCAAAGACTTTCATGTTGTA 120
          |||||
Sbjct 61   AGAGAGCCTCTTTCAGAGGTTGATGCTTTTAGGTGCATGGTCAAAGACTTTCATGTTGTA 120

Query 121  ATTCCGGAAGGCTGTAGATAAGGTGCATGTACCACTTGTCTTGAAAAGTGTGTTAGCTACT 180
          |||||
Sbjct 121  ATTCCGGAAGGCTGTAGATAAGGTGCATGTACCACTTGTCTTGAAAAGTGTGTTAGCTACT 180

Query 181  GAAAGAAGACTTTGGCAAGGTGTTCCAGTAACAGGTGAGGAAGCTGAATTATTGCATGGC 240
          |||||
Sbjct 181  GAAAGAAGACTTTGGCAAGGTGTTCCAGTAACAGGTGAGGAAGCTGAATTATTGCATGGC 240

Query 241  AAAACACTTGATAGGCTTTGCATAAGATGCTGCTACTGTGGGGGCAAACAAcaaaaaat 300
          |||||
Sbjct 241  AAAACACTTGATAGGCTTTGCATAAGATGCTGCTACTGTGGGGGCAAACAAcaaaaaat 300

Query 301  gaaaaaCATCGGCATGTGCTTTTTAATGAGCCTTTCTGCAAAACCAGAGCTAACATAATT 360
          |||||
Sbjct 301  GAAAAACATCGGCATGTGCTTTTTAATGAGCCTTTCTGCAAAACCAGAGCTAACATAATT 360

Query 361  AGAGGACGCTGCTACGACTGCTGCAGACATGGTTCAAGGTCCAAATACCCATAG 414
          |||||
Sbjct 361  AGAGGACGCTGCTACGACTGCTGCAGACATGGTTCAAGGTCCAAATACCCATAG 414

```

Query 1 - Sequência recombinante; Sbjct - Sequência referência (*accession number* X02346). Áreas marcadas - diferenças encontradas entre as sequências. (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>).

Figura 18 - Alinhamento entre as sequências de aminoácidos das proteínas E6-1 recombinante e E6-1 referência (*PDB codes 3PY7*).

Setas - diferenças encontradas entre as sequências. Os aminoácidos da sequência referência (3PY7) não referentes à proteína E6 de BPV-1 (1-370), como aqueles pertencentes às sequências “linker” e à cauda MBP, foram desconsiderados e não foram alinhados à sequência proteica E6-1 recombinante (E6-1 rec). Na sequência 3PY7, os aminoácidos ausentes no arquivo PDB (371-380 e 494-500) foram representados por traços para o alinhamento. (GeneDoc 2.7).

Baseada no sequenciamento, de acordo com os quatro pontos de mutação encontrados na sequência recombinante, a matriz de identidade apresentou 0,99 de similaridade entre as sequências de nucleotídeos e 0,985 entre as sequências de aminoácidos. Foi observado que, quando traduzida em aminoácidos, duas dessas mutações (T48C e A78G) foram silenciosas, ou seja, não houve mudança nos aminoácidos gerados (GAT→GAC=D e GAA→GAG=C). As outras duas mutações (A73T e T155C) geraram aminoácidos diferentes (ACA=T≠TCA=S25 e ATT=I≠ACT=T52) (Tabela 1).

Tabela 1 - Mutações entre as sequências de nucleotídeos e de aminoácidos de E6-1. As mutações estão indicadas em vermelho.

E6 BPV-1							
Nucleotídeo			Códon		Aminoácido		Posição
Posição	Ref	Rec	Ref	Rec	Ref	Rec	
48	T	→ C	GAU	→ GAC	D	= D	16
73	A	→ T	ACA	→ UCA	T	≠ S	25
78	A	→ G	GAA	→ GAG	C	= C	26
155	T	→ C	AUU	→ ACU	I	≠ T	52

Notas - Rec - sequências recombinantes geradas em laboratório;

Ref - sequências referência (*accession number* X02346; *PDB codes* 3PY7).

5.5.2 Modelagem estrutural

Os dados referentes ao alinhamento indicaram que a identidade entre a proteína-alvo e a proteína-molde (*PDB codes* 3PY7) foi de 99%, revelando equivalência estrutural entre os resíduos de aminoácidos.

Dez modelos para a proteína recombinante E6-1 foram gerados, sendo então baseados na proteína E6 de BPV-1 (*PDB codes* 3PY7), a qual possui uma resolução de 2,3 Å (ZANIER et al., 2013). Os dez modelos foram analisados para validação utilizando os programas PROCHECK e VERIFY-3D.

5.5.3 Validação

O gráfico de Ramachandran mostra a distribuição das combinações entre todos os ângulos torsionais phi (Φ) e psi (Ψ) que uma proteína pode apresentar na cadeia principal, sendo um importante indicador da qualidade estereoquímica de uma proteína (BRANDEN; TOOZE, 1991; FERSHT; DAGGETT, 2002). Todos os dez modelos gerados através da modelagem molecular comparativa por homologia foram analisados (Tabela 2) para a seleção do modelo mais adequado, sendo também observado o número de resíduos que se encontravam em configurações desfavoráveis do gráfico de Ramachandran (Tabela 3). Os modelos que se mostraram estereoquimicamente mais favoráveis foram os modelos 2 e 6, pois foi observado que 94,2% dos resíduos de aminoácidos se apresentaram em regiões com combinações dos ângulos Φ e Ψ mais favoráveis (A, B e L, vermelho), 5,8% nas regiões

adicionalmente favoráveis (a, b, l e p, amarelo escuro) e não houve resíduos de aminoácidos nas regiões generosamente favoráveis (~a, ~b, ~l, e ~p, amarelo claro) e nas regiões desfavoráveis (região em branco). Foram localizadas nesses mesmos modelos, na região desfavorável, uma e duas glicinas, respectivamente. Porém, por convenção, os aminoácidos glicina e prolina foram desconsiderados, por possuírem padrões estereoquímicos diferentes dos outros resíduos (LASKOWSKI et al., 1993). Os resultados do gráfico de Ramachandran referente modelo 2 estão apresentados na figura 19.

Tabela 2 - Estatísticas do gráfico de Ramachandran.

Estatísticas Ramachandran					
Modelos	F	AF	GF	D	Overall
1	93,3	5,8	0,8	0	93,3
2	94,2	5,8	0	0	94,2
3	90	9,2	0,8	0	90
4	91,7	8,3	0	0	91,7
5	95	5	0	0	95
6	94,2	5,8	0	0	94,2
7	90,8	8,3	0,8	0	90,8
8	90,8	8,3	0,8	0	90,8
9	91,7	8,3	0	0	91,7
10	90,8	8,3	0,8	0	90,8

Notas - F - região favorável;

AF - região adicionalmente favorável;

GF - região generosamente favorável;

D - região desfavorável.

Tabela 3 - Resultados do gráfico de Ramachandran para cada resíduo de aminoácido. O número de resíduos que se encontra em regiões desfavoráveis está indicado para cada tipo de aminoácido.

AA	Modelos									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Ala	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Arg	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Asn	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Asp	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cys	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0
Gln	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Glu	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
Gly	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
His	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0
Ile	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Leu	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Lys	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
Met	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Phe	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
Pro	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Ser	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
Thr	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Trp	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tyr	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Val	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TOTAL	2	1	3	1	2	2	2	3	2	3

Figura 19 - Gráfico de Ramachandran das correlações entre os ângulos phi (ϕ) e psi (ψ) do modelo 2, resultante da modelagem molecular comparativa por homologia.

Nenhum dos dez modelos gerados apresentou problemas quanto à planaridade de ligações peptídicas. Somente os modelos 3, 7 e 10 apresentaram distorções angulares (Tabela 4).

Todos os modelos apresentaram valores do Fator-G acima de -0,5, sendo o modelo 1 o menos favorável (Fator-G -0,2) e os mais favoráveis os modelos 8, 2 e 5 (Fator-G 0,09, 0,07 e 0,07, respectivamente) (Tabela 3).

Tabela 4 - Análise dos modelos gerados para a proteína E6 de BPV-1 recombinante pelo programa PROCHECK - planaridade de ligações, distorções angulares e Fator-G.

Modelo	Planaridade	PROCHECK	
		Distorções angulares	Fator-G
1	0	0	-0,02
2	0	0	0,07
3	0	1	0,01
4	0	0	0,07
5	0	0	0,04
6	0	0	0,03
7	0	1	0,02
8	0	0	0,09
9	0	0	0,04
10	0	1	0,06

O programa VERIFY-3D listou os valores para cada um dos dez modelos gerados quando comparados à sequência molde. Nesta lista estão os “scores” 3D-1D atribuídos para cada aminoácido. A análise do “score” dos resíduos individualmente mostrou valores aceitáveis para todos os modelos. Foram identificados os valores mínimo e máximo para cada modelo (tabela 5) e um gráfico foi gerado para os dez modelos (Figura 20), sendo que, quanto mais aminoácidos com “score” alto, mais adequado é considerado o modelo. Observando esses dados, o modelo 2 apresentou o segundo maior “score” (0,64). Como o modelo 9 apresentou maior “score” (0,65) com pouca diferença em relação ao modelo 2 e o mesmo já havia sido descartado pelas análises anteriores, o modelo 2 foi apontado como o mais adequado. O gráfico do modelo 2 está representado separadamente na figura 21.

Tabela 5 - Resultados da análise através do software VERIFY-3D.

VERIFY-3D										
	Modelos									
Valores	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Mínimo	-0,10	-0,06	-0,09	-0,02	-0,08	-0,07	-0,13	0	-0,13	-0,09
Máximo	0,57	0,64	0,57	0,58	0,57	0,60	0,54	0,54	0,65	0,52

Figura 20 - Gráfico da análise do VERIFY-3D mostrando a confiabilidade dos modelos para a proteína E6-1 recombinante.

Figura 21 - Gráfico da análise do VERIFY-3D para o modelo escolhido (modelo 2) da proteína E6-1 recombinante.

5.5.4 Modelo final

Uma vez escolhido e validado o modelo final (modelo 2), representativo da estrutura tridimensional da proteína E6-1 recombinante, tanto a estrutura do modelo 2 como a estrutura do molde (3PY7) foram visualizadas e comparadas através do programa computacional SPDBV 3.7. Nas figuras 22A e 22B estão representadas as estruturas tridimensionais correspondentes à proteína referência 3PY7 e à proteína recombinante E6 de BPV-1. A sobreposição das duas estruturas, apontando os aminoácidos divergentes (Figura 22C) e a proteína recombinante E6 de BPV-1 com os átomos de zinco (Figura 22D) também foram obtidas através do SPDBV.

Figura 22 - Estrutura tridimensional *in silico* das proteínas E6-1.

A - proteína E6-1 referência (*PDB codes* 3PY7); **B** - proteína E6-1 recombinante; **C** - Sobreposição das proteínas E6-1 referência (*PDB codes* 3PY7) e E6-1 recombinante. Em amarelo - localização dos aminoácidos da proteína E6-1 recombinante (S25 e T52) divergentes em relação à proteína referência (correspondente - T25 e I52); **D** - proteína E6-1 recombinante e átomos de zinco (esferas cinza).

O programa SPDBV 3.7 calculou o RMSD entre os átomos da estrutura molde e o modelo gerado, sendo encontrado um desvio de 0,37 Å entre as estruturas.

5.5.5 Topologia

O programa PDBsum gerou o diagrama da topologia da proteína E6-1 recombinante (Figura 23). Foi observada a formação de sete folhas- β e cinco α -hélices.

Figura 23 - Diagrama da topologia da proteína E6-1 recombinante e sequência correspondente.

(PDBsum, disponível em <http://www.ebi.ac.uk/>).

5.5.6 Potencial eletrostático

O potencial eletrostático representado na superfície molecular das proteínas E6 de BPV-1 recombinante e referência mostrou que ambas as proteínas são eletrostaticamente polarizadas (Figuras 24A e 24B).

Quando sobrepostas, diferenças no potencial eletrostático foram observadas nos aminoácidos divergentes, ficando evidente que o aminoácido T25 presente na proteína referência é mais positivamente carregado (região azul) em relação ao aminoácido correspondente S25 da proteína E6-1 recombinante (região branca). O aminoácido I52 presente na proteína referência é menos negativamente carregado (pequena região vermelha) em relação ao aminoácido correspondente T52 da proteína E6-1 recombinante (maior região vermelha) (Figura 24C). Adicionalmente, é visível que na região superior à direita existe uma maior estrutura com maior concentração de cargas positivas na proteína E6-1 referência (Figura 24B).

Figura 24 - Mapa da superfície molecular, colorida de acordo com o potencial eletrostático.

Vermelho - carga negativa; Azul - carga positiva. **A** - Proteína E6 de BPV-1 referência (3PY7); **B** - Proteína E6 de BPV-1 recombinante; **C** - Sobreposição das proteínas E6 de BPV-1 referência (3PY7) e E6 de BPV-1 recombinante. Em verde - localização dos aminoácidos da proteína E6-1 recombinante (S25 e T52) divergentes em relação à proteína referência (correspondente - T25 e I52).

5.5.7 Antigenicidade

De acordo com o gráfico de antigenicidade, tanto a sequência da proteína E6-1 recombinante quanto da proteína E6-1 referência (*PDB codes* 3PY7) (Figura 25A) se mostraram imunogênicas, destacando-se um pico entre os aminoácidos 90 e 100 (CCYCGGKLTKNEKHR) (Figura 25D). Além disso, foi verificado que a cauda de histidina presente na proteína E6-1 recombinante não apresentou antigenicidade (valor de hidrofobicidade - -0,5) (Figura 25B). Após a digestão *in silico* com a protease TEV, o aminoácido residual (glicina) também não apresentou antigenicidade (valor de hidrofobicidade - 0,0) (Figura 25C).

Figura 25 - Gráfico da antigenicidade das proteínas E6-1, gerado a partir das sequências de aminoácidos.

A - proteína E6-1 referência (*PDB codes* 3PY7); **B** - proteína E6-1 recombinante. Círculo verde - cauda de histidina. Retângulo - valor de hidrofobicidade do aa histidina; **C** - proteína E6-1 recombinante após simulação da digestão com TEV. Círculo roxo - aminoácido glicina (G) correspondente ao sítio TEV, não pertencente à proteína E6. Retângulo - valor de hidrofobicidade do aa glicina. **D** - proteína E6-1 recombinante. (<http://bioinformatics.org/JaMBW>).

5.5.8 Regiões conservadas

Por predição *in silico*, foram apontadas as regiões conservadas entre a proteína E6-1 recombinante e todas as outras já depositadas, dos mais diferentes tipos de Papilomavírus. Adicionalmente, foram identificadas os domínios CXXC, altamente conservados e necessários para a ligação dos átomos de zinco (Figuras 26A e 26B). Ainda em relação aos domínios conservados CXXC, a figura 27 aponta a localização dos aminoácidos cisteína na estrutura 3D da proteína E6-1 recombinante.

Os aminoácidos capazes de realizar a ligação cátion- π foram localizados na estrutura terciária, sendo que, dos 3 pares de interações ARG/PHE e dos 2 pares ARG/TRP localizados, nenhum se mostrou energeticamente significativo para realizar interações cátion- π . Em relação aos pares ARG/TYR, foram observados 4 pares potencialmente capazes em 7. O único par ARG/TRP localizado foi considerado potencialmente capaz de realizar a interação cátion- π .

(Tabela 6). Os aminoácidos com valor para potencial ligação estão apontados na tabela 7 e na figura 28.

Figura 26 - Comparação entre a sequência da proteína E6-1 recombinante e as proteínas E6 existentes.

Legenda:

Escala de conservação:

- e** - Um resíduo exposto de acordo com o algoritmo "neural-network"
- b** - Um resíduo não exposto de acordo com o algoritmo "neural-network"
- f** - Um resíduo funcional por predição (altamente conservado e exposto)
- s** - Um resíduo estrutural por predição (altamente conservado e não exposto)
- x** - Dados insuficientes – o cálculo para esse local foi realizado para menos de 10% das sequências

A - Sequência linear, onde as mutações encontradas na proteína E6-1 rec em relação à proteína E6-1 ref (*PDB codes 3PY7*) estão indicadas pelas setas vermelhas e as regiões conservadas (CXXC) pelos retângulos vermelhos. **B** - Estrutura 3D correspondente à sequência linear, onde as mutações encontradas na proteína E6-1 rec em relação à proteína E6-1 ref (*PDB codes 3PY7*) e o posicionamento dos aminoácidos estão indicados pelas setas pretas. (<http://consurf.tau.ac.il>).

Figura 27 - Identificação e localização dos aminoácidos cisteína (CXXC), regiões conservadas propensas à ligação de átomos de zinco.

Tabela 6 - Pares de aminoácidos capazes de realizar interação cátion- π . Os pares encontrados na proteína E6-1 recombinante e aqueles com valores energeticamente significantes estão apontados.

Par de interação	Nº de pares encontrados	Nº de pares energeticamente
		significantes - cátion- π
ARG/PHE	3	0
ARG/TYR	7	4
ARG/TRP	1	1
LYS/PHE	2	0
LYS/TYR	0	0
LYS/TRP	0	0

Tabela 7 - Aminoácidos relacionados à formação de pares cátion- π . O posicionamento na proteína E6-1 e os valores energéticos significantes estão indicados.

Cátion (posição)		π (posição)	
Valor energético		Valor energético	
ARG	(21)	TYR	(47)
	-2.69		-1.22
ARG	(104)	TYR	(125)
	-1.88		-1.61
ARG	(129)	TYR	(92)
	-3.45		-3.75
ARG	(133)	TYR	(136)
	-2.20		-2.29
ARG	(116)	TRP	(65)
	-4.67		-1.89

Figura 28 - Identificação e localização dos aminoácidos com capacidade para ligações cátion- π .

Em destaque, aminoácidos com potencial para ligação cátion- π . Em amarelo - tirosina (Y), azul - triptofano (W).

6 DISCUSSÃO

O BPV tem contribuído significativamente como modelo para entender a genética dos papilomavírus, o papel dos genes de replicação precoce (E) na transformação celular, e continua contribuindo graças às constantes descobertas relacionadas aos tumores equinos e bovinos (BORZACCHIELO et al., 2009). Na década de 80, a especulação de que a proteína E6 poderia desempenhar uma função importante em tumores malignos foi reforçada pela descoberta de que a região gênica correspondente seria transcricionalmente ativa em carcinomas transplantáveis, induzidos pelo papilomavírus de coelhos (CRPV) (DANOS et al., 1985; NASSERI; WETTSTEIN, 1984). Desde então, estudos visam à identificação e caracterização da proteína codificada pela ORF E6 de BPV em células de mamífero transformadas por este gene (ANDROPHY; SCHILLER; LOWY, 1985).

Em relação aos papilomavírus, a clonagem e expressão de genes em vetores bacterianos já têm sido usadas há algum tempo. Como exemplo, foi realizada a caracterização do gene E7 de HPV-16 usando-se vetores bacterianos e, então, a purificação da respectiva proteína, o que possibilitou o estudo estrutural da mesma (PAHEL et al., 1993). Dessa forma, por se constituir uma abordagem metodológica viável, técnicas similares foram adotadas no presente estudo, tais como clonagem, expressão e purificação da proteína E6 do BPV-1 em sistema bacteriano, permitindo sua análise estrutural por bioinformática, bem como o estudo preliminar de viabilidade para sua utilização como antígeno vacinal terapêutico.

Em contraste com os muitos trabalhos sobre as funções biológicas da proteína E6, há poucos estudos sobre a sua estrutura e biofísica, devido às dificuldades na preparação de proteínas solúveis. No presente trabalho, os iniciadores sintetizados foram eficientes não somente para a amplificação do gene E6 do BPV-1, mas também para a clonagem. A banda apresentada no gel após a amplificação apresentou aproximadamente 500 pb, conforme esperado, pois o gene E6 do BPV-1 possui 414 nucleotídeos (*accession number* X02346). Além disso, os iniciadores permitiram a clonagem e se mostraram eficazes para o sequenciamento.

O sequenciamento apontou quatro pontos de mutação na sequência recombinante quando comparada à sequência depositada no banco de dados (*PDB codes* 3PY7). Foi observado que, quando traduzida em aminoácidos, duas dessas mutações foram silenciosas, ou seja, não houve mudança nos aminoácidos gerados. As outras duas mutações geraram aminoácidos diferentes. Em relação às mutações silenciosas, o aminoácido D, na posição 16, corresponde a uma região de baixa conservação, ou seja, variável, sendo estruturalmente considerado um aminoácido exposto. Já o C, na posição 26, corresponde a uma região de média conservação, sendo também considerado exposto. Regiões conservadas tendem a ser

mantidas evolutivamente, sendo necessárias para a manutenção da estrutura e função das proteínas. Por exemplo, a proteína E7 possui 127 aminoácidos e o domínio “zinc finger” (BOHL; HULL; VANDE POL, 2001). Proteínas E7 com regiões mutadas apresentaram menor eficiência na atividade transformante (SARVER et al., 1984). Vários estudos indicaram que a natureza hidrofóbica da proteína E5 do BPV possui resíduos de aminoácidos importantes, os quais conferem sua atividade transformante (HORWITZ et al., 1988). Esses aminoácidos essenciais são altamente conservados entre os papilomas relatados (KULKE; DIMAIO, 1991).

No presente estudo, a sequência de nucleotídeos referente à proteína clonada apresentou equivalência com as quatro regiões CXXC. Na maioria dos PVs de mamíferos, as E6 são pequenas proteínas de até 150 aminoácidos, ricas em cisteína, consistindo em domínios E6-N e E6-C para a ligação de átomos de zinco (LIPARI et al., 2001; NOMINÉ et al., 2003). Pela predição da estrutura tridimensional das proteínas recombinantes e da proteína referência, foi possível observar as regiões às quais os átomos de zinco se ligam.

Cole e Danos (1987) sugeriram que os genes E6 e E7 são formados pela duplicação de unidades com 33 aminoácidos contendo cada uma duas porções CXXC. A proteína E6 possui quatro repetições, diferentemente da E7 que possui duas repetições completas e uma terceira degenerada, sem uma das cisteínas. Os motivos CXXC foram reconhecidos como “zinc finger”, pois coordenam a ligação de metais às proteínas. Além disso, as repetições CXXC são características de proteínas que se ligam ao DNA, tendo efeito regulatório do ponto de vista transcricional (BERG, 1986; WAIN-HOBSON et al., 1985). A identificação de polipeptídeos que se ligam ao zinco através do Western blot mostrou que E6 e E7 do BPV-1 e do HPV-18 eram duas dessas proteínas (BARBOSA; LOWY; SCHILLER, 1989). Quanto às mudanças de aminoácidos, a alteração de um T por um S na posição 25, corresponde a uma região de média conservação, sendo considerados aminoácidos expostos. A mudança de um I por um T na posição 52 corresponde a uma região altamente variável de aminoácidos expostos, situada entre aminoácidos altamente conservados, correspondente à região CXXC (CTTC), o que provavelmente não altera a função da proteína.

Proteínas E6 de papilomavírus são notoriamente difíceis de expressar e purificar, formando agregados solúveis mediante a superexpressão bacteriana. Imai et al. (1989) demonstraram que a proteína E6, de comprimento completo ou contendo a cauda de histidina, formava corpúsculos de inclusão ao ser produzida em *E. coli*. No presente trabalho, foi verificada a formação desses corpúsculos, indicando a expressão das proteínas E6-1 recombinantes na forma insolúvel, justificando o uso de agente caotrópico (ureia). Durante a

diálise, foi observada a formação de pequenos agregados, sendo que os mesmos foram eliminados após sucessivas passagens pela agulha da seringa utilizada na recuperação das amostras. Em outros trabalhos, ensaios foram desenvolvidos para detectar agregados e a ultrafiltração foi utilizada para eliminá-los (NOMINÉ et al., 2001a; NOMINÉ et al., 2001b; ZANIER et al., 2007). No entanto, proteínas monoméricas obtidas por esse procedimento mostraram-se propensas à auto-associação em concentração elevada, o que dificulta sua análise biofísica e estrutural (ZANIER et al., 2010). O mesmo acontece após a proteólise de caudas para solubilização, tais como GST e MBP, fusionadas às proteínas, ocorrendo uma rápida precipitação da E6 (LECHNER; LAIMINS, 1994).

Um dos problemas para obtenção da proteína E6 purificada e em quantidades suficientes para estudos estruturais é a alta quantidade de cisteínas, o que dificulta sua solubilidade, como por exemplo, a proteína E6 do HPV-16 que possui 14 cisteínas (revisto em LIU; BALEJA, 2008). Foi observado que a proteína E6 recombinante obtida em nosso estudo possui 15 cisteínas, da mesma forma que a E6 referência.

Após a expressão da proteína E6-1 recombinante, foi verificada por Western blotting a presença de proteínas inferiores a 15 kDa, indicando a quebra da proteína. Foi observado que a E6 do HPV-16 possui uma região propensa à clivagem por proteases (LIPARI et al., 2001; NOMINÉ et al., 2003; RISTRANI et al., 2001). Por outro lado, mesmo após duas purificações, foi observada a presença de proteínas com tamanho superior a 15 kDa, indicando a formação de complexos proteicos por auto-associação. Sidi et al. (2011) demonstraram que a proteína E6 de BPV-1, da mesma forma que a E6 do HPV, é uma proteína propensa à agregação, o que dificulta sua análise biofísica. A proteína E6 possui uma interface de auto-associação necessária para a atividade de degradação de p53 (ZANIER et al., 2012).

Apesar das evidências claras de que é E6 uma proteína eficiente na transformação *in vitro* (DAS; BOHL; VANDE POL, 2000; TONG; HOWLEY, 1997), a atividade *in vivo* em tumores que ocorrem naturalmente ainda é incerta e deve ser investigada. Logo, o domínio de técnicas biotecnológicas para a expressão da mesma em diferentes cultivos celulares ou sua obtenção se faz necessária.

Nos últimos 30 anos, diferentes construções em vectores de expressão em procariotos, principalmente em *E. coli*, vêm sendo elaboradas e modificadas na tentativa de se produzir grandes quantidades de proteínas E6, tanto de HPV-16 quanto para BPV-1, para sua avaliação estrutural e funcional mais detalhada (ANDROPHY et al., 1987; DANIELS et al., 1997; DEGENKOLBE et al., 2003; IMAI et al., 1989; LIPARI et al., 2001; LIU et al., 2009;

NOMINÉ et al., 2001a; NOMINÉ et al., 2001b; OPPENHEIM et al., 1982; SIDI et al., 2011; ZANIER et al., 2007; ZANIER et al., 2010). Porém, até o início de 2013, nenhuma das proteínas E6 de papilomavírus havia gerado amostras passíveis de análise estrutural. A determinação tridimensional havia sido realizada apenas por NMR (“Nuclear Magnetic Resonance”), abrangendo separadamente os domínios da E6 de HPV-16 (E6N e E6C) e não a proteína toda, sendo sua estrutura relativamente imprecisa quando comparada a outras de tamanho similar. Ou, como no presente trabalho, a estrutura havia sido revelada por predição a partir da sequência de aminoácidos, ou seja, a partir de sua estrutura secundária (NOMINÉ et al., 2006; ULLMAN et al., 1996). Somente, no começo de 2013, houve a primeira determinação da estrutura tridimensional completa por cristalografia das proteínas E6 de BPV-1 e HPV-16, a partir de proteínas recombinantes fusionadas a ligantes (ZANIER et al., 2013). Dessa forma, abriu-se um leque de possibilidades para a avaliação *in silico* através da comparação estrutural preditiva, buscando-se a modelagem de proteínas semelhantes e pesquisas aplicadas mais confiáveis.

Um modelo 3D de uma proteína alvo pode ser construído a partir de proteínas que possuem relação de similaridade estrutural (GINALSKI, 2006). Inicialmente, o ideal é avaliar a identidade entre estruturas primárias de uma proteína-molde e de proteínas homólogas de estruturas 3D conhecidas que trazem consigo uma similaridade estrutural (CHOTIA; LESK, 1986; SILVEIRA, 2005). A última etapa do processo de modelagem por homologia de uma proteína é a análise da confiabilidade da estrutura gerada, a qual depende de diversas propriedades em diferentes níveis de organização estrutural.

O PROCHECK é o programa mais utilizado na avaliação dos parâmetros estereoquímicos, analisando o número de resíduos em regiões “permitidas” e “não permitidas” apontadas no gráfico de Ramachandran, os ângulos de ligação, entre outros parâmetros (LASKOWSKI et al., 1993).

Para ser considerado um bom modelo, o resultado do gráfico de Ramachandran deve apresentar, na região “mais favorável” mais de 90% dos resíduos, desconsiderando os resíduos de glicina, prolina e os resíduos das extremidades que apresentam padrões estereoquímicos diferentes dos outros resíduos (LASKOWSKI et al., 1993). Logo, os modelos 2 e 6 foram escolhidos por apresentarem 94,2% dos resíduos de aminoácidos nas regiões “mais favoráveis”, 5,8% nas regiões “adicionalmente favoráveis” e nenhum resíduo de aminoácido nas regiões “generosamente favoráveis” e “desfavoráveis”.

As formas α -hélice ou β -folha correspondem à estrutura secundária da cadeia proteica, resultante das interações intermoleculares formadoras pelas pontes de hidrogênio, as quais

podem apresentar distorções angulares (BRANDEN; TOOZE, 1998). No presente estudo, somente os modelos 3, 7 e 10 apresentaram essas distorções, conferindo a característica de modelos estruturais menos aceitáveis.

A ligação peptídica é planar. Resíduos com grandes desvios de planaridade indicam tensão na estrutura proteica causada pela cadeia principal incorreta ou pelo incorreto posicionamento da cadeia lateral. Nenhum dos dez modelos gerados apresentou problemas quanto à planaridade de ligações peptídicas, mostrando que todas as estruturas geradas foram válidas.

O Fator-G (“overall G-Factor”) é uma medida da normalidade da estrutura, sendo obtido pela média dos outros fatores, como a interação resíduo-resíduo de aminoácidos e a angulação entre eles. Logo, é uma média da qualidade relativa à maioria dos parâmetros avaliados, apontando o quão incomum algumas propriedades podem estar. Um bom modelo deve ter um Fator-G maior que -0.5 (ENGH; HUBER, 1991). Com base nos resultados apresentados o modelo 1 se apresentou o menos favorável e os mais favoráveis foram os modelos 8, 2 e 5, pois o fator G elevado indica uma conformação de alta probabilidade.

O programa VERIFY-3D é utilizado para analisar erros estruturais com o intuito de promover a confiabilidade do modelo atômico 3D, gerando uma pontuação (“scores”), a partir de uma análise estatística baseada nas estruturas de proteínas depositadas no banco de dados (PDB). Os modelos com maiores pontuações são considerados mais confiáveis. O método avalia o “score” 3D-1D para cada aminoácido de acordo com sua localização e ambiente, ou seja, considera o ambiente do modelo tridimensional (3D) de cada resíduo com sua própria sequência de aminoácido (1D), o qual deve apresentar, preferencialmente, valores maiores do que zero. A cada resíduo é estabelecida uma probabilidade de estar neste ambiente (BOWIE; LÜTHY; EISENBERG, 1991; EISENBERG; LUTHY; BOWIE, 1997; LÜTHY; BOWIE; EISENBERG, 1992). Apesar de terem apresentado alguns aminoácidos com valores menores do que zero, todos dez modelos gerados apresentaram “scores” aceitáveis, sendo os maiores encontrados nos modelos 9 e 2, respectivamente. Em relação ao modelo 2, apontado por análises anteriores como um dos modelos mais mais aceitáveis, este apresentou cinco aminoácidos com valores negativos (R31, C32, M33, K35 e D36), sendo que o menor valor encontrado (-0,6) foi para o aminoácido lisina (K35), localizado ao final de uma α -hélice. Essa relação 3D-1D com valor negativo indica um provável enovelamento incorreto nesta região. Porém, quando comparada à estrutura já estabelecida por cristalografia para a proteína referência (3PY7), essas regiões são homólogas, desconsiderando-se o erro. O maior valor (0,64) foi referente a uma arginina (R89), localizada no início de uma folha- β , sendo também

um aminoácido com carga positiva. A validade da qualidade do modelo foi considerada pelo fato de 96,35% dos aminoácidos apresentarem relação 3D-1D positiva.

Tomados em conjunto, os dados sugeriram que os dez modelos foram estereoquimicamente válidos e, por conseguinte, o modelo 2 foi considerado o mais adequado para a análise de sequência estrutural.

Após a escolha do melhor modelo, diferentes análises podem ser realizadas. O programa SPDBV (GUEx; PEITSCH, 1997) calculou o RMSD entre a proteína molde (3PY7) e o modelo 2 da proteína E6-1 recombinante, sendo encontrado um desvio de 0,37 Å entre as estruturas. O RMSD é uma distância que dá a ideia da diferença estrutural das proteínas em estudo. Quanto menor o valor RMSD de comparação entre as estruturas, maior é a similaridade estrutural das mesmas (BENAVENTE, 2000; NAPOLI, 2003). Deste modo, o modelo 2 novamente se mostrou apropriado.

Posteriormente, foi plotado o potencial eletrostático em ambas as superfícies proteicas. Interações eletrostáticas têm um papel importante na estrutura e função das moléculas biológicas. As reações eletrostáticas certamente influenciam o encontro dinâmico entre moléculas por serem decisivas para o dobramento, especificidade e afinidade da ligação proteína-proteína. Interações deste tipo interferem na associação entre moléculas e alterações no seu potencial podem gerar uma menor atração entre o ligante e seu receptor (BERLINER; EATON; EATON, 2000; WEINER et al., 1982). Foram observadas diferenças na plotagem do potencial eletrostático entre as proteínas referência e a recombinante na região da superfície onde se encontram os aminoácidos divergentes. Na posição 25, a proteína E6-1 referência apresenta uma treonina, mais positivamente carregada em relação à serina encontrada na proteína E6-1 recombinante. Na posição 52, a proteína E6-1 referência apresenta uma isoleucina, menos negativamente carregada em relação à treonina encontrada na proteína E6-1 recombinante. Quando analisada a predição tridimensional de ambas as proteínas, foi observado que essas diferenças não causam alterações estruturais.

A determinação das regiões antigênicas de uma proteína requer tempo e o resultado pode não ser confiável, sendo necessárias caracterizações químicas e testes da atividade imunológica a partir de peptídeos derivados da proteína em análise (ATASSI, 1975; ATASSI, LEE, 1978). Análises computacionais podem, a partir da análise da composição da sequência de aminoácidos de uma proteína, apontar possíveis regiões antigênicas. O programa JambW (TOLDO, 1997) se baseia no valor de hidrofiliabilidade atribuído a cada aminoácido e posterior cálculo da média desses valores ao longo da cadeia polipeptídica, sendo que as regiões mais hidrofílicas, mais expostas, correspondem às regiões antigênicas (HOOP, WOODS, 1981). As

regiões antigênicas da proteína E6-1 recombinante foram apontadas, destacando-se a região aproximadamente entre os aminoácidos 90 e 100. Quando analisado o grau de conservação, foi observado que essa região é composta por aminoácidos expostos e altamente conservados, considerados funcionais, sendo esta uma possível região para reconhecimento pelo sistema imune, representando um epítopo para o desenvolvimento de anticorpos. Há um grande conjunto de evidências de que, durante a infecção pelos papilomavírus, anticorpos são produzidos e dirigidos contra epítopos conformacionais, os quais desempenham um papel importante na imunidade contra o vírus (CHRISTENSEN et al., 1994; GHIM et al., 1991).

O alinhamento de múltiplas sequências depositadas em bancos de dados confere uma variedade de resíduos que podem ser encontrados em cada posição da sequência proteica, baseado no grau de conservação (ASHKENAZY et al., 2010). Provavelmente a função da proteína E6-1 recombinante não deve ser alterada pois, na posição 25 (S25) podem ser encontrados os resíduos S, T, D, K ou G e na posição 52 (T52) os resíduos S, A, T, P, H, I, G ou L.

Foi observado uma diferença de comprimento entre as estruturas proteicas, com maior concentração de cargas positivas na proteína E6-1 referência, pois esses resíduos (1-10aa) não estão visíveis na estrutura da proteína referência, devido a problemas na difração de raio-X. Além destes, analisando o arquivo PDB da proteína referência é possível observar a ausência dos sete últimos aminoácidos (ZANIER et al., 2013).

A estrutura e a função de vários compostos biológicos, principalmente proteínas, são dependentes de interações não covalentes entre seus compostos. Ao considerar as interações potenciais entre drogas e seus receptores, o foco tem sido em interações hidrofóbicas, ligações de hidrogênio e emparelhamento de íons. No entanto, outra interação não covalente, conhecida como cátion- π , tem sido estudada, sendo considerada importante nesse tipo de reconhecimento biológico e na conformação secundária de proteínas (GALLIVAN; DOUGHERTY, 1999; MA; DOUGHERTY, 1997; SCRUTTON; RAINE, 1996).

No reconhecimento biológico, o sistema π é tipicamente proporcionado pela cadeia lateral aromática da fenilalanina, da tirosina e do triptofano (DOUGHERTY, 1996). No modelo 2, dos dez aminoácidos capazes de realizar ligações cátion- π , cinco deles foram considerados potencialmente capazes de realizar interações. A interação cátion- π possibilita que diversas moléculas se liguem a uma gama de proteínas (ZACHARIAS; DOUGHERTY, 2002). Essas interações estão envolvidas, por exemplo, na interação das células de defesa com o complexo de histocompatibilidade (LI et al., 1998).

Um melhor entendimento dos processos patogênicos associados à infecção viral decorre, entre outros, da compreensão de como as diferentes proteínas expressas durante o ciclo replicativo viral interagem com o metabolismo celular. Proteínas virais expressas a partir genes clonados são importantes para o desenvolvimento de medicamentos antivirais (BEERHEID et al., 1999). Dessa forma, uma abordagem que possa isolar esses fatores, proporcionando caracterizar suas propriedades biológicas, torna-se não só atraente como necessária à elucidação de como os vírus atuam no organismo hospedeiro. Nesse sentido, a clonagem em vetores bacterianos para a expressão e purificação de proteínas apresenta vantagens como a grande quantidade de biomassa gerada, baixo custo relativo e rapidez, servindo a diferentes propósitos, entre eles a produção de insumos imunológicos como testes diagnósticos ou mesmo vacinas.

7 CONCLUSÕES

Os iniciadores sintetizados foram eficientes para amplificação, clonagem e sequenciamento. O gene E6 do BPV-1 foi corretamente amplificado e clonado em *E. coli*, possibilitando sua expressão. A mesma abordagem pode ser aplicada para outras proteínas. A microscopia eletrônica mostrou a formação de corpúsculos de inclusão e, após a eliminação dos mesmos, a diálise se mostrou eficiente. Logo, a proteína recombinante purificada E6 de BPV-1 foi obtida em estado purificado.

A modelagem por homologia da proteína E6 de BPV-1 recombinante, empregando a estrutura PDB *codes* 3PY7 como molde, foi bem sucedida e dez modelos foram obtidos. De acordo com a verificação para a validação dos modelos, o modelo 2 foi considerado o mais apropriado.

As duas mutações observadas na proteína E6 de BPV-1 recombinante em relação à proteína referência (3PY7), analisando o grau de conservação, estão de acordo com os possíveis aminoácidos que podem ser encontrados nessas regiões, permitindo a aplicabilidade da proteína recombinante. As diferenças de potencial eletrostático entre as proteínas referência e recombinante não resultaram em diferenças estruturais. Na estrutura terciária foram identificados aminoácidos potencialmente capazes de realizar interações cátion- π . Considerando que a proteína E6 é um potencial alvo para o desenvolvimento de vacinas terapêuticas, todas essas características observadas e compreendidas possibilitam a aplicabilidade mais direcionada da proteína como um todo ou de regiões específicas.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS¹

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular**. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012.
- AHMED, A.; TOLLEFSBOL, T. Telomeres and telomerase - basic science implications for aging. **J. Am. Geriatr. Soc.**, v. 49, p. 1105–1109, 2001.
- ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **J. Mol. Biol.**, v. 215, p. 403–410, 1990.
- ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHAFFER, A. A.; ZHANG, J. Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST - a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Res.**, v. 25, p. 3389–3402, 1997.
- AMTMANN, E.; MULLER, H.; SAUER, G. Equine connective tissue tumors contain unintegrated bovine papillomavirus DNA. **J. Virol.**, v. 35, p. 962–964, 1980.
- ANDROPHY, E. J.; SCHILLER, J. T.; LOWY, D. R. Identification of the protein encoded by the E6 transforming gene of bovine papillomavirus. **Science**, v. 230, p. 442–445, 1985.
- ANDROPHY, E. J.; HUBBERT, N. L.; SCHILLER, J. T.; LOWY, D. R. Identification of the HPV-16 E6 protein from transformed mouse cells and human cervical carcinoma cell lines. **EMBO J.**, v. 6, p. 989–992, 1987.
- ANTONSSON, A.; HANSSON, B. G. Healthy skin of many animal species harbors papillomaviruses which are closely related to their human counterparts. **J. Virol.**, v. 76, p. 12537–12542, 2002.
- ANUÁRIO DA PECUÁRIA NACIONAL. 2011. Disponível em: <<http://www.anuarios.com.br/upload/publicacaoCapitulo/pdfpt/pdf552.pdf>>. Acesso em: 7 nov. 2011.
- ASHKENAZY, H.; EREZ, E.; MARTZ, E.; PUPKO, T.; BEN-TAL, N. ConSurf 2010 - calculating evolutionary conservation in sequence and structure of proteins and nucleic acids. **Nucl. Acids Res.**, v. 38, p. 529–533, 2010.
- ATASSI, M. Z. Antigenic structure of myoglobin - the complete immunochemical anatomy of a protein and conclusions relating to antigenic structures of proteins. **Immunochemistry**, v. 12, p. 423–438, 1975.
- ATASSI, M. Z.; LEE, C. L. Precise determination of the entire antigenic structure of lysozyme - molecular features of protein antigenic structures and potential of "surface-simulation" synthesis--a powerful new concept for protein binding sites. **Biochem. J.**, v. 171, p. 429–434, 1978.

¹ De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BAKER, C. C.; PHELPS, W. C.; LINDGREN, V.; BRAUN, M. J., GONDA, M. A.; HOWLEY, P. M. Structural and transcriptional analysis of human papillomavirus type 16 sequences in cervical carcinoma cell lines. **J. Virol.**, v. 61, p. 962-971, 1987.

BANKS, L.; SPENCE, P.; ANDROPHY, E.; HUBBERT, N.; MATLASHEWSKI, G.; MURRAY, A.; CRAWFORD, L. Identification of human papillomavirus type 18 E6 polypeptide in cells derived from human cervical carcinomas. **J. Gen. Virol.**, v. 68, p. 1351-1359, 1987.

BAKER, C. C.; HOWLEY, P. M. Differential promoter utilization by the bovine papillomavirus in transformed cells and productively infected wart tissues. **EMBO J.**, v. 6, p. 1027-1035, 1987.

BARBOSA, M. S.; LOWY, D. R.; SCHILLER, J. T. Papillomavirus polypeptides E6 and E7 are zinc-binding proteins. **J. Virol.**, v. 63, p. 1404-1407, 1989.

BEEFPOINT. 2012. Disponível em: <<http://www.beefpoint.com.br/cadeia-produtiva/especiais/usda-relatorio-anual-de-producao-pecuaria-do-brasil-set2012/>>. Acesso em: 8 mar. 2011.

BEERHEIDE, W.; BERNARD, H. U.; TAN, Y. J.; GANESAN, A.; RICE, W. G.; TING, A. E. Potential Drugs Against Cervical Cancer - Zinc-Ejecting Inhibitors of the Human Papillomavirus Type 16 E6 Oncoprotein. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 91, n. 14, 1999.

BENAVENTE, J. M. M. **Comparación computacional de estructuras de proteínas. Aplicación AL Estudio de un Inhibidor de Carboxipeptidasa com agente antitumoral.** 2000. 141 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Institut de Biologia Fonamental "Vicent Villar i Palasí", Departament de Bioquímica, Universitat Autònoma de Barcelona - UAB, Bellaterra, 2000.

BERG, J. Potential metal-binding domains in nucleic acid binding proteins. **Science**, v. 232, p. 485-487, 1986.

BERLINER, J. L.; EATON, S. S.; EATON, G. R. Biological Magnetic Resonance. **Springer**, v. 19, n. 7, p. 309-311, 2000.

BERMAN, H.; WESTBROOK, J.; FENG, Z.; et al. The Protein Data Bank. **Nucleic Acids Res.**, v. 28, p. 235-242, 2000.

BOGAERT, L.; MARTENS, A.; DE BAERE, C.; GASTHUYS, F. Detection of bovine papillomavirus DNA on the normal skin and in the habitual surroundings of horses with and without equine sarcoids. **Research in Veterinary Science**, v. 79, p. 253-258, 2005.

BOHL, J.; DAS, K.; DASGUPTA, B.; VANDE POL, S. B. Competitive binding to a charged leucine motif represses transformation by a papillomavirus E6 oncoprotein. **Virology**, v. 271, p. 163-170, 2000.

BOHL, J.; HULL, B.; VANDE POL, S. B. Cooperative transformation and coexpression of Bovine Papillomavirus type 1 E5 and E7 proteins. **Journal of Virology**, v. 75, n. 1, p. 513-521, 2001.

BORZACCHIELLO, G.; ROPERTO, F. Bovine papillomaviruses, papillomas and cancer in cattle. **Veterinary Research**, v. 39, p. 45, 2008.

BORZACCHIELLO, G.; ROPERTO, F.; NASIR, L.; CAMPO, M. S. Human papillomavirus research - Do we still need animal models? **Int. J. Cancer**, v. 125, p. 739–740, 2009.

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

BOWIE, J. U.; LÜTHY, R.; EISENBERG, D. A method to identify protein sequences that fold into a known three-dimensional structure. **Science**, v. 12, n. 5016, p. 164–170, 1991.

BOXUS, M.; TWIZERE, J.C.; LEGROS, S.; DEWULF, J.F.; KETTMANN, R.; WILLEMS, L. The HTLV-1 Tax interactome. **Retrovirology**, v. 5, p. 76, 2008.

BRANDEN, C.; TOOZE, J. **Introduction to protein structure**. 2nd ed. New York, USA: Garland Publishing, 1998.

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

BRIMER, N.; LYONS, C.; WALLBERG, A. E.; VANDE POL, S. B. Cutaneous papillomavirus E6 oncoproteins associate with MAML1 to repress transactivation and NOTCH signaling. **Oncogenesis**, p. 1–8, 2012.

BUCK, C. B.; PASTRANA, D. V.; LOWY, D. R.; SCHILLER, J. T. Efficient intracellular assembly of papillomaviral vectors. **Journal of Virology**, v. 78, n. 2, p. 751–757, 2004.

BURKHARDT, A.; DIMAIO, D.; SCHLEGEL, R. Genetic and biochemical definition of the bovine papillomavirus E5 transforming protein. **EMBO J.**, v. 8, p. 2381–2385, 1987.

CAMPO, M. S.; COGGINS, L. W. Molecular cloning of bovine papillomavirus genomes and comparison of their sequence homologies by heteroduplex mapping. **J. Gen. Virol.**, v. 63, p. 255–264, 1982.

CAMPO, M. S. Infection by bovine papillomavirus and prospects for vaccination. **Trends Microbiol.**, v. 3, n. 3, p. 92–97, 1995.

CAMPO, M. S. Vaccination against papillomavirus in cattle. **Clinics in Dermatology**, v. 15, p. 275–283, 1997.

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

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

CAMPOS, S. R. C.; TRINDADE, C.; FERRAZ, O. P.; GIOVANNI, D. N. S.; LIMA, A. A.; CAETANO, H. V. A.; CARVALHO, R. F.; BIRGEL JR, E. H.; DAGLI, M. L. Z.; MORI, E.;

BRANDÃO, P. E.; RICHTZENHAIN, L. J.; BEÇAK, W.; STOCCO, R. C. Can established cultured papilloma cells harbor bovine papillomavirus? **Genetics and Molecular Research**, v. 7, n. 4, p. 1119-1126, 2008.

CARR, J.; GYORFI, T. Human papillomavirus. Epidemiology, transmission, and pathogenesis. **Clinics in Laboratory Medicine**, v. 20, p. 235-255, 2000.

CARR, E. A.; THÉON, A. P.; MADEWELL, B. R.; GRIFFEY, S. M.; HITCHCOCK, M. E. Bovine papillomavirus DNA in neoplastic and nonneoplastic tissues obtained from horses with and without sarcoids in the western United States. **Am. J. Vet. Res.**, v. 62, p. 741-744, 2001.

CARVALHO, C.; FREITAS, A. C.; BRUNNER, O.; GOES, L. G. B.; YAGUIU, A.; BEÇAK, W.; STOCCO, R. C. Bovine papillomavirus type 2 in reproductive tract and gametes of slaughtered bovine females. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34, n. 1, p. 82-84, 2003.

CHEN, J. J.; HONG, Y.; RUSTAMZADEH, E.; BALEJA, J. D.; ANDROPHY, E. J. Identification of an alpha helical motif sufficient for association with papillomavirus E6. **J. Biol. Chem.**, v. 273, p. 13537-13544, 1998.

CHOW, L. T.; BROKER, T. R. Papillomavirus DNA replication. **Intervirology**, v. 37, p. 150-158, 1994.

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

COLARES, T. **Animais transgênicos - princípios & métodos**. São Carlos: Suprema, 2005.

COLE, S. T.; DANOS, O. Nucleotide sequence and comparative analysis of the human papillomavirus type 18 genome - phylogeny of papillomaviruses and repeated structure of the E6 and E7 gene products. **J. Mol. Biol.**, v. 193, p. 599-608, 1987.

CHOTIA, C.; LESK, A. M. The relation between the divergence of sequence and structures in proteins. **EMBO Journal**, v. 5, n. 4, p. 823-826, 1986.

CRISH, J. F.; BONE, F.; BALASUBRAMANIAN, S.; ZAIM, T. M.; WAGNER, T.; YUN, J.; RORKE, E. A.; ECKERT, R. L. Suprabasal expression of the human papillomavirus type 16 oncoproteins in mouse epidermis alters expression of cell cycle regulatory proteins. **Carcinogenesis**, v. 21, p. 1031-1037, 2000.

DAF, S.; JENA, L.; KUMAR, S. Comparative phylogenetic analysis of E6 and E7 proteins of different 42 Strains of HPV. **JK Science**, v. 12, n. 1, 2010.

DANIELS, P. R.; SANDERS, C. M.; COULSON, P.; MAITLAND, N. J. Molecular analysis of the interaction between HPV type 16 E6 and human E6-associated protein. **FEBS Lett.**, v. 416, p. 6-10, 1997.

DANOS, O.; ENGEL, L. W.; CHEN, E. Y.; YANIV, M.; HOWLEY, P. M. Comparative analysis of the human type 1a and Bovine type 1 Papillomavirus genomes. **Journal of Virology**, v. 46, n. 2, p. 557-566, 1983.

DANOS, O.; GEORGES, E.; ORTH, G.; YANIV, M. Fine structure of the cottontail rabbit papillomavirus mRNAs expressed in the transplantable VX2 carcinoma. **Journal of Virology**, v. 53, p. 735-741, 1985.

DAS, K.; BOHL, J.; VANDE POL, S. B. Identification of a second transforming function in Bovine Papillomavirus type 1 E6 and the role of E6 interactions with Paxillin, E6BP, and E6AP. **Journal of Virology**, v. 74, n. 2, p. 812-816, 2000.

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

DEGENKOLBE, P.; GILLIGAN, S.; GUPTA, H.; BERNARD, U. Chelating agents stabilize the monomeric state of the zinc binding human papillomavirus 16 E6 oncoprotein, **Biochemistry**, v. 42, p. 3868-3873, 2003.

DEPARTMENT OF CHEMISTRY, UNIVERSITY OF GUELPH, ONTARIO, CANADA. Disponível em: <<http://www.chembio.uoguelph.ca/educmat/phy456/456lec01.htm>>. Acesso em: 24 abr. 2013.

DINIZ, N.; MELO, T. C.; SANTOS, J. F.; MORI, E.; BRANDÃO, P. E.; RICHTZENHAIN, L. J.; FREITAS, A. C.; BEÇAK, W.; CARVALHO, R. F.; STOCCO, R. C. Simultaneous presence of bovine papillomavirus in blood and in short-term lymphocyte cultures from dairy cattle in Pernambuco, Brazil. **Genet. Mol. Res.**, v. 8, n. 4, p. 1474-1480, 2009.

DOORBAR, J.; ELY, S.; STERLING, J.; MCLEAN, C.; CRAWFORD, L. Specific interaction between HPV-16 E1-E4 and cytokeratins results in collapse of the epithelial intermediate filament network. **Nature**, v. 352, p. 824-827, 1991.

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

DOUGHERTY, D. A. Cation- π interactions in chemistry and biology. A new view of benzene, Phe, Tyr, and Trp. **Science**, v. 271, p. 163-168, 1996.

DURÃO, J. F. C. Aspectos anatomopatológicos e clínicos da hematúria enzoótica dos bovinos. **Revista Portuguesa de Ciência Veterinária**, v. 90, p. 132-137, 1995.

DURST, M.; GLITZ, D.; SCHNEIDER, A.; ZUR HAUSEN, H. Human papillomavirus type 16 (HPV 16) gene expression and DNA replication in cervical neoplasia - analysis by *in situ* hybridization. **Virology**, v. 189, p. 132-140, 1992.

EISENBERG, D.; LUTHY, R.; BOWIE, J.U. VERIFY3D - assessment of protein models with three-dimensional profiles. **Methods Enzymol.**, v. 277, p. 396-404, 1997.

ENGH, R. A.; HUBER, R. Accurate bond and angle parameters for X-ray protein structure refinement. **Acta Cryst.**, v. 47, p. 392-400, 1991.

ELSTON, R. C.; NAPHTHINE, S.; DOORBAR, J. The identification of a conserved binding motif within human papillomavirus type 16 E6 binding peptides, E6AP and E6BP. **J. Gen. Virol.**, v. 79, n.2, p. 371-374, 1998.

- EMBRAPA. 2008. Disponível em: <<http://www.cnpgl.embrapa.br/nova/sala/artigos/artigolinha.php?id=38>>. Acesso em: 1 nov. 2011.
- FAVRE, M.; BREITBURD, F.; CROISSANT, O.; ORTH, G. Structural polypeptides of rabbit, bovine, and human papillomaviruses. **J. Virol.**, v. 15, p. 1239–1247, 1975.
- FAVRE, M.; RAMOZ, N.; ORTH, G. Human papillomaviruses - general features. **Clin. Dermatol.**, v. 15, p. 181–198, 1997.
- FERSHT, A. R.; DAGGETT, V. Protein folding and unfolding at atomic resolution. **Cell**, v. 108, p. 573–582, 2002.
- FORSLUND, O.; ANTONSSON, A.; NORDIN, P.; STENQUIST, B.; HANSSON, B. G. A broad range of human papillomavirus types detected with a general PCR method suitable for analysis of cutaneous tumours and normal skin. **Journal of General Virology**, v. 80, p. 2437–2443, 1999.
- FREITAS, A. C.; CARVALHO, C.; BRUNNER, O.; BIRGEL JR, E. H.; LIBERA, A. M. D.; BENESI, F. J.; GREGORY, L.; BEÇAK, W.; STOCCO, R. C. Viral DNA sequences in peripheral blood and vertical transmission of the virus - a discussion about BPV-1. **Brazilian J. Microbiol.**, v. 34, p. 76-78, 2003.
- FREITAS, A. C.; SILVA, M. A. R.; CARVALHO, C. C. R.; BIRGEL JR., E. H.; LIBERA, A. M. D.; BENESI, F. J.; BEÇAK, W.; STOCCO DOS SANTOS, R. C. Papillomavirus DNA detection in non-epithelial tissues - a discussion about bovine papillomavirus. **Comting Cur. Res. and Educat. Topics and Trends in Applied Microbi.**, v. 2, p. 697-704, 2007.
- GALLIVAN, J. P.; DOUGHERTY, D. A. Cation- π interactions in structural biology. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 96, p. 9459–9464, 1999.
- GENBANK. GenBank Statistics. Bethesda -National Center Biotechnology Information, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/genbankstats-2008/>>. Acesso em: 20 fev. 2013.
- GINALSKI, K. Comparative modeling for protein structure prediction. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 6, n. 2, p. 172-177, 2006.
- GORMAN, N. T. Equine sarcoid-time for optimism. **Equine Vet. J.**, v. 17, p. 412-414, 1985.
- GRIFFITHS, A. J. F.; MILLER, J. H.; SUZUKI, D. T.; LEWONTIN, R. C.; GELBART, W. M. Genética e diferenciação celular. In:_____. **Introdução à genética**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998. p. 682-708.
- GUEX, N.; PEITSCH, M. C. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer - An environment for comparative protein modeling. **Electrophoresis**, v. 18, p. 2714-2723, 1997.
- HALL, T. A. BioEdit - a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucl. Acids. Symp. Ser.**, v. 41, p. 95-98, 1999.
- HAM, J.; DOSTATNI, N.; ARNOS, F.; YANIV, M. Several different upstream promoter elements can potentiate transactivation by the BPV-1 E2 protein. **EMBO J.**, v. 10, p. 2931–2940, 1991.

HARTWELL, L. Defects in a cell cycle checkpoint may be responsible for the genomic instability of cancer cells. **Cell**, v. 71, p. 543–546, 1992.

HATAMA, S.; KIYOKO, N.; TORU, K. Genomic and phylogenetic analysis of two novel bovine papillomaviruses, BPV-9 and BPV-10. **J. G. Virology**, v. 89, p. 158-163, 2008.

HATAMA, S.; ISHIHARA, R.; UEDA, Y.; KANNO, T.; UCHIDA, I. Detection of a novel bovine papillomavirus type 11 (BPV-11) using xipapillomavirus consensus polymerase chain reaction primers. **Arch. Virol.**, v. 156, p. 1281–1285, 2011.

HEBNER, C. M.; LAIMINS, L. A. Human papillomaviruses - basic mechanisms of pathogenesis and oncogenicity. **Rev. Med. Virol.**, v. 16, p. 83–97, 2006,

HEDGE, R. S. The papillomavirus E2 proteins - structure, function, and biology. **Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure**, v. 31, p. 343-360, 2002.

HERWIG, S.; STRAUSS, M. The retinoblastoma protein - a master regulator of cell cycle, differentiation and apoptosis. **Eur. J. Biochem.**, v. 246, p. 581-601, 1997.

HOOP, T. P.; WOODS, K. R. Prediction of protein and antigenic determinants from amino acid sequences. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 78; p. 3821-3824, 1981.

HORWITZ, B. H.; BURKHARDT, A. L.; SCHLEGEL, R.; DIMAIO, D. Transforming activity of a 16-amino-acid segment of the bovine papillomavirus E5 protein linked to random sequences of hydrophobic amino acids. **Mol. Cell. Biol.**, v. 8, p. 4071-4078, 1988.

HUIBREGTSE, J. M.; SCHEFFNER, M.; HOWLEY, P. M. A cellular protein mediates association of p53 with the E6 oncoprotein of human papillomavirus types 16 or 18. **EMBO J.**, v. 10, p. 4129-4135, 1991.

HUIBREGTSE, J. M.; SCHEFFNER, M.; HOWLEY, P. M. Cloning and expression of the cDNA for E6-AP, a protein that mediates the interaction of the human papillomavirus E6 oncoprotein with p53. **Mol. Cell Biol.**, v. 13, p. 775-784, 1993a.

HUIBREGTSE, J. M.; SCHEFFNER, M.; HOWLEY, P. M. Localization of the E6-AP regions that direct human papillomavirus E6 binding, association with p53, and ubiquitination of associated proteins. **Mol. Cell Biol.**, v. 13, p. 4918-4927, 1993b.

ICTVDB MANAGEMENT. 2006. Papillomaviridae. In - ICTVdB - The Universal Virus Database, version 4. Büchen-Osmond, C. (Ed), Columbia University, New York, USA. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/ICTVdB/>>. Acesso em: 13 maio 2011.

IMAI, Y.; TSUNOKAWA, Y.; SUGIMURA, T.; TERADA, M. Purification and DNA-binding properties of human papillomavirus type 16 E6 protein expressed in Escherichia coli. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 164, p. 1402–1410, 1989.

INCA. Instituto Nacional de Câncer Disponível em: <<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/inca/portal/home>>. Acesso em: 10 out. 2012.

JACKSON, C. The incidence and pathology of tumours of domestic animals in South Africa. **Onderstepoort. J. Vet. Sci. Anim. Ind.**, v. 6, p. 378–385, 1936.

JACKSON, M. E.; CAMPO, M. S. Positive and negative E2-independent regulatory elements in the long control region of bovine papillomavirus type 4. **Journal of General Virology**, v. 72, p. 877-883, 1991.

JAMBW. JaMBW, the Java based Molecular Biologist's Workbench, coordinated by Luca I.G.Toldo. Disponível em: <<http://www.bioinformatics.org/JaMBW/>>. Acesso em: 13 maio 2012.

JARRETT, W. F.; O'NEIL, B. W.; GAUKROGER, J. M.; SMITH, K. T.; LAIRD, H. M.; CAMPO, M. S. Studies on vaccination against papillomaviruses - the immunity after infection and vaccination with bovine papillomaviruses of different types. **Veterinary Record**, v. 126, p. 473-475, 1990a.

JARRETT, W. F.; O'NEIL, B. W.; GAUKROGER, J. M.; SMITH, K. T.; LAIRD, H. M.; CAMPO, M. S. Studies on vaccination against papillomaviruses - a comparison of purified virus, tumour extract and transformed cells in prophylactic vaccination. **Veterinary Record**, v. 126, p. 449-452, 1990b.

JARRETT, W. F.; SMITH, K. T.; O'NEIL, B. W.; GAUKROGER, J. M.; CHANDRACHUD, L. M.; GRINDLAY, G. J.; MCGARVIE, G. M.; CAMPO, M. S. Studies on vaccination against Papillomaviruses - Prophylactic and therapeutic vaccination with recombinant structural proteins. **Virology**, v. 194, p. 33-421, 1991.

JELÍNEK, F.; TACHEZY, R. Cutaneous papillomatosis in cattle. **J. Comp. Pathol.**, v. 132, p. 70-81, 2005.

JONES, D. L.; MÜNGER, K. Interactions of the human papillomavirus E7 protein with cell cycle regulators. **Semin. Cancer Biol.**, v. 7, p. 327-337, 1996.

KEHMEIER, E.; RÜHL, H.; VOLAND, B.; STÖPPLER, M. C.; ANDROPHY, E.; STÖPPLER, H. Cellular steady-state levels of "high risk" but not "low risk" human papillomavirus (HPV) E6 proteins are increased by inhibition of proteasome-dependent degradation independent of their p53- and E6AP-binding capabilities. **Virology**, v. 299; p. 72-87, 2002.

KENNEDY, M. B. Origin of PDZ (DHR, GLGF) domains. **Trends Biochem. Sci.**, v. 20, n. 9, p. 350, 1995.

KISSELJOV, F. L. Virus-associated human tumors - cervical carcinomas and papilloma viruses. **Biochemistry**, v. 65, n. 1, p. 68-77, 2000.

KLINGELHUTZ, A.; ROMAN, A. Cellular transformation by human papillomaviruses - lessons learned by comparing high- and low-risk viruses. **Virology**, v. 424, n. 2, p. 77-98, 2012.

KULKE, R.; DIMAIO, D. Biological properties of the deer papillomavirus E5 gene in mouse C127 cells - growth transformation, induction of DNA synthesis, and activation of the platelet-derived growth factor receptor. **J. Virol.**, v. 65, n. 9, p. 4943-4949, 1991.

KUMAR, S.; JENA, L.; BHOMALE, V. W.; DAF, S. *In silico* structural prediction of E6 and E7 proteins of Human Papillomavirus strains by comparative modeling. **Int. J. Bioautomation**, v. 16, n. 2, p. 101-110, 2012.

LANCASTER, W. D.; THEILIN, G. H.; OLSON, C. Hybridization of bovine papilloma virus type 1 and type 2 DNA from virus-induced hamster tumours and naturally occurring equine tumours. **Equine Sarcoid. Intervirology**, v. 11, p. 227–233, 1979.

LARSEN, P. M.; STORGAARD, L.; FEY, S. J. Proteins present in bovine papillomavirus. **J. Virol.**, v. 61, n. 11, p. 3596–3601, 1987.

LASKOWSKI, R. A.; MCARTHUR, M. W.; MOSS, D. S.; THORNTON, J. M. PROCHECK - a program to check the stereochemical quality of protein structures. **J. Appl. Crystallogr.**, v. 26, p. 283–291, 1993.

LASKOWSKI, R. A. PDBsum new things. **Nucleic Acids Res.**, v. 37, p. 335–359, 2009.

LEAL, A.M.; FERRAZ, O.P.; CARVALHO, C.; FREITAS, A.C.; BENISTON, R.G.; BEÇAK, W.; CAMPO, M.S.; STOCCO DOS SANTOS, R.C. Quercetin induces structural chromosomal aberrations and uncommon rearrangements in bovine cells transformed by the E7 protein of bovine papillomavirus type 4. **Veterinary and Comparative Oncology**, v. 1, n. 1, p. 15–21, 2003.

LECHNER, M. S.; LAIMINS, L. A. Inhibition of p53 DNA binding by human papillomavirus E6 proteins. **J. Virol.**, v. 68, p. 426–427, 1994.

LEECHANACHAI, P.; BANKS, L.; MOREAU, F.; MATLASHEWSKI, G. The E5 gene from human papillomavirus type 16 is an oncogene which enhances growth factor-mediated signal transduction to the nucleus. **Oncogene**, v. 7, p. 19–25, 1992.

LEPTAK, C.; RAMON, Y.; CAJAL, S.; KULKE, R.; HORWITZ, B. H.; RIESE II, D. J.; DOTTO, G. P.; DIMAIO, D. Tumorigenic transformation of murine keratinocytes by the E5 genes of bovine papillomavirus type 1 and human papillomavirus type 16. **J. Virol.**, v. 65, p. 7078–7083, 1991.

LI, S.; CHOKSI, S.; SHAN, S.; HU, X.; GAO, J.; KORNGOLD, R.; HUANG, Z. Identification of the CD8 DE Loop as a Surface Functional Epitope. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 26, p. 16442–16445, 1998.

LINDSEY, C. J.; ALMEIDA, M. E.; VICARI, C. F.; CARVALHO, C.; YAGUIU, A.; FREITAS, A. C.; BEÇAK, W.; STOCCO, R. C. Bovine papillomavirus DNA in milk, blood, urine, semen, and spermatozoa of bovine papillomavirus-infected animals. **Genetics and Molecular Research**, v. 8, p. 310–318, 2009.

LIPARI, F.; MCGIBBON, G. A.; WARDROP, E.; CORDINGLEY, M. G. Purification and biophysical characterization of a minimal functional domain and of an Nterminal Zn²⁺-binding fragment from the human papillomavirus type 16 E6 protein. **Biochemistry**, v. 40, p. 1196–1204, 2001.

LIU, J.; GISSMAN, L.; SUN, X. Y.; KANJANAHALUETHAI, A.; LLER, M. M.; DOORBAR, J.; ZHOU, J. Sequence close to the N-terminus of L2 protein is displayed on the surface of bovine papillomavirus type 1 virions. **Virology**, v. 227, p. 474–483, 1997.

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

LIU, Y.; BALEJA, J. D. Structure and function of the papillomavirus E6 protein and its interacting proteins. **Frontiers in Bioscience**, v. 13, p. 121-134, 2008.

LIU, Y.; CHERRY, J. J.; DINEEN, J. V.; ANDROPHY, E. J.; BALEJA, J. D. Determinants of stability for the E6 protein of papillomavirus type 16. **J. Mol. Biol.**, v. 386, p. 1123–1137, 2009.

LOWY, D. R.; SCHILLER, J. T. Prophylactic human papillomavirus vaccines. **J. Clin. Invest.**, v. 116, n. 5, p. 1167, 2006.

LUNARDI, M.; ALFIERI, A. A.; OTONEL, R. A. A.; ALCÂNTARA, B. K.; RODRIGUES, W. B.; MIRANDA, A. B.; ALFIERI, A. F. Genetic characterization of a novel bovine papillomavirus member of the Deltapapillomavirus genus. **Veterinary Microbiology**, v. 162, p. 207–213, 2013.

LÜTHY, R.; BOWIE, J. U.; EISENBERG, D. Assessment of protein models with three-dimensional profiles. **Nature**, v. 356, p. 83–85, 1992.

MA, J. C.; DOUGHERTY, D. A. The cation-pi interaction. **Chem. Rev.**, v. 97, p. 1303–1324, 1997.

MA, B.; XU, Y.; HUNG, C. F.; WU, T. C. HPV and therapeutic vaccines - Where are we in 2010? **Current Cancer Therapy Reviews**, v. 6, p. 81-103, 2010.

MAEDA, Y.; SHIBAHARA, T.; WADA, Y.; KADOTA, K.; KANNO, T.; UCHIDA, I.; HATAMA, S. An outbreak of teat papillomatosis in cattle caused by bovine papilloma virus (BPV) type 6 and unclassified BPVs. **Veterinary Microbiology**, v. 121, p. 242-248, 2007.

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

MARTENS, A.; DE MOOR, A.; DEMEULEMEESTER, J.; PEELMAN, L. Polymerase chain reaction analysis of the surgical margins of equine sarcoids for bovine papilloma virus DNA. **Vet. Surg.**, v. 30, p. 460–467, 2001.

MARTÍ-RENOM, M. A.; STUART, A. C.; FISER, A.; SÁNCHEZ, R.; MELO, F.; SALI, A. Comparative protein structure modeling of genes and genomes. **Annu. Ver. Biophys. Biomol. Struct.**, v. 29; p. 291–325, 2000.

MELO, T. C. **Avaliação de aberrações cromossômicas em bovinos (*Bos taurus taurus*) infectados pelo papilomavírus bovino**. 2009. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil, 2009.

MELO, T. C.; DINIZ, N.; CAMPOS, S. R. C.; FERRAZ, O. P.; LINDSEY, C. J.; RIEGER, T. T.; BEÇAK, W.; STOCCO, R. C. Cytogenetic studies in peripheral blood of bovines afflicted by papillomatosis. **Veterinary and Comparative Oncology**, p. 1476-5829, 2011.

MINISTÉRIO DO DESENVOLVIMENTO, INDÚSTRIA E COMÉRCIO – MDIC. 2008. Disponível em: <<http://www.desenvolvimento.gov.br/sitio/interna/interna.php?area=2&menu=855>>. Acesso em: 1 nov. 2011.

MOONEY, C.; DAVEY, N.; MARTIN, A. J. M.; WALSH, I.; SHIELDS, D. C.; POLLASTRI, G. *In silico* protein motif discovery and structural analysis. In - ***in silico* tools for gene discovery series - Methods in Molecular Biology**, v. 760, p 341-353, 2011.

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

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

MURO, F. F.; BOTTURA, C. R. P.; PICCININ, A. Papilomatose Bovina. **Rev. Cient. Ele. Med. Veterinária**, v. 5, n. 10, p. 1679-7353, 2008.

NASSERI, M.; WETTSTEIN, F. O. Differences exist between viral transcripts in the cottontail rabbit papillomavirus-induced benign and malignant tumors as well as non-virus-producing and virus-producing tumors. **J. Virol.**, v. 51, p. 706-712, 1984.

NAPOLI, W. F. M. **Introdução à bioinformática**. 2003. 163 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Engenharia de Computação) - Escola de Engenharia Elétrica e de Computação, Universidade Federal de Goiás – UFG, Goiânia, 2003.

NASIR, L.; REID, S. W. J. Bovine papillomaviral gene expression in equine sarcoid tumours. **Virus Res.**, v. 61, p. 171-175, 1999.

NASIR, L.; GAULT, E.; MORGAN, I. M.; CHAMBERS, G.; ELLSMORE, V.; CAMPO, M. S. Identification and functional analysis of sequence variants in the long control region and the E2 open reading frame of bovine papillomavirus type 1 isolated from equine sarcoids. **Virology**, v. 364, p. 355-361, 2007.

NICHOLAS, K. B.; NICHOLAS JR, H. B. GeneDoc - a tool for editing and annotating multiple sequence alignments. Distributed by the authors. 1997. Disponível em: <www.psc.edu/biomed/genedoc>. Acesso em: 10 fev. 2013.

NICHOLLS, P. K.; STANLEY, M. A. The immunology of animal papillomaviruses. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 73, n. 2, p. 101-127, 2000.

NOMINÉ, Y.; RISTRANI, T.; LAURENT, C.; LEFÈVRE, J. F.; WEISS, E.; TRAVÉ, G. A strategy for optimizing the monodispersity of fusion proteins - application to purification of recombinant HPV E6 oncoprotein. **Protein. Eng.**, v. 14, p. 297–305, 2001a.

NOMINÉ, Y.; RISTRANI, T.; LAURENT, C.; LEFÈVRE, J. F.; WEISS, E.; TRAVÉ, G. Formation of soluble inclusion bodies by HPV E6 oncoprotein fused to Maltose-binding protein. **Protein Expr. Purif.**, v. 23, p. 22–32, 2001b.

NOMINÉ, Y.; CHARBONNIER, S.; RISTRANI, T.; STIER, G.; MASSON, M.; CAVUSOGLU, N.; VAN DORSSELAER, A.; WEISS, E.; KIEFFER, B.; TRAVÉ, G. Domain substructure of HPV E6 protein - biophysical characterization of E6 C-terminal DNA-binding domain. **Biochemistry**, v. 42, p. 4909–4917, 2003.

NOMINÉ, Y.; MASSON, M.; CHARBONNIER, S.; ZANIER, K.; RISTRANI, T.; DERYCKERE, F.; SIBLER, A. P.; DESPLANCQ, D.; ATKINSON, R. A.; WEISS, E.;

ORFANOUDAKIS, G.; KIEFFER, B.; TRAVE, G. Structural and functional analysis of E6 oncoprotein - insights in the molecular pathways of human papillomavirus-mediated pathogenesis. **Mol. Cell**, v. 21, p. 665-678, 2006.

NORONHA, V.; MELLO, W.; VILLA, L.; BRITO, A.; MACÊDO, R.; BISI, F.; MOTA, R.; SASSAMOTO, K.; MONTEIRO, T.; LINHARES, A. Papilomavírus humano associado a lesões de cérvix uterina. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 32, n. 3, p. 235-240, 1999.

OGAWA, T.; TOMITA, Y.; OKADA, M.; SHINOZAKI, K.; KUBONOYA, H.; KAIHO, I.; SHIRASAWA, H. Broad-spectrum detection of papillomaviruses in bovine teat papillomas and healthy teat skin. **J. Gen. Virol.**, v. 85, p. 2191-2197, 2004.

OGAWA, T.; TOMITA, Y.; OKADA, M.; SHIRASAWA, H. Complete genome and phylogenetic position of bovine papillomavirus type 7. **J. Gen. Virol.**, v. 88, p. 1934-1938, 2007.

OLSON, C.; PAMUKCU, A. M.; BROBST, D. F.; KOWALCZYK, T.; SATTER, E. J.; PRICE, J. M. A urinary bladder tumor induced by a bovine cutaneous papilloma agent. **Cancer Res.**, v. 19, p. 779-782, 1959.

OLSON, C.; SKIDMORE, L. V. Therapy of experimentally produced bovine cutaneous papillomatosis with vaccines and excision. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 15, n. 135, p. 339-343, 1959.

OLSON, C.; SEGRE, D.; SKIDMORE, L. V. Further observations on immunity to bovine cutaneous papillomatosis. **Am. J. Vet. Res.**, v. 21, p. 233-242, 1960.

OPPENHEIM, A. B.; GOTTESMAN, S.; GOTTESMAN, M. Regulation of bacteriophage X in gene expression. **J. Mol. Biol.**, v. 158, p. 327-346, 1982.

PAHEL, G.; AULABAUGH, A.; SHORT, S. A.; BARNES, J. A.; PAINTER, G. R.; RAY, P.; PHELPS, W. C. Structural and functional characterization of the HPV-16 E7 protein expressed in bacteria. **J. Biol. Chem.**, v. 268, p. 26018-26025, 1993.

PASCOE, R. R.; SUMMERS, P. M. Clinical survey of tumours and tumour-like lesions in horses in south east Queensland. **Equine Vet. J.**, v. 13, p. 235-239, 1981.

PATEL, K. R.; SMITH, K. T.; CAMPO, M. S. The nucleotide sequence and genome organization of bovine papillomavirus type 4. **J Gen Virol.**, v. 68, n. 8, p. 2117-2128, 1977.

PENNIE, W. D.; GRINDLAY, G. J.; CAIRNEY, M.; CAMPO, M. S. Analysis of the transforming functions of bovine papillomavirus type 4. **Virology**, v. 193, p. 614-620, 1993.

PEREIRA, R.; HITZEROTH, I. I.; RYBICKI, E. P. Insights into the role and function of L2, the minor capsid protein of papillomaviruses. **Arch. Virol.**, v. 154, p. 187-197, 2009.

POLACK, E. W. **Toxicidade da *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn no Estado do Paraná.** 1990. 102 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1990.

PONTING, C. P. Evidence for PDZ domains in bacteria, yeast, and plants. **Protein Sci.**, v. 6, n. 2, p. 464-468, 1997.

RAGLAND, K. W. L.; KEOWN, G. F. H.; SPENCER, G. R. Equine sarcoid. **Equine Vet. J.**, v. 2, p. 2–11, 1970.

RAMACHANDRAN, G. N.; RAMAKRISHNAN, C.; SASISEKHARAN, V. Stereochemistry of polypeptide chain conformations. **Journal of Molecular Biology**, v. 7, p. 95-99, 1963.

RANGANATHAN, R.; ROSS, E. PDZ domain proteins - scaffolds for signaling complexes. **Curr. Biol.**, v. 7, n. 12, p. 770–773, 1997.

RANKBRASIL. 2013. Disponível em: <http://www.rankbrasil.com.br/Recordes/Materias/06rp/Minas_Gerais_E_O_Maior_Produtor_De_Leite_Do_Brasil>. Acesso em: 8 mar. 2013.

REGO, F. O. R. **Análise *in silico* de proteínas - modelo baseado na apolipoproteína-e relacionada à doença de Alzheimer**. 2012. 46 f. Monografia para obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas, Universidade Federal da Bahia, 2012.

REVISTA TERRA VIVA. 2008. Matéria publicada em 23/10/2008. Disponível em: <<http://www.cnpq.org.br/arquivos/couro111.pdf>>. Acesso em: 2 nov. 2011.

RICHARDSON, J. S. Anatomy and Taxonomy of Protein Structures. **Advances in Protein Chemistry**, v. 34, p. 167–339, 1981.

RISTRIANI, T.; NOMINE, Y.; MASSON, M.; WEISS, E.; TRAVE, G. Specific recognition of four-way DNA junctions by the C-terminal zinc-binding domain of HPV oncoprotein E6. **J. Mol. Biol.**, v. 305, p. 729–739, 2001.

RIVOIRE, W. A.; CAPP, E.; CORLETA, H. E.; SILVA, I. S. B. Bases biomoleculares da Oncogênese cervical. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 47, n. 2, p. 179-184, 2001.

ROBERTS, S.; ASHMOLE, I.; ROOKES, S. M.; GALLIMORE, P. H. Mutational analysis of the Human Papillomavirus type 16 E1/E4 protein shows that the C Terminus is dispensable for keratin cytoskeleton association but is involved in inducing disruption of the keratin filaments. **Journal of Virology**, v. 71, n. 5, p. 3554–3562, 1997.

RONCO, L. V.; KARPOVA, A. Y.; VIDAL, M.; HOWLEY, P. M. Human papillomavirus 16 E6 oncoprotein binds to interferon regulatory factor-3 and inhibits its transcriptional activity. **Genes Dev**, v. 12, p. 2061–2072, 1998.

ROPERTO, S.; BRUN, R.; PAOLINI, F.; URRARO, C.; RUSSO, V.; BORZACCHIELLO, G.; PAGNINI, U.; RASO, C.; RIZZO, C.; ROPERTO, F.; VENUTI, A. A. Detection of bovine papillomavirus type 2 in the peripheral blood of cattle with urinary bladder tumours - possible biological role. **J. Gen. Virol.**, v. 89, n. 12, p. 3027-3033, 2008.

RUDOLF, M. P.; MAN, S.; MELIEF, C. J.; SETTE, A.; KAST, W. M. Human T-cell responses to HLA-A-restricted high binding affinity peptides of human papillomavirus type 18 proteins E6 and E7. **Clin. Cancer Res.**, v. 7, p. 788–795, 2001.

RURAL CENTRO. 2011. Disponível em: <<http://www.ruralcentro.com.br/noticias/38554/expogrande-comeca-nesta-sexta-com-palestra-sobre-sustentabilidade>>. Acesso em: 1 nov. 2011.

SALI, A.; BLUNDELL, T. L. Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. **J. Mol. Biol.**, v. 234, p. 779–815, 1993.

SANNER, M. F.; OLSON, A. J.; SPEHNER, J. C. Reduced Surface - an Efficient Way to Compute Molecular Surfaces. **Biopolymers**, v. 38, n. 3, p. 305-320, 1996.

SANTIN, P. A. G.; BRITO, L. A. B. Estudo da papilomatose cutânea em bovinos leiteiros - Comparação de diferentes tratamentos. **Ciência Animal Brasileira**, v. 5, n. 1, p. 39-45, 2004.

SARVER, N.; RABSON, M. S.; YANG, Y. C.; BYRNE, J. C.; HOWLEY, P. M. Localization and analysis of bovine papillomavirus type 1 transforming functions. **J. Virol.**, v. 52, n. 2, p. 377–388, 1984.

SCHEFFNER, M.; WERNESS, B. A.; HUIBREGTSE, J. M.; LEVINE, A. J.; HOWLEY, P. M. The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. **Cell**, v. 63, p. 1129-1136, 1990.

SCHEFFNER, M.; HUIBREGTSE, J. M.; VIERSTRA, R. D.; HOWLEY, P. M. The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. **Cell**, v. 75, p. 495-505, 1993.

SCHEFFNER, M.; HUIBREGTSE, J. M.; HOWLEY, P. M. Identification of a human ubiquitin conjugating enzyme that mediates the E6-AP-dependent ubiquitination of p53. **Proc Natl. Acad. Sci. USA**, v. 91, p. 8797-8801, 1994.

SCHILLER, J. T.; VASS, W. C.; LOWY, D. R. Identification of a second transforming region in bovine papillomavirus DNA. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 81, p. 7880-7884, 1984.

SCHILLER, J. T.; VASS, W. C.; VOUSDEN, K. H.; LOWY, D. R. E5 open reading frame of bovine papillomavirus type 1 encodes a transforming gene. **J. Virol.**, v. 57, p. 1–6, 1986.

SCHLEGEL, R.; WADE-GLASS, M.; RABSON, M. S.; YANG, Y. Z. The E5 transforming gene of bovine papillomavirus encodes a small, hydrophobic polypeptide. **Science**, v. 233, p. 464-467, 1986.

SCHWARZ, E.; FREESE, U.; GISSMANN, L.; MAYER, W.; ROGGENBUCK, B.; STREMLAU, A.; ZUR HAUSEN, H. Structure and transcription of human papillomavirus sequences in cervical carcinoma cells. **Nature**, v. 314, p. 111-114, 1985.

SCRUTTON, N. S.; RAINE, A. R. C. Cation- π bonding and amino-aromatic interactions in the biomolecular recognition of substituted ammonium ligands. **Biochem. J.**, v. 319, p. 1–8, 1996.

SCULLY, C. Oral squamous cell carcinoma - from a hypothesis about virus, to concern about possible sexual transmission. **Oral Oncol.**, v. 38, p. 227-34, 2002.

SHAMANIN, V.; DELIUS, H.; DE VILLIERS, E. M. Development of a broad spectrum PCR assays for papillomaviruses and its application in screening lung cancer biopsies. **Journal of General Virology**, v. 75, p. 1149-1156, 1994.

SHOPE, R. E. Immunization of rabbits to infectious papillomatosis. **J. Exp. Med.**, v. 65, p. 219-231, 1937.

SIDI, A. O. M. O.; BABAH, K. O.; BRIMER, N.; NOMINÉ, Y.; ROMIER, C.; KIEFFER, B.; VANDE POL, S.; TRAVÉ, G.; ZANIER, K. Strategies for bacterial expression of protein-peptide complexes - Application to solubilization of papillomavirus E6. **Protein Expression and Purification**, v. 80, p. 8-16, 2011.

SILVEIRA, N. J. F. **Bioinformática estrutural aplicada ao estudo de proteínas alvo do genoma do *Mycobacterium tuberculosis***. 2005. 166 f. Tese (Doutorado em Biofísica Molecular) - Universidade Estadual Paulista, São Paulo, 2005.

STANLEY, M. A.; PETT, M. R.; COLEMAN, N. HPV - from infection to cancer. **Biochemical Society Transactions**, v. 35, n. 6, p. 1456-1460, 2007.

STELLER, M. A.; GURSKI, K. J.; MURAKAMI, M.; DANIEL, R. W.; SHAH, K. V.; CELIS, E.; SETTE, A.; TRIMBLE, E. L.; PARK, R. C.; MARINCOLA, F. M. Cell-mediated immunological responses in cervical and vaginal cancer patients immunized with a lapidated epitope of human papillomavirus type 16 E7. **Clin. Cancer Res.**, v. 4, p. 2103-2109, 1998.

STEWART, N.; BACCHETTI, S. Expression of SV40 large T antigen, but not small t antigen, is required for the induction of chromosomal aberrations in transformed human cells. **Virology**, v. 180, p. 49-57, 1991.

STOCCO DOS SANTOS, R. C.; FERRAZ, O.; CASTRO, N.; PINTO, J.; SANTELLI, G.; BEÇAK, W. Chromosome aberrations in cattle inoculated with blood of hematuric bovines. In - **Proceedings of the Seventeenth International Congress of Genetics**, Birmingham, UK, p. 213, 1993.

STOCCO DOS SANTOS, R. C.; LINDSEY, C. J.; FERRAZ, O. P.; PINTO, J.; MIRANDOLA, R. S.; BENESI, F. J.; BIRGEL, E. H.; PEREIRA, C. A.; BEÇAK, W. Bovine papillomavirus transmission and chromosomal aberrations - an experimental model. **Journal of General Virology**, v. 79, p. 2127-2135, 1998.

STUBENRAUCH, F.; LAIMINS, L. A. Human papillomavirus life cycle - active and latent phases. **Semin. Cancer Biol.**, v. 9, p. 379-386, 1999.

SUNDBERG, J. P. Papillomavirus infections in animals, In: SYRJÄNEN, K.; GISSMANN, L.; KOSS, L. G. (Ed.). **Papillomaviruses and human disease**. Springer Verlag, 1987. p. 40-103.

SUNDBERG, J. P.; VAN RANST, M.; BURK, R.D.; JENSON, A.B. The nonhuman (animal) papillomaviruses - Host range, epitope conservation, and molecular diversity. In: GROSS, G.; VON KROGH, G. (Ed.). **Human Papillomavirus Infections in dermatovenereology**. Boca Raton: CRC Press, 1997. p. 47-68.

TERAI, M.; DESALLE, R.; BURK, R. D. Lack of Canonical E6 and E7 Open Reading Frames in Bird Papillomaviruses - *Fringilla coelebs* Papillomavirus and *Psittacus erithacus timneh* Papillomavirus. **Journal of Virology**, v. 10, p. 10020-10023, 2002.

THE UNIPROT CONSORTIUM. The Universal Protein Resource (UniProt). **Nucleic Acids Res.**, v. 36, p. 190-195, 2008.

THOMAS, M.; LAURA, R.; HEPNER, K.; GUCCIONE, E.; SAWYERS, C.; LASKY, L.; BANKS, L. Oncogenic human papillomavirus E6 proteins target the MAGI-2 and MAGI-3 proteins for degradation. **Oncogene**, v. 21, p. 5088–5096, 2002.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. CLUSTALW - improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Res.**, v. 22, p. 4673–4680, 1994.

TOMITA, Y.; LITERAK, I.; OGAWA, T.; JIN, Z.; SHIRASAWA, H. Complete genomes and phylogenetic positions of bovine papillomavirus type 8 and a variant type from a European bison. **Virus Genes**, v. 35, p. 243–249, 2007a.

TOMITA, Y.; LITERAK, I.; OGAWA, T.; JIN, Z.; SHIRASAWA, H. Genus specific features of bovine papillomavirus E6, E7, E5 and E8 proteins. **Virus Res.**, v. 124, p. 231–236, 2007b.

TONG, X.; HOWLEY, P. M. The bovine papillomavirus E6 oncoprotein interacts with paxillin and disrupts the actin cytoskeleton. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 94, p. 4412–4417, 1997.

TONG, X.; BOLL, W.; KIRCHHAUSEN, T.; HOWLEY, P. M. Interaction of the bovine papillomavirus E6 protein with the clathrin adaptor complex AP-1. **J. Virol.**, v. 72, p. 476–482, 1998.

TRUS, B. L.; RODEN, R. B.; GREENSTONE, H. L.; VRHEL, M.; SCHILLER, J. T.; BOOY, F. P. Novel structural features of bovine papillomavirus capsid revealed by a three-dimensional reconstruction to 9 Å resolution. **Nat. Struct. Biol.**, v. 4, p. 413–420, 1997.

TUMBARELLO, D. A.; BROWN, M. C.; TURNER, C. E. The paxillin LD motifs. **FEBS Lett.**, v. 513, p. 114–118.

ULLMAN, C. G.; HARIS, P. I.; GALLOWAY, D. A.; EMERY, V. C.; PERKINS, S. J. Predicted α -helix/ β -sheet secondary structures for the zinc-binding motifs of human papillomavirus E7 and E6 proteins by consensus prediction averaging and spectroscopic studies of E7. **Biochem. J.**, v. 319, p. 229–239, 1996.

VAN DOORSLAER, K.; SIDI, A. O. M. O.; ZANIER, K.; RYBIN, V.; DERYCKERE, F.; RECTOR, A.; BURK, R. D.; LIENAU, E. K.; VAN RANST, M.; TRAVE, G. Identification of unusual E6 and E7 proteins within Avian Papillomaviruses - cellular localization, biophysical characterization, and phylogenetic analysis. **Journal of Virology**, v. 83, n. 17, p. 8759–8770, 2009.

VANDE POL, S. B.; BROWN, M. C.; TURNER, C. E. Association of bovine papillomavirus type 1 E6 oncoprotein with the focal adhesion protein paxillin through a conserved protein interaction motif. **Oncogene**, v. 16, p. 43–52, 1998.

VILLA, L. L.; COSTA, R. L. R.; PETTA, C. A.; ANDRADE, R. P.; AULT, K. A.; GIULIANNO, A. R.; WHELLER, C. M.; KOUTSKY, L. A.; MALM, C.; LEHTINEN, M. et al. Prophylactic quadrivalent human papillomavirus (types 6, 11, 16 and 18) L1 virus-like particle vaccine in young women - a randomised double-blind placebo-controlled multicenter phase II efficacy trial. **Lancet. Oncol.**, v. 6, p. 271–278, 2005.

VON KNEBEL DOEBERITZ, M.; RITTMULLER, C.; AENGENEYNDT, F.; JANSEN-DURR, P.; SPITKOVSKY, D. Reversible repression of papillomavirus oncogene expression in cervical carcinoma cells - consequences for the phenotype and E6-p53 and E7-pRB interactions. **J. Virol.**, v. 68, p. 2811-2821, 1994.

VOUSDEN, K. Interactions of human papillomavirus transforming proteins with the products of tumor suppressor genes. **FASEB J.**, v. 7, p. 872-879, 1993.

WADE, R.; BRIMER, N.; VANDE POL, S. Transformation by bovine papillomavirus type 1 E6 requires paxillin. **J. Virol.**, v. 82, p. 5962-5966, 2008.

WAIN-HOBSON, S.; SONIGO, P.; DANOS, O.; COLE, S. ALIZON, M. Nucleotide sequence of the AIDS Virus, LAV. **Cell**, v. 40, p. 9-17, 1985.

WALTER-MOURA, J.; STOCCO DOS SANTOS, R. C.; DAGLI, M. L. Z.; D'ANGELINO, J. L.; BIRGEL, E. H.; BEÇAK, W. Chromosome aberrations in cattle raised on bracken fern pasture. **Experientia**, v. 44, p. 785-788, 1988.

WANG, S.; PANG, T.; GAO, M.; KANG, H.; DING, W.; SUN, X.; ZHAO, Y.; ZHU, W.; TANG, X.; YAO, Y.; HU, X. HPV E6 induces eIF4E transcription to promote the proliferation and migration of cervical cancer. **FEBS**, 2013 (In Press).

WAZER, D. E.; LIU, X.; CHU, Q.; GAO, Q.; BAND, V. immortalization of distinct human mammary epithelial cell types by human papillomavirus 16 E6 or E7. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 92, p. 3687-3691, 1995.

WEINER, P. K.; LANGRIDGE, R.; BLANEY, J. M.; SCHAEFER, R.; KOLLMAN, P. A. Electrostatic potential molecular surfaces. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 79, p. 3754-3758, 1982.

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

WOSIACKI, S. R.; REIS, A. C. F.; ALFIERI, A. F.; ALFIERI, A. A. Papilomavírus bovino tipo 2 na etiologia da hematúria enzoótica bovina. **Ciências Agrárias**, v. 23, n. 1, p. 121-130, 2002.

WOSIACKI, S. R.; BARREIRO, M. A. B.; ALFIERI, A. F.; ALFIERI, A. A. Semi-nested PCR for detection and typing of bovine Papillomavirus type 2 in urinary bladder and whole blood from cattle with enzootic haematuria. **Journal of Virological**, v. 126, p. 215-219, 2005.

XIONG, J. **Essential Bioinformatics**. Cambridge University Press, 2006. 339 p.

YAGUIU, A.; DAGLI, M. L. Z.; BIRGEL JR, E. H.; ALVES, B. C. A.; FERRAZ, O. P.; PITUCO, E. M.; FREITAS, A. C.; BEÇAK, W.; STOCCO, R. C. Simultaneous presence of bovine papillomavirus and bovine leukemia virus in different tissues - in situ hybridization and cytogenetic analysis. **Genetics and Molecular Research**, v. 7, p. 487-497, 2008.

YOU, J.; CROYLE, J.; NISHIMURA, A.; OZATO, K.; HOWLEY, P. Interaction of the bovine papillomavirus E2 protein with brd4 tethers the viral DNA to host mitotic chromosomes. **Cell**, v. 117, p. 349-360, 2004.

YUAN, Z.; GOBEIL, P. A.; CAMPO, M. S.; NASIR, L. Equine sarcoid fibroblasts over-express matrix metalloproteinases and are invasive. **Virology**, v. 396, p. 143–151, 2010.

YUAN, Z.; GAULT, E. A.; CAMPO, M. S.; NASIR, L. Different contribution of bovine papillomavirus type 1 oncoproteins to the transformation of equine fibroblasts. **J. Gen. Virol.**, v. 92, p. 773–783, 2011.

ZACHARIAS, N.; DOUGHERTY, D. A. Cation- π interactions in ligand recognition and catalysis. **TRENDS in Pharmacological Sciences**, v. 23, n. 6, p. 281-287, 2002.

ZANIER, K.; NOMINE, Y.; CHARBONNIER, S.; RUHLMANN, C.; SCHULTZ, P.; SCHWEIZER, J.; TRAVE, G. Formation of well-defined soluble aggregates upon fusion to MBP is a generic property of E6 proteins from various human papillomavirus species. **Protein Expr. Purif.**, v. 51, p. 59–70, 2007.

ZANIER, K.; RUHLMANN, C.; MELIN, F.; MASSON, M.; SIDI, O.; BERNARD, X.; FISCHER, B.; BRINO, L.; RISTRANI, T.; RYBIN, V.; BALTZINGER, M.; VANDE POL, S.; HELLWIG, P.; SCHULTZ, P.; TRAVE, G. E6 proteins from diverse papillomaviruses selfassociate both in vitro and in vivo. **J. Mol. Biol.**, v. 396, p. 90–104, 2010.

ZANIER, K.; SIDI, A. O. M. O.; BOULADE-LADAME, C.; RYBIN, V.; CHAPPELLE, A.; ATKINSON, A.; KIEFFER, B.; TRAVÉ, G. Solution structure analysis of the HPV16 E6 oncoprotein reveals a self-association mechanism required for E6-mediated degradation of p53. **Structure**, v. 20, p. 604-617, 2012.

ZANIER, K.; CHARBONNIER, S.; SIDI, A. O. M. O.; MCEWEN, A. G.; FERRARIO, M. G.; POUSSIN-COURMONTAGNE, P.; CURA, V.; BRIMER, N.; BABAH, K. O.; ANSARI, T.; MULLER, I.; STOTE, R. H.; CAVARELLI, J.; VANDE POL, S.; TRAVÉ, G. Structural Basis for Hijacking of Cellular LxxLL Motifs by Papillomavirus E6 Oncoproteins. **Science**, v. 339, n. 694, p. 694-698, 2013.

ZHANG, Y.; DASGUPTA, J.; MA, R. Z.; BANKS, L.; THOMAS, M.; CHEN, X. S. Structures of a Human Papillomavirus (HPV) E6 polypeptide bound to MAGUK Proteins - Mechanisms of targeting tumor suppressors by a High-Risk HPV oncoprotein. **Journal of Virology**, v. 81, n. 7, p. 3618–3626, 2007.

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

ZIMMERMANN, H.; KOH, C.H.; DEGENKOLBE, R.; O'CONNOR, M. J.; MÜLLER, A.; STEGER, G.; CHEN, J. J.; LUI, Y.; ANDROPHY, E.; BERNARD, H. Interaction with CBP/p300 enables the bovine papillomavirus type 1 E6 oncoprotein to downregulate CBP/p300-mediated transactivation by p53. **J. Gen. Virol.**, v. 81, p. 2617–2623, 2000.

ZUR HAUSEN, H. Papillomavirus infections--a major cause of human cancers. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1288, n. 2, p. 55-78, 1996.

ZUR HAUSEN, H. Papillomaviruses causing cancer - evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 92, p. 690-698, 2000.

APÊNDICE – Artigo submetido

Artigo submetido para publicação na revista BioMed Research International
(<http://www.hindawi.com/journals/bmri/>)

EXPRESSION AND *IN SILICO* ANALYSIS OF THE RECOMBINANT BOVINE PAPILLOMAVIRUS E6 PROTEIN AS A MODEL FOR VIRAL ONCOPROTEINS STUDIES

Mazzuchelli-de-Souza J^{1,2}, Carvalho RF¹, Ruiz RM^{1,2}, Melo TC^{1,3}, Araldi RP^{1,2},
Carvalho E⁴, Thompson C⁵, Sircili MP^{1,2}, Beçak W⁵, Stocco RC^{1,2}.

¹Laboratório de Genética, Instituto Butantan, Secretaria de Estado da Saúde. Av. Vital Brasil, 1500, Butantã, 05503-900, São Paulo, SP – Brazil

²Programa de Pós-graduação Interunidades em Biotecnologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, Avenida Prof. Lineu Prestes, 2415 Edifício ICB - III - Cidade Universitária – CEP 05508-900 - São Paulo-SP – Brazil

³Programa de Pós-graduação em Biologia Estrutural e Funcional, Universidade Federal de São Paulo, Rua Botucatu, 740, CEP 04023-900, São Paulo, SP, Brazil

⁴Laboratório de Biotecnologia Molecular, Instituto Butantan, Secretaria de Estado da Saúde. Av. Vital Brasil, 1500, Butantã, 05503-900, São Paulo, SP – Brazil

⁵Laboratório Nacional de Computação Científica, Av. Getúlio Vargas, 333, Quitandinha, 25651-075, Petrópolis, RJ, Brazil.

⁶Departamento de Biologia, Universidade Federal da Integração Latino-Americana (UNILA). Av. Tancredo Neves, 6731 bloco 4, 85867-970, Foz do Iguaçu, PR, Brazil.

Corresponding author -

Rita de Cassia Stocco

Instituto Butantan, Laboratório de Genética, Av. Vital Brasil, 1500, São Paulo, SP, Brazil, CEP 05503-900

Phone number - 55 xx 11 2627-9701

Email - ritastocco@butantan.gov.br or ritastocco@yahoo.com

Abstract

Bovine papillomaviruses (BPVs) are recognized as the causal agents of economical relevant diseases in cattle, associated with the development of tumors in skin and mucosa. The oncogenesis process is mainly associated with different viral oncoprotein expression, which are involved in cell transformation. The expression and characterization of recombinant viral oncoproteins represents an attractive strategy to obtain biotechnological products as antibodies and potential vaccines. Thus, the aim of this work was to clone and express the BPV-1 and BPV-2 E6 recombinant protein and perform *in silico* analysis in order to develop a strategy for the systematic study of other papillomaviruses oncoproteins. The results demonstrated that BPV-1 and BPV-2 E6 recombinant proteins were expressed and purified from bacterial system as well as its *in silico* analysis was performed in order to explore and predict biological characteristics of these proteins.

Keywords - Bovine papillomavirus, E6 recombinant protein, *in silico* analysis.

Introduction

Different papillomaviruses (PVs) has been described as infectious agents of the vertebrates species, including domestic animals and being human [1, 2]. The correlation between the papillomavirus infection and the cellular malignant progression is associated with the expression of viral oncoproteins. These proteins act on different aspects of the tumoral suppression cascades as well as on that ones that take part in the control of cell cycle and immune response. Viral oncoproteins can also interact with cellular DNA. All together, these actions can induce mutational changes in the host cell chromatin [3].

Currently, the *Papillomaviridae* family is divided into 16 genera according to their genomic organization [4, 5]. These small (55-60 nm), non enveloped viruses have a genome of a double-stranded circular DNA molecule of approximately eight kilobases [6], codifying functional, early (E) proteins and structural, late (L) proteins, expressed at different stages of the viral cycle. With at least eight potential open reading frames, the viral genome also consists of a non coding region, the long control region (LCR), associated with the viral transcriptional regulation. The E region encodes the replication and transcription regulatory proteins E1, E2, and the transforming proteins E5, E6 and E7, which are associated with uncontrolled cell proliferation and differentiation [7]. The E4 protein formed by alternative splicing of genes E1 and E1/E4 transcripts (E4-E1) is associated with the release of the virions through the disruption of the cytoskeleton structure [8, 9, 10]. It's also shown that actin cytoskeleton was altered in BPV-1 E6-transformed cells through E6 interaction with the focal adhesion protein paxillin [11]. On the other hand, the L region encodes structural proteins L1 and L2 that assemble into the capsid during the viral particle maturation [8]. Specifically, L1 is the most conserved gene within PV genome and has therefore been used for the identification of new PVs types [4].

The Bovine papillomavirus (BPV) is recognized as the causal agent of benign and malignant tumors in cattle, such as cutaneous papillomas, urinary bladder and esophagus cancer. This virus is distributed worldwide, being associated with severe economic losses in meat, milk and leather production. Thirteen types of the BPVs are currently well characterized and classified into three distinct genera - Delta, Epsilon, and Xi - have been characterised and associated with different histopathological lesions [15]. Specifically, the BPV-1 and -2 are classified as *Deltapapillomaviruses* [16]. Characteristically, these types induce the appearance of fibropapillomas, associated with the recruitment of the sub-epithelial fibroblasts [17]. and

have the ability to infect different host species, not only bovines, causing the equine sarcoid [18]. Lately, the genome of a new Delta-BPV type (BPV-13) was fully sequenced [19].

BPV-1 is commonly associated with lesions in the teats and udder [15, 20, 21]. BPV-1 can cause fibropapillomas of the penis, leading to necrosis and the loss of reproductive function [22]. BPV-2 is the causal agent of malignant tumors in the bladder [23]. Both types have also already been detected in peripheral blood and in tissues of the reproductive tract, and their vertical transmission have been suggested [17, 23, 24, 25, 26, 27, 28].

The first evidence of the oncogenic properties of E6 protein came from studies on human tumors cell lineages derivate from uterine cervix where E6 was found expressed and maintained many years after the initial transformation events [9, 10, 11]. The E6 and E7 gene products are essential in the process of cell transformation and immortalization [10, 12]. Particularly, E6 protein has a central role as a carcinogen factor because it binds to p53, a major tumor suppressor protein, inducing its degradation [4]. Studies conducted with different cervical cancer cell lines infected with HPV-16 showed that the only expressed viral proteins were E6 and E7, leading to the speculation that they could be expressed like fusion proteins, an important indicator for the malignant progression [13]. It is also suggested that the genes E6 and E7 have a synergic action during the induction of genital human keratinocytes immortalization, although in some other cell types, like mammary epithelial cells, they may act separately [14].

Knowing the importance of E6 protein, the aim of this work was to clone and express the BPV-1 and BPV-2 E6 recombinant protein enabling the development of antibodies and vaccines and perform *in silico* analysis in order to develop a strategy for the systematic study of other papillomaviruses oncoproteins.

Material and methods

E6-1 and E6-2 gene amplification

The following specific primers were designed - E6-1 sense primer, 5'-GAAAACCTGTATTTTCAGGGCTAGGACCTGAAACCTTTTGC-3'; and E6-1 antisense primer, 5'-GGCCTCGAGCTGCAGGTGAATCATCCAAG-3', E6-2 sense primer, 5'-GAAAACCTGTATTTTCAGGGCATGGACCTGCAAAGTTTTTC-3'; and E6-2 antisense primer, 5'-GGCCTCGAGGAATCATCCAAGTTTCTA-3'. Underlined letters indicate the nucleotides for TEV protease site and italic underlined letters indicate *XhoI* restriction site. The primers were designed based on complete genome sequences deposited on GenBank

(accession number X02346 and M20219.1). These primers were used in a PCR reaction to amplify E6 gene, using the genomic DNA of BPV-1 or BPV-2 previously cloned in pAT153 vector as template [29]. A PalmCycler© Cobbert Research Version 2.1.7 (Uniscience) was used with the following amplification program - a initial denaturation step of 95°C for 4 min followed by 30 cycles of 95°C for 1 min, 50°C for 30 sec, and 72°C for 1 min and final, 5 min, elongation step at 72°C.

Cloning and subcloning

The amplified PCR products were detected in a 1% agarose gel electrophoresis, excised from the gel, and purified with Invisorb® Fragment Clean Up Kit (Invitex). The purified amplicons were cloned in pCR4-TOPO vector (Invitrogen). The resulting constructs were cloned in transformed *E. coli* DH5a competent cells and positive clones were selected from plates supplemented with ampicillin. Plasmid DNA was prepared from overnight grown cultures with a WIZARD Mini Prep Purification Kit (Promega) following the manufacturer's recommendations. Plasmids were digested with *Eco*RI and *Xho*I to check the insert presence. Purified inserts were subcloned into the pET-28(+) vector (Merck), which was previously digested with the same enzymes. T4 DNA ligase (Invitrogen) was used for the ligation reaction. Recombinant pET-E61 and pET-E62 was then used to transform *E. coli* BL21 (DE3) quimiocompetent cells by heat shock. Positive recombinant clones were selected on LB plates containing kanamycin, and the correct insertion of the E6 ORF into the cloning sites was verified by DNA sequencing.

Protein expression

Transformed *E. coli* BL21 (DE) cells harboring the correct expression construct (pET-E61 and pET-E62) were grown in 1L LB broth containing kanamycin (50 µg/ml) at 37 °C until the growth reached log phase (OD₆₀₀ = 0.6). IPTG at a final concentration of 1 mM was added to the cultures to induce recombinant protein expression. Induced bacterial cultures were pelleted by centrifugation at 10,000 g for 30 min at 4 °C.

Electron microscopy

Samples of transformed *E. coli* BL21 cultured cells with the recombinant plasmid E6-1/pET-28a and with the empty pET-28a vector (negative control) were induced for recombinant protein expression. Fractions of these cultures were centrifuged and resuspended in approximately 1.0 mL of glutaraldehyde. These samples were sent to the Department of Cell Biology and Development at the Institute of Biomedical Sciences - ICB II to be prepared for electron microscopy (ME) for the verification of the E6 recombinant expression through the observation of inclusion bodies. ME observations and image recording were performed at the Laboratory of Cellular Biology, Instituto Butantan, using a transmission electron microscope LEO 906E.2.5

Protein purification

In order to purify the E6 recombinant proteins, the bacterial pellets were resuspended in 20mM TrisHCl, NaCl 500mM, pH 8.0, supplemented with protease inhibitor (PMSF at final concentration of 2mM) and lysed with a French Press. The cell lysates were centrifuged at 6000 g for 60 min at 4 °C. The pellets were resuspended in 20mM TrisHCl, 500mM NaCl, 8M ureia, 50mM imidazole, pH8.0, final volume 25mL. Aliquots of the clarified suspension were collected and analyzed in 17% SDS-PAGE. His tagged recombinant proteins were purified by Ni Sepharose 6 Fast Flow (GE Healthcare) - the clarified supernatants were passed through columns of charged resin, subsequently washed with 20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 500 mM NaCl, 6 M urea and 50 mM imidazole. The recombinant proteins were then eluted with 500mM imidazole in the same buffer. The proteins quantification was determined by the Bradford method [30]. Purified recombinant proteins were separated by 17% SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membranes. Membranes were blocked with 5% powdered nonfat dry milk in phosphate buffered saline containing 0.05% Tween 20 (PBST) and incubated for 2 h with using Anti-His Monoclonal Antibody (GE) (1 -3000). Blots were then submitted to three 5 min washes with TBST, incubated with Goat Anti-Mouse IgG Horseradish Peroxidase (1 -2000) for 1 h at room temperature. Bands were visualized by chemiluminescence reaction in the presence of H₂O₂ and using diaminobenzidine (DAB). The reaction was stopped with distilled water.

Bioinformatics

The nucleotide sequences generated by sequencing of E6-1 and E6-2 cloned genes were translated into amino acids with the BioEdit 7.1.3.0 [31]. The obtained nucleotide and amino acids sequences were aligned with sequences deposited in Nucleotide Collection and Protein Data Bank using BLASTN and BLASTP algorithms (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Sequence alignments were also performed using the BioEdit software and the Identity Matrix was calculated. The topology diagrams of the recombinant proteins were generated with the PDBsum software [32].

Conserved regions analysis of the proteins E6-1 to E6-2 recombinants were performed by comparing all E6 protein sequences of other PVs already deposited using consurf.tau.ac.il [33]. The degree of conservation for each amino acid was pointed out in a linear sequence. In addition, the analysis of the antigenicity properties was performed using the JaMBW Edition 1.1 software [34].

Results and Discussion

E6-1 and E6-2 gene amplification and cloning

E6-1 and E6-2 gene PCR products showed bands in the gel with approximately 500pb. E6-1/TOPO and E6-2/TOPO were successful cloned in *E. coli* DH5a competent cells as indicated with double digestion of the recombinant TOPO vectors. Subsequently, E6-1/pET and E6-2/pET were subcloned in *E. coli* BL21 competent cells as indicated by double digestion and sequencing. DNA sequencing showed that the cloned genes were inserted in the correct frame of pET-28a(+). The primers sets were also effective for DNA sequencing.

Electron microscopy

In regard to electronic microscopy (EM), both induced and non induced cultured bacteria used as negative control (transformed with pET-28a, but without E6 insert) showed no inclusion corpuscles (Figure 1A and Figure 1B). On the other hand, EM of the cultured, induced *E. coli* BL21 cells transformed with E6-1/pET-28a, revealed the presence of inclusion bodies (Figure 1D), suggesting the presence of recombinant protein expression. As before, these were not observed in non induced, E6-1/pET-28a bacteria (Figure 1C).

Papillomavirus E6 proteins are notoriously difficult to express and purify and unfused E6 proteins form insoluble aggregates upon bacterial overexpression [35]. However, in this study it was demonstrated the feasibility of E6-1 and E6-2 purification from a bacterial expression system.

E6 recombinant protein expression and purification

Cloning and expression of different papillomavirus oncoproteins in bacterial vectors has already been done, enabling structural studies [36]. In the present work, the E6 gene of both BPV-1 and BPV-2 was cloned in a bacterial expression system, being the respective recombinant proteins purified.

SDS-PAGE and Western blotting analysis using an anti-his tag antibody demonstrated that the large majority of detected fusion proteins migrated predominantly as a single band with an approximate expected molecular mass of 16kDa (Figure 2A). However, Western blotting showed other bands also, indicating the possible occurrence of protein dimerization (Figure 2B). The purified recombinant eluted proteins were also examined by SDS-PAGE and Western blotting as before, being observed bands with approximately 16kDa.

Bioinformatics analysis

Alignment and Identity Matrix

The identity matrix showed 0.99 of similarity between E6-1 recombinant and reference (X02346) sequences of nucleotides. The amino acid sequence of the E6-1 recombinant protein showed 0.99 of identity with PDB codes 3PY7 sequence which has been considered as the protein sequence reference.

It was observed that, when translated into amino acids, two mutations (A78G and T48C) were silent, i.e. no change in the amino acids generated. The other two mutations (A73T and T155C) generated different amino acid (Table 1).

Differences between recombinant cloned E6-2 and deposited corresponding sequences also were observed. The identity matrix showed 0.99 of similarity between E6-2 recombinant and reference (M20219.1) sequences of nucleotides. Amino acid sequence of the E6-2 recombinant protein showed 0.98 of identity with UniProtKB/Swiss-Prot codes P11302.1

sequence which has been considered as the protein sequence reference. It was observed that, when translated into amino acids, all three mutations (T68C and T45G and A405C) generated different amino acid (Table 2).

Topology

Topology diagram of recombinant protein E6-1 and E6-1 was generated. It was observed the presence of seven β -sheets and five α -helices in both (Figures 3A and 3B).

Antigenicity prediction

According to the antigenicity graph E6-1 recombinant protein sequence showed one peak near amino acids 90 and 100 (CCYCGGKLTNEKHR) and E6-2 recombinant protein showed two peaks near amino acids 50 and 60 (CTTCLENCLDKE) and amino acids 90 and 100 (CCYCGGKLTNEKQR) were predicted as especially immunogenic (Figures 4A and 4B). Interesting, these potential immunogenic, mapped, regions could represent targets for the development of new designed antibodies.

Conserved regions

In silico prediction identified conserved regions between the E6-1 to E6-2 proteins as well as from other papillomaviruses species. CXXC motifs were localized at regions associated with the binding of zinc atoms (Figs. 5A and 5B).

Usually, papillomavirus E6 proteins share a common architecture consisting of two zinc-binding domains (E6-N and E6-C). These structural features indicated that E6 can interact directly with DNA molecule, acting as a transcriptional activator [37, 38, 39]. Both BPV-1 and BPV-2 encodes an E6 protein of 137 amino acids that acts as a transcriptional activator, p53 and paxillin ligand, presenting also telomerase activity. Here, the primary amino acid sequences of these recombinant proteins were analyzed *in silico* for comparison with virtual protein sequences deposited in GenBank. There were observed the presence of divergences which may represent functional differences. It's emphasized that the DNA sequencing in our laboratory were redundant in order to cover the entire E6 gene sequence for at least three times.

Among papillomaviruses oncoproteins, conserved regions were maintained in regard to the structure and function of these proteins. For example, the E7 protein has 127 amino acids and a zinc finger domain [40]. Recombinant E7 proteins with mutated regions showed lower efficiency in transforming activity [41]. On the other hand, several studies indicated that the hydrophobic nature of the BPV E5 protein has a crucial importance in confer the transforming activity [42]. These essential amino acid residues are highly conserved among papillomaviruses as previously reported [43].

Conclusions

The cloning and recombinant protein expression of E6-1 and E6-2 in bacterial system proved to be a feasible methodological approach. For the first time the BPV-2 E6 protein is expressed and purified in a bacterial system. The purification of E6 BPV recombinant protein as well its structural and antigenicity analyses could allow the production of biotechnology material such as antibodies and vaccines candidates. This work could be also employed as a model for the obtainment of other papillomaviruses recombinant oncoproteins.

Acknowledgments - The authors would like to thanks to *Ministério de Ciência, Tecnologia e Inovação / Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico* (CNPq Proc. 554816/2006-7 and 402539/2011-7), FAPESP (Proc. 2006/02439-6) and Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES) for the financial support and to Carolina da Paz Sabino for her editorial support.

References

1. zur Hausen, H. 1996. Papillomavirus infections--a major cause of human cancers. *Biochim Biophys Acta*, 9, 1288(2) -55-78.
2. Carr, J., Gyorfí, T. Human papillomavirus. 2000. Epidemiology, transmission, and pathogenesis. *Clinics in Laboratory Medicine*, 20 -235-255.
3. Stewart, N., Bacchetti, S. 1991. Expression of SV40 large T antigen, but not small t antigen, is required for the induction of chromosomal aberrations in transformed human cells. *Virology*, 180 -49-57.

4. Chan S-Y, Delius H, Halpern AL, Bernard HU. 2005. Analysis of genomic sequences of 95 papillomavirus types - uniting typing, phylogeny, and taxonomy. *Journal of Virology*. 69 -3074-3083.
5. de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, Zur HH. 2004. Classification of papillomaviruses. *Virology*. 324 -17-27.
6. Campo MS. 2003. Papillomavirus and disease in humans and animals. *Veterinary and Comparative Oncology*. 1 -3-14.
7. Gottschling M, Köhler A, Stockfleth E, Nindl I. 2007. Phylogenetic analysis of beta-papillomaviruses as inferred from nucleotide and amino acid sequence data. *Mol Phylogenet Evol*. 42 - 213-222.
8. Doorbar J, Ely S, Sterling J, McLean C, Crawford L. 1991. Specific interaction between HPV-16 E1-E4 and cytokeratins results in collapse of the epithelial all intermediate filament network. *Nature*. 352 - 824-827.
9. Roberts S, Ashmole I, Rookes SM, Gallimore PH. 1997. Mutational analysis of the Human Papillomavirus type 16 E1/E4 protein shows that the C Terminus is dispensable for keratin cytoskeleton association but is involved in inducing disruption of the keratin filaments. *Journal of Virology*. 71 (5) - 3554-3562.
10. Doorbar J, Parton A, Hartley K, Banks L, Crook T, Stanley M, Crawford L. 1990. Detection of novel splicing patterns in a HPV16-containing keratinocyte cell line. *Virology*. 178(1) - 254-62.
11. Tong X, Howley PM. 1997. The bovine papillomavirus E6 oncoprotein interacts with paxillin and disrupts the actin cytoskeleton. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 94 - 4412-4417.
12. Doorbar, J. 2005. The papillomavirus life cycle. *Journal of Clinical Virology*. 32 - 7-15.
13. Schwarz, E.; Freese, U.; Gissmann, L.; Mayer, W.; Roggenbuck, B.; Stremlau, A.; zur Hausen, H. 1985. Structure and transcription of human papillomavirus sequences in cervical carcinoma cells. *Nature*. 314 -111-114.
14. Androphy, E.J.; Hubbert, N.L.; Schiller, J.T.; Lowy, D.R. 1987. Identification of the HPV-16 E6 protein from transformed mouse cells and human cervical carcinoma cell lines. *EMBO J*. 6 - 989-992.
15. Banks, L.; Spence, P.; Androphy, E.; Hubbert, N.; Matlashewski, G.; Murray, A.; Crawford, L. 1987. Identification of human papillomavirus type 18 E6 polypeptide in cells derived from human cervical carcinomas. *J. Gen. Virol*. 68 - 1351-1359.

16. Rivoire, W.A.; Capp, E.; Corleta, H.E.; Silva, I.S.B. 2001. Bases biomoleculares da Oncogênese cervical - Revista Brasileira de Cancerologia. 47(2) -179-84.
17. Baker, C.C.; Phelps, W.C.; Lindgren, V.; Braun, M.J., Gonda, M.A.; Howley, P.M. 1987. Structural and transcriptional analysis of human papillomavirus type 16 sequences in cervical carcinoma cell lines. J. Virol. 61 - 962-971.
18. Wazer, D.E.; Liu, X.; Chu, Q.; Gao, Q.; Band, V. 1995. Immortalization of distinct human mammary epithelial cell types by human papillomavirus 16 E6 or E7. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 92 -3687-3691.
19. Borzacchiello G., Roperto F. 2008. Bovine papillomaviruses, papillomas and cancer in cattle. *Veterinary Research*. 39-45.
20. Campo MS, Jarrett WFH, Barron R, O'Neil BW, Smith KT. 1992. Association of bovine papillomavirus type 2 and bracken fern with bladder cancer in cattle. *Cancer Research*. 52 -6898-6904.
21. Jelínek F, Tachezy R. 2005. Cutaneous papillomatosis in Cattle. *Journal of Comparative Pathology*. 132 -70-81.
22. Nasir L, Campo MS. 2008. Bovine papillomaviruses - their role in the aetiology of cutaneous tumours of bovids and equids. *Veterinary Dermatology*. 119 -243-254.
23. Lunardi M, Alfieri AA, Otonel RA, et al. 2012. Genetic characterization of a novel bovine papillomavirus member of the Deltapapillomavirus genus. *Veterinary Microbiology*. 378-1135.
24. Jarrett, W.F.; Smith, K.T.; O'Neil, B.W.; Gaukroger, J.M.; Chandrachud, L. M.; Grindlay, G.J.; McGarvie, G.M.; Campo, M.S. 1991. Studies on Vaccination against Papillomaviruses - Prophylactic and Therapeutic Vaccination with Recombinant Structural Proteins. *Virology*. 194 - 33-421.
25. Hatama, S.; Ishihara, R.; Ueda, Y.; Kanno, T.; Uchida, I. 2011. Detection of a novel bovine papillomavirus type 11 (BPV-11) using xipapillomavirus consensus polymerase chain reaction primers. *Arch Virol*. 156 -1281-1285
26. Gardiner DW, Teifke JP, Podell BK, Kamstock DA. 2008. Fibropapilloma of the glans penis in a horse. *J Vet Diagn Invest*. 20(6) -816-9.
27. Wosiacki, S.R.; Barreiro, M.A.B.; Alfieri, A.F.; Alfieri, A.A. 2005. Semi-nested PCR for detection and typing of bovine Papillomavirus type 2 in urinary bladder and whole blood from cattle with enzootic haematuria. *Journal of Virological*. 126 -215-219.

28. Freitas, A.C., Carvalho, C. Brunner, O., Birgel Jr, E.H., Libera, A.M.D., Benesi, F.J., Gregory, L., Beçak, W., Stocco, R.C. 2003. Viral DNA sequences in peripheral blood and vertical transmission of the virus - a discussion about BPV-1. *Brazilian J. Microbiol.*, 34 -76-78.
29. Stocco, R.C., Lindsey, C.J., Ferraz, O.P., Pinto, J., Mirandola, R.S., Benesi, F.J., Birgel, E.H., Pereira, C.A., Beçak, W. 1998. Bovine papillomavirus transmission and chromosomal aberrations - an experimental model. *Journal of General Virology*, 79 -2127-2135.
30. Carvalho, C., Freitas, A.C., Brunner, O., Goes, L.G.B., Yagui, A., Beçak, W., Stocco, R.C. 2003. Bovine papillomavirus type 2 in reproductive tract and gametes of slaughtered bovine females. *Brazilian Journal of Microbiology*, 34(1) -82-84.
31. Roperto, S.; Brun, R.; Paolini, F.; Urraro, C.; Russo, V.; Borzacchiello, G.; Pagnini, U.; Raso, C; Rizzo, C.; Roperto, F.; Venuti, A. 2008. A Detection of bovine papillomavirus type 2 in the peripheral blood of cattle with urinary bladder tumours - possible biological role. *J. Gen. Virol.* 89(12) - 3027-3033.
32. Lindsey, C.J., Almeida, M.E., Vicari, C.F., Carvalho, C., Yagui, A., Freitas, A.C., Becak, W., Stocco, R.C. 2009. Bovine papillomavirus DNA in milk, blood, urine, semen, and spermatozoa of bovine papillomavirus-infected animals. *Genetics and Molecular Research*, 8 -310-318.
33. Campo, M.S., Coggins, L.W. 1982. Molecular cloning of bovine papillomavirus genomes and comparison of their sequence homologies by heteroduplex mapping. *J. Gen. Virol.*, 63 -255-264.
34. Bradford, M.M. 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical biochemistry*. 72 - 248-254.
35. Hall, T.A. 1999. BioEdit - a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41 -95-98.
36. Laskowski, R.A.; McArthur, M.W.; Moss, D.S.; Thornton, J.M. 1993. PROCHECK - a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. Appl. Crystalogr.* 26, 283–291.
37. Ashkenazy, H.; Erez, E.; Martz, E.; Pupko, T.; Ben-Tal, N. ConSurf 2010 - calculating evolutionary conservation in sequence and structure of proteins and nucleic acids. *Nucl. Acids Res.* 2010.

38. Toldo, I.G. 1997. JaMBW - JaMBW, the Java based Molecular Biologist's Workbench, coordinated by Luca Toldo. Disponível em - [http - //www.bioinformatics.org/JaMBW/](http://www.bioinformatics.org/JaMBW/)
39. Sidi, A.O.M.O.; Babah, K.O.; Brimer, N.; Nominé, Y.; Romier, C.; Kieffer, B.; Vande Pol, S.; Travé, G.; Zanier, K. 2011. Strategies for bacterial expression of protein-peptide complexes - Application to solubilization of papillomavirus E6. *Protein Expression and Purification*. 80 -8-16.
40. Pahel, G.; Aulabaugh, A.; Short, S.A.; Barnes, J.A.; Painter, G.R.; Ray, P.; Phelps, W.C. 1993. Structural and functional characterization of the HPV-16 E7 protein expressed in bacteria. *J. Biol. Chem.* 268 -26018-26025.
41. Lusk M, Berg L, Weiher H, Botchan M. 1983. Bovine papilloma virus contains an activator of gene expression at the distal end of the early transcription unit. *Mol Cell Biol.* 3(6) -1108-22.
42. Jackson, M.E.; Campo, M.S. 1991. Positive and negative E2-independent regulatory elements in the long control region of bovine papillomavirus type 4. *Journal of General Virology.* 72 - 877-883.
43. Groff DE, Lancaster WD. 1986. Genetic analysis of the 3' early region transformation and replication functions of bovine papillomavirus type 1. *Virology.* Apr 15;150(1) -221-230.
44. Bohl, J.; Das, K.; Dasgupta, B.; Vande Pol, S.B. 2000. Competitive binding to a charged leucine motif represses transformation by a papillomavirus E6 oncoprotein. *Virology.* 271 - 163-170.
45. Sarver N, Rabson MS, Yang YC, Byrne JC, Howley PM. 1984. Localization and analysis of bovine papillomavirus type 1 transforming functions. *J Virol.* 52(2) -377-88.
46. Horwitz BH, Burkhardt AL, Schlegel R, DiMaio D. 1988. Transforming activity of a 16-amino-acid segment of the bovine papillomavirus E5 protein linked to random sequences of hydrophobic amino acids. *Mol. Cell. Biol.* 8 -4071-4078.
47. Kulke R, Horwitz BH, Zibello T, DiMaio D. 1992. The central hydrophobic domain of the bovine papillomavirus E5 transforming protein can be functionally replaced by many hydrophobic amino acid sequences containing a glutamine. *J. Virol.* 66 - 505-511.

TABLES

Table 1 - Mutations in nucleotide and aminoacid sequences of BPV1 E6 (red). **Ref.** reference sequences (accession number X02346 and PDB codes 3PY7); **Rec.** recombinant sequences obtained in this study.

E6 BPV-1							
Nucleotide			Codon		Amino acid		
Position	Ref	Rec	Ref	Rec	Ref	Rec	Position
48	T	→ C	GAU	→ GAC	D	= D	16
73	A	→ T	ACA	→ UCA	T	≠ S	25
78	A	→ G	GAA	→ GAG	C	= C	26
155	T	→ C	AUU	→ ACU	I	≠ T	52

Table 2 - Mutations in nucleotide and aminoacid sequences of BPV2 E6 (red). **Ref.** reference sequences (accession number M20219.1 and UniProtKB/Swiss-Prot codes P11302.1); **Rec.** recombinant sequences obtained in this study.

E6 BPV-2							
Nucleotide			Codon		Amino acid		
Position	Ref	Rec	Ref	Rec	Ref	Rec	Position
68	C	→ T	CCU	→ CUU	P	≠ L	23
134	G	→ T	GUG	→ UUG	V	≠ L	45
405	C	→ A	AAC	→ AAA	N	≠ K	135

FIGURES

Figure 1 - Electron microscopy E.coli BL21 (DE) not induced and induced by IPTG. **A** - transformed bactéria - plasmide pET-28a, without E6-1 not induced, 12.930X; **B** - transformed bactéria - plasmide pET-28a, without E6-1 induced, 16.700X; **C** - transformed bactéria - plasmide pET-28a, with E6-1 not induced, 35.970X; **D** - transformed bactéria - plasmide pET-28a, with E6-1 induced 27.800X. Arrows - inclusion bodies. Transmission Microscopy LEO 906E, Laboratório de Biologia Celular do Instituto Butantan.

Figure 2 - A - Induction of E6-1 recombinant protein. M - molecular weight marker; NI_D - non induced D colony; I_D - induced D colony; NI_E - non induced E colony; I_E - induced E colony. SDS-PAGE 17% stained with Coomassie blue. **B** - Western blotting of E6-1 recombinant protein induction. M - molecular weight marker; NI_D - non induced D colony; I_D - induced D colony; NI_E - non induced E colony; I_E - induced E colony.

Figure 4 – Antigenicity of recombinante E6-1 and E6-2 proteins. **A** - E6-1 recombinant; **B** - E6-2 recombinant.

The conservation scale:

Variable Average Conserved

- e - An exposed residue according to the neural-network algorithm.
- b - A buried residue according to the neural-network algorithm.
- f - A predicted functional residue (highly conserved and exposed).
- s - A predicted structural residue (highly conserved and buried).
- X - Insufficient data - the calculation for this site was performed on less than 10% of the sequences.

Figure 5 - Protein sequences E6-1 e E6-2- conservation levels. **A** - E6-1 recombinant; **B** - E6-2 recombinant. CXXC red.