RENATO MANCINI ASTRAY

Expressão da glicoproteína recombinante do vírus rábico em sistemas *Drosophila melanogaster* (S2) e Semliki Forest Virus (SFV) = L'expression de la glycoprotéine du virus de la rage dans les systèmes *Drosophila melanogaster* (S2) et Semliki Forest Virus (SFV)

Tese em co-tutela apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, para obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia.

São Paulo

2009

RENATO MANCINI ASTRAY

Expressão da glicoproteína recombinante do vírus rábico em sistemas *Drosophila melanogaster* (S2) e Semliki Forest Virus (SFV) = L'expression de la glycoprotéine du virus de la rage dans les systèmes *Drosophila melanogaster* (S2) et Semliki Forest Virus (SFV)

Tese em co-tutela apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, para obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia

Área de concentração: Biotecnologia

**Orientadores: Carlos Augusto Pereira
Franc Pattus**

Co-orientador: Renaud Wagner

São Paulo

2009

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

© reprodução total

Astray, Renato Mancini.

Expressão da glicoproteína recombinante do vírus rábico em sistemas *Drosophila melanogaster* (S2) e Semliki Forest Virus (SFV) / Renato Mancini Astray. -- São Paulo, 2009.

Orientador: Carlos Augusto Pereira
Franc Pattus.

Tese (Doutorado) – 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: Expressão recombinante em células eucarióticas.

Versão do título para o inglês: Rabies virus glycoprotein expression in *Drosophila melanogaster* (S2) and Semliki Forest Virus (SFV) systems.

Descritores: 1. Células S2 2. Glicoproteína do vírus rábico 3. Semliki Forest Virus 4. qRT-PCR 5. ELISA 6. RVGPmRNA I. Pereira, Carlos Augusto II. Pattus, Franc III. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia IV. Título.

ICB/SBIB0123/2009

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

Candidato(a): Renato Mancini Astray.

Título da Tese: Expressão da glicoproteína recombinante do vírus rábico em sistemas *Drosophila melanogaster* (S2) e Semliki Forest Virus (SFV).

Orientador(a): Carlos Augusto Pereira.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

() Aprovado(a)

() Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

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) 3726-7222 ramal 2106 - Fax: (55) (011) 3726-1505

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Estudo da imunogenicidade de glicoproteína da raiva", protocolo nº 433/07, sob a responsabilidade de Carlos Augusto Pereira, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO INSTITUTO BUTANTAN (CEUAIB) em reunião de 12/03/2008.

Vigência do Projeto: 01/2008 – 12/2009	Nº de animais/espécie
	80 / camundongo

São Paulo, 17 de março de 2008.

P/ Dra. Denise V. Tambourgi
Presidente da CEUAIB

De acordo:

Dr. Otávio Azevedo Mercadante
Diretor do Instituto Butantan

**Dedico esta tese à Cha, amada e amiga,
aos seus passos e ao seu sorriso.**

AGRADECIMENTOS/REMERCIEMENTS/AGRADECIMIENTOS

A Carlos Augusto Pereira por toda a confiança depositada em meu trabalho, por todas as oportunidades que me proporcionou e pela transmissão de muito conhecimento sem desperdiçar uma palavra.

A Renaud Wagner pour toute la connaissance acquise au Département de Récepteurs et Protéines Membranaires de l'Institut Gilbert Laustriat et pour l'aide avec mes séjours à Strasbourg.

Aos colegas do Laboratório de Imunologia Viral do Instituto Butantan e do grupo temático-TACnet de pesquisa. Aos que estão lá e aos que passaram. Com cada um aprende-se alguma coisa. O tesouro é guardado àqueles que entendem o valor do ser coletivo.

Aux collègues du Département de Récepteurs et Protéines Membranaires de l'Institut Gilbert Laustriat, vous avez étés vraiment patients avec moi et les mots franc-brésiliens.

Aos meus pais José Luis e Lenita, meu irmão Rodrigo, minha irmã Valéria, meu tio Nino, minha avó Yolanda, minha linda Marah... e viva a família brasileira!

A mi abuela, mis tíos y tías de Galicia que tanto quiero, ¡y viva la familia española!

Aos meus amigos, um exército de amigos, na selva, no prado, na legião estrangeira.

Aos pesquisadores do laboratório de Imunogenética do Instituto Butantan, pela grande ajuda e empréstimo de equipamentos, sem os quais não haveria esta tese.

Ao Instituto Butantan e à FAPESP (06-50338-4 e 02/09482-3) pela infraestrutura e pelo financiamento da pesquisa.

Aos Funcionários do Instituto Butantan que sorriem e não se furtam a dizer bom dia.

A l'École Supérieure de Biotechnologie de Strasbourg de l'Université de Strasbourg et au CNRS (06BRA0006) pour le financement de la recherche et des séjours à Strasbourg.

Aos funcionários e professores do Programa de pós-graduação Interunidades em Biotecnologia.

MUITO OBRIGADO/MERCI BEAUCOUP/MUCHAS GRACIAS

“É um grande esforço para o pobre obter o que lhe falta, e também um grande trabalho para o rico conservar o que lhe sobra”.
(Che Guevara)

“Cada dia a natureza produz o suficiente para nossa carência. Se cada um tomasse o que lhe fosse necessário, não haveria pobreza no mundo e ninguém morreria de fome”.
(Mahatma Gandhi)

RESUMO*

Astray RM. Expressão da glicoproteína recombinante do vírus rábico em sistemas *Drosophila melanogaster* (S2) e Semliki Forest Virus (SFV) [Tese]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2009.*

A glicoproteína do vírus rábico (RVGP) é reconhecidamente o antígeno capaz de induzir a formação de anticorpos neutralizantes e a resposta imune protetora contra a infecção pelo vírus rábico, além de ter participação central na infecção viral por sua ligação com o receptor na membrana das células alvo. Para apresentar sua correta conformação antigênica e função biológica, a RVGP deve estar oligomerizada (trímero) e ser submetida a modificações pós-traducionais. Portanto, a expressão da RVGP recombinante em células de eucariotos superiores é importante para a obtenção de um antígeno com as características adequadas. Estudamos nesta tese as cinéticas de expressão da RVGP e de seu RNA mensageiro (*RVGPmRNA*) em dois sistemas distintos de expressão recombinante: células S2 de *Drosophila melanogaster* estavelmente transfectadas (rS2) e células BHK-21 infectadas com o Semliki Forest Virus (SFV) capaz de produzir o *RVGPmRNA* (SFV-RVGP). Para isso, fizemos um trabalho de padronização do tratamento de amostras de cultivos celulares, adequando-as a um ELISA para dosagem da RVGP e estabelecemos e padronizamos um método de RT-PCR quantitativa (qRT-PCR) para a dosagem do *RVGPmRNA*. Nas células rS2, mostramos que a quantidade do *RVGPmRNA*, regulado por um promotor constitutivo (actina), apresentou um pico de concentração quando o cultivo saiu da fase exponencial de crescimento, coincidindo com a maior concentração de RVGP/célula. Quando a expressão do *RVGPmRNA* foi regulada por um promotor indutível (metalotioneína), sua quantidade foi máxima em 48 h após a indução com CuSO_4 e a produção da RVGP atingiu valores em torno de $1,2 \mu\text{g}/10^7$ células. Em algumas situações verificamos que a quantidade da RVGP celular aumentou quando a velocidade de crescimento celular foi diminuída, sem alteração nos níveis do *RVGPmRNA*. Na expressão em células BHK-21 infectadas com SFV-RVGP observamos uma correspondência direta entre a razão de infecção (ROI) utilizada e as quantidades de *RVGPmRNA*, RVGP e % de células fluorescentes para a RVGP. Devido à rápida ocorrência de efeito citopático nos cultivos infectados, verificamos que a utilização de ROIs mais elevadas é a melhor condição de trabalho para alcançar maior produtividade de RVGP. Também verificamos que o SFV-RVGP foi capaz de infectar e levar à expressão da RVGP em células

BHK-21 e HuH7, mas não em células HEK-293 e VERO. Para os cálculos das ROI utilizadas, desenvolvemos um novo método de titulação de partículas SFV por qRT-PCR, aplicável a outras construções de SFV recombinante. Utilizamos a RVGP expressa pelos sistemas rS2 e SFV-RVGP em ensaios *in vivo* preliminares para estudar as características imunogênicas das RVGP. As preparações de RVGP utilizadas em ensaios preliminares para a imunização de camundongos foram capazes de induzir a formação de anticorpos neutralizantes e de conferir um bom grau de proteção ao teste de desafio intracerebral com vírus rábico.

Palavras-chave: Células S2. Glicoproteína do vírus rábico. Semliki Forest Vírus. qRT-PCR. ELISA. *RVGPmRNA*

RÉSUMÉ**

Astray RM. L'expression de la glycoprotéine du virus de la rage dans les systèmes *Drosophila melanogaster* (S2) et Semliki Forest Virus (SFV). 2009. p. Thèse (Biotechnologie). Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009**

La glycoprotéine du virus de la rage, (RVGP) est un antigène qui peut induire la formation d'anticorps neutralisants et une réponse immunitaire protectrice contre l'infection par le virus de la rage, tout en ayant un rôle fondamental pendant l'infection virale de part son interaction avec son récepteur à la membrane des cellules cibles. La RVPG doit adopter une forme oligomérique (trimère) et exige des modifications post-traductionnelles afin de présenter une conformation antigénique correcte et exprimer sa fonction biologique. Dans une problématique de production de RVPG recombinante, l'utilisation de cellules eucaryotes supérieures comme hôte d'expression est donc recommandée pour obtenir un antigène avec les caractéristiques adéquates. Nous avons étudié dans cette thèse les cinétiques d'expression de la RVPG et de son ARN messager (*RVGPARNm*) dans deux systèmes d'expression distincts, les cellules S2 de *Drosophila melanogaster* transfectées de manière stable (rS2) et les cellules BHK-21 infectées par un virus recombinant à ARN, le Semliki Forest Virus (SFV). Pour ce faire, nous avons mis au point un traitement des échantillons de cellules rS2 en les adaptant à un ELISA pour le dosage de la protéine RVPG et avons développé une méthode de RT-PCR quantitative (qRT-PCR) pour le dosage de *RVGPARNm*. En utilisant ces méthodes, nous avons démontré que la quantité de *RVGPARNm* sous contrôle d'un promoteur constitutif (actine) dans les cellules rS2 présente une concentration maximale quand la culture cellulaire a quitté la phase exponentielle de croissance, coïncidant avec la concentration maximale de protéine RVGP par cellule. Dans les cellules rS2 où l'expression du *RVGPARNm* est contrôlée par un promoteur inductible (metallotioneine), la concentration maximale est atteinte 48 heures après l'induction par le CuSO_4 et la production de RVGP atteint une concentration de l'ordre de $1.2 \mu\text{g}/10^7$ cellules. Dans certains cas nous avons vérifié que la concentration de RVPG augmente quand la vitesse de croissance diminue, sans pour autant observer d'altération de la concentration de *RVGPARNm*. Dans les cellules BHK-21 infectées par le SFV-RVGP nous avons observé une correspondance directe entre taux d'infection (ROI) utilisée et les concentrations de *RVGPARNm*, RVPG et pourcentages de cellules fluorescentes

pour la RVPG. En raison de l'apparition rapide de l'effet cytotoxique dans les cultures cellulaires infectées, nous avons vérifié que l'utilisation d'un ROI plus élevé était la meilleure manière d'atteindre une productivité plus importante de RVPG. Nous avons également vérifié que le SFV-RVGP était capable d'infecter et d'induire l'expression de la RVPG dans les cellules BHK-21 et Huh7 mais pas dans les cellules HEK-293 et VERO. Pour le calcul des ROI utilisés, nous avons mis au point une méthode de titration des particules SFV par qRT-PCR, méthode pouvant être appliquée à d'autres constructions de SFV recombinant. Dans des essais préliminaires *in vivo*, nous avons comparé les caractéristiques immunologiques des RVPG synthétisée par les systèmes rS2 et SFV-RVGP. Les préparations de RVPG utilisées dans des essais préliminaires d'immunisation de souris ont notamment induit la formation d'anticorps neutralisants et ont donné une bonne protection contre une infection expérimentale par le virus de la rage.

Mots clés: Cellules S2. Glycoprotéine du virus de la rage. Semliki Forest Virus. qRT-PCR. ELISA. *RVGPARNm*.

ABSTRACT***

Astray RM. Rabies virus glycoprotein expression in *Drosophila melanogaster* (S2) and Semliki Forest Virus (SFV) systems. 2009. p. Phd thesis (Biotechnology). Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.***

The rabies virus glycoprotein (RVGP) is the major antigen able to induce a neutralizing response and survival after challenge against rabies virus infection, besides its major role on virus infection by driving attachment to target cells receptors. In order to show its antigenic conformation and biologic function, the RVGP has to be oligomerized (trimeric) and undergo post-translational modifications. Therefore, the recombinant RVGP expression in higher eukaryotic cells is mandatory to synthesize an antigen with the required characteristics. We have studied the kinetic expression of RVGP and its messenger RNA (*RVGPmRNA*) in two different recombinant expression systems: stably transfected *Drosophila melanogaster* cells (rS2) and BHK-21 cells infected with Semliki Forest Virus carrying RVGP genetic information (SFV-RVGP). We have done a work of standardization of the cell culture samples treatment prior to RVGP quantification by ELISA, and we have developed and standardized a quantitative RT-PCR (qRT-PCR) to quantify the *RVGPmRNA*. In rS2 cells, we demonstrated that the *RVGPmRNA* regulated by a constitutive promoter (actin) presented a concentration peak when the culture left the exponential growth phase, coinciding with the highest concentration of RVGP/cell. When the *RVGPmRNA* expression was regulated by an inducible promoter (metallothionein), its level was maximum 48 h after the CuSO₄ induction and the RVGP production attained values around 1.2 µg/10⁷ cells. In some situations we verified that the amount of cellular RVGP increased with the decrease of the cellular growth rate, with no changes on the *RVGPmRNA* levels. In the expression using BHK-21 cells infected with SFV-RVGP we observed a direct correspondence, between the ratio of infection (ROI) and the amount of *RVGPmRNA*, RVGP and % RVGP fluorescent cells. Due to the fast cytotoxic effects observed in infected cultures, we have determined the utilization of high values of ROI as the best work condition to attain the highest RVGP productivity. We also verified that the SFV-RVGP was able to infect and to trigger the expression of RVGP in BHK-21 and HuH7 cells, but not in HEK-293 and VERO cells. For the calculations of the ROI used, we have developed a new method of SFV particles titration by qRT-PCR, which we have shown to be applicable to other recombinant SFV constructions. We utilized the

RVGP expressed by rS2 and SFV-RVGP systems on preliminary qualitative *in vivo* assays. The RVGP samples used in experimental mouse immunization assays were able to induce neutralizing antibodies and to lead to protection against the experimental intracerebral rabies virus challenge.

Key words: S2 cells. Rabies virus glycoprotein. Semliki Forest Virus. qRT-PCR. ELISA. *RVGPmRNA*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Vírus rábico.....	29
Figura 2. Representação esquemática do sistema SFV de expressão recombinante.....	36
Quadro 1. Características dos oligonucleotídeos desenhados.....	54
Quadro 2. Combinações, fragmentos e aplicações dos oligonucleotídeos	54
Figura 3 Linearidade da diluição do RNA em relação à absorbância medida por espectrofotometria a 260 nm.....	56
Figura 4. Eficiência da amplificação do RVGPcDNA.....	61
Figura 5. Eficiência da amplificação do AccDNA.....	62
Quadro 3. Formulação dos tampões de lise.....	69
Figura 6. Relação entre DO e concentração da RVGP no padrão diluído em tampão recomendado PBS + Tween + BSA, LB2 ou LB4.....	78
Figura 7. Quantificação da RVGP dependente da quantidade de células lisadas.....	79
Figura 8. Quantificação da RVGP dependente da concentração de NP-40.....	80
Figura 9. Distribuição das amostras do grupo TacNet [®] por faixa de concentração da RVGP.....	81
Figura 10. Verificação de duas séries de oligonucleotídeos desenhados para a amplificação de região codificante para a poliproteína não estrutural do SFV.....	82
Figura 11. Curvas de quantificação de mRNA do SFV.....	83
Figura 12. Cinética do crescimento celular e das expressões do <i>RVGPmRNA</i> e da RVGP em cultivos de células S2AcRVGP-2k em cultivo estático ou sob agitação.....	86
Figura 13. Cinética do crescimento celular e das expressões do <i>RVGPmRNA</i> e da RVGP em cultivos de células S2AcRVGP-2k e S2MtRVGP-Hy a 22 °C ou 28 °C.....	88
Figura 14. Cinética do crescimento celular e da expressão do <i>RVGPmRNA</i> e da RVGP em cultivos de células S2MtRVGP-Hy sob agitação.....	90
Figura 15. Cinética do crescimento celular e das expressões do <i>RVGPmRNA</i> e da RVGP em cultivos de células S2MtRVGP-Hy sob agitação, induzidas com 300 ou 700 µM de CuSO ₄	91

Figura 16. Cinética da expressão do <i>RVGPmRNA</i> e da RVGP em cultivos de células BHK-21 infectadas com SFV-RVGP às razões ROI de 6,5 ou 13.....	93
Figura 17. Cinética da expressão do <i>RVGPmRNA</i> e da RVGP em cultivos de células BHK-21 após a infecção (p.i.) com SFV-RVGP à ROI de 0,15 , 1,5 e 15.....	95
Figura 18. Expressão da RVGP e do <i>RVGPmRNA</i> em cultivos de células BHK-21, HuH7, VERO e HEK-293 após a infecção (p.i.) com SFV-RVGP a ROI 15.....	97
Figura 19. Imunofluorescência de células S2AcRVGP-2k, BHK-21, HuH7, VERO e HEK-293.....	99
Figura 20. Cinética de produção de anticorpos anti-RVGP.....	100
Figura 21. Produção de anticorpos e proteção contra o desafio com vírus rábico (CCZ).....	102
Figura 22. Produção de anticorpos e proteção contra o desafio com vírus rábico (DJA).....	103

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Dados para a determinação das eficiências das reações.....	61
Tabela 2. Armazenagem, tratamento de lise e quantificação da RVGP em amostras de células S2AcRVGP-2.....	77
Tabela 3. Titulação de diversas construções do SFV.....	84
Tabela 4. Titulação de SFV-RVGP e cálculo de ROIs.....	84
Tabela 5. Produção de RVGP após a infecção de células BHK-21 com SFV-RVGP tratado a diferentes temperaturas.....	85
Tabela 6. Título de anticorpos anti RVGP após as imunizações.....	101

LISTA DE ABREVIATURAS

Ac – Actina-42 de *Drosophila melanogaster*

AccDNA – cDNA da actina-42 de *Drosophila melanogaster*

AcmRNA – RNA mensageiro da actina-42 de *Drosophila melanogaster*

CCZ – Centro de Controle de Zoonoses do município de São Paulo

ELISA – “Enzyme Linked Immunosorbent Assay” – Ensaio de ligação imunoenzimático

PCR – “Polimerase Chain Reaction”, Reação em cadeia da polimerase

q-PCR – Reação em cadeia da polimerase, quantitativa.

q-RT-PCR – Reação em cadeia da polimerase, quantitativa, sobre cDNA gerado a partir de transcrição reversa de um RNA mensageiro

ROI – Razão de infecção. Quantidade de moléculas de SFV-RNA/célula

RT-PCR – Reação em cadeia da polimerase sobre cDNA gerado a partir de transcrição reversa de um RNA mensageiro

RVGP – Glicoproteína recombinante do vírus rábico

RVGPcDNA – cDNA da glicoproteína do vírus rábico

RVGPmRNA – RNA mensageiro da glicoproteína do vírus rábico

SFV – Semliki Forest Virus

SFV-RVGP – Semliki Forest Virus recombinante, portando o RNA da RVGP

SFV-RNA – RNA do SFV

SFVgp1 – Gene codificante para as proteínas não estruturais do SFV

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	22
1.1 Contexto e justificativa do trabalho.....	22
1.2 Grupo TACnet®	25
1.3 Objetivos.....	26
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	27
2.1 Raiva e vacina anti-rábica.....	27
2.2 Vírus rábico e Glicoproteína do Vírus Rábico (RVGP).....	29
2.3 Sistemas recombinantes produtores de proteínas heterólogas.....	30
2.4 Sistema de expressão de genes heterólogos: <i>Drosophila melanogaster</i> (S2).....	31
2.5 Temperatura de cultivo e velocidade de crescimento na expressão protéica recombinante.....	34
2.6 Sistema de expressão de genes heterólogos: Semliki Forest Virus (SFV).....	35
2.7 Controle e análise da expressão recombinante.....	39
2.8 Técnica da PCR e RT-PCR quantitativas (qPCR e qRT-PCR).....	42
2.9 Utilização da qPCR e qRT-PCR em biotecnologia.....	44
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	47
3.1 Células de inseto: <i>Drosophila melanogaster</i>, Schneider 2 (S2).....	47
3.1.1 Células recombinantes.....	47
3.1.1.1 S2AcRVGP-2 e S2AcRVGP-2k (Yokomizo et al., 2007).....	47
3.1.1.2 S2MtRVGP-Hy (Lemos et al., no prelo).....	48
3.1.2 Manutenção das células S2.....	48
3.1.3 Determinação da concentração celular e medida da viabilidade celular.....	48
3.1.4 Congelamento de células S2: estabelecimento do banco de trabalho.....	48
3.1.4.1 Bancos de células.....	49
3.1.5 Descongelamento das células S2.....	49
3.1.6 Cultivos e amostragem para análise da expressão da RVGP e do <i>RVGPmRNA</i>	49
3.2 Semliki Forest Virus recombinante (SFV-RVGP).....	50
3.2.1 Ativação de SFV.....	50
3.3 Células de mamíferos.....	51
3.3.1 Baby Hamster Kidney (BHK-21).....	51

3.3.2 Outras células de mamíferos.....	51
3.3.2.1 Human Embryonic Kidney (HEK-293).....	51
3.3.2.2 Human Hepato Cellular Carcinoma (HuH7).....	51
3.3.2.3 Green Monkey Kidney (VERO).....	51
3.3.3 Manutenção das células de mamíferos.....	51
3.3.4 Infecção com SFV-RVGP e amostragem para análise da expressão da RVGP e do <i>RVGPmRNA</i>	52
3.4 Desenho e verificação dos oligonucleotídeos.....	53
3.5 Extração de RNA.....	54
3.6 Extração de DNA.....	55
3.7 Quantificação do RNA total.....	55
3.7.1 Quantificação por espectrofotometria.....	55
3.7.2 Quantificação por fluorimetria.....	56
3.8 Tratamento com DNase.....	57
3.9 Transcrição Reversa.....	57
3.10 PCR e Nested-PCR.....	57
3.11 qRT-PCR.....	58
3.12 qRT-PCR – Análise de dados.....	59
3.13 Padronizações da qRT-PCR para análise da quantidade de <i>RVGPmRNA</i> em amostras de células de inseto: Quantificação relativa.....	59
3.13.1 Determinação da melhor quantidade de cDNA a ser inserida na reação.....	59
3.13.2 Determinação da melhor quantidade de oligonucleotídeos a ser inserida na reação.....	60
3.13.3 Determinação da eficiência de amplificação.....	60
3.13.4 Validação da qRT-PCR.....	62
3.13.4.1 Reprodutibilidade intra-ensaios.....	62
3.13.4.2 Reprodutibilidade inter-ensaios.....	62
3.13.4.3 Sensibilidade.....	63
3.13.5 Modelo matemático para cálculo da quantificação relativa (Pfaffl, 2001).....	63
3.14 Obtenção dos padrões para a construção da curva padrão pra a quantificação absoluta do <i>RVGPmRNA</i>	64
3.15 Desenvolvimento metodológico.....	64
3.15.1 Utilização da qRT-PCR para a titulação de SFV.....	65
3.15.1.1 Construção da curva padrão.....	65
3.15.1.2 Análise da curva padrão.....	66

3.15.1.3 Extração do RNA de amostras de SFV.....	66
3.15.1.4 Utilização da metodologia para a quantificação de amostras de SFV.....	66
3.15.1.4.1 Titulação de amostras de diferentes SFV.....	66
3.15.1.4.2 Titulação de amostras de SFV-RVGP submetidas a tratamento de temperatura.....	67
3.15.2 Padronização da conservação e lise das células de inseto para a quantificação da RVGP por ELISA.....	68
3.15.2.1 Cultivos de células S2 selvagens e recombinantes.....	68
3.15.2.2 Determinação do melhor método de lise.....	69
3.15.2.3 Lise utilizando agente químico.....	69
3.15.2.4 Lise utilizando agente mecânico – sonicação.....	70
3.15.2.5 Lise utilizando agente físico – choque de temperatura.....	70
3.16 ELISA para a quantificação da RVGP.....	71
3.16.1 Reagentes.....	71
3.16.2 Soluções.....	71
3.16.3 Preparação das amostras.....	71
3.16.4 Procedimento de análise.....	72
3.17 Imunofluorescência.....	72
3.18 Microscopia confocal.....	73
3.19 Citometria de fluxo (FACs).....	73
3.20 Ensaios <i>in vivo</i>	73
3.20.1 Análise da produção de anticorpos anti-RVGP pela imunização com SFV-RVGP.....	74
3.20.2 Análise da produção de anticorpos neutralizantes pela imunização com SFV-RVGP e com S2 recombinante e sobrevivência ao teste de desafio com vírus rábico.....	75
3.20.3 Análise da produção de anticorpos anti-vírus rábico pela imunização com SFV-RVGP e com S2 recombinante e sobrevivência ao teste de desafio com vírus rábico.....	76
3.21 Análises estatísticas.....	76
4 RESULTADOS.....	77
4.1 Desenvolvimento Tecnológico.....	77
4.1.1 Padronização do preparo de amostras para ELISA-RVGP.....	77
4.1.2 Padronização da qRT-PCR para a titulação do SFV.....	82
4.2 Cinéticas de expressão do <i>RVGPmRNA</i> e da RVGP	86
4.2.1 Cinéticas de expressão do <i>RVGPmRNA</i> e da RVGP em diferentes populações de células S2 transfectadas.....	86

4.2.2 Cinéticas da expressão do <i>RVGPmRNA</i> e da RVGP em células BHK-21 infectadas com SFV-RVGP.....	93
4.2.3 Estudo da infecção de células VERO, HuH7 e HEK-293 com SFV-RVGP.....	97
4.2.4 Localização da RVGP expressa em sistemas recombinantes.....	99
4.3 Atividade biológica da RVGP recombinante.....	100
5 DISCUSSÃO.....	105
6 CONCLUSÕES.....	121
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	123
APÊNDICE A.....	135
APÊNDICE B.....	136
APÊNDICE C.....	137
APÊNDICE D.....	141
ANEXOS (A – G) – TRABALHOS PUBLICADOS....-	142

1 INTRODUÇÃO

1.1 Contexto e justificativa do trabalho

A raiva é responsável anualmente pela morte de cerca de 55 milhões de pessoas em todo o mundo. Essa situação ocorre apesar de existirem métodos profiláticos eficazes, como a vacinação e a aplicação de imunoglobulina anti-rábica em casos de acidentes mais graves. O problema reside principalmente em muitos países, que ainda não têm condições de produção de vacinas modernas ou utilizam vacinas menos eficazes produzidas em tecido nervoso de animais, devido ao alto custo e sofisticação tecnológica das vacinas mais seguras, produzidas em culturas celulares.

Além disso, a contínua pressão do homem sobre a natureza tem levado ao encontro mais freqüente entre a fauna selvagem (morcegos, raposas, etc...) e a doméstica (cães, gado, etc...), aumentando a possibilidade de transmissão do vírus rábico de seus reservatórios naturais para intermediários, ou diretamente para o ser humano.

Essa realidade faz com que seja interessante dos pontos de vista de saúde pública e econômico, o desenvolvimento de vacinas anti-rábicas mais baratas e mais seguras que as vacinas de vírus inativado, especialmente para o uso veterinário. Tem igual importância, o desenvolvimento de produtos associados ao vírus rábico, como imunoglobulinas e antígenos para a composição de kits de diagnóstico, ou para a utilização no controle de etapas produtivas de vacinas anti-rábicas.

O principal antígeno capaz de conferir resposta imune contra o vírus rábico é sua glicoproteína transmembranária. Trata-se de uma glicoproteína trimérica que depende de modificação pós-traducional para a preservação de sua antigenicidade.

A realização de modificações pós-traducionais em proteínas complexas é uma particularidade de organismos eucarióticos. A expressão de genes heterólogos em sistemas eucarióticos, apesar de em geral ser menos produtiva que em sistemas procarióticos, possui a vantagem de gerar uma proteína recombinante complexa, com alto grau de semelhança à encontrada em organismos superiores, preservando sua função e sua antigenicidade.

A expressão da glicoproteína do vírus rábico recombinante (RVGP) tem sido realizada com sucesso pelo grupo TACnet[®], que congrega vários laboratórios e pesquisadores

de diferentes instituições (**seção 1.2**). Nosso principal trabalho tem sido a expressão da RVGP em células S2 de *Drosophila melanogaster*.

Desde o princípio dos trabalhos, o grupo constatou a necessidade de obter um método confiável e com boa reprodutibilidade, para a dosagem da RVGP produzida nas células de inseto. A ausência desse método levava a muitos resultados de difícil comparação e a questionamentos sobre a capacidade produtiva do sistema S2. Um dos resultados desta tese foi o desenvolvimento de um método de armazenamento e tratamento de amostras de células S2 recombinantes (rS2), destinadas à dosagem da RVGP por ELISA, que auxiliou em muitos trabalhos acadêmicos (Galesi et al., 2008; Mendonça et al., 2008; Swiech et al., 2008a, b, c) (**Anexo C ao Anexo G**) e que foi publicado na forma de artigo científico (Astray et al., 2008) (**Anexo A**).

Além disso, como o sistema S2 ainda foi pouco estudado, comparativamente a outros sistemas de expressão em organismos eucarióticos, muitas abordagens para o aumento da produtividade do sistema, como mudanças nas condições de cultivo e adição de indutores, resultam em efeitos justificáveis apenas por comparação com outros sistemas mais bem conhecidos. Sabe-se que uma mudança no perfil de produção de uma proteína recombinante, após a introdução de uma nova condição de cultivo ou indução, pode ser devida à maior ou menor disponibilidade do RNA mensageiro de interesse. Nesse sentido, avaliar a quantidade e o perfil de disponibilidade do seu RNA mensageiro, relacionando-o à proteína recombinante, é uma abordagem capaz de esclarecer os motivos associados com a melhora ou piora da produtividade de um determinado sistema, frente a uma nova situação e permitir importante otimização.

Para determinar a relação entre a expressão da RVGP e seu RNA mensageiro (*RVGPmRNA*) nas células rS2, desenvolvemos e padronizamos uma técnica de RT-PCR quantitativa (qRT-PCR) apropriada aos estudos cinéticos. Através da medida da quantidade do *RVGPmRNA*, associada à quantificação da RVGP por ELISA e por marcação fluorescente anti-RVGP medida por citometria de fluxo, estudamos o papel do *RVGPmRNA* na expressão da RVGP em diferentes populações de células recombinantes e sob diferentes situações de cultivo ou de indução.

Essa mesma abordagem analítica foi utilizada para estudar a expressão da RVGP pela infecção de células BHK-21 com Semliki Forest Vírus, contendo um RNA⁺ da RVGP (SFV-RVGP) sob a regulação de um promotor viral. O sistema SFV caracteriza-se pela capacidade de produzir uma grande quantidade do RNA mensageiro de interesse nas células

infectadas, levando a um alto nível de expressão da proteína recombinante. Apesar da abundância do mensageiro de interesse, após a infecção ocorre uma rápida indução de apoptose nos cultivos, ocasionando uma incompleta utilização da capacidade do sistema de produzir a proteína recombinante. Nossos estudos cinéticos possibilitaram relacionar a quantidade de vírus por célula utilizada na infecção, com as produções do *RVGPmRNA* e da RVGP, contribuindo para o entendimento da dinâmica da produção recombinante na presença do estímulo pró-apoptótico.

Pelo fato de o SFV ser um sistema capaz de infectar diversos tipos celulares, de células de artrópodes a células de mamíferos, estudamos também a infecção de outras células de mamíferos (HuH7, VERO, HEK-293) além da BHK-21 com o SFV-RVGP, para analisar a expressão da RVGP nessas células.

A análise das quantidades de RVGP e de *RVGPmRNA*, em estudos cinéticos de diferentes sistemas de expressão, além de permitir uma comparação entre eles, permitiu aprofundar o conhecimento sobre as características da expressão da RVGP em sistemas heterólogos. Esse conhecimento poderá servir de base para outros estudos futuros, tendo como base a RVGP ou outras moléculas semelhantes de interesse biotecnológico.

Paralelamente à análise da expressão do *RVGPmRNA* e da RVGP, desenvolvemos uma metodologia de quantificação de SFV por qRT-PCR. Trata-se de uma metodologia inovadora para a determinação de título viral em amostras de SFV apresentando vantagens em relação aos tradicionais métodos de quantificação viral. Reúne em si a aplicabilidade a diversas construções de SFV, a precisão e sensibilidade analítica da qRT-PCR e a rapidez de obtenção dos resultados, além de ser uma técnica moderna, facilmente estabelecida em laboratórios que já trabalham com biologia molecular.

Por fim, utilizamos esses dois sistemas na avaliação da antigenicidade e imunogenicidade da RVGP produzida. Através da imunização de camundongos em três laboratórios diferentes, acessamos a capacidade da RVGP produzida em células S2 ou produzida *in vivo* mediante a infecção com o SFV-RVGP, em gerar anticorpos específicos ou neutralizantes. Os animais imunizados foram também submetidos a testes de proteção contra o desafio intracerebral com vírus rábico, avaliando o potencial das preparações em conferir imunidade à infecção experimental pelo vírus da raiva.

Esses estudos são particularmente importantes, pois, ao mesmo tempo em que informam sobre as propriedades imunogênicas da RVGP produzida em células rS2, confirmam

o potencial desse sistema em produzir moléculas adequadas à utilização médica. Quanto à imunização com SFV-RVGP, pela primeira vez são apresentados dados sobre a utilização desse sistema na proteção contra o vírus rábico. Esse sistema é de particular interesse na área de desenvolvimento de novas vacinas, principalmente virais, pois realiza a infecção de células do hospedeiro, carregando não uma proteína imunogênica, mas a informação genética (RNA+) para sua produção *in vivo*. Isso faz com que seja em parte mimetizada a infecção com o patógeno real e estimuladas respostas imunológicas celulares associadas à presença de material genético exógeno no citoplasma celular.

1.2 Grupo TACnet®

O grupo TACnet (www.tacnet.orgfree.com) - Rede de Laboratórios para P&D em Tecnologias com Células Animais - foi criado em 2002, fruto da experiência de cinco laboratórios de cinco instituições diferentes que se uniram na execução de um projeto temático multidisciplinar (FAPESP 02/09482-3) intitulado “Expressão de genes heterólogos em células de dípteros: Biologia molecular e engenharia de processos”.

As atividades do grupo têm se concentrado na expressão da RVGP em células S2, realizando uma ampla caracterização metabólica desse sistema, desenvolvendo meios de cultura sem soro fetal bovino, realizando estudos de cultivo de células rS2 em biorreatores, estudos de modelagem matemática do processo de produção da RVGP nesse sistema e desenvolvendo novos clones na tentativa de obter linhagens mais produtivas.

Além disso, o grupo tem realizado outros projetos de P&D e organizado reuniões científicas, cursos, estágios de treinamento e congressos.

1.3 Objetivos

- Padronizar o processamento das amostras do grupo TACnet[®] para a quantificação da RVGP por ELISA;
- Desenvolver e padronizar uma metodologia de titulação de amostras de SFV por qRT-PCR;
- Desenvolver e padronizar a qRT-PCR para análise quantitativa do *RVGPmRNA* em amostras de cultivo celular;
- Correlacionar as cinéticas de expressão do *RVGPmRNA* e da RVGP, nos sistemas de expressão S2 e de infecção de células BHK-21 com SFV-RVGP;
- Analisar a expressão da RVGP em diferentes células de mamíferos mediante a infecção com SFV-RVGP;
- Verificar a antigenicidade e a imunogenicidade da RVGP expressa nas células S2 ;
- Verificar a antigenicidade e a imunogenicidade da RVGP expressa pelo SFV-RVGP.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Raiva e vacina anti-rábica (World Health Organization, 2007)

A raiva é causada pela infecção do organismo pelo vírus rábico, pertencente à família *Rabdoviridae* e ao gênero *Lyssavirus*. Se não tratada, a raiva leva a óbito em 100% dos casos. Os primeiros sintomas da raiva são parecidos com os da gripe, incluindo febre, dor de cabeça e fadiga, que progride para um envolvimento dos sistemas respiratório, gastrointestinal e sistema nervoso central. No estágio crítico há sinais de hiperatividade ou paralisia. Em ambos os casos, há a progressão para uma paralisia completa, seguida de coma e morte, geralmente por falha respiratória. Sem cuidados intensivos a morte costuma acontecer durante os primeiros sete dias a partir do aparecimento dos sintomas.

Essa situação ocorre apesar de medidas como a limpeza profunda do ferimento, imunização e tratamento com imunoglobulinas, feitas o mais rapidamente possível após o contato suspeito, poderem prevenir virtualmente 100% dos casos. Uma vez que os sintomas se manifestam, não há tratamento e a doença é sempre fatal.

A raiva é distribuída em todo o mundo e está presente em todos os continentes. O número e tamanho dos países, territórios e áreas livres da raiva são pequenos se comparados com as áreas afetadas. De acordo com a base de dados internacional sobre raiva, RabNet, em 2005, apenas 43 de 129 países e territórios que geram dados não confirmaram casos de raiva nesse ano e no anterior. Muitos dos territórios livres da raiva são ilhas.

A maioria (95%) das cerca de 55 000 mortes anuais causadas pela raiva em todo o mundo ocorrem na Ásia e na África. Mais de 3,3 bilhões de pessoas vivem em áreas de risco. A maior parte das vítimas é de crianças com menos de 15 anos de idade (30 – 50%). A raiva canina é a fonte de 99% das infecções em humanos e a responsável pela aplicação de cerca de 14 milhões de tratamentos preventivos. Aproximadamente 10 milhões de pessoas anualmente recebem tratamento profilático pós-exposição, a maioria na China e na Índia. Estima-se que o tratamento profilático previna mais de 330 mil mortes todos os anos. O custo médio de um tratamento anti-rábico é de US\$ 40 na África e de US\$ 49 na Ásia. Esse valor é muito elevado para muitos países em que a renda média é de US\$ 1 a 2 por pessoa por dia. O gasto global com a prevenção da raiva está em torno de US\$ 1 bilhão.

Globalmente, a estratégia mais efetiva para a prevenção da raiva é a eliminação da raiva em cães através da vacinação. Em países desenvolvidos a raiva continua presente em

animais selvagens. A doença é transmitida a animais domésticos e humanos através da exposição à saliva infectada. Nos últimos anos, a raiva transmitida pelo morcego tem sido considerada um problema de saúde pública nas Américas e na Europa. Pela primeira vez em 2003, mais pessoas na América do Sul morreram de raiva devido ao contato com animais selvagens, particularmente morcegos, que por mordida de cães domésticos.

Há basicamente três gerações de vacinas anti-rábicas. A primeira geração começou a ser utilizada há mais de 100 anos quando Louis Pasteur e seus colegas desenvolveram uma vacina a partir de vírus atenuado obtido de tecido nervoso infectado. Esse tipo de vacina, produzido em cérebros de ovelhas ou camundongos recém-nascidos, é associado com a ocorrência de uma reação adversa muito grave de encefalomielite alérgica, devido à presença de neuroproteínas contaminantes. Além disso, são vacinas menos potentes que as vacinas de segunda geração, requerendo várias imunizações diárias (chegando a 23!) para conferir proteção. Ainda assim, dado seu baixo custo e disponibilidade local, essas vacinas são utilizadas em um pequeno número de países do sudeste asiático.

As vacinas de segunda geração são baseadas em culturas celulares. Consistem de vírus inativado após a propagação em ovos embrionados ou em cultura de células (fibroblastos humanos diplóides, células fetais de rhesus, células primárias de rim de hamster Syrian, células VERO, células de embrião de galinha). Após o crescimento em suas culturas celulares respectivas, os vírus são concentrados por centrifugação zonal/ultracentrifugação, inativados com beta-propiolactona e liofilizados.

As vacinas de terceira geração estão sendo utilizadas na área veterinária e incluem as vacinas recombinantes. As vacinas recombinantes tendem a não causar patogenicidade residual causada pela raiva, porque elas contêm apenas produtos gênicos não virulentos.

Muitos vetores recombinantes (p ex. poxvirus animal, ou adenovírus humano ou canino) expressando a glicoproteína do vírus rábico foram testados em diferentes espécies selvagens pela via oral. A única vacina recombinante que é produzida atualmente e utilizada em larga escala é a vacina baseada no vírus da varíola recombinante expressando a glicoproteína (VRG). O VRG apresenta muitas das propriedades básicas do vírus da varíola (cepa Copenhagen), mas difere em outras, de maneira que o vetor é seguro. Quando administrada oralmente, a raposas jovens ou adultas, uma dose de 10^8 TCID₅₀ de VRG induz altos níveis de anticorpos neutralizantes e confere proteção contra o desafio com vírus rábico.

2.2 Vírus rábico e Glicoproteína do Vírus Rábico (RVGP)

O vírus rábico contém uma única fita de RNA negativo, linear e não segmentado, de cerca de 12 kb. Seu genoma foi completamente sequenciado (Tordo et al., 1986, 1988), sendo que codifica para cinco proteínas: uma nucleoproteína (N), uma fosfoproteína (NS), uma RNA polimerase (L), a proteína de matriz (M) e a glicoproteína de superfície (G) ou RVGP. O complexo ribonucléico conhecido como RNP é formado pela união das proteínas N, NS e L. O envoltório viral é uma membrana que circunda a partícula viral, sendo adquirida durante o processo de brotamento do vírus a partir da membrana celular (**Figura 1**) (Yang et al., 1998).

Figura 1 – Vírus Rábico. Apresenta formato balístico. O nucleocapsídeo contém o RNA negativo simples fita firmemente embalado na proteína N, L e P; a membrana em bicamada contém as proteínas G (transmembrana) e M (periférica) que adere à superfície interna da membrana e ao nucleocapsídeo (ICTV, 2009).

A glicoproteína do vírus rábico está presente no envelope viral na quantidade aproximada de 1200 moléculas agrupadas na forma de 400 espículas triméricas (formadas por monômeros de 65 kDa), responsáveis pela adesão do vírus aos receptores da célula hospedeira (Gaudin et al., 1992). É o elemento responsável pela indução de anticorpos neutralizantes no organismo exposto ao vírus rábico (Perrin et al., 1985).

A RVGP é composta por 524 aminoácidos. Os primeiros 19 aminoácidos do N-terminal correspondem ao peptídeo sinal e estão ausentes na proteína madura, os demais estão organizados em três domínios: ectodomínio N-terminal glicosilado (aminoácidos de 1 a 439), um domínio hidrofóbico transmembranário (aminoácidos 440 a 461) e o domínio hidrofílico intracitoplasmático carboxiterminal (aminoácidos de 462 a 524) (Gaudin et al., 1999). O ectodomínio da RVGP possui 8 sítios antigênicos estabelecidos (I – VI, “a” e G1). Desses, os sítios II e III, após anos de estudo, demonstraram possuir a maior representação de epitopos

para anticorpos neutralizantes (97%), sendo portanto, os de maior interesse para o estudo do desenvolvimento de resposta imune contra essa molécula (Benmansour et al., 1991).

O sítio antigênico III está presente exclusivamente na forma trimérica da proteína, apontada como essencial para a ligação da mesma aos receptores celulares. Essa ligação é produzida através de uma interação hidrofóbica do vírus com a membrana da célula, mediante a interação de um grande número de moléculas de RVGP em um ambiente de pH baixo. A RVGP apresenta três estados conformacionais possíveis e intercambiáveis: Um estado inativo, necessário para seu transporte pelo complexo de Golgi, um estado nativo hidrofóbico, presente no vírus circulante e um estado ativo presente no pH ligeiramente ácido a que é exposto logo após a adesão à célula hospedeira e internalização mediada por endocitose, o que leva à fusão do vírus com a membrana do endossomo (Gaudin et al., 1991; 1999).

A via de síntese da RVGP pela célula hospedeira começa pela tradução ribossomal associada ao retículo, seguindo uma translocação da proteína pelas cisternas desse retículo endoplasmático rugoso (RER), estimulada pelo segmento sinal amino terminal. Durante esse evento iniciam-se a formação dos trímeros e as modificações pós-traducionais da proteína, como a glicosilação inicial, levando finalmente à formação das vesículas do complexo de Golgi (Gaudin, 1997). Neste, ocorre a glicosilação terminal com hidrólise parcial da fração glicídica e a adição de novos açúcares em um ou dois dos seus três potenciais sítios de ligação N-link para oligossacarídeos (Dietzschold, 1977), originando assim a proteína específica estrutural e funcionalmente completa. Além da glicosilação, a RVGP sofre uma acetilação durante seu transporte para o Complexo de Golgi e uma palmitolação em uma cisteína situada ao lado do carbono terminal da sua região transmembrana (Gaudin et al., 1992).

2.3 Sistemas recombinantes produtores de proteínas heterólogas

A produção de proteínas para fins de imunização ou diagnóstico pode ser feita através de diversos sistemas, sejam eles bacterianos, fúngicos ou celulares. Estes últimos apresentam destacado interesse para a área médica, pois possibilitam uma melhor qualidade na expressão de genes heterólogos, uma vez que as células eucarióticas podem traduzir um gene integrado em seu genoma e realizar modificações pós-traducionais necessárias ao bom funcionamento da proteína decodificada.

As células eucarióticas de organismos superiores mais utilizadas para esse fim são as células de mamíferos, que embora tenham a capacidade de incorporar, manter,

expressar e processar convenientemente genes heterólogos, exigem condições de cultura delicadas e dispendiosas em laboratório (Jorge et al., 1996). Também as células de insetos têm sido utilizadas, porém quase sempre em sistemas de expressão de genes transportados por baculovírus, que possui o inconveniente de ser transiente e não permanente (Pfeifer et al., 1997).

Frente às células de mamíferos, as células de inseto possuem algumas vantagens para a expressão recombinante: a capacidade de crescimento até altas concentrações em suspensão, sem a necessidade de estabelecer uma imobilização ou adesão a matrizes, capacidade de crescer à temperatura ambiente e em meios livres de soro fetal bovino, sem a necessidade do controle de CO₂ (Ivey-Hoyle, 1991a).

2.4 Sistema de expressão de genes heterólogos: *Drosophila melanogaster* (S2)

As células de *Drosophila melanogaster* S2 são células derivadas de uma cultura primária de embriões em estágio tardio de desenvolvimento. Dentre todas as linhagens celulares estabelecidas a partir desse inseto, as células S2 têm se destacado como instrumento de produção de proteínas heterólogas, devido principalmente à facilidade de cultivo, quando comparada com células de mamíferos, à capacidade de realizar modificações pós-traducionais, ao conhecimento de promotores gênicos muito eficientes e finalmente à capacidade de inserção de muitas cópias do gene de interesse diretamente no núcleo das células transfectadas, criando assim uma população com expressão estável da proteína de interesse (McCarroll e King, 1997). Outro aspecto vantajoso é a facilidade e rapidez em que uma linhagem estável é obtida. Em duas a três semanas após a transfecção, populações celulares altamente produtoras são estabelecidas, enquanto que para o estabelecimento de uma linhagem CHO estável altamente produtora, podem ser necessários alguns meses e um processo de amplificação gênica (Johansson et al., 2007).

Os sistemas de expressão em células de drosófilas, utilizando eficientes promotores gênicos e elevado número de cópias de plasmídeos por célula transfectada, têm obtido sucesso em relação às demais estratégias, produzindo um elevado nível de expressão de proteínas heterólogas (McCarroll e King, 1997). Descreve-se mesmo a integração de mais de 1000 cópias de um cassete de expressão por célula em um único evento de transfecção e seleção (De mL et al., 1999).

Os promotores mais utilizados para a expressão em células S2 são os promotores da actina e da metalotioneína.

O primeiro é um promotor constitutivo, o que equivale a dizer que seu funcionamento está ligado ao funcionamento fisiológico normal das células, sendo regulado por mecanismos de regulação gênica da própria célula e que esta utiliza para a regulação de seu próprio promotor. O gene da actina 5C, principal gene da *Drosophila melanogaster* que codifica para a actina do citoesqueleto, presente em todos os tipos celulares e em todos os estágios de crescimento, possui dois promotores, um distal que controla a formação de um mRNA composto pelos exons 1 e 3 e um proximal que controla a formação de um mRNA composto pelos exons 2 e 3. Como a região codificadora se localiza inteiramente no exon 3, a proteína actina é a mesma em ambos os casos. Mas a presença de dois promotores dá ao organismo múltiplos modos de regulação desse gene altamente expresso. Enquanto o promotor proximal serve para a manutenção do citoesqueleto em todas as células, o promotor distal é regulado em diferentes tecidos em diferentes estágios de crescimento (Chung e Keller, 1990a, b).

O promotor distal é de interesse especial porque se trata do promotor mais forte já testado em expressão transiente por culturas de células embrionárias de *Drosophila*, sendo geralmente utilizado em vetores de expressão (Chung e Keller, 1990a, b).

O promotor da metalotioneína é um promotor forte, que é induzido pela exposição da célula a um meio contendo metais pesados. A transcrição e tradução da enzima metalotioneína é estimulada como mecanismo de defesa aos efeitos tóxicos desses metais em solução. O gene que é transfectado acoplado a esse mesmo promotor apresenta início de sua transcrição e tradução após a exposição das células aos metais pesados.

A obtenção de linhagens estavelmente transfectadas é feita pela co-transfecção dos vetores contendo o gene da proteína de interesse e um vetor auxiliar, que codifica para um gene de resistência. Os vetores de resistência mais utilizados são os que carregam o gene da resistência à higromicina ou à puomicina. Nessas condições é possível estabelecer uma população de células transfectadas e produtoras em apenas três semanas (Iwaki et al., 2003).

O promotor de expressão da actina de *Drosophila* foi pouco utilizado para a expressão de proteínas de interesse biotecnológico. Destaca-se a produção da enzima β -secretase responsável pela clivagem do precursor da proteína amilóide, o principal componente das placas encontradas nos cérebros de pacientes com Alzheimer (Mallender et al., 2001) e de duas proteínas de envelope viral, a glicoproteína do vírus da encefalite japonesa (Zhang et al., 2007) e a glicoproteína do vírus rábico (Swiech et al., 2008), ambas atingindo valores de 2 a 3

mg/L. Este último sistema, assim como o trabalho apresentado nesta tese, faz parte de um projeto temático que aborda desde a construção dos vetores de expressão em células S2, até o cultivo destas em grande escala para a produção da glicoproteína do vírus rábico (FAPESP 02/09482-3).

O promotor da metalotioneína é o mais utilizado para a expressão recombinante em células S2, principalmente de proteínas destinadas à secreção. Com sua utilização foram obtidas expressões muito variadas, desde menos de 2 mg/L (Shin e Cha, 2003) até 100 mg/L (Scotter et al., 2006) em diferentes tempos de coleta após a indução. Isso demonstra como pode ser variável a quantidade da proteína produzida, dependendo de suas características.

Utilizando o promotor da metalotioneína, proteínas complexas foram expressas com sucesso em S2. Por exemplo, os receptores opióides, que possuem vários domínios transmembrana, chegando a um total de até 20.000 receptores por célula (Perret et al., 2003; Brillet et al., 2006). Também glicoproteínas diversas, como a glicoproteína viral gp120 do vírus HIV na ordem de 5 a 35 mg/L (Ivey-Hoyle et al., 1991b), a eritropoietina humana a 18 mg/L (Kim et al., 2005), imunoglobulinas humana ou recombinante na ordem de 1 mg/L (Kirkpatrick et al., 1995; Johansson et al., 2007) ou em quantidades muito maiores como a GP6 adequadamente glicosilada (*platelet glycoprotein VI*) a 26,3 mg/L (Jennings et al., 2007). Outras proteínas interessantes que também foram expressas nesse sistema são: o minicolageno mC21 humano (Li et al., 2005), o plasminogênio recombinante (Nilsen e Castellino, 1999) a transferrina humana (Lim et al., 2004) e a canstatina, uma proteína globular (Lee et al., 2007), apresentando quantidades de 3 mg/L, 15 mg/L, 40 mg/L e 76 mg/L (ou 51 μ g/1E7 células) respectivamente. Em geral, quando a proteína é secretada, a produção tende a ser mais elevada.

Todos os trabalhos citados anteriormente tratam da expressão de glicoproteínas de interesse médico. Apesar de serem feitas considerações sobre os diferentes padrões de glicosilação de proteínas em células de mamíferos e em células de inseto, em praticamente todos os casos conclui-se que a qualidade das proteínas heterólogas produzidas em ambos os sistemas é muito equivalente.

Um bom exemplo é a produção da dopamina β hidroxilase humana recombinante em células S2. Embora essa glicoproteína tenha apresentado uma pequena diferença de massa molecular (66 kDa) em relação à proteína nativa (73 kDa), foi demonstrado que suas propriedades enzimáticas se mantiveram preservadas. A comprovada qualidade e a produção em níveis acima de 16 mg/L permitiram seu uso como substituta da dopamina derivada de neuroblastoma, ajudando no tratamento de problemas de falência cardíaca (Li et al., 1996).

A diferença de glicosilação entre células de inseto e de mamíferos se deve principalmente à capacidade destas últimas em realizar uma glicosilação mais completa, incluindo a sialização e o processamento de N-glicanos complexos, que podem ser essenciais para o bom funcionamento da glicoproteína (Buttler, 2004). Essa diferença foi crítica para o funcionamento da eritropoietina humana expressa em S2, uma proteína muito estudada em sistemas de produção recombinante. Foi demonstrado que a sua glicosilação em células S2 era feita basicamente com N-glicanos pequenos, contendo duas ou três manoses com ou sem fucose, diferentemente da glicosilação com N-glicanos complexos encontrada em células de mamíferos. Esse dado corresponde ao que já se conhece sobre a glicosilação em células de inseto mais bem estudadas (Sf9 e Tni) (Kim et al., 2005).

A maior parte dos trabalhos consultados trata pelo menos em parte a questão de uma otimização das condições de produção, almejando obter maiores quantidades de proteína em sua conformação adequada. No entanto, o funcionamento do promotor, ou os níveis do RNA mensageiro da proteína de interesse são investigados em apenas um trabalho (Kirkpatrick et al., 1995). Mesmo assim, o resultado encontrado não é esclarecedor, já que não se pode relacionar diretamente as intensidades das bandas encontradas por Northern blotting, com a quantidade de proteína produzida.

2.5 Temperatura de cultivo e velocidade de crescimento na expressão protéica recombinante

A melhoria da produção de proteínas complexas, que demandam modificações pós-traducionais de diversas qualidades, nem sempre pode ser encarada como uma consequência direta da otimização dos parâmetros utilizados para a avaliação da performance de bioprocessos (quantidade de biomassa, consumo de nutrientes, velocidade de crescimento, consumo de oxigênio etc...). Há situações em que a produção da proteína recombinante pode não estar associada ao crescimento ou ser melhorada mediante algum tipo de stress ou restrição (Palomares et al., 2004).

A diminuição da temperatura de cultivo é uma estratégia muito utilizada para aumentar a produtividade de proteínas recombinantes expressas em células de mamíferos (Yoon et al., 2003). Esse procedimento induz o que se denomina de “growth arrest” ou “interrupção do crescimento”. Nessa situação, as células interrompem seu crescimento na fase S/G₁ do ciclo celular, retardando a apoptose e em alguns casos aumentando a produção específica da proteína recombinante (Fussenegger, 2001).

Embora essa abordagem seja muito utilizada, seu resultado pode ser muito variável. Em particular para as células CHO (Chinese Hamster Ovary), esse procedimento tem tido muito sucesso (Al-Fageeh et al., 2005).

Em alguns casos, nessas células foi observado que a expressão da proteína recombinante à baixa temperatura de cultivo pode ser obtida mesmo na presença de crescimento celular, não sendo portanto dependente do “growth arrest”. Através de medições do mRNA específico, foi demonstrado que à temperatura de 32 °C os níveis de mRNA eram maiores que à 37 °C, o que poderia ser então responsável pela melhor produtividade (Yoon et al., 2003).

Outros estudos ainda confirmaram que a melhor expressão nessas condições estava relacionada ao nível do mensageiro e não a uma possível conservação da proteína a uma temperatura reduzida, e sugeriram a manutenção de células durante todo o crescimento a temperaturas mais baixas, de modo que a maior produtividade celular se traduza também em maior produtividade total, já que em muitos casos a ausência de crescimento faz com que a produtividade total fique baixa (Fox et al., 2009).

Porém esses dados ainda são muito centralizados na experiência com células CHO. Como o efeito da temperatura na produtividade parece ser temperatura, linhagem celular e proteína alvo dependente (Al-Fageeh et al., 2005), é interessante questionar se uma linhagem celular específica, que produz mais proteína a uma temperatura reduzida, apresenta ou não maiores quantidades do transcrito da proteína de interesse ou se esse efeito se deve a um fenômeno de “growth arrest”.

Nos trabalhos consultados, não há relato de experiência com a diminuição da temperatura do cultivo de células S2. Recentemente publicamos um trabalho contendo as primeiras informações sobre esse procedimento para células S2 (Swiech et al., 2008) (**Anexo C**). Nesse trabalho ficou demonstrado que as células S2 podem apresentar melhor produção da glicoproteína do vírus rábico quando submetidas a uma redução da temperatura. Contudo, ainda não havíamos analisado se esse fenômeno se devia a um efeito de “growth arrest” ou se a uma melhoria na quantidade de mensageiro presente.

2.6 Sistema de expressão de genes heterólogos: Semliki Forest Virus (SFV)

Muitas vezes, as linhagens celulares convencionais estavelmente transfectadas além de demandarem um longo tempo de desenvolvimento não apresentam níveis de expressão mais do que modestos. Aliado a isso está o problema da perda da expressão com o

decorrer das passagens, seja por inativação ou deleção do gene integrado. Em contraste com essa situação, os vetores virais possuem características atrativas como a alta eficiência de entrega do gene em diferentes linhagens celulares e o uso de promotores muito fortes, responsáveis por uma expressão intensa do gene de interesse (Lundstrom, 2003a).

O SFV é um vírus envelopado de RNA positivo simples fita, pertencente ao gênero *Alphavirus* da família *Togaviridae*. Os vírus pertencentes a essa família caracterizam-se por possuir um genoma de RNA simples fita não segmentado, que funciona como RNA mensageiro. Essa fita de RNA positivo é encapsidada por um único tipo de proteína, arranjada em configuração icosaédrica. O nucleocapsídeo é envelopado por uma bicamada lipídica derivada da membrana plasmática da célula hospedeira. Projetadas para o exterior do envelope viral estão as glicoproteínas virais E1 e E2 (Schelesinger e Schelesinger, 1991).

Para o desenvolvimento do vetor de expressão, o cDNA correspondente a seu genoma foi cortado e inserido em dois plasmídeos diferentes: O plasmídeo de expressão, que contém o gene (*SFVgp1*) das proteínas não estruturais do SFV (nsP1-4) e o promotor forte subgenômico SFV 26S localizado antes de uma região de policlonagem destinada à introdução do gene de interesse; e um plasmídeo auxiliar que contém os genes das proteínas estruturais do envelope viral (**Figura 2**).

Figura 2 – Representação esquemática do sistema SFV de expressão recombinante. Genoma do SFV selvagem, **A**. Vetor de expressão em que os genes das proteínas estruturais foram substituídos por um sítio de policlonagem, em que é inserido o gene de interesse **B**. Vetor auxiliar necessário para a formação de partículas virais na célula hospedeira **C**. Adaptado de Riezebos-Brilman, 2006.

Após a realização da transcrição *in vitro* de ambos os plasmídeos, os RNAs são co-transfectados em células de mamífero (geralmente BHK-21). O RNA + do vetor de expressão funciona como um RNA mensageiro da célula hospedeira, com um códon AUG situado a 59 nucleotídeos do sítio 5' cap (m^7G). A tradução é encerrada antes do promotor 26S pela presença de um stop códon. A poliproteína não estrutural gerada é então clivada em

diversos complexos associados ou em partes individuais. Esses polipeptídeos não estruturais então catalisam as atividades de replicação e de transcrição: atuam como RNA polimerase RNA-dependente e sintetizam uma fita negativa do RNA completo, que serve como molde para dois transcritos, um RNA + de tamanho total contendo o sinal de encapsidação e um RNA + subgenômico a partir do promotor 26S que dará origem às proteínas estruturais. Quando uma quantidade suficiente de proteína de capsídeo viral está disponível, o RNA + de expressão liga-se a ela formando o nucleocapsídeo viral. O estágio final ocorre principalmente na membrana plasmática de células animais, quando o nucleocapsídeo interage com o domínio citoplasmático da glicoproteína E2, iniciando o processo de brotamento (Schelesinger e Schelesinger, 1991).

Todo esse processo resulta na formação de aproximadamente 10^9 a 10^{10} partículas infecciosas por mililitro. Essas partículas são capazes de infectar uma ampla gama de células animais, notadamente as células de mamíferos. Devido à ausência do sinal de encapsidação no RNA codificante para as proteínas estruturais, apenas o RNA contendo o gene de interesse é encapsidado, constituindo o único RNA presente na partícula viral, o que na prática faz com que essas partículas sejam infecciosas mas não replicativas (Lijestrom e Garoff, 1991). Posteriormente, visando aumentar a segurança do sistema, a proteína de envelope viral E2 foi mutada, de forma que o vírus apenas pode realizar a fusão com a membrana plasmática da célula quando previamente tratado com α -quimiotripsina (Berqlung et al., 1993). Mais recentemente, foi desenvolvido um sistema SFV que não necessita de ativação enzimática, porém apresenta sensibilidade à temperatura como método de contenção (Lundstrom, 2003b).

Uma das características marcantes do sistema SFV é a rápida indução de apoptose na célula hospedeira. O mecanismo pelo qual isso acontece ainda não foi totalmente esclarecido, mas supõe-se que a proteína viral nsP2, presente nos primeiros momentos após a infecção, tenha uma participação ativa. Como a expressão transgênica a partir de vetores SFV é feita utilizando um ou mais promotores 26S, altos níveis do mRNA de interesse são alcançados apenas tardiamente no ciclo de infecção. No momento da expressão transgênica, muitas das funções celulares já estão extintas (Piven et al., 2005). Isso faz com que os cultivos de células infectadas com SFV raramente ultrapassem 48 h após a infecção (Eifler et al., 2007; Hassaine et al., 2006; Schukla et al., 2006).

Diversas proteínas já foram expressas utilizando o sistema SFV. De maneira geral, qualquer molécula que já tenha sido expressa por um determinado tipo celular que possa ser infectado por SFV, pode também ser expressa pela utilização desse sistema. Em 2003, pelo

menos 28 proteínas de membrana, dentre elas alguns receptores complexos, haviam sido expressas pelo sistema SFV, sendo que o nível de expressão variou entre 3 nmol/L até quantidades de 10 mg/L (Lundstrom, 2003a). Para a expressão de GPCRs (Receptores celulares acoplados à proteína G) por exemplo, enquanto os mais eficientes sistemas de expressão transiente em células de mamíferos resultaram em níveis de expressão da ordem de 1 a 5 pmol/mg, os sistemas baseados no SFV chegaram a 100-300 pmol/mg para alguns receptores (Hassaine et al., 2006).

Comparado com um sistema de expressão de características equivalentes, a utilização de células Sf9 (*Spodoptera frugiperda*) e infecção por baculovírus recombinante, o sistema SFV demonstrou a mesma capacidade de expressar o receptor da angiotensina II, ambos produzindo a proteína na ordem de 30 pmol/mg, com semelhante atividade. Com a vantagem da menor presença de produtos de degradação da proteína nas células BHK-21 que nas células Sf9 (Shukla et al., 2006).

A expressão de diversos receptores, em ambos os sistemas, também encontrou quantidades de proteínas muito semelhantes. Porém, como o sistema Sf9 atinge maiores concentrações celulares e maior biomassa, constatou-se que a razão entre proteína de interesse e proteína total era cem vezes maior no sistema SFV, o que pode simplificar a etapa de purificação (Eifler et al., 2007). Nesse mesmo trabalho foram encontradas proteínas diferencialmente expressas e degradadas em diversas linhagens celulares. Seus resultados ainda sugeriram que quando a maioria das proteínas membranárias expressas estão ativas, o nível de expressão é consideravelmente baixo, na ordem de 0,2 a 0,4 mg/L, quando exclusivamente localizada na membrana plasmática, o que levanta a questão sobre a quantidade de proteína membranária com conformação apropriada que uma célula é capaz de acomodar. Segundo os autores quando o nível de expressão é elevado (superior a 1 mg/L), a proteína estaria presente primariamente nas membranas internas (Eifler et al., 2007).

Como todo sistema de expressão, o sistema SFV também possui desvantagens, como o alto custo da produção do vírus recombinante e da manutenção de células de mamíferos. Pode também não ser eficiente em alguns casos, como no caso da expressão do receptor tipo 2 da neuromedina U sem sua correta glicosilação (Schukla et al., 2007).

A titulação de construções de SFV tem sido apontada como um dos principais pontos limitantes à sua utilização. Apesar de ser um sistema indutor de apoptose em cultivos *in vitro* (Glasgow et al., 1998) e dessa característica ser utilizada para a titulação viral em placas (Zusinaite et al., 2007), ou ainda de sua titulação viral poder ser feita por técnica de dot-blotting utilizando sonda de DNA marcada radiativamente (Walhfors e Morgan, 2002), a

titulação viral do SFV ainda carece de uma nova técnica mais simples e mais precisa para a melhoria do controle do sistema. Essa mesma dificuldade levou ao desenvolvimento de técnicas de quantificação de baculovírus por qPCR (Lo e Chao, 2004; Hitchman et al., 2007). Essa técnica pode ser a quantificação por qRT-PCR, já que a grande difusão de aparelhos e o conhecimento prévio sobre seu uso em titulação viral (Hitchman, 2007; Morsy et al., 2007; Rohr et al., 2002; Zhang et al., 2008; Zhao et al., 2007;) dão um suporte considerável à essa abordagem.

O sistema SFV também é estudado como um promissor vetor de imunização, tendo demonstrado atividade de estímulo das respostas imunes celular e humoral. Sua utilização como sistema viral de replicação defectiva para uso em humanos é apoiada por diversas características como: Produção de altos níveis da proteína de interesse; formação de corpos apoptóticos após 48-72h com altos níveis da proteína heteróloga, servindo como indutor de resposta imune via estímulo indireto (cross-priming); ativação dos sistemas imunes inato e adaptativo; produção de intermediários dsRNA, conhecidos imunopotencializadores (podem ser reconhecidos por receptores do tipo Toll-3 e estimular a produção de Interferon-I, sendo capazes ainda de ativar e induzir a maturação de células dendríticas); e finalmente o fato de que humanos geralmente não carregam anticorpos neutralizantes contra o vírus SFV (Riezebos-Brilman et al., 2005).

2.7 Controle e análise da expressão recombinante

Durante as etapas de obtenção de um sistema de expressão heteróloga, é comum dirigir algumas análises para as características moleculares, do que pode vir a ser um clone produtor de alguma molécula de interesse biotecnológico.

Uma das abordagens mais interessantes para a eleição de melhores clones obtidos através de um processo de transfecção é a quantificação do número de cópias do gene de interesse inseridas por célula, baseando-se em uma possível relação direta entre as quantidades de cDNA específico e de proteína produzida.

O método mais utilizado para determinar o número de cópias de um gene é a análise por southern blot, na qual o DNA genômico de interesse é hibridizado com uma sonda de DNA radiativa (Bubner e Baldwin, 2004). Embora muito sensível, a técnica de southern blot permite apenas uma quantificação estimada do número de cópias de um gene por célula. Além disso, em geral requer uma grande quantidade de DNA para que seja possível realizar a análise, o que por vezes pode dificultar a realização de replicatas para uma análise estatística

mais precisa. Alguns pontos críticos da utilização da técnica de southern blot para quantificação são: a necessidade de digestão por enzimas de restrição (fragmentos não bem digeridos podem levar à ligação inespecífica das sondas); a separação dos fragmentos por eletroforese e sua transferência para membrana (que podem levar à perda de material); possibilidade de ligação cruzada (inespecificidade) e dificuldade de reprodutibilidade na eficiência de hibridização. Os cálculos dos resultados obtidos por essa técnica estão sujeitos a mais um fator de erro, já que incluem a necessidade de delimitação manual da área contendo o sinal e a correção do sinal de fundo (Chain et al., 2004).

De mL et al., 1999 utilizaram o southern blot para medir a quantidade do cDNA do antígeno viral da hepatite B (HBsAg) inserido em células S2 de *Drosophila melanogaster*, revelando a presença de 10 a 240 cópias do gene por célula transfectada. A análise do número de cópias do gene por célula revelou-se importante para entender as diferenças entre os métodos de transfecção utilizados, pois permitiu correlacionar em diversos clones, a concentração do vetor de transfecção com a eficiência do processo. Mas, a presença de 240 cópias por célula não levou à melhor expressão protéica, o que demonstra que nem sempre a quantidade de gene específico integrado por célula é diretamente proporcional à quantidade de proteína obtida. Outros fatores tais como a localização e a conformação das cópias inseridas no genoma da célula podem interferir no mecanismo de transcrição do mRNA.

A melhor opção para a seleção de um clone produtor ou da melhor condição de produção da proteína de interesse é a análise da quantidade da própria proteína produzida.

A quantificação de um produto protéico específico, originado de um gene exógeno em um dado sistema recombinante, pode ser feita por técnicas dependentes ou não de anticorpos específicos. Na ausência de marcadores específicos, é necessário recorrer a técnicas de purificação prévias, antes da análise da atividade ou presença da proteína de interesse. Para isso é necessário conhecimento anterior ou desenvolvimento da metodologia de purificação, o que é um processo que geralmente aumenta o custo e o tempo de análise.

Dentre as técnicas mais diretas e utilizadas destaca-se o western blot. Nesta técnica sensível, capaz de detectar até 5 ng de proteína em uma amostra, a proteína é separada por eletroforese, transferida do gel para uma membrana e marcada com reagente específico para a sequência particular de aminoácidos. As sondas são geralmente anticorpos que reagem especificamente com epitopos antigênicos apresentados pela proteína-alvo ou por sequências sinalizadoras adicionadas a ela. Alguns problemas relacionados com a técnica incluem uma

transferência ineficiente, a perda de sítios antigênicos, alto valor de background e método de detecção apenas parcialmente quantitativo (Sambrook e Russel, 2001a).

Além disso, nem todos os anticorpos monoclonais podem ser utilizados como sondas em WB, já que as proteínas podem estar desnaturadas e terem perdido os epitopos de reconhecimento, o que não permite por vezes avaliar a boa conformação da proteína. Soro policlonal, por outro lado, são misturas indefinidas de imunoglobulinas, cuja especificidade, afinidade e concentração são geralmente desconhecidos. Não é possível, portanto, prever a eficiência de um dado anti-soro policlonal capaz de detectar diferentes epitopos antigênicos de uma proteína-alvo desnaturada e imobilizada (Sambrook e Russel, 2001b).

O ELISA é outro método de detecção protéica em amostras complexas. Este teste também pode ser dependente do estado conformacional da proteína de interesse, já que está baseado em uma ligação específica de antígeno-anticorpo. O estabelecimento de um ELISA específico para uma proteína recombinante é buscado principalmente quando se tem a intenção de trabalhar com grandes quantidades de amostra, pois demanda tempo para sua padronização e geralmente demanda a utilização de grandes quantidades de anticorpos.

Admitindo que as quantidades de mRNA específico produzido e de sua proteína correspondente obedecem a alguma correlação, a seleção das melhores condições de produção protéica em um determinado sistema também poderia ser avaliada pelo nível de mRNA presente. As vantagens seriam trabalhar com a especificidade das ligações entre ácidos nucléicos e a rapidez das análises, facilitando por exemplo, a seleção dos melhores clones produtores, sem apresentar a mesma incerteza trazida pela tentativa de correlacionar o número de cópias do gene presente com a quantidade de proteína obtida. (Sambrook e Russel, 2001c).

Dentre os métodos mais utilizados para a quantificação de moléculas de mRNA específicas: northern blotting, hibridização *in situ*, ensaios de proteção contra RNase, RT-PCR competitiva ou não competitiva e o método de RT-PCR quantitativa (qRT-PCR), este último é o que tem maior possibilidade de ser utilizado para a diferenciação entre clones e para a caracterização do padrão de transcrição em um cultivo. Isso se deve ao fato de ser a única técnica capaz de realmente quantificar as moléculas de mRNA presentes em uma amostra, já que as demais não apresentam a mesma precisão (Bustin, 2000). Além disso, a maioria desses métodos, quando comparados com a qRT-PCR demonstram ser muito mais trabalhosos e demorados (Pfaffl, 2003).

A qRT-PCR tem sido utilizada constantemente para o diagnóstico clínico de diversos tipos de doenças ou para a avaliação de resposta a tratamentos. Trata-se do método de quantificação de mRNA mundialmente mais utilizado em pesquisa (Bustin, 2002).

Além disso, a qRT-PCR demonstra uma inserção cada vez maior para a verificação de outros métodos analíticos. Em alguns momentos a análise da variação da expressão não é suficientemente satisfatória quando se utilizam métodos semi-quantitativos, como RT-PCR e WB, sendo necessário recorrer a essa técnica mais precisa (Hasegawa, 2003).

A disponibilidade de diversos tipos de kits, que facilitam os procedimentos mais laboriosos da técnica de qRT-PCR, aumenta ainda mais o interesse pela utilização dessa técnica para a avaliação da quantidade de RNA transcrito em sistemas de expressão. É possível, por exemplo, lisar uma determinada quantidade de células, tratá-las com DNase e sintetizar o cDNA em apenas um tubo (Invitrogen, 2008).

2.8 Técnica da PCR e RT-PCR quantitativas (qPCR e qRT-PCR)

O método da qRT-PCR consiste basicamente na transcrição reversa de uma molécula de mRNA específica, dando origem a um cDNA que compreende a sequência alvo da PCR. Em seguida esse cDNA é submetido à reação da PCR ora na presença de um reagente que fluoresce ao se intercalar em moléculas de DNA dupla fita, ora na presença de uma sonda fluorescente. Ocorre durante a PCR um acúmulo de segmentos de DNA dupla fita que são reconhecidos pelas sondas, ou aos quais o intercalante se liga, aumentando progressivamente a fluorescência dentro do tubo de ensaio. Essa fluorescência é então registrada por um equipamento que combina um fluorímetro e um termociclador, acoplados a um computador.

O acúmulo de um produto específico durante uma reação de PCR pode ser descrito pela seguinte função exponencial:

$$X_n = X_0 (1+E)^n \quad (1)$$

Em que X_n é o número de cópias após n ciclos; X_0 é o número inicial de moléculas-alvo ou DNA molde; n é o número de ciclos realizados; E , a eficiência da reação (Bubner e Baldwin, 2004).

Esse processo cinético possui três fases típicas. Na primeira, há a desnaturação da dupla fita, ligação dos oligonucleotídeos e amplificação inicial. Nesse momento, a reação possui uma fluorescência basal, devida à fluorescência do próprio intercalante de bases não ligado e daquele ligado aos poucos fragmentos amplificados. Na segunda fase, a reação adquire seu caráter exponencial atingindo um alto nível de fluorescência. O ciclo correspondente ao primeiro ponto de fluorescência acima do valor basal é denominado de Ct (threshold cycle). Geralmente utiliza-se esse valor para determinar qual a quantidade de moléculas iniciais presentes na amostra. A última fase é constituída de um platô, que ocorre em ciclos tardios da PCR e que por ser muito semelhante para diversas quantidades de moléculas iniciais, pois retrata um período de esgotamento da capacidade da reação, não tem utilidade para a quantificação do DNA ou cDNA molde.

Há diversas opiniões sobre a estratégia preferível de normalização dos resultados em qRT-PCR. Em geral atribui-se uma preferência pela normalização utilizando o número de células, o RNA total ou o rRNA, quando o volume de amostras não é limitado, uma característica geral dos ensaios *in vitro* (Bustin, 2002). No entanto, essa afirmação deve ser analisada cuidadosamente. A característica exponencial da reação de PCR faz com que qualquer diferença mínima na quantidade de material inserido decorra em grande diferença de quantificação. Portanto, para a utilização dessas estratégias, é fundamental que a reprodutibilidade intra-ensaios seja máxima. Essa reprodutibilidade é alcançada com a segurança na obtenção de amostras de tamanho similar e método validado de quantificação de ácidos nucleicos (Huggett et al., 2005).

A normalização por esses parâmetros apresenta ainda o problema de não considerar as variações inerentes à etapa de transcrição reversa (Libus e Storchova, 2006) ou da própria PCR, devido à presença de inibidores, por exemplo. A normalização pela quantidade de RNA total apresenta a fragilidade teórica de assumir que a relação entre o RNA ribossômico (80% do RNA da célula) e o mRNA não varia, o que tem sido publicado como não verdadeiro, principalmente em cultivos celulares (Huggett et al., 2005).

Outra estratégia de normalização, mais utilizada, é a comparação da quantidade dos transcritos do gene de interesse e dos genes de manutenção celular (*housekeeping genes*). A normalização de amostras obtidas a partir de ensaios *in vitro* pode ser feita desse modo, desde que seja demonstrado que a expressão desses genes não é afetada pelas condições experimentais (Bustin, 2002; Dheda, 2004). Trata-se de um método simples para o controle de variações operacionais na qRT-PCR, como por exemplo a inserção de diferentes quantidades de RNA ou cDNA nas diferentes etapas do procedimento (Huggett et al., 2005).

Muitas vezes a escolha de um método de normalização não é simples, o que leva à associação de técnicas de quantificação relativa com técnicas de quantificação absoluta (Wikstrom, 2006).

2.9 Utilização da qPCR e qRT-PCR em biotecnologia

A qPCR e a qRT-PCR já foram utilizadas em alguns processos de cultivo celular, visando o estudo da expressão protéica por meio da transcrição. A seguir estão citados alguns trabalhos, em que essas técnicas foram utilizadas para obter informações como o melhor tempo para a retirada do produto e a melhor condição de crescimento para o cultivo. Outros trabalhos abordam apenas a relação entre a quantidade de mRNA específico e da proteína em estudo, ou ainda a utilização das técnicas para a titulação viral.

Relacionar a quantidade de uma proteína produzida *in vitro*, seja homóloga ou heteróloga, com a quantidade de seu mRNA tem sido uma abordagem bastante estudada.

Muitas vezes assume-se uma relação direta entre esses dois parâmetros, como por exemplo, a associação encontrada no trabalho de Wilkstrom (2006), que relacionou a maior ou menor expressão da proteína E2-2 (HeLa E-box binding protein) com diferentes estágios do desenvolvimento de linfócitos B, medindo apenas a quantidade de seu mRNA.

Porém, a maioria dos trabalhos ainda é cautelosa e analisa conjuntamente a quantidade de proteína e de mRNA específico. Um exemplo de correlação bem sucedida está no trabalho de Ficko (2007), que analisou a diferença existente entre a presença da glicoproteína GPIIIa em células CD34+ de indivíduos saudáveis e de portadores de trombocitopenia, durante a indução de sua diferenciação a megakariócito *in vitro*. Analisando por citometria de fluxo, foi detectada 33-34% mais proteína na superfície das células dos pacientes. A quantificação do mRNA específico por qRT-PCR relativa revelou exatamente a mesma diferença entre indivíduos saudáveis e pacientes.

Em outros casos, a correlação entre mRNA e proteína pode não apresentar um comportamento diretamente proporcional. Assumir essa hipótese como verdadeira requer cuidado. Assim, pesquisadores investigando a ação da gastrina na ativação de genes endógenos ciclina D1 e c-fos (protooncogene) em células AR42J *in vitro*, demonstraram que a cinética de indução da expressão era muito diferente entre os genes. Após o estímulo com gastrina, a ciclina D1 apresentou um aumento gradual de seu mRNA durante todo o período de exposição, atingindo duas vezes a expressão das células não tratadas. Para a c-fos, apenas uma hora após o estímulo com gastrina, foram quantificadas 20 vezes mais mRNA em relação ao controle não

tratado. O mRNA da c-fos voltou ao normal em apenas 6 horas após o início do estímulo, permanecendo nesse patamar até o final das 24h, porém a proteína produzida estava presente durante todo o período (Tonje et al., 2007). Alguns genes, como no caso do c-fos podem apresentar um comportamento de resposta imediata, característica do funcionamento de um gene de defesa. Alguns promotores indutíveis utilizados em vetores de expressão podem apresentar comportamento semelhante, já que provêm de genes de defesa.

De nosso especial interesse é o estudo cinético da expressão de um mRNA específico, de maneira que o acúmulo do mensageiro durante o cultivo seja relacionado à produção da proteína *in vitro*. Encontramos um trabalho em que a qRT-PCR conseguiu estimar a atividade enzimática da CMCax na hidrólise da gentiobiose em amostras de *A. xylinum*, durante uma cinética de cultivo, demonstrando um perfil crescente de acúmulo de mRNA até o quinto dia de cultivo e a correspondência desse com o aumento da atividade enzimática (Kawano et al., 2008).

Além de ser um método de análise substitutivo em alguns casos, a qPCR ou qRT-PCR, pode ser um método de análise complementar para definir melhores condições de cultivo, tendo em vista uma melhor produção da proteína recombinante.

Em um trabalho muito interessante, Fox et al. (2008) utilizaram a qRT-PCR para a avaliação da produção de IFN- γ em cultivos agitados de células CHO. Após a verificação da correlação direta entre as quantidades de IFN- γ e de seu mRNA, basearam-se na qRT-PCR para verificar a diferença de produção entre cultivos efetuados a 32 °C e a 37 °C. Foi encontrado no primeiro, uma maior quantidade de mRNA específico durante todo o período de cultivo, demonstrando que o melhor nível de produção da proteína possuiu pelo menos alguma participação do nível de transcrição. Esse dado é condizente com outro trabalho demonstrando o efeito positivo da diminuição da temperatura para o aumento da expressão da eritropoietina e de seu mRNA em células CHO (Yoon et al., 2003). Outro possível mecanismo de favorecimento da produção a 32 °C vem da constatação de que, a essa temperatura a quantidade de RNA total isolada foi maior. Como o rRNA (ribossômico) é responsável por 80% de todo o RNA presente na célula, isso quer dizer que, havendo mais rRNA à baixa temperatura, a capacidade produtora de proteína poderia estar potencializada.

Igualmente visando eleger a melhor condição de cultivo, hepatócitos humanos da linhagem C3A foram cultivados em biorreator e em frascos T. A produção de duas enzimas hepáticas, CYP3A4 e UGT2B7, normalmente produzidas em condições de cultivo adequado,

foi monitorada pela qRT-PCR. Através da quantificação dos mRNAs concluiu-se que o sistema agitado era superior ao estático em produtividade (Shvartsman, 2008).

A comparação entre cultivo estático e agitado, acessando a quantidade de DNA viral por qPCR e a quantidade de proteína de envelope do vírus da hepatite B (HBsAg) por ELISA, no sobrenadante de células HepG2.2.15 estavelmente transformadas e produtoras contínuas de partículas virais, demonstrou que o cultivo agitado era capaz de produzir uma maior quantidade de partículas virais íntegras. A conclusão foi obtida quando se revelou que os cultivos em microcarregadores apresentavam maior quantidade de DNA viral no sobrenadante, mas uma menor quantidade de HBsAg, o que significa uma menor presença de partículas virais defectivas (Lupberger et al., 2006).

A utilização da qPCR e da qRT-PCR para titulação viral tem ganhado muita importância. Nesse caso, em geral é utilizada a quantificação absoluta, baseada em uma curva-padrão. Essa tecnologia tem substituído as tradicionais titulações em placa, especialmente quando as amostras virais não apresentam problemas de variação da infectividade (Ekstrom et al., 2007).

Uma aplicação biotecnológica da quantificação viral por qPCR foi na determinação da inibição de replicação de adenovírus por drogas antivirais, pela quantificação do DNA viral após um período de incubação das células infectadas e tratadas com os compostos em estudo (Uchio et al., 2007).

Também através da qPCR foi possível quantificar o aumento de diversos mutantes de baculovírus *A californica*, à medida em que ocorriam as passagens em células Sf21. Analisando quais tipos de mutações eram mais presentes e sua reversibilidade quando os vírus eram passados pela infecção *in vivo*. Chegou-se à conclusão que a presença de partículas virais não infecciosas era predominante quando o MOI utilizado para infecção era maior (Zwart et al., 2008). A titulação por qPCR, de amostras de baculovírus utilizados para a infecção de cultivos celulares, também foi desenvolvida recentemente (Lo e Chao, 2004; Hitchman et al., 2007).

Finalmente, a qPCR também já foi sugerida como método de determinação da concentração celular em amostras complexas, como em co-cultivo de leveduras em processos de fermentação (Feng et al., 2007).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Células de inseto: *Drosophila melanogaster*, Schneider 2 (S2)

Foram utilizadas neste trabalho as células de inseto provenientes do organismo *Drosophila melanogaster*, cuja linhagem S2 foi estabelecida por Schneider (Schneider, 1972) a partir de embriões em estágio tardio. Este sistema de expressão comercializado pela empresa Invitrogen® tem como características importantes, o crescimento abundante e independente de adesão celular e a facilidade de trabalho em meios livres de soro fetal bovino.

3.1.1 Células recombinantes

3.1.1.1 S2AcRVGP-2 e S2AcRVGP-2k (Yokomizo et al., 2007)

Células S2 transfectadas com vetor contendo o cDNA da RVGP sob a regulação do promotor da actina de *D. melanogaster*.

As etapas que envolveram a construção deste sistema de expressão podem ser descritas resumidamente: O cDNA da RVGP foi obtido a partir do plamídeo RVGP/PV, fornecido pelo Dr Yves Jacob do Instituto Pasteur de Paris. Este cDNA foi clonado em um vetor de expressão pAc 5.1/V5 – His A (Invitrogen), dando origem ao vetor pAcRVGP. Através da utilização de Celfectin® Reagent (Invitrogen), o vetor de expressão foi co-transfectado com o vetor de seleção pCoHygro (Invitrogen), que confere resistência à higromicina. As células co-transfectadas foram então submetidas à pressão seletiva durante três semanas em meio de cultura contendo 500 µg/mL de higromicina B, após este processo permaneceram em cultivo apenas as células resistentes. Dado que essas células não crescem em baixa densidade e que, portanto, não permitem a separação clonal, recorreu-se à separação das mesmas em diversas subpopulações que foram avaliadas para a sua capacidade produtora de RVGP. Após diversos repiques a linhagem S2AcRVGP-2 foi estabelecida como sendo a melhor produtora dentre as subpopulações oriundas da mesma co-transfecção com os vetores pAcRVGP e pCoHygro (Yokomizo et al., 2007). Esta população foi novamente submetida a processos de seleção, originando a população S2AcRVGP-2k.

3.1.1.2 S2MtRVGP-Hy (Lemos et al., no prelo)

Células S2 transfectadas com o vetor contendo o cDNA da RVGP sob a regulação do promotor da metalotioneína de *D. melanogaster*.

As etapas que envolveram a construção deste sistema de expressão são semelhantes às descritas para a célula S2AcRVGP-2k, com a diferença de que o gene de resistência à higromicina foi retirado do plasmídeo original e clonado no mesmo vetor de expressão que o cDNA da RVGP, dando origem assim a um vetor de expressão e seleção. Esse vetor também foi transfectado com Celfectin[®] Reagent e através do mesmo processo de seleção foi estabelecida esta subpopulação celular.

3.1.2 Manutenção das células S2

As células S2, transfectadas ou não, foram mantidas em meio de cultura SF900II (Invitrogen) livre de soro fetal bovino (SFB), prioritariamente à temperatura de 28 °C (± 2 °C), sendo subcultivadas (repicadas) em intervalos de 5 a 6 dias. As culturas estáticas foram realizadas em frascos T de 25 cm², com volume de trabalho de 5 mL. As culturas sob agitação foram realizadas em frascos Duran (Schott) de 100 mL com volume de trabalho de 20 mL e agitação orbital a 100 rpm em incubadora (New Brunswick).

Para efetuar alguns experimentos, eventualmente as células transfectadas foram mantidas também à temperatura de 22 °C (± 2 °C).

3.1.3 Determinação da concentração celular e medida da viabilidade celular

A concentração celular em um dado cultivo foi determinada pela contagem em hemacitômetro, ou câmara de Neubauer. A viabilidade celular foi determinada pela diferença de contagem entre as células vivas e mortas, identificadas pelo método de exclusão com o corante azul de Tripan (0,2%) (Butler, 2004).

3.1.4 Congelamento de células S2: estabelecimento do banco de trabalho

Cultivos celulares com alta viabilidade (>95%), foram submetidos a centrifugação (1000 rpm/5 minutos). As células foram então ressuspensas no meio de congelamento (meio condicionado: soro fetal bovino (SFB): DMSO, 4:5:1), de maneira que a

concentração celular ficasse em torno de $1E7$ células/mL. Foram distribuídos 1,5 mL da suspensão celular por criotubo identificado. Após a incubação de 15 minutos à temperatura ambiente, os criotubos foram posicionados no contêiner para congelamento (Nalgene® cryo 1 °C freezing container), de forma que, uma vez posicionado em freezer -80 °C fosse atingida uma taxa de resfriamento de 1 °C/minuto. Após 24h de congelamento os criotubos foram transferidos para um tambor de nitrogênio líquido.

3.1.4.1 Bancos de células

Foram estabelecidos por congelamento, quatro bancos de células:

- 1 S2 selvagem (passagem 6)
- 2 S2AcRVGP-2 (passagem 18)
- 3 S2AcRVGP-2k (passagem 70)
- 4 S2MtRVGP-Hy (passagem 36)

3.1.5 Descongelamento das células S2

Os criotubos contendo as células congeladas foram transferidos diretamente do nitrogênio líquido para o banho-maria a 37 °C. No momento em que restava apenas um pequeno núcleo de material congelado no interior do tubo, a suspensão foi rapidamente transferida para um tubo de centrífuga de 15 mL, contendo 10 mL de meio SF900II. O tubo foi centrifugado a 1000 rpm durante 10 minutos, o sobrenadante descartado e as células ressuspendidas em 5 mL meio SF900II novo, sendo finalmente transferidas para um frasco T de 25 cm² e levadas à temperatura indicada de incubação.

3.1.6 Cultivos e amostragem para análise da expressão da RVGP e do *RVGPMRNA*

Os cultivos de células S2 transfectadas para a análise da expressão da RVGP e do *RVGPMRNA* foram feitos em frascos sob agitação e em frascos T 25cm², utilizando sempre o meio SF900II. O inóculo utilizado em todas as ocasiões foi de $1E6$ células/mL. O tempo de cultivo variou de um mínimo de 96h até um máximo de 168h após a inoculação.

A amostragem dos cultivos foi realizada da seguinte maneira: 30 µL de suspensão eram diluídos em PBS (pH 7,2), adicionados de reagente azul de Trypan e submetidos à determinação da concentração celular em hemacitômetro. Com base na

concentração total de células, eram retiradas para análise, após a padronização da metodologia, 1E6 células para o teste de ELISA e 3E6 células para qRT-PCR. As amostras para ELISA eram centrifugadas a 1000 rpm durante 3 minutos, o sobrenadante descartado ou reservado (300 µL), o precipitado celular era lavado com solução de PBS + sacarose 320 mM, centrifugado a 3000 rpm durante 1 minuto, a solução de lavagem descartada e o precipitado celular congelado imediatamente a -20 °C. As amostras para qRT-PCR eram centrifugadas a 100 rpm durante 3 minutos, o sobrenadante descartado, o precipitado celular lavado com PBS e após nova centrifugação e descarte da solução de lavagem, as células eram ressuspensas em reagente Trizol[®] (Invitrogen) e congeladas a -80 °C. Todas as amostras, tanto para ELISA como para qRT-PCR, foram analisadas no prazo máximo de um mês após sua obtenção.

3.2 Semliki Forest Virus recombinante (SFV-RVGP)

Os SFV recombinantes foram obtidos através da clonagem do mesmo cDNA da RVGP utilizado nas construções que deram origem às células de inseto recombinantes (RVGP/PV). Esta construção foi realizada no laboratório de Receptores de Proteínas Membranárias da universidade Louis Pasteur em Strasbourg, França, no âmbito de colaboração internacional (FAPESP/CNRS) entre este e o Laboratório de Imunologia Viral do Instituto Butantan. As etapas de construção e obtenção do SFV-RVGP estão resumidas no **Apêndice A** e podem ser consultadas em detalhe no artigo “High-level expression of rabies virus glycoprotein with the RNA-based Semliki Forest Virus expression vector” publicado na revista Journal of Biotechnology, volume 139, páginas 283-290, 2009 (**Anexo B**).

3.2.1 Ativação de SFV

As preparações de SFV são obtidas inativadas, devido a uma mutação inserida na proteína estrutural E1. Para a ativação do SFV tratamos as partículas com α -quimiotripsina (0,26 mg/mL), incubação à temperatura ambiente (TA) por 30 min e posterior inativação com aprotinina (0,1 mg/mL) durante 5 min à TA. Após esse procedimento os vírus eram utilizados ou armazenados a -20 °C.

3.3 Células de mamíferos

3.3.1 Baby Hamster Kidney (BHK-21)

As células BHK-21 do organismo *Mesocricetus auratus* (hamster, Syrian golden) (passagem 91) foram utilizadas para a expressão da RVGP a partir da infecção com vírus SFV-RVGP. A quantidade de RVGP expressa foi medida por ELISA e avaliada por imunofluorescência e citometria de fluxo. Adicionalmente, as células BHK-21 foram utilizadas também para a quantificação do *RVGPmRNA* presente após a infecção viral *in vitro*.

3.3.2 Outras células de mamíferos

Três outras linhagens de células de mamíferos foram utilizadas para a realização de estudos de infecção com SFV-RVGP. Foram analisados os efeitos citopáticos e as produções de RVGP foram acessadas por imunofluorescência, citometria de fluxo e por ELISA.

3.3.2.1 Human Embryonic Kidney (HEK-293)

Células derivadas de rim humano, congeladas na passagem 61.

3.3.2.2 Human Hepato Cellular Carcinoma (HuH7)

Células diferenciadas *in vitro* de células de hepatoma, congeladas na passagem 36.

3.3.2.3 Green Monkey Kidney (VERO)

Células do organismo *Cercopithecus aethiops*, congeladas na passagem 162.

3.3.3 Manutenção das células de mamíferos

A manutenção das células de mamífero foi feita com meio α -MEM (Invitrogen), acrescentado de 10% de soro fetal bovino (Cultilab). O crescimento pós-infecção foi feito no mesmo meio, sem o soro fetal bovino. A cada três dias, as células confluentes eram

repicadas de um frasco T para outro, pelo método de tripsinização e descolamento do tapete. Aproximadamente um sexto da quantidade de células inicial era passado a outro frasco e recebia 15,0 mL de meio de cultura novo. Os cultivos eram mantidos a 37 °C em atmosfera contendo 5% de CO₂.

3.3.4 Infecção com SFV-RVGP e amostragem para análise da expressão da RVGP e do *RVGPmRNA*

As células de mamífero foram infectadas em placas de cultivo com seis poços ou em frascos T 25cm². No dia anterior à infecção a viabilidade celular era determinada pelo método de exclusão com azul de Trypan. Cada poço da placa recebia 7×10^5 células em um volume de 1,5 mL de meio de cultura ($\sim 4,6 \times 10^5$ células/mL). Para os frascos T 25 cm² a quantidade de células era a mesma, porém o volume era de 3 mL ($\sim 2,3 \times 10^5$ células/mL). No dia seguinte, as células recebiam os volumes correspondentes às quantidades de SFV-RVGP desejadas.

Na etapa de infecção viral, primeiramente era retirado o meio de cultura contendo soro fetal bovino e adicionados 0,8 mL ou 2,0 mL de PBS estéril, em cada poço e em cada frasco respectivamente. Após agitação suave, o PBS era retirado e adicionado o vírus na quantidade desejada, previamente diluído em 1,0 mL ou 2,0 mL de meio α -MEM sem soro. Os cultivos permaneciam então à temperatura ambiente (24 °C $\pm$ 2 °C) durante duas horas, em agitador de Kline. Após esse período os cultivos eram recolocados a 37 °C em atmosfera contendo 5% de CO₂.

Em diferentes tempos após a infecção, as células eram descoladas pela utilização de PBS + EDTA 5 mM e incubação a 37 °C durante 5 minutos. A tripsina deixou de ser usada na amostragem pois foi verificado que sua utilização diminuía a concentração de RVGP presente. Após a determinação da concentração celular, eram retiradas amostras de no mínimo 3×10^5 células para o teste de ELISA-RVGP e 8×10^5 células para o teste de qRT-PCR. As amostras eram tratadas exatamente como o descrito para as células de inseto (**seção 3.1.6**).

Destaca-se apenas que as amostras destinadas à qRT-PCR tiveram seu RNA extraído e quantificado por fluorimetria, em triplicatas. Foi tomado um cuidado especial no sentido da quantificação desse RNA, pois a abordagem da quantificação absoluta, aplicada neste caso, exige uma normalização precisa pela quantidade de RNA total.

3.4 Desenho e verificação dos oligonucleotídeos

O objetivo da utilização da RT-PCR neste estudo, foi obter a amplificação dos cDNAs originados dos RNAs da *RVGP* (*RVGPmRNA*), da *Actina-42* de *Drosophila melanogaster* (*AcmRNA*) e de região da poliproteína não estrutural de SFV, a *gp1* (*SFV-RNA*).

Com o auxílio do aplicativo Primer design^R, foram desenhados oligonucleotídeos com base em critérios bem estabelecidos (Alkami guide for PCR, 1999). Utilizamos as seqüências do cDNA da *RVGP* cepa Pasteur (Tordo et al., 1986), do gene da actina 42A de *D. melanogaster* (Tobin, 1990) e das regiões nsp2 e nsp3 do gene *SFVgp1* da poliproteína não estrutural de Semliki Forest Vírus.

Para a *RVGP* foram desenhados cinco oligonucleotídeos, sendo três no sentido senso (*RVGP1a*, *RVGP5*, *RVGP9*) e dois no sentido anti-senso (*RVGPr1*, *RVGPr3*), todos próximos à terminação 3' do cDNA.

Para o gene da actina 42A foi utilizado como referência o trabalho de Southon et al. 2004, cujos oligonucleotídeos sugeridos foram analisados pelo alinhamento com a seqüência do gene através do aplicativo Clustal X (1.83), sendo então considerados adequados (*Ac42f* e *Ac42r*).

Para as regiões nsp2 e nsp3 do *SFVgp1* foram desenhados oito oligonucleotídeos, sendo quatro no sentido senso (*F-E-1*, *F-I-1*, *F-E-2*, *F-I-2*) e quatro no sentido anti-senso (*R-E-1*, *R-I-1*, *R-E-2*, *R-I-2*).

As características dos oligonucleotídeos sintetizados (IDT, Coralville) foram analisadas (OligoAnalyser, 2007) e podem ser consultadas no **Quadro 1**. As combinações dos oligonucleotídeos, os tamanhos dos fragmentos gerados e suas utilizações específicas estão descritos no **Quadro 2**. A avaliação da especificidade dos oligonucleotídeos em ensaios de PCR e RT-PCR encontra-se no **Apêndice B**.

Quadro 1 – Características dos oligonucleotídeos desenhados

Nome	Tamanho (bases)	GC (%)	Tm (°C)	Sequência
RVGP1a	18	61.1	56.4	TGGTTCCTCAGGCTCTCC
RVGP5	19	57.8	57.2	AGACAAGCTTGGTCCCTGG
RVGP9	19	57.8	55.2	CTGACTACCACTGGCTTCG
RVGPr1	21	47.6	54.5	TGTAATCGTGGTTAGTGGAGC
RVGPr3	19	63.1	59.9	AGCCGCAAGTCTCACTCCC
Ac42f	20	50.0	54.9	GCTTCGCTGTCTACTTTCCA
Ac42r	20	55.0	56.2	CAGCCCGACTACTGCTTAGA
F-E-1	19	52.6	55.7	TGTGTGCAGCATCCTTGAC
F-I-1	19	52.6	52.9	CAAGACCACAGACACTGTC
R-E-1	20	50.0	54.7	GAGGTCACTTACTTGCTGCT
R-I-1	19	52.6	55.0	GAGGACGCACAGAAGTTGT
F-E-2	19	52.6	54.1	TGTGCACCATCCTACAGAG
F-I-2	19	52.6	54.2	ACAGACTGTCACTGAGCAG
R-E-2	20	50.0	54.7	CTCAATGATGACGTGGAGCT
R-I-2	20	50.0	53.1	GTGACCATCTACTGCAGAGA

Quadro 2 – Combinações, tamanhos dos fragmentos e aplicações dos oligonucleotídeos

Senso	Anti-senso	Gene	Fragmento (bp)	Utilização
	RVGPr3 Ac42r R-E-2	<i>RVGP</i> <i>Actina</i> <i>gp1</i>		Transcrição reversa (RT)
RVGP1a	RVGPr3		683	PCR
RVGP5	RVGPr1	<i>RVGP</i>	503	PCR
RVGP9	RVGPr1		177	qPCR
Ac42f	Ac42r	<i>Actina</i>	105	PCR + qPCR
F-E-2	R-E-2	<i>gp1</i>	515	PCR
F-I-2	R-I-2		145	qPCR

3.5 Extração de RNA

O RNA total das células amostradas foi extraído pelo método do isotiocianato de guanidina-fenol-clorofórmio (Chomczynski & Scacchi, 1987), utilizando o reagente Trizol[®] (Invitrogen). Após o descongelamento, as amostras eram homogeneizadas com o reagente por pipetagem sucessiva e incubadas à TA (22-24 °C) durante cinco minutos. Em seguida 200 µL

de clorofórmio eram adicionados aos tubos e as amostras agitadas, vigorosa e manualmente durante 15 segundos, após o que eram novamente incubadas à TA durante cinco minutos. Após a incubação as amostras eram centrifugadas (12000 g /15min /4 °C) para a separação das fases aquosa e orgânica. Eram retirados 300 µL da fase aquosa e depositados em um tubo contendo 500 µL de isopropanol e em seguida a amostra era incubada à TA durante 10 minutos. Após nova centrifugação (12000 g /10min /4 °C) formava-se um precipitado celular com a aparência de gel que, removido o sobrenadante, era lavado uma vez com 1,0 mL de etanol 75%, antes de ser submetido à secagem (TA) e à ressuspensão com 20 µL de água livre de DNase e RNase (10min /55 °C). A suspensão de RNA sempre foi imediatamente submetida às etapas seguintes de processamento.

3.6 Extração de DNA

O DNA foi extraído utilizando-se o mesmo método descrito para a extração do RNA, com a diferença de que se trabalha com a fase orgânica a partir da etapa de separação das fases. À fase orgânica então, se adicionava 300 µL de etanol puro e se misturava por repetidas inversões. Após breve incubação (3min /TA) o DNA era precipitado por centrifugação (2000 g /5min /4 °C) e o sobrenadante removido. O precipitado era lavado duas vezes com 1,0 mL de citrato de sódio 1 M em etanol 10%, com um tempo de molho de 30 minutos a cada lavagem, acompanhado de homogeneização periódica. Após nova centrifugação (2000 g /5min /4 °C), o DNA era ressuspensionado em 1,5 mL de etanol 75% (10min /TA). Procedia-se com uma nova centrifugação (2000 g /5min /4 °C), retirava-se o sobrenadante e secava-se o precipitado ao ar. Para finalizar, o DNA era dissolvido em 100 µL de NaOH 8 mM pH 9,0 e estocado a -20 °C não mais que um mês.

3.7 Quantificação do RNA total

3.7.1 Quantificação por espectrofotometria

Em uma parte do trabalho foi utilizado um espectrofotômetro (Gênese 10uv, Thermo Spectronic) para realizar a quantificação do RNA. As amostras eram diluídas à razão de 1:20 (5 µL + 95 µL) em água livre de DNase e RNase, e submetidas à leitura da absorbância a 280 nm, a 260 nm e a 270 nm em cubeta de quartzo. O valor obtido a 260 nm era então multiplicado pelo fator de conversão de absorbância em concentração de RNA (x40)

e pela diluição efetuada (x20), para determinar a concentração do RNA na suspensão original. O valor da razão entre as absorvâncias 260 nm/280 nm era avaliado para garantir a pureza das amostras, sendo que eram esperados valores entre 1,9 e 2,0 para garantir a ausência de proteínas contaminantes. A leitura da absorvância da amostra a 270 nm, era utilizada para determinar se as amostras estavam livres de contaminação por fenol, isto é, se a razão entre as absorvâncias 260 nm /270 nm estava próxima a 1,2 (Sambrook e Russell, 2001d). Para determinar se a relação entre a absorvância medida e a concentração de trabalho do RNA extraído e diluído era de linearidade (obedeciam à lei de Beer-Lambert), foi feita uma série de diluições de uma amostra de RNA e tomada sua absorvância. O gráfico resultante, apresentado na **Figura 3**, demonstra a linearidade da análise e, portanto, a possibilidade de trabalhar com a diluição da amostra para ajuste da concentração de RNA.

Figura 3 – Linearidade da diluição do RNA em relação à absorvância medida por espectrofotometria a 260 nm.

3.7.2 Quantificação por fluorimetria

Em outra parte do trabalho, a concentração de RNA total foi determinada através da utilização do reagente Quant-it RNA assay kit[®] e do fluorímetro Qu-bit[®] (Invitrogen). Esse reagente permite a quantificação em separado do RNA e do DNA presente em uma amostra qualquer. A performance da quantificação utilizando esse método foi avaliada em relação ao que vinha sendo obtido pela espectrofotometria, demonstrando que a correspondência entre ambos os métodos permitia a troca, sem prejuízo para a comparação dos experimentos.

A quantificação do DNA extraído foi sempre efetuada através da utilização do reagente Quant-it DSDNA HS assay kit[®] (Invitrogen) e do mesmo equipamento citado acima.

3.8 Tratamento com DNase

Para a remoção do DNA contaminante, presente em amostras de RNA, três microgramas do material (5 µL do RNA diluído a 0,6 µg/µL) eram tratados com três unidades de enzima DNase I (Promega) durante 30 minutos a 37 °C, na presença de inibidor de RNase (RNase-Out, Invitrogen). Terminado o período de incubação, a enzima era inativada pela elevação da temperatura a 65 °C por 10 minutos, na presença de inibidor enzimático à base de EGTA. O volume final da reação era de 20 µL e a concentração final de RNA de 150 ng/µL. O RNA livre de DNA era então imediatamente submetido à reação de transcrição reversa.

3.9 Transcrição Reversa

A etapa de transcrição reversa era realizada em duas etapas. Primeiramente, 600 ng de RNA tratado com DNase eram incubados a 65 °C durante 5 minutos, juntamente com 0,5 pmol de oligonucleotídeos anti-senso específico (RVGPr3 ou Ac42r), 10 mMol de dNTPs e 7,5 µL de água livre de DNase e RNase em um volume total de 13 µL. Em seguida a mistura era resfriada rapidamente no gelo e adicionados o tampão 5X (4 µL), o DTT 0,1M (2 µL) e 200 U (1 µL) da enzima transcriptase reversa M- MLV (Invitrogen), completando o volume de reação total de 20 µL. A reação era incubada a 37 °C durante 50 minutos para a síntese do cDNA da RVGP ou da Actina. A reação era interrompida a 70 °C durante 15 minutos. As amostras eram então armazenadas não mais que um mês a -20 °C até a análise.

3.10 PCR e Nested-PCR

A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi efetuada através da utilização de um kit comercial Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen), de acordo com as recomendações do fabricante. Assim, amostras de DNA ou de cDNA foram adicionadas à reação, juntamente com 20pmol de oligonucleotídeos senso e anti-senso, 10 mMol de dNTPs, 50 mMol de MgCl₂, uma unidade da enzima, tampão e água, em um volume final de 25 µL. Após poucas etapas de testes iniciais no termociclador (PTC-200, MJ Research) foi estabelecido o seguinte ciclo de amplificação para ambos os genes: 50 °C /2 minutos, 95 °C /2 minutos (95 °C /15 s, 55 °C /30 s, 72 °C /30 s) x 34, 72 °C /10 min. As mesmas condições

foram utilizadas nas reações de nested-PCR, sendo que as amostras eram provenientes da primeira PCR. As amostras para a amplificação do SFV-RNA, tiveram apenas a temperatura de anelamento modificada para 53 °C, o restante do ciclo permanecendo o mesmo.

Os fragmentos amplificados puderam ser visualizados através de eletroforese em gel de agarose 1% contendo 0,5 µg/mL de brometo de etídeo e revelação em transiluminador (TFX-20M, Life Technologies) sob luz ultravioleta e captura de imagem através de sistema fotodocumentador (DC290, Kodak) e análise com aplicativo (Alpha DigiDoc).

3.11 qRT-PCR

A RT-PCR quantitativa (qRT-PCR) foi desenvolvida no equipamento CHROMO4 Continuous Fluorescence Detector – Peltier Thermal Cyclers-200 (MJ Research), situado no laboratório de Imunogenética do Instituto Butantan. Foi utilizado o kit Platinum[®] Sybr[®] green qPCR supermix UDG (Invitrogen) para a execução das reações. Esse kit contém uma mistura de dNTPs, MgCl₂, Taq DNA polimerase e reagente intercalante de bases e fluorescente Sybr green, em tampão próprio, pronto para uso. Primeiramente era realizada a inclusão do par de oligonucleotídeos à mistura dada, seguida da distribuição de 9,5 µL dessa nova mistura a cada microtubo, posteriormente adicionavam-se 3 µL (90 ng) de amostra por tubo, totalizando 12,5 µL de volume total, em microtubos de 200 µL de capacidade (Optical tubes, Applied Biosystems). Terminada a distribuição das amostras, controles ou padrões, todos em triplicatas, os microtubos eram tampados com tampa especial para leituras ópticas (Optical caps, Applied Biosystems) e brevemente centrifugados (600 rpm /5 segundos) para coletar todo o volume no fundo do recipiente.

As amostras para amplificação dos fragmentos da *actina*, da *RVGP* e do SFV-RNA foram submetidas ao mesmo ciclo de amplificação já descrito (seção 3.10). A leitura da fluorescência emitida era feita uma vez a cada ciclo após a elevação da temperatura a 80 °C. Terminada a amplificação era determinado o ponto de dissociação dos produtos da PCR (“melting point”) através da elevação gradual da temperatura de 65 °C a 90 °C, com leitura a cada 1 °C de elevação. Para os fragmentos da *actina* e da *RVGP*, era esperada a temperatura de dissociação de 83 °C, para o fragmento do *SFVgpl* era esperada a temperatura de 85 °C. Em todas as análises foram submetidos à amplificação no mesmo ciclo, os cDNAs dos genes da *RVGP* e da *actina*, ou as amostras de SFV-RNA e os padrões para a construção da curva de quantificação.

3.12 qRT-PCR – Análise de dados

A análise dos dados de fluorescência capturados pelo aparelho foi feita através do aplicativo Opticon Monitor®, versão 2.03.5. Para a referida análise, o patamar de fluorescência, pelo qual passa a linha de amplificação exponencial (“threshold”), era definido pela estratégia de subtração do sinal de fundo (“baseline”) pelo método de média entre o sinal presente do ciclo número 1 ao ciclo número 12. Em seguida, através da visualização dos gráficos de amplificação suavizados (“smooth”) em escala logarítmica, conforme a pré-definição do aplicativo, podia-se fixar o patamar de fluorescência mais adequado, próximo ao início da curva exponencial de aumento da fluorescência. O ponto de intersecção entre a curva de amplificação da fluorescência e o patamar fixado é definido como ciclo de quantificação ou “cycle threshold” e é o parâmetro utilizado nas análises.

3.13 Padronizações da qRT-PCR para análise da quantidade de *RVGPmRNA* em amostras de células de inseto: Quantificação relativa

3.13.1 Determinação da melhor quantidade de cDNA a ser inserida na reação

Cinco amostras de cultivos de células S2AcRVGP2k tiveram seu RNA extraído, foram tratadas com DNase e submetidas à reação de transcrição reversa tanto para *RVGPmRNA* quanto para *AcmRNA*. As amostras de cDNA obtidas foram unificadas em dois tubos, um contendo o RVGPcDNA e o outro o AccDNA e suas concentrações medidas por espectrofotometria. Foram efetuadas diluições dos cDNAs de maneira que a concentração final de ácidos nucleicos nas reações, após a inserção de 3,0 µL de amostra, ficasse compreendida entre 160 ng/µL e 1,0 ng/µL, já que a maioria das referências trabalha com concentrações dentro desse intervalo. A reação de qPCR (seção 3.11) foi efetuada em triplicatas. A concentração de 7,2 ng/µL ou 90 ng de cDNA por reação de PCR foi definida como quantidade padrão, pois apresentou o aparecimento mais precoce da fase exponencial de amplificação, com uma consistente amplitude de reação, ou seja, com um pico elevado de fluorescência máxima, tanto para o gene alvo como para o controle endógeno (Nolan et al., 2006).

3.13.2 Determinação da melhor quantidade de oligonucleotídeos a ser inserida na reação

De maneira semelhante ao item anterior, cinco amostras de cultivos de células S2AcRVGP2k tiveram seu RNA extraído, foram tratadas com DNase e submetidas à reação de transcrição reversa tanto para RVGP quanto para Actina. As amostras de cDNA obtidas foram unificadas em dois tubos, um contendo o RVGPcDNA e o outro o AccDNA e a concentração das amostras medida por espectrofotometria. A concentração de cDNA foi ajustada de maneira a que, inserindo 3,0 μ L de amostra por reação, a concentração final de cDNA fosse 7,2 ng/ μ L. Em seguida os oligonucleotídeos RVGP9, RVGPr1, Ac42f, Ac42r foram diluídos de maneira a que fossem obtidos estoques de cada um nas seguintes concentrações: 3 μ M, 2 μ M, 1 μ M e 0,5 μ M. Foram testadas 36 diferentes combinações, entre as concentrações de oligos senso e anti-senso para cada gene. As concentrações finais de 200 nM para sentido senso e 300 nM para sentido anti-senso apresentaram os melhores resultados, tendo sido avaliados os seguintes critérios: ausência de dímeros, menor valor de Ct, maior nível final de fluorescência e ausência de sinal nos controles negativos (Nolan et al., 2006).

3.13.3 Determinação da eficiência de amplificação

Para a determinação da eficiência de amplificação dos cDNAs da RVGP e da Actina, foram realizadas diluições seriadas a partir de uma alíquota do estoque de cDNA (seção 3.13.1) e seguidas as instruções de Pfaffl, 2001. Como diluente foi utilizada uma suspensão contendo RNA isolado a partir de células Vero e tratado com DNase, sendo que a concentração de ácidos nucléicos totais nessa suspensão foi ajustada para a mesma concentração padronizada para a amostra. Assim, após a diluição seriada da amostra de cDNA proveniente de células S2AcRVGP2k, esta se encontrava com diferentes concentrações de RVGPcDNA ou AccDNA em uma mesma quantidade de ácidos nucléicos totais. Esse procedimento evita que ocorram diferentes performances de amplificação devido às diferentes concentrações de ácidos nucléicos nas preparações (Pfaffl e Hageleit, 2001). Diluições seriadas na base 10 foram efetuadas e as reações estabelecidas conforme o descrito anteriormente. Os resultados em Ct foram relacionados ao logaritmo da diluição das amostras e, no gráfico resultante, foi inserida uma regressão linear entre os pontos, obtendo assim a equação da reta “ $y = Sx + b$ ”, em que “S” é a inclinação da mesma. Com base nesse dado, substituiu-se “S” por seu valor correspondente na equação 2, encontrando as eficiências de amplificação de 2,13 e 2,23 para os genes da RVGP e da Actina respectivamente.

$$E = 10^{(-1/S)} \quad (2)$$

A eficiência da reação de amplificação, tanto para o gene alvo como para o gene de referência, é um parâmetro fundamental para a análise por qRT-PCR. Sua importância tem sido tão debatida, que não raro encontramos referências que defendem a explicitação dos valores nas publicações. Apresentamos na **Tabela 1** e **Figuras 4 e 5** as determinações das eficiências de amplificação para RVGP (2,13) e para actina (2,23).

Tabela 1 – Dados para a determinação das eficiências das reações

Gene	Diluição	Log da diluição	Ct médio	Desvpad
GPV	1	0	20,75	0,10
	0.1	-1	23,59	0,57
	0.01	-2	26,48	0,75
	0.001	-3	29,58	0,11
	0.0001	-4	32,98	0,26
	0.00001	-5	32,66	0,54
	0.000001	-6	31,64	0,06
	controle -			
Actina	1	0	22,61	0,79
	0.1	-1	24,80	0,43
	0.01	-2	27,58	0,14
	0.001	-3	30,37	0,68
	0.0001	-4	34,17	0,67
	0.00001	-5	36,25	3,33
	0.000001	-6	35,73	
	controle -

Figura 4 – Eficiência da amplificação do RVGPcDNA. A eficiência é obtida a partir da inclinação da regressão linear traçada sobre os valores de Ct medidos e o logaritmo da diluição correspondente

Figura 5 – Eficiência da amplificação do AccDNA. A eficiência é obtida a partir da inclinação da regressão linear traçada sobre os valores de Ct medidos e o logaritmo da diluição correspondente

3.13.4 Validação da qRT-PCR

A reação de qRT-PCR foi validada após as etapas de padronização, em busca de gerar maior confiança nos resultados obtidos.

3.13.4.1 Reprodutibilidade intra-ensaios

Três amostras de células S2AcRVGP2k contendo 3×10^6 células foram misturadas e em seguida aliquotadas em volumes iguais em três microtubos diferentes. Em seguida foram submetidas aos procedimentos normais de extração do RNA, tratamento com DNase e realização da transcrição reversa. O mesmo volume de cada cDNA sintetizado foi inserido em triplicatas em uma mesma corrida de qPCR. Assume-se que partindo da mesma preparação original, a variabilidade da resposta da amplificação deve ser mínima e devida às variações intrínsecas ao procedimento de manipulação das amostras. Os desvios padrão, relativos aos Cts, encontrados para as nove replicatas foram de 1,06 para a amplificação do *RVGPmRNA* e de 0,94 para a amplificação do *AcmRNA*.

3.13.4.2 Reprodutibilidade inter-ensaios

Três amostras de células S2AcRVGP2k contendo 3×10^6 células foram misturadas e em seguida aliquotadas em volumes iguais em três microtubos diferentes. Em seguida foram submetidas aos procedimentos normais de extração do RNA, tratamento com DNase e realização da transcrição reversa. Duas alíquotas foram congeladas a -20°C , enquanto uma foi analisada por qPCR. Nos dois dias subsequentes, as outras duas alíquotas foram analisadas, uma em cada dia, sendo que o volume de amostra inserido foi sempre o mesmo ($3 \mu\text{L}$). A

reprodutibilidade inter-ensaios depende não apenas da manipulação da amostra em relação às suas amostras-irmãs, mas também da variação intrínseca ao sistema de análise. Os desvios padrão, relativos aos Cts, entre as nove replicatas foram de 1,84 para a amplificação do *RVGPmRNA* e de 1,56 para a amplificação do *AcmRNA*.

3.13.4.3 Sensibilidade

A sensibilidade da análise de qRT-PCR era preocupação secundária no desenvolvimento do projeto, pois não havia o interesse de quantificar a presença de *RVGPmRNA* em concentrações muito baixas, uma vez que não havia limitação de amostra. Ainda assim a sensibilidade pode ser expressa pela capacidade de se quantificar a maior diluição do padrão utilizado para a construção da curva de quantificação, ou seja, 300 cópias para ambos os genes.

3.13.5 Modelo matemático para cálculo da quantificação relativa (Pfaffl, 2001)

Para efetuar o cálculo da quantidade relativa de *RVGPmRNA* presente nas diferentes amostras, foi utilizado o modelo matemático (Equação 3) descrito em Pfaffl, 2001. Este modelo permite o cálculo da quantidade do gene alvo em uma dada amostra em relação à quantidade do mesmo gene em uma amostra normalizadora. Além disso, o modelo prevê a correção de variações na qRT-PCR devidas à imprecisão da quantidade de material inserido, através da consideração da amplificação também do gene de referência. Finalmente, o modelo se ajusta bem aos casos em que, as eficiências de amplificação entre gene alvo e gene de referência diferem de forma que não podem ser consideradas equivalentes, portanto ambas são consideradas nos cálculos.

$$R = \frac{(E_{RVGP})^{(Ct_{calibrador} - Ct_{amostra})}}{(E_{actina})^{(Ct_{calibrador} - Ct_{amostra})}} \quad (3)$$

Nessa equação, **R** é a quantidade relativa de mRNA da amostra em relação ao calibrador escolhido, E_{RVGP} e E_{actina} são as eficiências da reação de amplificação para os

genes da RVGP e da actina respectivamente. No numerador são introduzidos os dados relativos à amplificação da RVGP e no denominador são introduzidos os dados relativos à amplificação da actina.

A amostra de calibração foi definida de duas maneiras. Na maioria das situações o calibrador escolhido foi a quantidade dos RNAs presentes no momento inicial de cada cinética individualmente. Em outras situações, quando eram estudados os efeitos de diferentes condições de cultivo sobre a expressão dos RNAs, o calibrador escolhido foi a amostra do início do cultivo nas condições padrões.

3.14 Obtenção dos padrões para a construção da curva padrão pra a quantificação absoluta do *RVGPmRNA*

A abordagem de quantificação absoluta do mRNA, isto é, a determinação do número de cópias da molécula em uma amostra, foi feita com base em uma curva-padrão, construída a partir da clonagem de fragmento oriundo da amplificação do cDNAs da RVGP, em vetor de clonagem de fragmentos de PCR pGEM-T Easy (Promega). As etapas da construção do padrão RVGP e Actina estão detalhadas no **Apêndice C**.

Os vetores contendo os fragmentos de interesse foram purificados a partir de culturas de *E. coli*, tratados com RNase (10 µg/mL) a 37 °C /1 h, submetidos à digestão por enzima de restrição *Adh I* para linearização, quantificados por espectrofotometria (Nanodrop) e diluídos para a obtenção de diversas quantidades de cópias em um mesmo volume de 3 µL de padrão (3×10^8 , 3×10^7 , 3×10^6 , 3×10^5 , 3×10^4 e 3×10^3 cópias). A solução estoque e os padrões diluídos e aliquotados foram armazenados a -20 °C até o momento do uso.

Foi realizada uma série de amplificações da curva de quantificação para determinar sua reprodutibilidade. Foi encontrada uma eficiência de amplificação de 2,02 para os padrões da RVGP, muito próxima da eficiência de amplificação para as amostras (**seção 3.13.3**). A reprodutibilidade intra ensaio foi de $0,31 \pm 0,05$ e a reprodutibilidade entre ensaios de $0,87 \pm 0,15$, ambas demonstram que a curva de quantificação obtida estava adequada para a utilização.

3.15 Desenvolvimento metodológico

Esta seção de Materiais e Métodos se destina ao detalhamento dos métodos utilizados no desenvolvimento de duas metodologias: uma reação de qRT-PCR para a titulação

de amostras de vírus SFV e uma metodologia de preparação de amostras para a quantificação da RVGP por ELISA.

No caso da titulação do SFV, trata-se de uma nova proposta metodológica inovadora para realizar a determinação do título viral não apenas de construções SFV-RVGP, mas de qualquer construção SFV.

No caso da metodologia de preparação de amostras para a quantificação da RVGP por ELISA, estudamos em muitos ensaios e durante um longo período, métodos de congelamento, descongelamento e lise das células de inseto, para obter uma preparação adequada à quantificação da RVGP expressa em seu estado trimérico.

3.15.1 Utilização da qRT-PCR para a titulação de SFV

3.15.1.1 Construção da curva padrão

Para a construção da curva padrão para a quantificação do SFV-RNA, foi utilizado o plasmídeo pSFV-RVGP, normalmente utilizado para a obtenção do RNA do SFV por transcrição *in vitro* e posterior co-transfecção com o RNA-Helper em células BHK-21.

O pSFV-RVGP foi amplificado em bactéria e purificado em coluna de extração (Maxi-prep, Qiagen), tratado com RNase livre de DNases e pré-quantificado por espectrofotometria. Em seguida, uma quantidade determinada de plasmídeo foi submetida à digestão com a enzima Not I para linearização. O plasmídeo linearizado foi então submetido à PCR para verificar a eficiência da linearização. Posteriormente, o plasmídeo foi quantificado para se obter a concentração de DNA presente na preparação e, com base nos cálculos da quantidade de cópias da região alvo desejadas, foram feitas cinco diluições (água + EGTA 1 mM) para a obtenção dos padrões da curva de quantificação contendo 3×10^8 , 3×10^7 , 3×10^6 , 3×10^5 , 3×10^4 ou 3×10^3 cópias a cada 3 μ L da preparação.

Cada análise de quantificação absoluta do número de cópias era acompanhada pela corrida de uma curva-padrão. Os padrões eram sempre corridos em triplicatas, a exemplo das amostras e controles.

3.15.1.2 Análise da curva padrão

Após a obtenção dos plasmídeos purificados e quantificados e da verificação dos oligonucleotídeos sintetizados, visando à amplificação da região Ns3 do gene *SFVgp1* do SFV, foi feita uma série de quatro amplificações, em triplicatas, das diluições do padrão.

As características da curva padrão obtida são apresentadas na **seção 4.1.2** de “Resultados”.

3.15.1.3 Extração do RNA de amostras de SFV

Para realizar a extração do RNA a partir de amostras virais, foi utilizado o reagente Trizol LS[®], contendo glicogênio a 33 µg/mL. O protocolo de extração utilizado foi o mesmo utilizado anteriormente (**seção 3.5**).

Primeiramente foram testados três volumes de amostra de SFV-RVGP (50 µL, 100 µL e 200 µL), de maneira a determinar um tamanho de amostra compatível com o método e com quantidade suficiente de material para a análise. A melhor performance de amplificação pela qRT-PCR foi para a amostra de 100 µL.

Como era fundamental saber qual o rendimento da etapa de extração, para posteriormente extrapolar os valores dos números de cópias nas preparações originais, introduzimos em cada amostra, no início de cada processo de extração, a quantidade de 3 µg de RNA total extraído de células BHK-21 não infectadas. Dessa forma, após o processo de extração, era possível quantificar o RNA total extraído e calcular a perda durante o processo.

3.15.1.4 Utilização da metodologia para a quantificação de amostras de SFV

Para validar a metodologia de quantificação de amostras de SFV, foram efetuados alguns experimentos.

3.15.1.4.1 Titulação de amostras de diferentes SFV

Diferentes amostras de SFV foram utilizadas para a validação da qRT-PCR:

SFV-Mta-1-YFP lote 1

SFV-Mta-1-YFP lote 2

SFV-Ala-80-YFP

SFV-20A2-GFP

SFV-RVGP

Todas as construções codificam para proteínas de membrana e foram gentilmente cedidas pelo Dr. Renaud Wagner do departamento de Récepteurs et protéines membranaires da Université de Strasbourg. As proteínas expressas por esses vírus são: GPCR (G-protein coupled receptor) Melatonina A 1 com YFP (“yellow fluorescent protein”) conjugada no C-terminal (SFV-Mta-1-YFP); GPCR Adenosina A2A deletada da parte C-terminal (-80 aa), com YFP conjugada no C-terminal (SFV-Ala-80-YFP); GPCR Adenosina A2A “wild-type”, com GFP conjugada no C-terminal (SFV-20A2-GFP) e finalmente a Glicoproteína do vírus rábico (SFV-RVGP).

Cada preparação viral foi titulada em duplicatas, seguindo a metodologia de extração do RNA e de qRT-PCR já descritas anteriormente (**seção 3.5 e seção 3.11**).

Após a obtenção do resultado da qRT-PCR e do cálculo dos títulos virais, com base na equação da curva de quantificação, o número de cópias do SFV-RNA era determinado multiplicando-se o resultado da titulação pelas diluições efetuadas e pelo rendimento do processo de extração:

$$\text{Número de cópias} = A \times B \times C \times D \times R$$

Em que:

A = resultado da qRT-PCR, ou o número de cópias de cDNA em 3 µL de amostra de RT

B = conversão para o número de cópias de cDNA no volume total da RT (x20/3)

C = conversão para o número de cópias de RNA tratado com DNase (x20/5)

D = conversão para o número de cópias de RNA após a extração (x10/5)

R = fator de correção pelo rendimento do processo de extração (ex. rendimento de 40%, R = 1,4).

3.15.1.4.2 Titulação de amostras de SFV-RVGP submetidas a tratamento de temperatura

Uma mesma preparação de SFV-RVGP foi separada em 5 diferentes amostras e cada qual recebeu um tratamento diferenciado. A amostra controle foi recolocada a -20 °C, e as demais deixadas a 24 °C durante 1h ou 3h ou a 37 °C durante 1h ou 3h. Em seguida as

amostras foram recolocadas a -20 °C e descongeladas no momento de sua utilização para a titulação ou para a infecção de células BHK-21.

Cada preparação viral foi titulada em quintuplicatas, seguindo a metodologia de extração do RNA e de qRT-PCR já descritas anteriormente (**seção 3.5 e seção 3.11**).

No momento da infecção foram calculados os volumes necessários de cada amostra, para se obter as razões de infecção (**ROI**) desejadas.

A expressão da RVGP nas células infectadas foi analisada por ELISA (**seção 3.16**).

3.15.2 Padronização da conservação e lise das células de inseto para a quantificação da RVGP por ELISA (Astray et al., 2008)

Com a finalidade de utilizar o teste de ELISA comercializado pelo Instituto Pasteur (Rabies Glycoprotein Enzyme Immunoassay, Institute Pasteur – França), para a quantificação da RVGP expressa nas células de inseto, obtendo um resultado confiável nas análises, foi necessário realizar um extenso trabalho de padronização do tratamento das amostras de células, uma vez que os resultados apresentados até então pela dosagem de RVGP em amostras do grupo temático (Expressão de genes heterólogos em células de dípteros: Biologia molecular e engenharia de processos, FAPESP 02/09482-3) careciam de reprodutibilidade e apontavam para uma possível subestimação do nível real de RVGP produzida pelo sistema. O estudo descrito a seguir e nas demais subdivisões desta tese foi publicado na forma de artigo científico na revista *Biotechnology Journal*, volume 3, páginas 98-103, 2008 (**Anexo A**).

3.15.2.1 Cultivos de células S2 selvagens e recombinantes

Foram utilizadas células S2, S2AcRVGP2 e S2AcRVRVGP2k. O cultivo foi realizado no meio SF900-II (Invitrogen), em frascos T durante 5 dias. As células foram então coletadas separadamente, centrifugadas a 100 g /5 minutos (ou em uma variação testada de 900 g /3 minutos), ressuspensas em PBS e tiveram sua concentração determinada em hemacitômetro. Alíquotas de um mesmo lote foram distribuídas em diversas quantidades (10^5 , 5×10^5 , 10^6 , 5×10^6 , 10^7 , 2×10^7 e 3×10^7 células) em microtubos. As suspensões celulares foram então submetidas a centrifugação 900 g /3 minutos e o sobrenadante foi descartado. As células

foram então congeladas a -20 °C como pellet seco, ou células ressuspensas nos tampões B1 a B4 ou ainda como lisados celulares em tampões de lise LB1 a LB4.

3.15.2.2 Determinação do melhor método de lise

O parâmetro considerado para a definição do melhor método de lise, foi a quantidade de RVGP apropriadamente extraída das células de inseto. Esse valor foi obtido através da quantificação da RVGP nas amostras de lisados celulares por ELISA e da expressão do valor em termos de ng / 10⁷ células.

3.15.2.3 Lise utilizando agente químico

As formulações dos tampões e tampões de lise utilizados neste estudo encontram-se no **Quadro 3**.

Quadro 3 - Formulação dos tampões de lise

Tampão de lise (LB)			
	Tampão (B)	Detergente (%)	Referência
1	50mM Tris, 150mM NaCl, 10% glicerol, 4mM EDTA, 1mM PMSF, pH 7.4	CHAPS (1%)	[15]
2	50mM Tris, 150mM NaCl, 1mM PMSF, pH 7.4	NP40 (1%)	RIPA (modificado)
3	25mM Tris HCl, 137mM NaCl, 5mM KCl, 0,7mM Na ₂ PO ₄ , 1mM PMSF, pH 7.4	CHAPS (1%)	[16]
4	25mM Tris, 25mM NaCl, 5mM MgCl ₂ , 1mM PMSF, pH 7.4	NP40 (0.2%)	[17]

CHAPS 3-((3-Cholamidopropyl)dimethylammonio)-1-propanesulfonate; NP-40, Nonidet P-40, Octylphenyl-polyethylene glycol; PMSF, Phenylmethanesulfonyl fluoride. RIPA, Radioimmunoprecipitation assay buffer modificado para lise de células de inseto de acordo com as recomendações da empresa Invitrogen

Esses tampões de lise foram definidos com base em trabalhos científicos já publicados e que tratavam ou da extração protéica a partir de células de inseto ou da extração da RVGP a partir de sistemas de expressão em células animais.

A lise das amostras de células foi feita usando quatro métodos diferentes, sempre utilizando reagentes frios (~ 4 °C): (1) Pellets celulares foram descongelados pela incubação com 0,5 mL de tampão (B1-B4) durante um minuto, seguida da adição de 0,5 mL do tampão de lise correspondente (LB1-LB4), com o dobro da concentração final de detergente. (2) Pellets celulares foram descongelados pela incubação à temperatura ambiente por alguns segundos, seguida da adição de 1 mL de tampão de lise. (3) Amostras de células congeladas em 0,5 mL de tampão (B1-B4) foram descongeladas à temperatura ambiente, em seguida foram adicionados 0,5 mL do seu tampão de lise correspondente (LB1-LB4), contendo o dobro da concentração final de detergente. (4) Amostras de lisado celular, obtidas pela incubação do pellet com o tampão de lise durante uma hora a 4 °C antes do congelamento, foram descongeladas a 4 °C logo antes da análise. Excetuando as amostras destinadas à avaliação da armazenagem em tampão de lise (4), as demais foram homogeneizadas em vortex durante 10 segundos e mantidas a 4 °C durante uma hora, com agitação periódica a cada 15 minutos, para efetuar o processo de lise. Em seguida, todas as amostras foram centrifugadas a 10.000 g durante 5 minutos e os sobrenadantes analisados.

3.15.2.4 Lise utilizando agente mecânico – sonicação

Amostras de pellet celulares foram descongeladas pela adição de PBS (4 °C, pH 7,4) contendo 1 mM de PMSF, homogeneizadas em vórtex e submetidas a três pulsos de sonicação de 6 segundos cada, à frequência de 75 Hz (Vibra Cell - Sonics & Materials), intercalados por banho de gelo de 30 segundos. O protocolo de sonicação foi estabelecido pela observação da lise celular através de microscopia ótica. Após a lise, as amostras foram centrifugadas a 10000 g por 5 minutos, para a remoção dos debris celulares antes da análise.

3.15.2.5 Lise utilizando agente físico – choque de temperatura

Amostras de pellet celulares foram descongeladas pela adição de tampão gelado (50 mM NaH₂PO₄, 500 mM NaCl, 1 mM PMSF, pH 8,0). As amostras foram então submersas em nitrogênio líquido durante 2 minutos e em seguida colocadas em banho-maria a 42 °C durante 5 minutos. O processo foi repetido duas vezes, após o que, as células foram centrifugadas a 10.000 g durante 5 minutos e os sobrenadantes analisados.

3.16 ELISA para a quantificação da RVGP (Perrin et al., 1996)

3.16.1 Reagentes

- Anticorpos monoclonais para a sensibilização das placas (IgG-D1):
Imunoglobulina anti-sítio III da glicoproteína rábica
- Anticorpos monoclonais conjugados com peroxidase (igG-D1-Po):
Imunoglobulina idêntica à utilizada para a sensibilização das placas, conjugada com peroxidase
- Antígeno de referência: Vírus rábico (linhagem Pasteur) inativado, purificado e liofilizado, apresentando 10 µg de RVGP.

3.16.2 Soluções

- Tampão carbonato 0,05 M pH 9,6: solução de bicarbonato de sódio 0,05 M, com pH 9,6 ajustado com solução de carbonato de sódio 0,05 M.
- Tampão de bloqueio: 0,3% albumina de soro bovino (BSA) + 5% sacarose em tampão carbonato pH 9,6.
- Tampão PBS pH 7,0 concentrado 10x
- Tampão de lavagem: PBS + 0,005% Tween 20
- Tampão de diluição: PBS + 0,05% Tween 20 + 0,5% BSA pH 7,0
- Tampão citrato pH 5,6: Citrato de sódio + ácido cítrico + 0,1% peróxido de hidrogênio 40 v.
- Solução de substrato cromógeno: Tampão citrato + orto-phenylene diamine (2 mg/mL)
- Solução de parada: Ácido sulfúrico 4 N

3.16.3 Preparação das amostras

A correta preparação das amostras demandou extensa etapa de padronização (**seção 3.15.2**) como pode ser observado no artigo anexado (Astray et al., 2008). A seguir está descrito o método estabelecido, que foi utilizado para as amostras dos estudos cinéticos da produção da RVGP.

As amostras de células mantidas a -20°C foram submetidas às seguintes etapas: descongelamento a 4°C , adição de 500 μL de tampão 4, homogeneização, adição de 500 μL de tampão de lise 4, nova homogeneização e incubação a 4°C durante uma hora com homogeneização a cada 15 minutos. Terminado o tempo de incubação as amostras foram submetidas à centrifugação a 12.000 g durante 10 minutos para a separação dos debris celulares. Este sobrenadante foi aplicado na reação no volume de 200 μL em duplicatas. O sobrenadante de cultivo foi tratado da mesma maneira que o precipitado celular, sendo que seu volume inicial era de 300 μL .

3.16.4 Procedimento de análise

As placas eram sensibilizadas (3h a 37°C) com anticorpos monoclonais, específicos para o sítio III antigênico da RVGP em seu estado trimérico. Em seguida eram bloqueadas com solução de bloqueio (30min a 37°C) e lavadas 5x com tampão de lavagem. As amostras, o controle negativo (lisado de células S2 não transfectadas) e o antígeno de referência em tampão de diluição nas concentrações de 7,8 ng/mL, 14,6 ng/mL, 31,2 ng/mL, 62,5 ng/mL, 125 ng/mL, 250 ng/mL e 500 ng/mL eram incubados (1h a 37°C) para a ligação da RVGP aos anticorpos aderidos à placa. Após cinco lavagens, a placa recebia o anticorpo monoclonal anti-RVGP conjugado com peroxidase, em tampão de diluição (1h a 37°C). Em seguida a placa era lavada por seis vezes e a solução de cromógeno adicionada. A reação era então incubada no escuro (30min a 22°C), desenvolvendo coloração alaranjada após a adição da solução de parada. A absorbância era lida no comprimento de onda de 492 nm em leitor de microplacas (Multiskan MJ-Labsystems). Os cálculos para a obtenção da concentração de RVGP presente foram realizados através da comparação da absorbância das amostras com a curva de referência.

3.17 Imunofluorescência

A marcação era feita através da adesão das células de inseto à lâmina (TA/10 minutos), retirada do sobrenadante, fixação da amostra (0°C /10 min) com 20 μL de acetona 80% em PBS. Após a lavagem com PBS, foi feita uma nova incubação (37°C /1h) com 50 μL de anticorpo monoclonal IgG-D1 conjugado com fluoresceína (Yokomizo, 2006), diluído 1:400 em solução de azul de Evans 0,02% em PBS. Em seguida as lâminas eram abundantemente lavadas com solução de PBS e recebiam uma gota de PBS + glicerol 50%,

antes de ser colocada a lamínula. As amostras eram mantidas no escuro até o momento da visualização em microscópio de fluorescência (BX51, Olympus) ou ainda em microscópio confocal (**seção 3.20**). Cada amostra foi fotografada em filme fotográfico ou imagem digital após a visualização de toda a lâmina e a eleição de uma região representativa. Algumas amostras, devido à dificuldade em estabelecer uma região representativa foram fotografadas mais de uma vez.

3.18 Microscopia confocal

Amostras de células de mamíferos provenientes da infecção com SFV-RVGP foram obtidas através do crescimento e infecção das células em lamínula. A lamínula uma vez retirada da placa de cultivo foi tratada exatamente como o feito para as células de inseto nos ensaios de imunofluorescência, com exceção da primeira etapa de adesão à lamínula. As amostras foram analisadas no microscópio confocal Zeiss LSM 510 Meta.

3.19 Citometria de fluxo (FACs)

Amostras contendo 10^6 células foram centrifugadas (1000 g /5 min) e o sobrenadante descartado. Os precipitados celulares foram incubados (4 °C /30 min) com 50 µL de anticorpo monoclonal D1 anti-RVGP conjugado com fluoresceína diluído 1:400 em PBS + 2% de soro fetal bovino (SFB). Após a ligação dos anticorpos às células expressando a RVGP, as amostras eram centrifugadas (1000 g/ 5 min), o sobrenadante retirado e enfim ressuspendidas em PBS + 0,2% de p-formaldeído, para leitura imediata ou armazenamento ao abrigo da luz e leitura em até cinco dias. As análises da proporção de células fluorescentes e da mediana de fluorescência eram realizadas no aparelho FACSCalibur (Becton Dickinson), a partir da contagem de 10.000 eventos para cada amostra.

3.20 Ensaios *in vivo*

Uma série de ensaios de imunização de camundongos Balb/c foi feita com preparações de células S2AcRVGP2k ou S2MtRVGP-Hy e preparações de vírus SFV-RVGP. Esses ensaios consistiram na avaliação da produção de anticorpos (antigenicidade) contra a RVGP e na proteção dos animais contra o desafio com vírus rábico (imunogenicidade).

Os ensaios contaram com a colaboração do Laboratório de Imunogenética, do Laboratório de Raiva do Centro de Controle de Zoonoses do município de São Paulo (CCZ) e da empresa Dalian JA (DJA), Ltd situada em Dalian, China.

Os ensaios *in vivo* foram aprovados pela “Comissão de ética no uso de animais do Instituto Butantan (CEUAIB)” em 12/03/2008, protocolo 433/07.

3.20.1 Análise da produção de anticorpos anti-RVGP pela imunização com SFV-RVGP

Foram realizados uma série de três ensaios, utilizando de 10 a 12 camundongos Balb/c de ambos os sexos, com três semanas de vida.

Os camundongos foram imunizados 3 vezes (dias 0, 7, 14) com $8,3 \times 10^6$ SFV-RNA ativado, vacina antirábica (Biovet, Brasil) ou PBS para os animais controle negativo. As amostras de sangue foram coletadas por sangria retrorbital 7 dias após a última inoculação nos três ensaios. No último ensaio foi feita a análise dos títulos de anticorpos nos dias 7, 14 e 21 após a primeira inoculação. Após a sangria, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical. As amostras de soro, obtidas após a coagulação do sangue e a centrifugação para a separação das fases, foram armazenadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o momento da análise.

Os títulos de anticorpos anti RVGP foram dosados por ELISA, utilizando o Platelia® Rabies II kit (Bio-Rad). Neste teste, as amostras de soro são diluídas em tampão próprio e aplicadas em uma placa contendo glicoproteína do vírus rábico adsorvida (fornecida no kit). Após incubação e lavagem, é adicionado o conjugado enzimático proteína A (*S. aureus*) conjugada com enzima peroxidase. A reação é completada pela adição de H_2O_2 (0,015%) e dimetilsulfoxido (DMSO, 4%) para o desenvolvimento da coloração. As absorbâncias são lidas a 492 nm. Valores acima de 0,5 unidades internacionais por mL (UI/mL) são considerados como soroconversão suficiente.

Esse kit ainda está sendo avaliado pelas autoridades sanitárias brasileiras para a determinação da equivalência ao teste estabelecido nacionalmente, principalmente pela existência de relatos divergentes sobre sua capacidade de dosar apenas anticorpos neutralizantes ou anticorpos anti-RVGP totais (Servat, et al., 2006; Niederhauser et al., 2008).

Este experimento foi realizado em parceria com os pesquisadores do Laboratório de Imunogenética do Instituto Butantan.

3.20.2 Análise da produção de anticorpos neutralizantes pela imunização com SFV-RVGP e com S2 recombinante e sobrevivência ao teste de desafio com vírus rábico.

Foram utilizados 40 camundongos Balb/c de ambos os sexos, com três semanas de vida.

Os camundongos foram imunizados 3 vezes (dias 0, 7, 14) com $8,3 \times 10^6$ SFV-RNA ativado, vacina antirábica (Biovet, Brasil), células S2AcRVGP-2k na quantidade correspondente a 0,06 µg ou 0,3 µg de RVGP ou PBS para os animais controle negativo. As amostras de sangue foram coletadas por sangria retrorbital sob anestesia com ketamina, 7 dias após a última imunização. As amostras de soro foram obtidas como o descrito na **seção 3.20.1**.

Após a retirada das amostras de sangue, os animais foram submetidos ao teste de desafio à infecção intracerebral com vírus rábico. Os animais foram inoculados com uma dosagem de $30 \times \text{DL}_{50}$ de vírus rábico CVS (Challenge Virus Standard) e observados durante 30 dias, iniciando no 21º dia após a primeira imunização. Os animais sobreviventes foram anestesiados, tiveram seu sangue coletado e então foram sacrificados com doses elevadas de ketamina.

Os títulos de anticorpos neutralizantes foram dosados imediatamente antes e 30 dias após o desafio por técnica sorológica estabelecida mundialmente e padronizada no CCZ.

O teste sorológico utilizado é o “Teste de rápida inibição do foco de fluorescência” (RIFFIT). Resumidamente, diluições da amostra de soro em meio de cultura são distribuídas em lâminas de cultura com 8 poços, posteriormente é adicionada uma quantidade padrão do vírus rábico CVS a cada diluição. A mistura é mantida a 37 °C durante 90 minutos, em seguida são adicionadas células BHK-21 (5×10^4 células /0,2 mL). O cultivo é então incubado a 35 °C durante 20h. Após a incubação, as lâminas são lavadas, fixadas com acetona gelada (-20 °C) durante 10 minutos à temperatura ambiente, secadas ao ar, e tratadas com soro anti-rábico conjugado com isotiocianato de fluoresceína. As lâminas são incubadas a 37 °C durante 20 a 30 minutos e posteriormente lavadas com PBS. Por meio da observação das lâminas ao microscópio de fluorescência, é possível determinar a maior diluição do soro na qual 50% dos campos microscópicos contem um ou mais células infectadas (ou 97% de redução no inóculo viral). O cálculo do título em unidades internacionais (UI) é realizado por comparação com o título do soro padrão de referência nacional incluído em cada teste.

Este experimento foi realizado em parceria com as pesquisadoras do CCZ.

3.20.3 Análise da produção de anticorpos anti-vírus rábico pela imunização com SFV-RVGP e com S2 recombinante e sobrevivência ao teste de desafio com vírus rábico.

Foram utilizados 140 camundongos Balb/c de ambos os sexos, com três semanas de vida.

Os camundongos foram imunizados 3 vezes (dias 0, 7, 14) com $1,9 \times 10^7$ SFV-RNA ativado, vacina antirábica (DJA, China), células S2AcRVGP-2k na quantidade correspondente a 0,2 µg de RVGP contendo ou não o adjuvante à mesma concentração utilizada na formulação da vacina comercial da empresa DJA ou PBS para os animais controle negativo. As amostras de sangue foram coletadas de metade dos animais por punção endovenosa e nos dias 14, 21, 28 e 35 após o início da imunização. As amostras de soro foram obtidas como o descrito na **seção 3.20.1**.

A outra metade dos animais imunizados foi submetida ao teste de desafio à infecção intracerebral com vírus rábico. Os animais foram inoculados com uma dosagem de 30 x DL₅₀ de vírus rábico CVS (Challenge Virus Standard) e observados durante 30 dias, iniciando no 21^º dia após a primeira imunização.

Nas amostras de soro foram dosados os títulos de anticorpos anti-vírus rábico total, o que inclui anticorpos contra outras proteínas virais, por metodologia de ELISA estabelecida na empresa. São considerados como soroconversão suficiente, valores de densidade óptica (DO) maiores que 0,5.

3.21 Análises estatísticas

Quando foi necessário, os dados foram analisados estatisticamente utilizando o aplicativo Minitab[®] 15.1.30.0 Statistical software (Minitab Inc.).

Para os dados das cinéticas de produção da RVGP e do *RVGPmRNA*, assim como as cinéticas de produção de anticorpos foi utilizado o teste T de Student entre duas amostras diferentes, ou pareado no caso da análise da produção de anticorpos antes e após o teste de desafio com vírus rábico, sempre com intervalo de confiança de 95% ($P < 0,05$).

Para os dados de sobrevivência ao teste de desafio com vírus rábico foi utilizado o teste exato de Fisher bi-caudal, com intervalo de confiança de 95% ($P < 0,05$).

4 RESULTADOS

4.1 Desenvolvimento Tecnológico

4.1.1 Padronização do preparo de amostras para ELISA-RVGP (Astray et al., 2008)

Foi necessário testar diversas abordagens metodológicas, antes de encontrar uma situação ideal de análise da RVGP em extratos celulares. Na **Tabela 2** estão relacionados os principais resultados, que levaram ao estabelecimento de um protocolo adequado de armazenagem e tratamento de lise das amostras.

Tabela 2 – Armazenagem, tratamento de lise e quantificação da RVGP em amostras de células S2AcRVGP-2

Método	Tratamento			RVGP quantificação	
	Congelamento	Descong. (T °C)	Lise[c]	OD $\pm$ SD	ng/10 ⁷ céls
A	Células (pellet seco)	0,5mL B1 (4°C)	0,5mL LB1 [2x]	0,359 $\pm$ 0,003	40,94
		0,5mL B2 (4°C)	0,5mL LB2 [2x]	0,143 $\pm$ 0,000	12,66
		0,5mL B3 (4°C)	0,5mL LB3 [2x]	0,350 $\pm$ 0,030	39,54
		0,5mL B4 (4°C)	0,5mL LB4 [2x]	0,412 $\pm$ 0,003	48,42
B	Células (pellet seco)	(TA)	1,0 mL LB1	0,194 $\pm$ 0,003	19,01
			1,0 mL LB2	0,113 $\pm$ 0,013	9,02
			1,0 mL LB3	0,212 $\pm$ 0,030	21,16
			1,0 mL LB4	0,311 $\pm$ 0,019	34,24
C	Células (0,5mL B1)	(TA)	0,5mL LB1 [2x]	0,357 $\pm$ 0,014	40,59
	Células (0,5mL B2)		0,5mL LB2 [2x]	0,163 $\pm$ 0,000	15,10
	Células (0,5mL B3)		0,5mL LB3 [2x]	0,427 $\pm$ 0,059	50,61
	Células (0,5mL B4)		0,5mL LB4 [2x]	0,402 $\pm$ 0,009	46,98
D	Lisado (1,0mL LB1)	(4°C)		0,173 $\pm$ 0,010	16,27
	Lisado (1,0mL LB2)			0,115 $\pm$ 0,019	9,31
	Lisado (1,0mL LB3)			0,090 $\pm$ 0,002	6,32
	Lisado (1,0mL LB4)			0,133 $\pm$ 0,007	11,46
E	Células (pellet seco)	1,0mL PBS (4°C)	Sonicação	0,267 $\pm$ 0,052	28,34
F	Células (pellet seco)	1,0mL PBS (4°C)	Cong/Descong	0,160 $\pm$ 0,022	14,73

10⁷ células S2AcRVGP-2 viáveis foram coletadas na fase exponencial de crescimento, tratadas como indicado e congeladas a -20°C. As células foram descongeladas como indicado e lisadas com LB, por cong/descong em N2 e a 42°C durante 2min e 5min ou por sonicação com 3 pulsos de 6 s cada. As amostras foram então submetidas à quantificação da RVGP por ELISA. Os resultados estão expressos pela densidade óptica $\pm$ o desvio padrão (OD $\pm$ SD) como média de 2 determinações e em ng de RVGP/10⁷ células. TA, temperatura ambiente.

Observamos que os métodos físicos ou mecânicos de extração da RVGP foram menos eficientes em extrair a proteína, ou em manter sua conformação trimérica. No geral, os

métodos de lise química apresentaram melhor desempenho, principalmente quando o “pellet” (precipitado celular) foi descongelado e ressuspensionado em tampão sem detergente e posteriormente submetido à lise com o tampão de lise completo (Método A).

Os resultados demonstraram que o armazenamento das amostras a -20 °C como pellet seco não possui diferença significativa da condição de armazenamento em tampão (Método A x Método C). Portanto, o primeiro foi escolhido para a continuidade do estudo, por ser tradicionalmente utilizado por nosso grupo temático e por não manter as células em ambiente líquido, o que poderia gerar maior degradação.

A utilização do LB4, que contém o detergente Nonidet P-40 (NP-40) em sua formulação, apresentou desempenho semelhante à utilização dos tampões LB1 e LB3 que contêm CHAPS, um detergente de referência para o trabalho com a RVGP (Gaudin et al., 1992). Como o CHAPS apresenta alto custo, o LB4 foi escolhido para a continuidade do trabalho.

Um dos motivos pelos quais, o LB4 apresentou melhores resultados que o LB2 na quantificação da RVGP, foi sua reduzida concentração de NP-40. Como pode ser observado na **Figura 6**, quando o padrão do ELISA (vírus rábico inativado) foi diluído no LB4, a curva de quantificação assemelhou-se muito à curva obtida com sua diluição no tampão recomendado (PBS + Tween 20 + BSA). O mesmo não aconteceu quando ele foi diluído no primeiro tampão de lise utilizado, o LB2. Na prática isso significa que, neste último caso, as amostras seguiam um comportamento diferente da curva de quantificação, subestimando a correta concentração de RVGP presente. Isso aconteceu todas as vezes em que um tampão

Figura 6 – Relação entre DO e concentração da RVGP no padrão diluído em tampão recomendado PBS + Tween + BSA, LB2 ou LB4.

contendo NP-40 a 1% foi utilizado para diluir o padrão. Por outro lado, a diluição da amostra de lisado celular, em tampão de lise sem detergente, para a diluição do detergente antes da aplicação na placa de ELISA, não era uma abordagem interessante, pois regularmente a amostra saía dos limites de detecção.

Uma vez estabelecidas as melhores condições de armazenamento e de lise, determinamos a melhor quantidade de células para a composição da amostra (**Figura 7**).

Figura 7 – Quantificação da RVGP dependente da quantidade de células lisadas. Diferentes quantidades de células S2AcRVGP-2k foram tratadas segundo a metodologia estabelecida (Método A) e submetidas à quantificação da RVGP por ELISA. Os resultados médios ($n = 3$) estão expressos em ng RVGP/10⁷ células.

A **Figura 7** mostra que quanto menor a quantidade de células analisada, melhor foi o isolamento da RVGP, já que os valores foram todos “normalizados” ou extrapolados para a RVGP presente em 10⁷ células. Por exemplo, a média extraída a partir de 10⁵ células foi de aproximadamente 10,5 ng, correspondendo a 1050 ng em 10⁷ células.

Para avaliar se a diferença de isolamento da RVGP estava ligada à relação entre a quantidade de detergente presente no LB4 e a quantidade de células totais, diversas quantidades de células foram tratadas com diferentes quantidades de detergentes adicionadas ao tampão B4. Antes da análise, algumas amostras precisaram ser diluídas para ajustar a concentração de detergente para 0,2%, evitando a interferência no teste de ELISA (**Figura 8**).

Os resultados revelaram que a utilização de uma maior quantidade de detergente, para uma maior quantidade de células, não resolveu o problema do isolamento da RVGP. Os melhores resultados continuaram sendo obtidos através da extração da proteína a partir de 10⁶ células com NP-40 a 0,2%.

Figura 8 – Quantificação da RVGP dependente da concentração de NP-40. Diferentes quantidades de células S2AcRVGP-2k foram tratadas segundo a metodologia estabelecida (Método A) com LB4 contendo diferentes concentrações finais (C) de NP-40 (0,2%, 0,5% ou 1%) e submetidas à quantificação da RVGP por ELISA. Os resultados médios (n = 3) estão expressos em ng RVGP/10⁷ células.

Baseado nesses resultados, o protocolo de armazenamento e extração da RVGP a partir das células de inseto para análise em ELISA foi definido como: amostra de 10⁶ células em forma de pellet seco, congelada a -20 °C até o momento da análise, descongelada a 4 °C com adição de 0,5 mL de tampão sem detergente, homogeneização, adição de 0,5 mL de LB4 com o dobro da concentração final de detergente, homogeneização, incubação a 4 °C durante 1 h com agitações a cada 15 minutos e finalmente centrifugação a 10.000 g /4 °C /10 min, para a remoção dos debris celulares.

Esse protocolo começou a ser aplicado em 2007. Foi posteriormente publicado em formato de artigo científico (Astray et al., 2008) (**Anexo A**), tendo sido aplicado a todas as análises de RVGP desta tese e a trabalhos conjuntos realizados com membros do grupo temático (**Anexos C – G**).

O impacto desse desenvolvimento tecnológico, associado a outros fatores, como a obtenção de populações mais produtivas e o estabelecimento de condições de cultivo e meios de cultura mais favoráveis à produção da RVGP, pode ser acompanhado na **Figura 9**. Há um aumento nos níveis de RVGP detectados nas amostras do grupo TACnet[®] (**seção 1.2**) como um todo. As **Figuras 9A e 9B** mostram, respectivamente, as distribuições das amostras entre níveis de RVGP antes e após o processo de desenvolvimento tecnológico do armazenamento e tratamento de amostras para ELISA. Um aumento significativo aconteceu nas dosagens que ultrapassaram 31,2 ng/mL, além de uma grande diminuição na quantidade de amostras localizadas na região abaixo de 7,8 ng/mL, compreendendo a faixa indetectável. Vale ressaltar que na **Figura 9A** o tamanho das amostras não era padronizado, excedendo, na maioria das

vezes, a quantidade de 10^6 células. Levando em consideração apenas as amostras com essa quantidade de células, a quantidade de RVGP detectada apresentou um aumento de pelo menos 100%.

Figura 9 – Distribuição das amostras do grupo TacNet[®] por faixa de concentração da RVGP. Distribuição das amostras tratadas com LB2 antes do desenvolvimento tecnológico (A). Distribuição das amostras tratadas com LB4 após o desenvolvimento tecnológico (B).

4.1.2 Padronização da qRT-PCR para a titulação do SFV

Com base na sequência codificadora para a poliproteína não estrutural do SFV (SFVgp1) presente no plasmídeo de expressão, foram desenhados e sintetizados duas séries de oligonucleotídeos. Suas especificidades foram consideradas adequadas mediante análise por PCR convencional utilizando o plasmídeo pSFV-RVGP como molde (**Figura 10**). Durante o teste de amplificação por qRT-PCR, foi constatado que os oligonucleotídeos internos da primeira série (F-E-1 e R-I-1) apresentavam formação de dímeros, elevando o valor de fluorescência de fundo. Portanto foram selecionados os oligonucleotídeos da segunda série, R-E-2 para a etapa de transcrição reversa e R-I-2 e F-I-2 para a qPCR.

Figura 10 – Verificação de duas séries de oligonucleotídeos desenhados para a amplificação de região codificante para a poliproteína não estrutural do SFV. Marcador de peso molecular (M). Primeira série externos (F-E-1 e R-E-1) 620bp (1 – 3). Segunda série externos (F-E-2 e R-E-2) 515bp (4 – 6). Primeira série internos (F-E-1 e R-I-1) 131bp (7 – 9). Segunda série internos (F-I-2 e R-I-2) 145bp (10 – 12).

Após a verificação dos oligonucleotídeos e a preparação dos padrões (**seções 3.4 e 3.15.1.1**), foram executadas várias amplificações da curva de calibração para verificar sua reprodutibilidade entre ensaios e para calcular sua eficiência média de amplificação (**Figura 11**).

Figura 11 – Curvas de quantificação de mRNA do SFV. Quatro curvas foram geradas em dias diferentes (A). Inclinações das curvas e características da curva padrão média (B). Aspecto da curva padrão média (C).

As curvas obtidas na melhor condição de amplificação apresentaram os requisitos fundamentais para a construção de uma curva em qRT-PCR: Utilização de pelo menos 5 diluições do padrão, valores de inclinação preferencialmente entre -3,3 e -3,8, valor de R² em torno de 0,99 (Qiagen, 2006).

O coeficiente de variação médio calculado entre ensaios e intra ensaios para uma mesma amostra de cDNA foram respectivamente de $0,23 \pm 0,06$ e de $0,10 \pm 0,06$.

Para verificar se o método testado com o SFV-RVGP, de fato se aplicava a outras construções com SFV, realizamos as amplificações dos vírus Mta-1-YFP-SFV lotes 1 e 2, Ala-80-YFP, 20A2-GFP-SFV (seção 3.15.1.4.1), resumidas na **Tabela 3**.

Tabela 3 – Titulação de diversas construções do SFV.

SFV	Cópias RNA/ μ L		
	Média	Desvio	CV (%)
<i>Mta-1</i> -YFP lote 1	$6,31 \times 10^5$	$5,65 \times 10^4$	9,0
<i>Mta-1</i> -YFP lote 2	$6,14 \times 10^5$	$3,13 \times 10^5$	50,9
<i>Ala-80</i> -YFP	$8,20 \times 10^5$	$1,44 \times 10^5$	17,6
<i>20A2</i> -GFP	$3,20 \times 10^4$	$6,17 \times 10^3$	19,3
<i>RVGP</i>	$1,40 \times 10^6$	$4,18 \times 10^5$	29,9

Todas as construções em teste foram eficientemente amplificadas a partir de duas amostras iguais de cada vírus extraídas, tratadas com DNase e submetidas à RT em paralelo (para RVGP $n = 4$). Os títulos virais variaram de $3,2 \times 10^4$ cópias/ μ L a $1,4 \times 10^6$ cópias/ μ L, uma diferença de até 43% para o mesmo tamanho de amostra (100 μ L). Apesar do sucesso na amplificação das diferentes construções do SFV, foi constatada uma grande variabilidade na determinação do título viral de uma mesma amostra quando é considerado todo o processo, desde a extração do RNA viral até a amplificação.

Pela incubação de amostras de um mesmo lote de vírus SFV-RVGP às temperaturas de 25 °C e 37 °C durante uma ou três horas, seguida da titulação dessas amostras em quintuplicatas (CV médio = 15%) e sua utilização para a infecção de células BHK-21, constatamos que o tratamento térmico leva à degradação do mRNA presente nas partículas virais (**Tabela 4**).

Tabela 4 – Titulação de SFV-RVGP e cálculo de ROIs

Tratamento	Título Viral (RNA/ μ L)	Volume necessário para infecção* (μ L)	
		ROI 1	ROI 10
24°C / 1h	$5,18 \times 10^6$	0,1	1
24°C / 3h	$5,08 \times 10^6$	0,1	1
37°C / 1h	$3,60 \times 10^6$	0,15	1,5
37°C / 3h	$9,75 \times 10^5$	0,5	5,3
-20°C	$5,20 \times 10^6$	0,1	1

* Calculado para a infecção de $51,6 \times 10^5$ células totais

O tratamento mais extremo, a 37 °C durante três horas, foi o que causou maior perda relativa ao controle não tratado, cerca de 20%. Já o tratamento mais brando a 24 °C, em ambas as durações, não causou perda significativa.

Foram então calculados os volumes necessários para a infecção de células BHK-21 em duas razões de infecção (ROI) diferentes, uma partícula ou dez partículas virais por célula, ou ROI 1 e ROI 10 respectivamente (**Tabela 4**). Foi efetuada a infecção e medida a quantidade de RVGP produzida em cada situação após 24 h de infecção (**Tabela 5**).

Tabela 5 – Produção de RVGP após a infecção de células BHK-21 com SFV-RVGP tratado a diferentes temperaturas (n = 2)

Amostra	RVGP (ng/mL)	
	ROI 1	ROI 10
24°C / 1h	37,7	240,8
24°C / 3h	21,5	246,5
37°C / 1h	24,9	207,2
37°C / 3h	115,2	222,1
-20°C	*	270,6

* Não determinado

A semelhança entre as quantidades de RVGP, produzidas à ROI 10 após 24h de infecção, sugere que as quantidades de partículas virais ativas utilizadas no ensaio eram pelo menos próximas entre os cinco grupos. Esse resultado significa que o cálculo do volume a ser utilizado na infecção, a partir da titulação viral por qRT-PCR, pôde ser executado com êxito. Na situação ROI 1 a amostra tratada a 37 °C / 3h apresentou uma quantidade muito maior de RVGP que as demais. Isso deve ser futuramente investigado, mas é grande a possibilidade que isso se deva ao pequeno volume de vírus utilizado para a infecção nos outros tratamentos, o que pode ter dificultado a reprodutibilidade ou levado a erros de pipetagem.

4.2 Cinéticas de expressão do *RVGPmRNA* e da RVGP

4.2.1 Cinéticas de expressão do *RVGPmRNA* e da RVGP em diferentes populações de células S2 transfectadas.

Foram realizados experimentos para definir quais eram os comportamentos cinéticos das expressões da RVGP e do *RVGPmRNA*, em cultivos de células S2AcRVGP-2k e S2MtRVGP-Hy (seção 3.1.1). Foram testadas diferentes condições de cultivo: estático ou agitado, às temperaturas de 22 °C ou 28 °C e com as concentrações de 300 μ M ou 700 μ M de CuSO_4 para a indução das células S2MtRVGP-Hy. Apresentamos aqui, ensaios representativos de cada situação estudada.

Os primeiros ensaios se concentraram na determinação da diferença entre os cultivos realizados em frascos T 25 cm^2 ou frascos Schott, denominados respectivamente, cultivo estático e cultivo agitado. A **Figura 12** resume esses ensaios com um exemplo de cultivo feito estaticamente e sob agitação em paralelo.

Figura 12 – Cinética do crescimento celular e das expressões do *RVGPmRNA* e da RVGP em cultivos de células S2AcRVGP-2k em cultivo estático (A = C) ou sob agitação (B = D). X, concentração celular, RVGP, concentração de RVGP medida por ELISA, % Células Fluorescentes, quantidade de células fluorescentes medida por citometria de fluxo, *RVGPmRNA*, quantidade de mRNA da RVGP determinada por qRT-PCR e relativa à quantidade medida no tempo inicial 0 h de cada ensaio separadamente (n = 3). Em (A) e (B) RVGP expressa em $\mu\text{g}/10^7$ células, em (C) e (D) RVGP expressa em $\mu\text{g}/\text{mL}$. Em (A) as barras de erros não foram incluídas por atrapalharem a visualização do gráfico, uma vez que os cultivos estáticos apresentam grandes variações. * pico de *RVGPmRNA* é estatisticamente diferente ($P < 0,05$) dos demais pontos.

Foi verificada uma maior produção da RVGP/célula em condições de cultivo estático. Quando se leva em conta a concentração da glicoproteína por unidade de volume, pode-se concluir o contrário, já que a concentração celular alta pode compensar a menor quantidade de RVGP/célula. Na **Figura 12** o cultivo estático apresentou maior produção de RVGP em ambas as considerações.

O acúmulo da RVGP ocorreu durante a maior parte dos cultivos, sendo mais importante no período de crescimento exponencial, apresentando um patamar antes de apresentar queda. Esse patamar na concentração da RVGP/célula pode não se aplicar à RVGP total, que pode continuar aumentando devido à multiplicação celular.

Na **Figura 12** a proporção de células fluorescentes nos cultivos estáticos foi sempre maior que nos cultivos agitados feitos em paralelo. As maiores proporções de células fluorescentes ocorreram no tempo 96h sendo 77% e 59% para **12A** e **12B** respectivamente.

A menor velocidade de crescimento dos cultivos estáticos, em relação aos agitados, nos ensaios **12A** e **12B** $\mu = 0,028 \text{ h}^{-1}$ e $0,037 \text{ h}^{-1}$ respectivamente, fez com que as células dividindo-se mais lentamente tivessem mais tempo para acumular RVGP em sua membrana.

Os níveis de *RVGPmRNA* foram na maior parte do tempo constantes, o que faz sentido para a expressão mediada por um promotor constitutivo. Porém em todas as situações, entre 72 h e 96 h houve a ocorrência de um pico na quantidade de *RVGPmRNA*, estatisticamente diferente das demais quantidades dosadas ao longo do cultivo. A ocorrência desses picos pode ser encarada como um momento de baixa utilização do *RVGPmRNA* disponível, o que leva a uma estagnação ou queda na quantidade de RVGP/célula no momento seguinte.

Os cultivos com células S2MtRVGP-Hy realizados estaticamente não apresentaram boa produção da RVGP e demonstraram comportamentos contraditórios, foram, portanto, excluídos desta tese.

No próximo experimento foram testadas as temperaturas de 22 °C e 28 °C, para o cultivo das células S2AcRVGP-2k e S2MtRVGP-Hy (**Figura 13**).

Há duas situações a serem comparadas: uma quando o cultivo é feito com células adaptadas ao crescimento a 22 °C e outra quando a temperatura do cultivo é diminuída durante o crescimento. Nossas tentativas de reduzir a temperatura durante o crescimento agitado não foram bem sucedidas, pois o cultivo de ambas as células entrava em estado estacionário progredindo para a morte. Por isso representamos a diminuição brusca da temperatura apenas com os cultivos estáticos.

Figura 13 – Cinética do crescimento celular e das expressões do *RVGPmRNA* e da *RVGP* em cultivos de células S2AcRVGP-2k (A – D) e S2MtRVGP-Hy induzidas com 700 μM de CuSO₄ em 24 h (E – F) a 22 °C ou 28 °C, sob agitação ou em cultivo estático. **X**, concentração celular, **RVGP**, concentração de *RVGP* medida por ELISA, **% Célis Fluo**, quantidade de células fluorescentes medida por citometria de fluxo, **RVGPmRNA**, quantidade de mRNA da *RVGP* determinada por qRT-PCR e relativa à quantidade medida no tempo inicial 0 h de cada ensaio separadamente (A – D), ou relativa à quantidade medida no tempo inicial 0 h do ensaio (E), considerado valor basal de referência em células S2MtRVGP-Hy (E – F). (A) e (E) células adaptadas ao crescimento a 22 °C durante três semanas. (C) cultivo cuja temperatura foi reduzida de 28 °C para 22 °C imediatamente após a inoculação.

Observamos que quando os cultivos foram pré-adaptados ao crescimento a 22 °C (Figura 13A e 13E), praticamente não houve alteração no tempo de duplicação celular (Td) e na velocidade de crescimento (μ) em relação aos cultivos controles a 28 °C. Nos ensaios 13A \ 13B, Td = 21,1 \ 18,8 h e μ = 0,033 \ 0,037 h⁻¹ e nos ensaios 13E \ 13F, Td = 19,1 \ 19,0 h e μ = 0,036 \ 0,037 h⁻¹. Já no ensaio 13C \ 13D, em que a temperatura foi reduzida bruscamente, as células praticamente estacionaram o crescimento a 22 °C, enquanto o cultivo a 28 °C cresceu normalmente, Td = 27,7 h e μ = 0,025 h⁻¹.

Tanto para S2AcRVGP-2k quanto para S2MtRVGP-Hy, quando adaptadas ao crescimento a 22 °C, observamos uma expressão do *RVGPmRNA* muito parecida com a

medida para as células crescendo a 28 °C. No entanto, essas células produziram menos RVGP mesmo com a forte ativação do promotor da metalotioneína (**Figura 13E x Figura 13F**).

Com base nos experimentos com cultivos estáticos ou agitados da célula S2AcRVGP-2k (**Figuras 12A e 12B**), determinamos que o melhor período para a realização do inóculo, reduzindo bruscamente a temperatura, era o momento em que as células apresentavam a melhor expressão da RVGP (72 h). Por isso os níveis iniciais de RVGP nos ensaios **13C e 13D** foram elevados.

Nessas condições, o cultivo submetido a uma brusca redução da temperatura (**Figura 13C**) continuou a apresentar perfis do mensageiro, semelhantes ao cultivo controle mantido a 28 °C (**Figura 13D**). No entanto, a expressão da RVGP/célula foi um pouco mais elevada, sobretudo na fase mais tardia do cultivo (2,76 $\mu\text{g}/10^7$ células x 2,18 $\mu\text{g}/10^7$ células). Isso não se traduziu em melhor produção da RVGP, já que a quantidade final de glicoproteína a 22 °C foi de 0,66 $\mu\text{g}/\text{mL}$, enquanto que a 28 °C foi de 2,73 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Após a redução brusca da temperatura, a estagnação do crescimento resultou no aumento gradual (34% a 53%) da quantidade de células fluorescentes, enquanto no controle a quantidade de células fluorescentes permaneceu estável (34% a 38%).

Nos ensaios **13E e 13F**, após a indução com CuSO_4 , houve intensa produção de *RVGPmRNA* em ambas as temperaturas. O perfil da disponibilidade do mensageiro foi semelhante, porém a quantidade de RVGP produzida por célula ou por volume foi menor a 22 °C que a 28 °C. Nos tempos 96 h e 120 h, as concentrações de RVGP eram de 1,0 e 1,2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a 22 °C e 1,5 e 2,4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a 28 °C respectivamente, o que demonstra que quando o cultivo foi realizado à temperatura fisiológica, a produção de RVGP foi mais eficiente.

As quantidades relativas de *RVGPmRNA* medidas demonstraram ser equivalentes em todas as situações de mudança de temperatura testadas, não sendo estatisticamente diferentes entre as duas situações estudadas, para nenhuma das duas populações celulares.

Para estudar a dinâmica da indução com CuSO_4 , foram realizados experimentos variando o momento da adição do indutor. Enquanto nos ensaios **13C e 13D**, essa indução foi realizada no início da fase exponencial de crescimento, nos ensaios da **Figura 14**, buscamos adicionar o indutor somente no fim dessa mesma fase, quando o cultivo havia atingido elevada densidade celular. Nas **Figuras 14A e 14B**, quando os cultivos atingiram concentrações de $11,6 \times 10^6$ células/mL e $10,6 \times 10^6$ células/mL respectivamente, foi realizada a indução.

Figura 14 – Cinética do crescimento celular e da expressão do *RVGPmRNA* e da RVGP em cultivos de células S2MitRVGP-Hy sob agitação, induzidas com 700 μ M de CuSO_4 . X, concentração celular, RVGP, concentração de RVGP medida por ELISA, *RVGPmRNA*, quantidade de mRNA da RVGP determinada por qRT-PCR e relativa à quantidade medida no tempo inicial 0 h de cada ensaio separadamente (n = 2).

No ensaio **14A**, a indução coincidiu com o final do crescimento, demonstrando que mesmo em fase estacionária (48 h – 72 h), o cultivo foi capaz de sintetizar rapidamente uma grande quantidade da RVGP, que em 24 h após a indução (t = 72 h) apresentou seu valor máximo. Após esse período, o *RVGPmRNA* acumulou-se e a quantidade de RVGP permaneceu estável.

No ensaio **14B**, a indução foi feita 24h antes do término da fase exponencial de cultivo, o que levou a um consequente acúmulo mais lento ($0,011 \mu\text{g h}^{-1} \text{ mL}^{-1}$) da RVGP celular em relação a **14A** ($0,041 \mu\text{g h}^{-1} \text{ mL}^{-1}$), já que as células ainda estavam em divisão. No intervalo entre 72 h e 96 h, em que **14B** sai da fase exponencial, a velocidade de formação da RVGP foi muito semelhante ($0,046 \mu\text{g h}^{-1} \text{ mL}^{-1}$) à encontrada em **14A**. Em 96 h o acúmulo de RNA foi intenso e a taxa de produção de RVGP caiu no período seguinte.

Procuramos ainda, acessar a diferença entre a indução da expressão com a quantidade estabelecida de CuSO_4 (700 μ M) e uma quantidade menor, de 300 μ M, para definir se a quantidade do *RVGPmRNA* presente era diferente (**Figura 15**).

Figura 15 – Cinética do crescimento celular e das expressões do *RVGPmRNA* e da RVGP em cultivos de células S2MtRVGP-Hy sob agitação, induzidas com 300 ou 700 µM de CuSO₄. X, concentração celular, RVGP, concentração de RVGP medida por ELISA, % Célis Fluo, quantidade de células fluorescentes medida por citometria de fluxo, *RVGPmRNA*, quantidade de mRNA da RVGP determinada por qRT-PCR e relativa à quantidade medida no tempo inicial 0 h do ensaio (A) considerado valor de expressão basal antes da indução. Os cultivos foram induzidos logo após a inoculação (n = 3). (A) e (C) são o mesmo ensaio com duas apresentações diferentes da quantidade de RVGP presente. (B) e (D) idem. * estatisticamente diferente

Os resultados demonstraram que, embora os níveis de *RVGPmRNA* encontrados nos cultivos com 700 µM de indutor sejam ligeiramente maiores, as diferenças em relação aos encontrados nos cultivos com a menor quantidade de indutor não foram estatisticamente significativas, sendo apenas o valor em 72 h do ensaio com 700 µM (**Figura 15A**) estatisticamente diferente dos demais.

Em todos os pontos de amostragem, a concentração de RVGP tanto por célula como volumétrica foi maior para a condição de indução com 700 µM. Houve diferença estatística apenas em 72 h de cultivo e indução. Nesse momento enquanto em **15A** houve uma grande elevação da quantidade de RVGP, novamente coincidente com a saída da fase exponencial de crescimento, em **15B** essa elevação foi menor, embora a fase de cultivo fosse praticamente a mesma e igualmente coincidisse com o pico de *RVGPmRNA*. Em ambos os casos houve uma diminuição na quantidade do mensageiro em 60 h, mas em 72 h constatamos que a magnitude da expressão em **15A** foi maior que em **15B**, justamente quando houve uma interrupção importante na utilização do mensageiro.

Outro aspecto importante foi a confirmação da forte indução da transcrição do mensageiro e o aparecimento de grandes quantidades de RVGP/células, até 24 h após a indução, em momento coincidente com a baixa velocidade de crescimento. No momento seguinte, a velocidade de produção da RVGP não foi suficiente para a manutenção de um perfil de aumento progressivo da curva de RVGP/célula em **15A** e **15B**. Pelos dados de concentração volumétrica da RVGP, **15C** e **15D**, constata-se que o acúmulo da proteína não decresceu até o fim da fase exponencial.

Este ensaio também foi uma mimetização de uma condição de expressão constitutiva. Para confirmar se o pico que apareceu nos ensaios com células contendo o promotor constitutivo se deveu não a uma maior ativação, mas a um maior acúmulo do mensageiro, as células S2MtRVGP-Hy foram induzidas no início do cultivo. Observamos que o mesmo pico presente nos cultivos de S2AcRVGP-2k, também apareceu neste sistema indutível ao redor de 72 h, confirmando que ele se deveu ao acúmulo do mensageiro nesse momento.

Após a ocorrência do pico, houve uma diminuição no acúmulo de RVGP, sendo que a posterior diminuição nos níveis de RNA mensageiro não deriva em aumento da quantidade de RVGP.

Nosso método de extração do RNA celular realiza a extração do RNA total, o que inclui RNA ribossômico e transportador, além de outras classes. Verificamos que a quantidade de RNA extraída, apesar de apresentar variações por conta do rendimento do método (aproximadamente $7,5 \pm 3,5 \mu\text{g RNA}/10^6$ células), não variou de maneira associada aos diferentes períodos do cultivo, desde as primeiras horas até o início da lise celular. Apenas na etapa de lise o RNA total diminuiu.

4.2.2 Cinéticas da expressão do *RVGPmRNA* e da RVGP em células BHK-21 infectadas com SFV-RVGP

Para avaliar as cinéticas de expressão do *RVGPmRNA* e da RVGP nas células BHK-21 infectadas com o vírus recombinante SFV-RVGP, foram feitas amostragens em diversos tempos após a inoculação do vírus. A reação de qRT-PCR foi realizada simultaneamente para amostras e padrões (seção 3.11) para a quantificação absoluta.

Primeiramente foi investigado o perfil da produção do *RVGPmRNA* a partir do momento da infecção e sua relação com a produção da RVGP (Figura 16).

Figura 16 – Cinética da expressão do *RVGPmRNA* e da RVGP em cultivos de células BHK-21 infectadas com SFV-RVGP às razões **ROI** de 6,5 (**A**) ou 13 (**B**) SFV-RNA/célula. **RVGP**, concentração de RVGP medida por ELISA em amostras de células infectadas, **RVGP sob**, concentração de RVGP medida por ELISA em amostras de sobrenadante, **RVGPmRNA**, quantidade de cópias de mRNA da RVGP em 90 ng de RNA total, determinada por qRT-PCR; **% Célus Fluo**, quantidade de células fluorescentes medida por citometria de fluxo.

Nas infecções de células BHK-21 com SFV-RVGP apresentadas na **Figura 16**, observou-se um aparecimento muito rápido do *RVGPmRNA*, fruto da forte ativação dos promotores virais nas células infectadas. Em menos de uma hora após a infecção já há RNA detectável. Entre 8 h e 24 h foram atingidos os valores máximos do mensageiro de interesse, $5,30 \times 10^7$ cópias e $2,83 \times 10^7$ cópias, para **16A** e **16B** respectivamente.

A produção da RVGP também foi realizada intensamente pelo menos até 24 h após a infecção, quando as células ainda estavam saudáveis. Nesse ponto as quantidades de RVGP eram praticamente idênticas para ambas as condições (1,79 e 1,75 $\mu\text{g}/10^6$ células). No cultivo infectado com ROI 13, o efeito citopático estava muito avançado em 48 h, o que pode atrapalhar a interpretação desse ponto.

A partir de 24 h de infecção, a produção da RVGP desacelerou ou reduziu, pois as células começaram a entrar em estado apoptótico avançado. Isso foi confirmado pelo aumento da quantidade de RVGP presente no sobrenadante de cultivo, oriunda da lise celular em curso. A indução de apoptose e o aparecimento da RVGP no sobrenadante foram observados mesmo em casos em que a infecção viral foi conduzida em cultivos não confluentes.

Para determinar a quantidade de células infectadas com SFV-RVGP, foi realizado um estudo de citometria de fluxo (**Figura 16**). Cerca de 80% das células apresentaram RVGP expressa na membrana celular em até 24 h após a infecção. A expressão da RVGP foi mais rápida com a utilização de um ROI maior. Como não houve infecção secundária, provavelmente as quantidades crescentes de células fluorescentes se deveram às diferentes quantidades de vírus que entraram por célula. Os valores muito próximos das medianas indicaram que o nível de fluorescência era semelhante para as duas situações.

Os dados deste experimento reunidos a outros dados foram publicados em co-autoria em formato de artigo científico (**Anexo B**).

A quantidade de moléculas de *RVGPmRNA* informada diz respeito à quantidade inicial de cópias de cDNA presentes em 90 ng de preparação de RNA total.

Para este ensaio, os títulos virais não haviam sido determinados precisamente, tendo sido estimados apenas em relação à marcação fluorescente realizada sobre as células infectadas e pelo efeito citopático observado nas placas. Posteriormente foi utilizada a qRT-PCR para a determinação da concentração de SFV-RNA presente no lote viral e o cálculo da valor ROI utilizada em cada caso.

Para verificar com mais precisão as diferenças entre as quantidades de *RVGPmRNA* e de RVGP produzidas em infecções com diferentes títulos virais, foi conduzido um novo experimento utilizando razões de 0,15, 1,5 e 15 *SFV-RNA*/célula (**Figura 17**).

Figura 17 – Cinética da expressão do *RVGPmRNA* e da RVGP em cultivos de células BHK-21 após a infecção (p.i.) com SFV-RVGP à ROI de 0,15 , 1,5 e 15 (n = 3). **RVGP**, concentração de RVGP medida por ELISA em amostras de células infectadas (RVGP/célula), ***RVGPmRNA***, quantidade de cópias de mRNA da RVGP em 90ng de RNA total determinada por qRT-PCR (A). **X**, concentração celular (células viáveis), (B). **RVGP**, concentração de RVGP medida por ELISA em amostras de células infectadas (RVGP/mL), (C).

Em **17A** constatamos que as infecções com variados ROI, seguindo o mesmo perfil de acúmulo exponencial, conduziram a quantidades máximas de *RVGPmRNA* estatisticamente diferentes, entre 12 h e 24 h. Após esse período, os desvios foram maiores e as diferenças tornaram-se não significativas. As concentrações de RVGP aumentam até 30 h pós-

infecção, sendo que as quantidades a ROI 15 nos tempos 24 h e 30 h são estatisticamente diferentes das demais. Conforme o cultivo entrou em declínio após 30 h, as quantidades de transcrito e glicoproteína também reduziram.

A **Figura 17B** mostra que todos os cultivos infectados apresentaram queda na concentração celular até 24 h pós-infecção. Diferentemente do controle negativo que continuou a crescer. Especialmente após 30 h, as células não infectadas começaram a se tornar mais numerosas e elevaram a concentração celular.

Apesar de após as infecções os cultivos terem apresentado interrupção de crescimento (**Figura 17B**), a concentração da RVGP por volume de cultivo aumentou a cada momento (**Figura 17C**). Até 30 h após a infecção a produção de RVGP foi melhor com a infecção à ROI 15. Apenas em 48 h, o cultivo infectado com ROI 0,15 apresentou maior quantidade de RVGP, devido ao processo apoptótico já avançado nos cultivos infectados com as outras ROIs. Mesmo assim, esse nível não chegou ao máximo produzido em 30 h pelo cultivo infectado com ROI 15 (0,31 µg/mL). Vale acrescentar que a análise por citometria de fluxo revelou uma maior quantidade de células fluorescentes nos tempos 12 h e 24 h para a ROI 15, em relação às outras duas.

4.2.3 Estudo da infecção de células VERO, HuH7 e HEK-293 com SFV-RVGP

Utilizamos o SFV-RVGP na tentativa de infectar outras células de mamíferos, com o intuito de estudar as expressões do *RVGPmRNA* e da RVGP nessas células e comparar com as anteriores (**Figura 18**).

Figura 18 – Expressão da RVGP e do *RVGPmRNA* em cultivos de células BHK-21, HuH7, VERO e HEK-293 após a infecção (p.i.) com SFV-RVGP a ROI 15. **RVGP**, concentração de RVGP medida por ELISA em amostras de células infectadas (**A**), **% Célis fluo**, quantidade de células fluorescentes detectadas por citometria de fluxo (**B**), **X**, concentração celular (**C**), *RVGPmRNA* (638bp) detectado por RT-PCR em 24 h e 48 h p.i. Marcador de tamanho, M, BHK-21, I, HuH7, II, HEK-293, III, VERO, IV, (**D**).

Em todos os ensaios que realizamos com essas células, constatamos que as células VERO e HEK-293 não apresentavam expressão da RVGP (**Figura 18A**). Mesmo quando tentamos detectar a RVGP com anticorpos policlonais anti-RVGP por ELISA e por imunofluorescência, não observamos resultados positivos para essas duas células.

A RVGP foi bem expressa nas células BHK-21 e HuH7 (**Figura 18A**). A expressão nesta última chamou a atenção por ser intensa e mais rápida que na primeira. A produção da RVGP em BHK-21 foi mais lenta em relação aos experimentos anteriores, provavelmente por causa da realização da infecção em frascos T 25 cm², ao invés de placas de

6 poços. Isso foi realizado para permitir ao cultivo a continuidade do crescimento celular mesmo após a infecção, de maneira a eliminar o fator concentração celular na indução de apoptose. Para fazer a infecção foi necessário colocar o volume de vírus correspondente a ROI 15 em 3,0 mL de meio, ao invés de 1,0 mL como nas condições padrões.

Os cultivos de BHK-21 e HuH7 experimentaram um declínio na quantidade de células viáveis em 24 h de cultivo, devido à infecção viral em massa (**Figura 18C**). As células BHK-21 chegaram a atingir 80% de células fluorescentes em 72 h de infecção (**Figura 18B**). Dentre as 20% de células restantes, há aquelas que não desenvolveram uma fase de infecção avançada, devido ao baixo número de partículas que penetraram na célula, ou que foram geradas das células não infectadas, dado o crescimento do cultivo observado em 48 h (**Figura 18C**).

Para verificar o motivo de as células HEK-293 e VERO não expressarem a RVGP e esta última apresentar morte celular em 48 h de infecção (**Figura 18C**), mesmo sem atingir a confluência, foi conduzido um experimento de RT-PCR com amostras de células infectadas com SFV-RVGP, para verificar se havia a penetração viral nas células HEK-293 e especialmente nas células VERO (**Figura 18D**).

Em todos os RNAs totais extraídos dos diferentes tipos celulares após 24 h de infecção, foi encontrado o *RVGPmRNA* (**Figura 18D**), o que pode identificar a penetração do vírus nas células. Este ensaio foi repetido mais uma vez obtendo o mesmo resultado. Em ambas as oportunidades, foram tomadas precauções para não haver contaminação cruzada com possíveis partículas aderidas externamente.

A presença e a ausência de banda em 24 h e 48 h de infecção respectivamente, constatadas na amplificação do *RVGPmRNA* das células HEK-293, pode indicar que essas células são aptas a receber o vírus, mas não à continuidade da infecção e à produção da RVGP. Há ainda a possibilidade de o método escolhido para a eliminação de possíveis vírus aderidos externamente não ter sido completamente eficiente.

Com relação às células VERO, a presença de banda em 24 h e de banda ainda mais intensa em 48 h, acompanhando o padrão encontrado para BHK-21 e HuH-7, sugere que essas células dão sequência à etapa de multiplicação do *RVGPmRNA* decorrente da infecção. Como após a infecção essas células experimentaram um decréscimo de viabilidade, sem antes atingir a confluência, é relativamente seguro acreditar que a RVGP não é expressa por outros motivos que não a ineficácia do processo de infecção viral.

4.2.4 Localização da RVGP expressa em sistemas recombinantes

A expressão da RVGP nos diversos sistemas foi acessada por técnicas de marcação fluorescente e visualização em microscopia de fluorescência ou confocal (**Figura 19**). A localização membranária da RVGP foi acessada após a marcação com anticorpos monoclonais específicos para a forma trimérica antigênica. A realização de cortes transversais, a cada 1,8 μm por microscopia confocal em amostra de células S2AcRVGP-2k, ajudou a visualização da localização da RVGP (**Apêndice D**).

Figura 19 – Imunofluorescência de células S2AcRVGP-2k, BHK-21, HuH7, VERO e HEK-293. Marcação com anticorpos monoclonais IgG anti-RVGP conjugados com fluoresceína e contraste com corante Azul de Evans (vermelho). Visualização e fotografia digital em microscópio de fluorescência (A – B) ou confocal (C – I). Células S2 (A), população celular S2AcRVGP-2k (B) e (C), células BHK-21 (D), células BHK-21 + SFV-RVGP (E) e (F), células HuH7 + SFV-RVGP (G), células VERO + SFV-RVGP (H), células HEK-293 + SFV-RVGP (I).

4.3 Atividade biológica da RVGP recombinante

Para a melhor caracterização da RVGP expressa nos dois sistemas, foram realizados alguns estudos *in vivo*, utilizando células S2AcRVGP-2k ou vírus SFV-RVGP para a imunização de camundongos.

Em alguns experimentos foi coletado o soro dos animais durante e após as imunizações. Essas amostras de soro foram utilizadas para a dosagem de anticorpos neutralizantes, anticorpos anti-vírus rábico e anticorpos anti-RVGP (seção 3.20). Após uma série de três imunizações, esquema padrão para todos os experimentos, alguns animais foram submetidos ao teste de desafio com o vírus rábico.

Como primeiro resultado, verificamos que a imunização com SFV-RVGP era responsável pela produção de anticorpos anti-RVGP (Figura 20) em quantidades satisfatórias (> 0,5 UI/mL) após 3 imunizações e 21 dias.

Figura 20 – Cinética de produção de anticorpos anti-RVGP. Camundongos Balb/c (n = 4/grupo) foram imunizados 3 vezes (dias 0, 7, 14) com SFV-RVGP ($8,3 \times 10^6$ SFV-RNA) ativado, vacina antirábica ou PBS. Os títulos de anticorpos anti-RVGP foram dosados por ELISA (Platellia) antes da primeira inoculação e nos dias 7, 14, 21.

Levando em consideração a cinética de produção de anticorpos anti-RVGP, e os dados preliminares de imunizações realizadas com células de inseto recombinantes (Yokomizo et al., 2007), estabelecemos o protocolo de imunização em três aplicações separadas por intervalos de sete dias.

Em três experimentos realizados em conjunto com o Laboratório de Imunogenética do Instituto Butantan, obtivemos bons resultados na produção de anticorpos anti-RVGP após as imunizações (**Tabela 6**).

Tabela 6 – Título de anticorpos anti RVGP após as imunizações.

Reagente	Experimento					
	1		2		3	
	n	UI/mL	n	UI/mL	n	UI/mL
PBS	2	0	3	0	4	0
Vacina	3	4,3 ± 1,5	3	3,9 ± 0,9	4	3,8 ± 0,6
SFV-RVGP	6	4,3 ± 1,4	4	5,5 ± 0,3	4	3,0 ± 1,8

N = número de animais imunizados

Valores > 0,5 UI/mL: soroconversão suficiente

Valores > 4,0 UI/mL alta soroconversão

Vacina antirábica Biovet®

SFV-RVGP: 8,3 x 10⁶ SFV-RNA

Em todos os experimentos, os animais em teste apresentaram alta soroconversão média e desvios parecidos com os valores encontrados para o grupo vacinado com vacina antirábica comercial.

A partir desse dado realizamos, em parceria com o Laboratório de Raiva do Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) do município de São Paulo, o primeiro teste para verificar o potencial da utilização do SFV-RVGP e das células S2AcRVGP-2k para a proteção ao desafio com o vírus rábico (**Figura 21**).

Neste experimento foi realizada a dosagem de anticorpos neutralizantes por técnica sorológica estabelecida no CCZ. Os anticorpos foram dosados imediatamente antes da inoculação do vírus rábico e posteriormente, após a sobrevivência ao desafio (**Figura 21A**). O único valor estatisticamente diferente ($P < 0,05$), de anticorpos neutralizantes depois do desafio em relação a antes do desafio, foi de 2,0 UI/mL encontrado nos animais imunizados com SFV-RVGP. Nas demais amostras, não houve diferença entre o título de anticorpos neutralizantes antes e após o desafio.

Todos os títulos de anticorpos neutralizantes, dosados em amostras de soros retirados imediatamente antes do desafio, são estatisticamente diferentes dos controles PBS e vacina antirábica ($P < 0,05$). O maior título encontrado foi de 0,5 UI/mL na amostra de 0,3 µg de RVGP em células S2AcRVGP-2k, sendo que os títulos para as amostras S2AcRVGP-2k -

0,06 μg e SFV-RVGP não são estatisticamente diferentes deste. Esse valor é considerado limite na taxa de soroconversão, ou seja, os valores abaixo dele devem ser considerados como soroconversão insuficiente. Mesmo com baixo título de anticorpos neutralizantes, enquanto o vírus rábico causou a mortalidade de 100% dos animais controle, nos animais vacinados com diferentes antígenos houve um bom número de sobreviventes (**Figura 21B**), sendo os grupos SFV-RVGP e S2AcRVGP-2k (0,3 μg) diferentes estatisticamente dos controles.

Figura 21 – Produção de anticorpos e proteção contra o desafio com vírus rábico. Camundongos Balb/c ($n = 8/\text{grupo}$) foram imunizados 3 vezes (dias 0, 7, 14) com células S2AcRVGP-2k (0,3 μg ou 0,06 μg RVGP), com SFV-RVGP ($8,3 \times 10^6$ SFV-RNA), vacina antirábica (Biovet[®]) ou apenas PBS. Os títulos de anticorpos neutralizantes foram dosados imediatamente antes e 30 dias após o desafio (**A**). Os camundongos foram desafiados com vírus rábico ($30 \times \text{DL}_{50}$) durante 30 dias, iniciando no 21^o dia após a primeira imunização (**B**).

Em outro experimento, em parceria com a empresa DJA, (Dalian, China) realizamos basicamente o mesmo protocolo de imunização e teste desafio (**Figura 22**). Neste novo experimento, foi incluído um grupo contendo o adjuvante utilizado na vacina comercializada pela empresa, em associação ao grupo S2AcRVGP-2k (0,2 μg).

Figura 22 – Produção de anticorpos e proteção contra o desafio com vírus rábico. Camundongos Balb/c ($n = 14/\text{grupo}$) foram imunizados 3 vezes (dias 0, 7, 14) com células S2AcRVGP-2k ($0,2 \mu\text{g RVGP}$) com ou sem adjuvante, com SFV-RVGP ($8,3 \times 10^6$ SFV-RNA), vacina (Dalian) ou apenas PBS. Em paralelo ($n = 7/\text{grupo}$) foram determinados os títulos de anticorpos anti vírus rábico nos dias 14, 21, 28 e 35 após o início da imunização (**A**), e conduzido o desafio com vírus rábico CVS (30 DL_{50}) durante 30 dias iniciando no 21º dia após a primeira imunização (**B**). **Adj**, adjuvante utilizado na vacina comercial, **PBS**, controle negativo e diluente das amostras.

Os títulos de anticorpos produzidos nos animais vacinados com as amostras foram semelhantes nos experimentos **21A** e **22A**. Neste último, a titulação efetuada pelo grupo de Dalian leva em conta não apenas anticorpos anti-RVGP ou neutralizantes, mas também anticorpos contra outros antígenos do vírus rábico. Isso deve ser considerado na interpretação da grande diferença entre os títulos de anticorpos encontrados para a imunização com a vacina antirábica ou com as amostras (**Figura 21A**). De qualquer maneira, todas as imunizações

levaram a valores finais acima de 0,5 em DO, valor de soroconversão suficiente segundo informação da empresa.

No experimento **22B**, foram atingidas altas porcentagens de sobrevivência dos camundongos imunizados com as amostras. Todos os valores são estatisticamente diferentes do controle negativo ($P < 0,05$) e não são diferentes do grupo que recebeu vacina antirábica ($P > 0,05$).

5 DISCUSSÃO

Os resultados apresentados neste trabalho podem se divididos em três partes principais: a realização de uma série de padronizações, que foram reunidas com o subtítulo de “Desenvolvimento Tecnológico” (**seção 4.1**); as análises cinéticas da expressão do *RVGPmRNA*, utilizando a tecnologia da qRT-PCR, para entender a dinâmica da produção da RVGP expressa em células S2 de *Drosophila melanogaster* (expressão constitutiva ou indutiva) e mediante a infecção com vírus SFV-RVGP especialmente em células BHK-21 (**seção 4.2**); e por fim a avaliação da antigenicidade e imunogenicidade da RVGP recombinante obtida (**seção 4.3**).

O “Desenvolvimento Tecnológico” foi considerado resultado desta tese, porque seu estabelecimento demandou extenso trabalho de pesquisa e experimentação. O estabelecimento do melhor sistema de lise para células de inseto, que ao mesmo tempo preservasse a RVGP em sua estrutura trimérica, assim como o estabelecimento da tecnologia de qRT-PCR para a quantificação de diversas construções do SFV-RVGP, são situações ainda não descritas na literatura científica.

No início do trabalho do grupo hoje associado como TACnet[®] (www.tacnet.orgfree.com) para o desenvolvimento do projeto temático FAPESP 02/09482-8 (**seção 1.2**), a RVGP era encontrada em concentrações abaixo do esperado em amostras de células de inseto transfectadas. Além disso, as amostras enviadas para análise, pelos variados laboratórios componentes do grupo, por vezes tinham características distintas quanto a seu isolamento e método de conservação, o que dificultava a comparação de dados.

Essa situação levou aos estudos de padronização da metodologia de análise por ELISA, abordando as condições de obtenção, preservação e tratamento das amostras (Astray et al., 2008) (**Anexo A**). Para isso, diferentes sistemas de lise celular foram utilizados, buscando a melhor preservação da estrutura da proteína. Os métodos de lise por sonicação ou por choque de temperatura foram testados por darem origem a fragmentos de membrana contendo a RVGP, uma abordagem interessante, já que a proteína trimérica, por definição, está exclusivamente localizada na membrana plasmática. Os métodos de lise com detergentes, por outro lado, extraem diretamente a proteína da membrana e são capazes de estabilizar sua estrutura em suspensão aquosa.

Os resultados demonstraram que os métodos de lise química foram superiores aos outros dois (**Tabela 2**). A necessidade de utilização de detergentes para a estabilização da

RVGP ficou clara quando se constatou que, apenas quando era aplicado detergente aos sobrenadantes de cultivos em estágios tardios, era possível detectar a RVGP proveniente da lise celular. Nesse sentido, podendo optar por realizar a lise mecanicamente e, posteriormente, adicionar detergente às amostras de membrana resultantes, preferimos utilizar o detergente diretamente, para evitar as perdas decorrentes da manipulação do lisado celular e possibilitar uma quantificação mais precisa da RVGP presente em quantidades celulares pré-definidas.

Para melhorar a reprodutibilidade da análise, a quantidade de células por amostra também foi padronizada. Foi escolhida a quantidade de 10^6 células para análise, pois esta apresentou boa reprodutibilidade entre ensaios, embora quantidades menores de células tenham apresentado melhor rendimento de extração (**Figura 7**). Além disso, essa quantidade de células permite uma visualização do precipitado celular após as etapas de centrifugação, o que diminui a possibilidade de erros na manipulação das amostras.

Os resultados demonstraram que a utilização de um tampão com pouca quantidade de detergente e baixa força iônica (LB4) foi mais favorável para a análise. A baixa força iônica pode prevenir, em parte, a tendência à agregação protéica exibida por essa glicoproteína em soluções salinas, devido à menor promoção de interações hidrofóbicas entre os domínios transmembrana. A relação entre a quantidade de células lisadas e a concentração de detergente utilizado durante a lise não resultou em quantidades proporcionais de RVGP isolada, sendo que a utilização de pouco detergente foi sempre a melhor condição (**Figura 8**).

Muito da melhoria na condição de análise e aumento dos níveis da RVGP detectados pode ser explicado pelo comportamento da curva de quantificação. Enquanto a utilização de B4 + LB4 (2x) para a diluição do padrão gerou uma curva de quantificação semelhante à gerada com a diluição do padrão em PBS + Tween 20 + BSA, recomendado pelo fabricante, a curva obtida com a diluição do padrão no tampão de lise utilizado antes da padronização, o LB2, apresentou grande influência na curva de quantificação, muito provavelmente por causa da concentração de 1% de NP-40 presente (**Figura 6**). Extrapolando para as amostras, fica claro que era necessário um aumento muito grande nos valores de DO para a quantificação de um aumento significativo na quantidade de RVGP detectada, uma situação inadequada para análise.

A metodologia de análise padronizada tem sido aplicada às amostras do grupo temático e seu desenvolvimento é considerado, juntamente com a obtenção de populações mais produtivas e o estabelecimento de condições de cultivo e meios de cultura mais favoráveis à produção da RVGP, um dos responsáveis pelo aumento nos níveis de RVGP detectados nas amostras do grupo TacNet[®] como um todo (**Figura 9**).

Finalmente, o estudo sobre o armazenamento da amostra, para a quantificação da RVGP, foi realizado visando encontrar um método favorável à manutenção das características da amostra (preservação da RVGP). Ensaios mais aprofundados de condições de armazenamento e lise mecânica, com isolamento dos fragmentos de membrana e posterior solubilização da RVGP, estão sendo executados, buscando principalmente, um método de lise para grandes quantidades de células e um processo adequado de solubilização da RVGP, para uma posterior etapa de purificação.

O desenvolvimento de uma metodologia de titulação de diferentes SFV recombinantes por qRT-PCR foi realizado no âmbito de um acordo de cooperação entre o Laboratório de Imunologia Viral do Instituto Butantan e o Laboratoire de Récepteurs et Protéines Membranaires da École Supérieure de Biotechnologie de Strasbourg, Université de Strasbourg FAPESP/CNRS 06/20338-4.

O objetivo desse desenvolvimento foi a obtenção de um método rápido e preciso, para determinar o título viral de diferentes construções de SFV. A qRT-PCR foi escolhida por ser uma metodologia moderna e sensível, sendo facilmente dominada por aqueles que trabalham com técnicas de biologia molecular e permitindo a titulação de cópias de RNA ou DNA específicos, com rapidez e reprodutibilidade.

As técnicas tradicionais de titulação do SFV (titulação em placa e citometria de fluxo) têm as vantagens de não necessitarem de reagentes ou equipamentos especiais e proporcionarem um real e direto dimensionamento dos efeitos da infecção, com uma determinada preparação viral. No entanto, nos trabalhos que utilizam SFV como vetor de expressão, é comum constatar diversas imprecisões nesse assunto. Ora o método de titulação é citado apenas brevemente, ora não é referida a razão de infecção (ou MOI) utilizada nos ensaios (Hassaine et al., 2006; Eifler et al., 2007; Schukla et al., 2006). Essa situação sugere que há uma dificuldade de estabelecimento e reprodução desses métodos.

Nesse caso, as desvantagens da qRT-PCR são relativas à disponibilidade de equipamento e também ao tempo de aplicação da nova técnica. Com o acúmulo de informações sobre sua utilização para a titulação de amostras de SFV, a qRT-PCR pode também levar a interpretações mais seguras de seus resultados, no sentido principalmente de poder prever, com base no número de cópias do *SFV-RNA* utilizado em uma infecção, os possíveis resultados em termos de expressão da proteína recombinante.

As análises em qRT-PCR absoluta tem sido muito utilizadas para a titulação de diversos vírus, principalmente em amostras biológicas. Apenas recentemente foi proposta uma

utilização da qRT-PCR para a quantificação de estoques de baculovírus gerados em cultivos celulares (Hitchman, 2007), em uma abordagem muito semelhante ao nosso trabalho.

Tendo em vista essas questões, desenvolvemos a metodologia da qRT-PCR, para quantificar o *SFV-RNA* com base na região Nsp3 do gene da poliproteína não estrutural do SFV, o *SFVgp1*. Para isso, desenhamos os oligonucleotídeos pensando nas melhores características para a qRT-PCR, inclusive analisando a possibilidade da formação de dímeros ou estruturas do tipo grampo (“hairpins”). Esses oligonucleotídeos foram testados em uma série de amplificações, de diluições do plasmídeo pSFV-RVGP linearizado ou de amostras de RNA viral.

A curva de quantificação foi construída tomando o cuidado de obtermos apenas DNA plasmidial linearizado, já que DNAs circulares resultam em geral em baixa eficiência de amplificação e não permitem a correta quantificação (Traul et al., 2005). A questão da utilização de curvas de cDNA obtido de padrões de RNA ou de curvas de DNA plasmidial, para a quantificação de amostras em qRT-PCR já foi amplamente debatida no contexto da consideração da eficiência da transcrição reversa (Bustin, 2000). Foi demonstrado que para reações bem padronizadas a curva de DNA plasmidial pode ser utilizada para a dosagem do cDNA, sendo de preferência por trabalhar com padrões muito mais estáveis (Pffafli e Hageleit, 2001).

Após os procedimentos de purificação do DNA plasmidial, linearização, estabilização e quantificação do padrão (**seção 3.15.1.1**), realizamos a qRT-PCR com as diluições do padrão obtendo curvas apropriadas (**Figura 11**), seguindo as recomendações de várias referências (Pffafli e Hageleit, 2001; Halford, 1999; Wong e Medrano, 2005; Nolan et al., 2006).

O maior desafio encontrado foi estabelecer um protocolo de isolamento do RNA viral e sua quantificação. Como optamos por trabalhar com um método de extração químico, utilizando Trizol-LS[®] (Invitrogen), enfrentamos problemas com o rendimento do método e com o tamanho da amostra. Esses problemas foram resolvidos adicionando glicogênio ao reagente e RNA de calibração às amostras. Assim, o glicogênio passou a atuar como carregador do RNA na etapa de precipitação com isopropanol e o RNA adicionado às amostras permitiu o cálculo do rendimento médio desse processo de extração e a determinação das perdas relativas a cada amostra. Vale ressaltar, que esses artifícios foram utilizados para a resolução rápida desses problemas, visando dar continuidade aos experimentos que determinariam o potencial da técnica para o propósito estudado. Futuramente será utilizado um

método de extração do RNA viral baseado no isolamento por coluna, capaz de render mais material com boa reprodutibilidade.

Após a verificação da boa reprodutibilidade entre ensaios das curvas de quantificação, verificamos através da titulação de outros SFV, além do SFV-RVGP, que o método pode ser aplicado para outras construções de SFV que utilizam o plasmídeo de expressão contendo a região Nsp3 conservada (**Tabela 4**).

Apesar de os títulos virais encontrados para todas as amostras de SFV analisadas estarem dentro do esperado, algumas dessas amostras, sendo mais antigas que as outras, podem ter sofrido processos de degradação (**Tabela 4**). Essas amostras também foram utilizadas para a infecção de células BHK-21 e a expressão protéica foi avaliada pela porcentagem de células fluorescentes medidas por citometria de fluxo (Dados não apresentados). No entanto, a utilização das mesmas ROIs, para as diferentes construções levou a resultados diferentes em porcentagem de células fluorescentes.

Há várias possíveis causas para esse resultado: o alto coeficiente de variação, encontrado nas titulações dos vírus realizadas em duplicatas, pode ter levado a uma incorreta determinação do título viral; as proteínas recombinantes testadas sendo diferentes e a infecção interrompida após 8 h da inoculação, podem ter tempos diferentes de maturação e trânsito nos compartimentos celulares, o que poderia levar às diferenças na proporção de células fluorescentes; ou ainda, como uma das proteínas é conjugada à GFP e as outras à YFP, há uma possível variação na própria eficácia de medição do citômetro.

Quando analisamos a expressão da RVGP pela infecção das células BHK-21 a ROIs 1 e 10, com SFV-RVGPs tratados a 24 °C ou a 37 °C, nos certificamos que a qRT-PCR é uma boa ferramenta para a determinação do título viral do SFV (**Tabela 5**). Nesse experimento, as infecções com ROIs ajustados com base na titulação (em quintuplicatas) de sub-lotes virais propositadamente degradados, ou do controle mantido conservado, resultaram na expressão de quantidades muito semelhantes de RVGP. Isso ficou particularmente evidente na utilização de ROI 10 (**Tabela 5**).

Esse resultado nos animou a determinar os títulos virais de lotes de SFV-RVGP já utilizados, mas que haviam sido titulados apenas de maneira aproximada. As titulações foram novamente conduzidas em quintuplicatas, dado que esse procedimento teve mais êxito que a titulação em duplicatas. Os resultados dessas titulações pareceram muito coerentes e foram incorporados às informações dos experimentos de infecção de células BHK-21 (**Figura 16 e Figura 17**).

A validação da metodologia de titulação do SFV ainda será executada pela comparação do título viral determinado pela qRT-PCR, com o título viral determinado pelo tradicional ensaio em placa.

Nos estudos das cinéticas de crescimento celular, de transcrição do *RVGPmRNA* e de expressão da RVGP em células S2AcRVGP-2k e S2MtRVGP-Hy, procuramos encontrar relações entre esses parâmetros analisados. Isso permitiu entender um pouco mais acerca do funcionamento dos promotores durante o cultivo celular e de seu diferente impacto sobre a produtividade de cada sistema

De maneira geral, a análise dos sistemas de expressão recombinante concentra-se prioritariamente na quantificação do produto de interesse (proteína recombinante), em detrimento da quantificação do passo anterior, a disponibilidade do RNA mensageiro.

Intervenções comumente realizadas, que melhoram a expressão de uma proteína recombinante, muitas vezes não têm uma explicação bem estabelecida, se restringindo a hipóteses, principalmente ligadas à indução do promotor utilizado ou à conservação ou qualidade da proteína produzida em diferentes situações de cultivo (Palomares et al., 2004).

Na medida em que os fatores determinantes para a concentração de uma proteína são a concentração de seu mRNA, a frequência de sua tradução e a estabilidade da proteína propriamente dita (Lodish et al., 2000), avaliar o perfil cinético da disponibilidade do transcrito da RVGP pode ser importante para o entendimento e otimização do sistema de expressão recombinante.

Elaboramos nossos estudos, no sentido de avaliar a disponibilidade e utilização do *RVGPmRNA* em diferentes situações de cultivo celular ou de concentração de indutor. Para quantificar esse ácido nucléico, estabelecemos e validamos uma qRT-PCR. Um processo que demandou um longo tempo de estudo e a realização de muitas etapas e testes.

Em nossas condições padrão de cultivo para as células S2 (Meio SF900II, inóculo 5×10^5 células/mL, 28 °C), as cinéticas de crescimento atingem a concentração máxima de células, em 72 h a 96 h após a inoculação. A fase exponencial de crescimento tem lugar entre 24 h e 72 h ou 48 h e 96 h, o suficiente para aproximadamente três gerações celulares.

Demonstramos que nessas condições padrões de cultivo, o promotor da actina, responsável pela expressão da RVGP, tem como característica estimular constantemente a transcrição do *RVGPmRNA* (**Figuras 12A, 12B, 13B, 13D**).

Nessas mesmas condições, ao fim da fase exponencial os cultivos entraram em uma fase estacionária de no máximo três dias. Exatamente na transição da fase exponencial para a fase estacionária do cultivo, observamos a maior concentração de RVGP/célula. Nos cultivos das células S2AcRVGP-2k, o ponto de maior concentração da RVGP/célula geralmente coincidiu com a ocorrência de um pico de *RVGPmRNA* (tempos 72 h, 84 h, 72 h, 72 h, **Figuras 12A, 12B, 13B, 13D**, respectivamente).

Dois fatores podem ser associados à ocorrência do pico de concentração do mensageiro: a interrupção da transcrição de outros RNAs regulados por sinais não mais presentes nessa etapa do cultivo, aumentando a concentração proporcional do *RVGPmRNA*; ou a diminuição da síntese protéica levando ao acúmulo do mensageiro, característica comum de fases estacionárias em cultivos celulares (Freshney, 2005). A diminuição das quantidades do RNA total e do *RVGPmRNA* medidas durante a fase estacionária, não resultando em novo aumento da concentração da RVGP/célula, mesmo sem crescimento celular, reforça esta última hipótese.

Em nenhum dos artigos científicos consultados, havia informação sobre os níveis do mRNA recombinante regulado pelo promotor da actina em células S2. Em apenas dois artigos há a análise de Northern blotting da expressão do mensageiro após a indução do promotor da metalotioneína. Em um deles, pouco é comentado a respeito, mas percebe-se após 48 h de indução, uma diferente quantidade do mensageiro para dois genes diferentes regulados pelo mesmo promotor (Kirkpatrick et al., 1995).

No outro, a indução é feita precocemente e podemos observar uma quantidade constante do mensageiro até o quarto dia de cultivo, quando a célula entra em estado estacionário e há uma elevação brusca das quantidades do transcrito e da proteína recombinante. A partir do quinto dia, embora ainda haja transcrito em altas concentrações, a quantidade de proteína apresenta uma queda (Lee et al., 2007). Essa situação é muito semelhante ao que ocorreu com nossos ensaios utilizando as células S2AcRVGP-2k.

Para esclarecer se o pico de *RVGPmRNA* nas células S2AcRVGP-2k se deveu a um efeito de acúmulo e não a uma maior ativação do promotor da actina nessa fase tardia do cultivo, induzimos as células S2MtRVGP-Hy desde o momento da inoculação, de maneira a mimetizar uma expressão constitutiva. Novamente observamos a ocorrência de um pico do *RVGPmRNA* na mesma fase do cultivo e, no momento subsequente, a tendência de queda na concentração da RVGP/célula (**Figuras 15A e 15B**). Portanto há indícios suficientes para afirmar que o pico de *RVGPmRNA* encontrado não se deveu a uma maior ativação do promotor

da actina, mas provavelmente ao seu acúmulo no citoplasma por falta de utilização, em um momento em que a célula está reduzindo sua taxa de síntese protéica.

Após a avaliação dos comportamentos cinéticos da expressão da RVGP/célula, do *RVGPmRNA* e do crescimento celular, investigamos a influência de algumas situações de cultivo sobre esses comportamentos. As abordagens, de cultivo estático e redução brusca da temperatura de cultivo, fazem parte de estratégias comuns para reduzir a velocidade de crescimento de células eucarióticas, visando a melhoria da produtividade na expressão da proteína recombinante (Palomares et al., 2004). Essa diminuição da velocidade de crescimento do cultivo é denominada “growth-arrest” e é particularmente muito utilizada em cultivos de células CHO (Chinese Hamster Ovary), aumentando consideravelmente a expressão de proteínas recombinantes, basicamente por induzir a permanência das células na fase S/G₁ do ciclo celular, uma fase considerada excelente para a síntese abundante de proteínas (Carvalho et al., 2003; Kim et al., 2000; Al-Fageeh et al., 2005).

Nos ensaios em que a redução da velocidade de crescimento foi realizada com êxito (**Figuras 12A e 13C**), os níveis de RVGP/célula foram maiores, tanto na dosagem da concentração por ELISA, quanto na porcentagem de células fluorescentes por citometria de fluxo. Porém, ao contrário de um estudo utilizando a mesma abordagem com células de mamíferos (Yoon et al., 2003), esse aumento não teve relação com o nível de *RVGPmRNA* e nem com o de RNA total. As hipóteses possíveis, para a maior concentração da proteína por célula, são as mesmas utilizadas na tentativa de explicar o fenômeno do “growth-arrest”: o fato de que as células, por se dividirem mais lentamente, acumularam mais proteína em sua membrana; ou devido a uma mudança na velocidade das reações que ocorreram na cultura; ou ainda por melhoria na etapa de maturação protéica (Palomares et al., 2004).

O fato de as células apresentarem valores de μ muito semelhantes quando cultivadas a 28 °C ou adaptadas ao cultivo a 22 °C (**Figuras 13A e 13B, Figuras 13E e 13F**), impediu que o efeito produtivo da RVGP ocorresse com a diminuição da temperatura. Pelo contrário, nos cultivos adaptados a 22 °C, os níveis de RVGP foram muito menores. Ou seja, o efeito de melhoria da produtividade, observado com a redução brusca da temperatura, não foi presenciado em situações em que as células estavam adaptadas a 22 °C. Nesse caso os parâmetros se assemelharam muito aos controles.

Isso reforça também a tese de que a melhoria da expressão da RVGP quando a temperatura é reduzida bruscamente, não está relacionada a uma maior estabilização da RVGP a 22 °C ou à menor ação de proteases.

Todos estes dados complementam os resultados encontrados em outro trabalho (Swiech et al., 2008) (**Anexo C**). Nesse trabalho o cultivo feito a 22 °C, com células não adaptadas, também apresentou diminuição na velocidade de crescimento e aumento na expressão da RVGP, porém na época ainda não era possível explicar se isso se devia ao efeito “growth arrest” ou a maiores quantidades de *RVGPmRNA* disponível.

Nos estudos com a população celular S2MtRVGP-Hy, carregando o promotor indutível, os experimentos permitiram a comparação da indução em diferentes fases do cultivo: inóculo (**Figura 15A**), exponencial precoce (**Figura 13F**), exponencial tardia (**Figura 14B**) e estacionária (**Figura 14A**).

Nos intervalos em que as células se duplicam lentamente ou não se multiplicam, o acúmulo da RVGP/célula é alto, mesmo logo após a indução no inóculo (**Figura 15A**). Em todas as situações, a transcrição do *RVGPmRNA* pôde ser constatada pelo menos 24 h após a indução com sulfato de cobre, com um comportamento ascendente pelo menos nas próximas 24 h. Esse nível se manteve constante e muito acima do nível basal antes da indução, o que garantiu o estímulo constante à produção da glicoproteína. Esse padrão de resposta leva a crer que o promotor da metalotioneína siga o comportamento de alguns promotores indutíveis de ação lenta e gradual, porém continuada, em oposição a promotores de resposta intensa e rápida, porém efêmera (Tonje et al., 2007).

De todos os ensaios realizados com S2MtRVGP-Hy, o que apresentou maior concentração volumétrica de RVGP foi induzido na fase de inóculo (**Figura 15A**), apresentando 2,5 µg/mL em 72 h de cultivo, enquanto que os cultivos com abordagens mais clássicas para a indução, ou seja, indução em estágios mais tardios do cultivo, apresentaram valores menores: 1,2 µg/mL em 72 h (**Figura 14A**) e 1,8 µg/mL em 120 h (**Figura 14B**).

Em suma, para o sistema de cultivo agitado, a medida do *RVGPmRNA* permite prever o melhor momento de interrupção do experimento e coleta da RVGP. Quando há a ocorrência do pico, embora a cultura ainda apresente uma possibilidade de crescimento nas próximas 48 h, a RVGP produzida nesse período pode não ser tão interessante. Primeiramente porque como é conhecido, em fases de crescimento em que a lise celular começa a ser mais intensa, a liberação de proteases no meio de cultura tende a ser maior, o que pode aumentar a degradação da RVGP produzida, não só ainda no frasco de cultivo, como durante o seu processamento posterior. Além disso, como a quantidade de RVGP por célula pouco se altera ou outras vezes chega a diminuir, a razão entre RVGP e proteína total do sistema não sofre alteração ou ainda diminui, o que é considerado ruim para futuros processos de purificação.

A relação entre a expressão da RVGP e a quantidade de *RVGPmRNA* presente também foi estudada através da utilização do sistema SFV-RVGP para a infecção de células BHK-21.

Utilizamos um SFV recombinante contendo o gene da RVGP sob o controle do promotor subgenômico 26S. Após a infecção das células BHK-21, o RNA + contido no nucleocapsídeo é liberado e dá origem à poliproteína não estrutural. Seu processamento, pela atividade proteolítica específica da região Nsp2, origina o complexo primário de replicação. Utilizando como molde a fita original de RNA +, o complexo de replicação sintetiza a fita de RNA -. Posteriormente, o complexo formado pelas quatro proteínas individuais encerra a síntese do RNA -, e este é utilizado como molde para a síntese do RNA de tamanho total e do *RVGPmRNA*.

Em nossos experimentos, constatamos o aparecimento de altos níveis do *RVGPmRNA* em 4 h após a infecção, demonstrando a rapidez do processo de adesão, penetração, desencapsidação, síntese do RNA – e posteriormente do mensageiro. Seu acúmulo apresentou comportamento exponencial e atingiu um limite de concentração nas células, entre 12 h e 24 h após o início da infecção (**Figura 16**). Essas observações foram possíveis porque a análise em qRT-PCR foi capaz de distinguir com clareza as concentrações de *RVGPmRNA* presente em cada momento de amostragem das cinéticas, mesmo em casos de infecções com pequenas diferenças de ROI

A produção protéica foi evidentemente mais lenta que o aparecimento do *RVGPmRNA*, entrando em fase de expressão mais intensa apenas 8 h após a infecção (**Figura 16**).

Em relação à produção da RVGP, é interessante observar que apesar das diferenças entre as quantidades do transcrito de interesse nas amostras infectadas com ROIs diferentes (6,5 ou 13), as quantidades de proteína recombinante produzidas foram muito próximas em 24 h de infecção. Como a RVGP foi produzida por praticamente a mesma quantidade de células infectadas, como pôde ser medido pela quantidade de células fluorescentes (**Figura 16**), podemos admitir que a somatória dos eventos de tradução, modificações pós-traducionais e transporte, limita a taxa com que a RVGP é acumulada. Em outras palavras, o *RVGPmRNA* é abundante nas duas condições, e eventualmente ultrapassa a capacidade de processamento da célula.

Invariavelmente, os cultivos de células BHK-21 infectados com o SFV-RVGP apresentaram efeito citopático evidente em 24 h e avançado após 48 h de infecção. A ocorrência desse efeito deve-se, sobretudo, ao efeito promotor de apoptose desencadeado

principalmente pela ativação da enzima proteína quinase celular dependente de RNA dupla fita (PKR), que é responsável pela fosforilação de diversos alvos, incluindo o fator de elongação 2a (elf2a), que comprovadamente está envolvido na redução da tradução do mRNA celular (Piver et al., 2005).

Na busca de melhorar o aproveitamento da quantidade de *RVGPmRNA* gerada, com o aumento da produção da proteína recombinante, tentamos estender o cultivo em pelo menos 24 h, realizando a infecção com ROIs bem menores em cultivos com menor confluência celular (**Figura 17**).

As quantidades do *RVGPmRNA* em cada momento analisado foram bem distinguidas pela quantificação em qRT-PCR, sendo possível observar a diferença do nível de transcrição entre as infecções com diferentes ROIs. Devido ao número limitado de células infectadas (não há infecção secundária), o perfil apresentado por todas as cinéticas do *RVGPmRNA* foi o mesmo: um acúmulo que cresce exponencialmente até aproximadamente 6 h após a infecção, cuja magnitude depende do número de células infectadas e da quantidade de vírus/célula, seguido de um aumento mais lento, que progride para uma manutenção em cerca de 24 h (**Figura 17A**).

Em 24 h de cultivo, o efeito citopático era muito semelhante para todos os cultivos (**Figura 17B**). Porém, o início do efeito foi diferente entre eles, sendo evidente já em 8 h pós-infecção para os cultivos infectados com ROI 15, em 10 h para ROI 1,5 e em 12 h para ROI 0,15. Esse pequeno retardamento do efeito citopático não levou a uma melhor produtividade da RVGP. Prioritariamente devido à entrada de menos partículas virais por célula que pela quantidade de células infectadas (**Figura 17C**), a quantidade de *RVGPmRNA* não foi suficiente para um aumento significativo da concentração da RVGP antes de que o efeito apoptótico avançasse para a inibição da síntese protéica e morte celular.

Esse rápido desencadeamento do efeito apoptótico, deve-se principalmente à participação da proteína Nsp2 na ativação da PKR citada acima. A dificuldade em prolongar os cultivos infectados com SFV é uma das desvantagens do sistema. Como o aumento da sobrevivência do cultivo celular é desejado, dentre outras coisas por possibilitar além de maior produtividade, uma melhoria na qualidade do produto da expressão recombinante (Hassaine et al., 2006), já foram desenvolvidas outras construções menos citotóxicas desse vetor de expressão (Lundstrom et al., 2003b).

Esse conjunto de ensaios cinéticos demonstraram uma correspondência entre o aumento da ROI utilizada e o aumento da quantidade de RVGP e *RVGPmRNA* produzidos,

assim como rápido aumento da porcentagem de células fluorescentes e rápido aparecimento de efeito citopático

Por esses resultados concluímos que é melhor realizar a infecção dos cultivos com uma ROI mais alta (de 10 a 15), de maneira que o número de partículas virais que entram por célula garanta um bom aproveitamento celular, a rápida e intensa expressão do *RVGPmRNA* e a coleta da RVGP entre 24 h e 30 h.

Para melhor entender o processo de infecção/expressão com o sistema SFV e seu potencial de utilização, assim como avaliar a qualidade da RVGP expressa por infecção de outros tipos celulares, utilizamos as células HuH7, HEK-293 e VERO. As duas primeiras são células de humanos, interessantes no caso de estudar o sistema SFV para utilização em imunizações, e a última proveniente de macaco, tendo o especial interesse de ser muito utilizada para a produção de vírus rábico em cultura de células para fins vacinais.

Observamos que dessas células testadas, apenas a célula HuH7 apresentou expressão da RVGP (**Figura 18A**). Comparada com a expressão em BHK-21, nessas células a produção da RVGP foi detectada mais rapidamente, porém a concentração final de glicoproteína produzida foi menor. As células HuH7 também demonstraram maior sensibilidade aos efeitos citotóxicos do SFV, apresentando uma grande queda na viabilidade celular em 24 h após a infecção (**Figura 18C**).

Apesar de também constar da lista de células suscetíveis à infecção pelo SFV (Lundstrom, 2003a), a HEK-293 não apresentou expressão da RVGP por ELISA, citometria de fluxo ou imunofluorescência e pareceu não sofrer infecção pelo SFV-RVGP, já que não houve queda na viabilidade celular e que não foi possível detectar o *RVGPmRNA* por RT-PCR em 48 h após a infecção (**Figura 18**). Não há muita informação a esse respeito, mas em pelo menos uma oportunidade foi visto que algumas proteínas de membrana, bem expressas em células BHK-21 infectadas com SFV, não foram expressas nas células HEK-293 (Hassaine et al., 2006).

O mais inusitado, porém, foi a situação das células VERO, em que o *RVGPmRNA* não apenas esteve presente em 48 h, como a intensidade da banda de RT-PCR seguiu os padrões das bandas encontradas para os mensageiros presentes nas BHK-21 e HuH7 (**Figura 18D**). A razão de as células VERO apresentarem o transcrito, mas não a RVGP em 24 h e 48 h de cultivo, ainda não pôde ser determinada. Algumas possíveis explicações seriam: a ausência de tradução, ou a falta de oligomerização da RVGP na membrana celular. Esta última hipótese foi investigada pela utilização de anticorpos policlonais anti-RVGP em ELISA.

Enquanto os anticorpos policlonais reconheceram a RVGP expressa em BHK-21 e HuH7, não houve a detecção da glicoproteína nas células VERO, o que reforça a hipótese de haver alguma deficiência na etapa de tradução. Isso pode estar relacionado aos elementos fusionados à RVGP na construção pSFV-RVGP que teve como origem o pSFV-genC que carrega diversos elementos: sequência sinal da hemaglutinina A, cauda FLAG para detecção, sítio de clivagem da Tev protease, cauda de histidina e de biotina de *Propriobacterium sermanii* para purificação (Benmaamar et al., 2009; Hassaine et al., 2006).

Realizando uma comparação entre os dois sistemas de expressão estudados (S2 x SFV-RVGP), verificamos que os valores máximos de produção da RVGP foram de 2 a 3 $\mu\text{g}/10^7$ células para o sistema S2 e de 20 a 30 $\mu\text{g}/10^7$ células para o sistema SFV + BHK-21. A diferença observada é relativa, pois pode ser devida ao fato de as células BHK-21 serem maiores e atingirem normalmente densidades celulares entre 10^6 e 2×10^6 células/mL, enquanto as células S2, menores, atingirem densidades celulares entre 10^7 e 2×10^7 células/mL. Ambos os sistemas têm suas vantagens particulares. A expressão da RVGP em BHK-21 já foi bem caracterizada (Rath et al., 2005) e pode ser mais interessante que nas células de inseto, por essas células realizarem uma glicosilação mais completa da RVGP, incluindo ácido siálico, e ser capaz de processar N-glicanos complexos (Buttler, 2004). Além disso, permite a expressão em um tempo de cultivo menor e por um método mais bem controlado. Por outro lado o sistema S2 permite a expressão constitutiva da RVGP com a facilidade de manutenção e adaptação do cultivo ao crescimento em suspensão.

A RVGP produzida nesses sistemas de expressão vem sendo estudada, quanto à sua capacidade de produzir anticorpos em camundongos e à capacidade dessa imunização em protegê-los contra o desafio com o vírus rábico. É bem difundido que a utilização da glicoproteína do vírus rábico, dissociada das demais proteínas virais, é capaz de induzir a formação de anticorpos neutralizantes (Wiktor et al., 1973; Cox et al., 1976; Prehaud et al., 1989) e proteger contra o desafio intracerebral com vírus rábico (Perrin et al., 1985). Além disso, a glicoproteína está envolvida na indução de imunidade celular que contribui de forma determinante na proteção antiviral (Celis et al., 1988).

Os estudos de produção de anticorpos (antigenicidade) contra a RVGP vêm sendo realizados em camundongos por três laboratórios. Os resultados das titulações não devem ser comparados diretamente entre si, pois cada laboratório utilizou uma técnica particular para a dosagem (**seção 3.20**).

Em todos os casos, as preparações de RVGP provenientes de células S2 e de SFV-RVGP foram capazes de induzir a formação de anticorpos (**Tabela 6** e **Figuras 21A e 22A**). Em três experimentos de imunização com SFV-RVGP, os níveis de anticorpos atingiram os mesmos níveis dos animais imunizados com vacina antirábica comercial (**Tabela 6**). Esse dado é importante, porque os anticorpos formados foram detectados por ensaio contra a glicoproteína presente em partículas virais, seja adsorvida a uma placa de ELISA, ou em vírus ativo que posteriormente foi testado para a infecção de células *in vitro* para a titulação de anticorpos neutralizantes. Ou seja, os anticorpos gerados contra a glicoproteína recombinante reconheceram a glicoproteína nativa, assim como os anticorpos monoclonais dirigidos especificamente para o sítio III da glicoproteína nativa reconhecem a RVGP recombinante, como visto nos ELISA realizados para a quantificação da RVGP expressa nas células S2 e BHK-21+SFV-RVGP.

Como os níveis de anticorpos anti-RVGP ou neutralizantes podem ser associados apenas parcialmente com a proteção de animais contra o vírus rábico (Piza et al., 2002) e podem não indicar com segurança a potência da vacina ou antígeno utilizado (World Health Organization, 2007), conduzimos experimentos de desafio, com a inoculação intracerebral do vírus rábico nos animais imunizados, para verificar o potencial da RVGP recombinante em conferir imunidade contra a raiva.

Mesmo sem otimização antigênica (estabilização, estudo de adjuvantes, etc...), observamos elevada taxa de sobrevivência dos camundongos vacinados com SFV-RVGP e com S2AcRVGP-2k, quando submetidos aos teste de desafio com o vírus rábico, 7 dias após a terceira e última vacinação (**Figuras 21-B e 22-B**). Como esse teste foi realizado em dois laboratórios diferentes, esses resultados demonstraram que sob condições diversas, de armazenamento, transporte e manipulação, as amostras conservaram sua capacidade de apresentar uma RVGP de qualidade ao sistema imune dos animais.

No experimento realizado no CCZ (**Figura 21**), nos chamou muito a atenção o fato de animais que possuíam baixo título de anticorpos sobreviverem ao teste de desafio com o vírus rábico, um teste 100% letal.

É importante considerar a ocorrência de mecanismos de defesa do tipo celular, além da resposta imune humoral. Na realidade, muitos estudos de imunização utilizando o SFV como vetor de proteínas recombinantes demonstraram que a resposta celular tende a ser predominante (Riezebos-Brilman et al., 2006). Como na infecção com o SFV-RVGP, o vetor carrega o RNA+ recombinante e os passos de transcrição e tradução ocorrem *in vivo*, é natural

que haja a ativação preferencial de resposta imune celular. Na imunização com células S2AcRVGP-2k, a utilização de uma RVGP já formada deve favorecer a resposta imune do tipo humoral, o que é reforçado pela melhoria na proteção quando a imunização foi feita na presença de adjuvante (hidróxido de alumínio), que reconhecidamente auxilia na promoção da resposta imune Th2 mediada por anticorpos (Ulanova et al., 2001).

No caso da imunização com vírus SFV-RVGP o efeito pró-apoptótico, que é uma dificuldade para o trabalho *in vitro*, provavelmente é vantajoso. Isso porque em contraste com as cepas de vírus rábico patogênicas que apresentam baixo grau de estímulo apoptótico, as cepas não patogênicas induzem uma forte resposta imune antiviral e apoptose expressiva, sugerindo uma correlação direta entre o grau de apoptose provocado e a imunidade conferida (Morimoto et al., 1999; Faber et al., 2002). O possível efeito adjuvante ocasionado pela indução de apoptose já foi considerado como de interesse em preparações para a imunização contra a raiva (Dietzschold e Schnell, 2002).

Fizemos alguns testes para identificar a resposta imune celular nos animais vacinados. Os ensaios preliminares apontam para uma tendência de proliferação preferencial de linfócitos CD8+ em amostras retiradas de camundongos imunizados com SFV-RVGP (dados não incluídos). Isso confirmaria a predominância da resposta imune celular.

Prevemos também a realização de experimentos para acessar essa informação, mediante a determinação do padrão de resposta IgG1/IgG2a contra a RVGP. Uma quantidade maior de anticorpos do subtipo IgG1 indicaria uma predominância da resposta imune do tipo Th2, ou humoral, enquanto uma maior quantidade de anticorpos IgG2a indicaria uma predominância da resposta imune do tipo Th1, ou celular (Kaur et al., 2009). Em alguns casos, já foi demonstrado que o padrão Th1 é predominante na resposta mediada por rSFV, e que posteriormente pode ser ampliado com a resposta Th2, pela imunização apenas com a proteína recombinante (Klimpi et al., 2001).

Esta tese foi elaborada seguindo algumas atividades práticas: melhoria e padronização de metodologia analítica ELISA-RVGP para dar maior confiança aos resultados dos estudos do grupo TACnet[®]; proposta e padronização de metodologia para a quantificação de SFV recombinantes por qRT-PCR; análises da expressão do *RVGPmRNA* em amostras de células S2 recombinantes e de células BHK-21 infectadas com SFV-RVGP, para o estudo do estímulo à produção da RVGP recombinante nesses sistemas; análise da expressão da RVGP

em diferentes células mediante a infecção com SFV-RVGP; e finalmente, análises da atividade biológica da RVGP produzida.

Todas essas atividades reúnem-se em torno de uma única molécula de interesse científico e biotecnológico, a RVGP. Seja como antígeno vacinal, seja como molécula de interesse econômico, ou ainda como modelo de estudo para a expressão recombinante em diferentes sistemas, a RVGP reúne em si aspectos que geralmente estão em questão para muitos processos de produção de moléculas complexas. Trata-se de uma glicoproteína, o que demanda sua expressão em células eucarióticas para assegurar a sua completa glicosilação. É uma proteína de membrana, com suas regiões intracelular, transmembrana e de ectodomínio, o que exige considerações especiais na hora de se estabelecer um protocolo de obtenção e purificação; É uma proteína oligomérica (trimérica), apresentando um tênue equilíbrio entre quantidade/qualidade, necessitando portanto de desenvolvimento de metodologia analítica apropriada; e finalmente, é um antígeno vacinal que pode induzir uma resposta imunológica protetora contra a infecção com o vírus rábico em humanos e animais, desde que assegurada sua qualidade.

Este trabalho contribui para o conhecimento científico, abordando a detecção e produção da RVGP em diferentes sistemas de expressão. É também a primeira avaliação de imunidade à raiva, conferida pela RVGP recombinante expressa *in vivo* pelo vetor SFV, e uma seqüência da avaliação da imunidade da RVGP produzida em células de inseto.

Este trabalho contribui para o conhecimento biotecnológico, agregando informação sobre a relação entre a transcrição de um gene heterólogo e a síntese de uma proteína heteróloga complexa. Finalmente, também contribui com uma proposta alternativa da quantificação de partículas SFV recombinantes, que pode auxiliar na difusão desse promissor vetor de expressão recombinante e candidato a vetor de vacinas.

6 CONCLUSÕES

- Uma melhora significativa na quantificação da RVGP por ELISA-RVGP foi obtida pelo estabelecimento de uma metodologia de armazenamento das amostras e extração da RVGP. Houve um aumento de pelo menos 100% na quantidade da RVGP detectada nas amostras do grupo TACnet®;
- Foi desenvolvida com sucesso uma metodologia de qRT-PCR para a titulação de diferentes construções do vetor de expressão SFV;
- As cinéticas de expressão do *RVGPmRNA* em células S2AcRVGP-2k demonstram que entre 72 h e 96 h de cultivo há a ocorrência de um pico de *RVGPmRNA* que geralmente coincide com o ponto de maior concentração da RVGP no sistema;
- As cinéticas de expressão do *RVGPmRNA* em células S2MtRVGP-Hy demonstraram que a quantidade máxima do transcrito é atingida em 48 h após a indução, em qualquer fase do cultivo;
- As cinéticas de expressão da RVGP em células S2AcRVGP-2k e S2MtRVGP-Hy demonstraram que a quantidade de RVGP/célula se correlaciona inversamente com a velocidade de crescimento e que sua concentração máxima ocorre entre 72 h e 96 h, no momento em que o cultivo sai da fase exponencial e entra na fase estacionária;
- As cinéticas de expressão da RVGP e do *RVGPmRNA* em células BHK-21 infectadas com SFV-RVGP demonstraram uma correspondência entre o aumento da ROI utilizada e o aumento da quantidade de RVGP e *RVGPmRNA* produzidos, assim como rápido aumento da porcentagem de células fluorescentes e rápido aparecimento de efeito citopático;
- As cinéticas de expressão da RVGP e do *RVGPmRNA* em células BHK-21 infectadas com SFV-RVGP demonstraram que deve-se optar pela infecção com alta ROI, para se obter uma expressão rápida e intensa da RVGP antes do avanço dos efeitos apoptóticos;
- O SFV-RVGP foi capaz de infectar as células BHK-21 e HuH7 e expressar a RVGP. As células VERO e HEK-293 não expressaram a RVGP, sendo que a última não apresentou indícios de haver sofrido infecção;

- Em ensaios preliminares, as amostras de células S2AcRVGP-2k e de SFV-RGVP foram capazes de induzir a formação de anticorpos em camundongos e de conferir um bom grau de proteção ao teste de desafio com vírus rábico;

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

Al-Fageeh MB, Marchant RJ, Carden MJ, Smales CM. The Cold-Shock Response in Cultured *Ma m*Malian Cells: Harnessing the Response for the Improvement of Recombinant Protein Production. *Biotechnol Bioeng*. 2006;93(5):829-35.

Alkami guide for PCR, a laboratory reference for the polymerase chain reaction. Estados Unidos: Alkami Biosystems Inc; 1999, Disponível em: <http://www.Alkami.org> [2005 Jun 02].

Astray RM, Augusto EF, Yokomizo AY, Pereira CA Analytical approach for the extraction of recombinant membrane viral glycoprotein from stably transfected *Drosophila melanogaster* cells. *Biotechnol J*. 2008;3:98-103.

Benmaamar R, Astray RM, Wagner R, Pereira CA. High-level expression of rabies virus glycoprotein with the RNA-based Semliki Forest Virus expression vector. *J Biotechnol*. 2009;139:283-90.

Benmansour A, Leblois H, Coulon P, Tuffereau C, Gaudin Y, Flamand A, Lafay F Antigenicity of rabies virus glycoprotein. *J Virol*. 1991;65(8):4198-203.

Berqlung P, Sjoberg M, Garoff H, Atkins GJ, Sheahan BJ, Liljestrom P. Semliki Forest Virus expression system: production of conditionally infectious recombinant particles. *Biotechnology*. 1993;11:916-20.

Brillet K, da Conceição MM, Pattus F, Pereira CA. Bioprocess parameters of cell growth and human mu opioid receptor expression in recombinant *Drosophila* S2 cell cultures in a bioreactor. *Bioprocess Biosyst Eng*. 2006;28(5):291-93.

Bubner BEM, Baldwin IT. Use of real-time PCR for determining copy number and zygosity in transgenic plants. *Plant Cell Rep*. 2004;23:263-71.

Bustin SA. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol*. 2000;25:169-93.

Bustin SA. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *J Mol Endocrinol*. 2002;29:23-39.

*De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journal: Sample References. C2003 – Available from: <http://www.icmje.org> [2007 May 22]

Butler M. Animal cell culture & technology. 2. ed. Cornwall, UK: Bios Scientific Publishers; 2004. 244 p.

Carvalho AV, Santos SS, Calado J, Haury M, Carrondo MJ. Cell growth arrest by nucleotides, nucleosides and bases as a tool for improved production of recombinant proteins. *Biotechnol Prog.* 2003;19:69-83.

Celis E, Ou D, Dietzschold B, Koprowski H. Recognition of rabies and rabies-related viruses by T cells derived from human vaccine recipients. *J Virol.* 1988;62(9):3128-134.

Chain JL, Joachims ML, Hooker SW, Laurent AB, Knott-Craig CK, Thompson LF. Real-time PCR method for the quantitative analysis of human T-cell receptor γ and β gene rearrangements. *J Immunol Methods.* 2005;300(1-2):12-23.

Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 1987;162:156-9.

Chung, YT, Keller EB. Positive and negative regulatory elements mediating transcription from the *Drosophila melanogaster* actin 5C distal promoter. *Mol Cell Bio.* 1990a;10(12):6172-80.

Chung YT, Keller EB Regulatory Elements Mediating Transcription from the *Drosophila melanogaster* Actin 5C Proximal Promoter. *Mol Cell Bio.* 1990b;10(1):206-16.

Cox JH, Schneider LG, Prophylactic immunization of humans against rabies by intradermal inoculation of human diploid cell culture vaccine. *J Clin Microbiol.* 1976;3(2):96-101.

De mL L, Wolf H, Wagner R. High level expression of hepatitis B virus surface antigen in stably transfected *Drosophila* Schneider-2 cells. *J Virol Methods.* 1999;79(2):191-203.

Dheda K, Huggett JF, Bustin SA, Johnson MA, Rook G, Zou mL A. Validation of housekeeping genes for normalizing RNA expression in real-time PCR. *BioTechniques.* 2004;37:112-9.

Dietzschold B. Oligosaccharides of the glycoprotein of rabies virus. *J Virol.* 1977;23(2):286-93.

Dietzschold B, Schnell M. New Approaches to the Development of Live Attenuated Rabies Vaccines. *Hybrid Hybrid.* 2002;21(2):98-106

Eifler N, Duckely M, Sumanovski LT, Egan TM, Oksche A, Konopka JB, Lüthi A, Engel A, Werten PJ. Functional expression of mammalian receptors and membrane channels in different cells. *J Struct Biol.* 2007;159(2):179-93.

Ekstrom JO, Tolf C, Fahlgren C, Johansson ES, Arbrandt G, Niklasson B, Edmana KA, Lindberg AM. Replication of Ljungan virus in cell culture: The genomic 5'-end, infectious cDNA clones and host cell response to viral infections. *Virus Res.* 2007;130:129-39.

Faber M, Pulmanausahakul R, Hodawadekar SS, Spitsin S, McGettigan JP, Schnell MJ, Dietzchold B. Overexpression of the rabies virus glycoprotein (G) results in enhancement of apoptosis and anti-viral response. *J Virol.* 2002;76:3374-81.

Feng XM, Passotha V, Eklund-Jonsson C, Almingerb ML, Schnurera J. *Rhizopus oligosporus* and yeast co-cultivation during barley tempeh fermentation: Nutritional impact and real-time PCR quantification of fungal growth dynamics. *Food Microb.* 2007;24:393-402.

Ficko T. Platelet glycoprotein IIIa gene expression in normal and malignant megakaryopoiesis. *Ann Hematol.* 2008;87:131-37.

Fox SR, Yap M, Wang DIC. The Effect of Culture Temperature on Recombinant IFN- γ Production and Quality. Disponível em: <http://hdl.handle.net/1721.1/3928> [2009 Jun 12].

Freshney RI. Culture of animal cells. Hoboken: Wiley-Liss; 2005. p. 335-58: Quantitation.

Fussenegger M. The impact of mammalian gene regulation concepts on functional genomic research metabolic engineering and advanced gene therapies. *Biotechnol Prog.* 2001;12(1):1-51.

Galesi ALL, Aguiar MA, Astray RM, Augusto EFP, Moraes AM. Growth of recombinant *Drosophila melanogaster* Schneider 2 cells producing rabies virus glycoprotein in bioreactor employing serum-free medium. *Cytotechnology.* 2008;57:73-81.

Gaudin Y, Tuffereau C, Segretain D, Knossow M, Flamand A. Reversible conformational changes and fusion activity of rabies virus glycoprotein. *J. Virol.* 1991;65:4853-59.

Gaudin Y, Ruigrok RWH, Tuffereau C, Knossow M, Flamand A. Rabies virus glycoprotein is a trimer. *Virol.* 1992;187:627-32.

Gaudin Y. Folding of rabies virus glycoprotein: Epitope acquisition and interaction with endoplasmic reticulum chaperones. *J Virol.* 1997;71(5):3742-50.

Gaudin Y, Moreira S, Benejean J, Blondel D. Soluble ectodomain of rabies virus glycoprotein expressed in eukaryotic cells folds in a monomeric conformation that is antigenically distinct from the native state of the complete, membrane-anchored glycoprotein. *J Gen Virol.* 1999;80:1647–56.

Glasgow GM, McGee MM, Tarbatt CJ, Mooney DA, Sheahan BJ, Atkins GJ. The Semliki Forest virus vector induces p53-independent apoptosis. *J Gen Virol.* 1998;79:2405–10.

Halford PW. The essential prerequisites for quantitative RT-PCR. *Nat Biotechnol.* 1999;17:835.

Hasegawa T, Suzuki K, Sakamoto C, Ohta K, Nishiki S, Hino M, Tatsumi N, Kitagawa S. Expression of the inhibitor of apoptosis (IAP) family members in human neutrophils: up-regulation of cIAP2 by granulocyte colony-stimulating factor and overexpression of cIAP2 in chronic neutrophilic leukaemia. *Blood.* 2003;101(3):1164–71.

Hassaine G, Wagner R, Kempf J, Cherouati N, Hassaine N, Prual C, André N, Reinhart C, Pattus F, Lundstrom K. Semliki Forest virus vectors for overexpression of 101 G protein-coupled receptors in mammalian host cells. *Protein Expr Purif.* 2006;45(2):343–51.

Hitchman RB, Siaterli EA, Nixon CP, King LA. Quantitative real-time PCR for rapid and accurate titration of recombinant baculovirus particles. *Biotechnol Bioeng.* 2007;96:810–14.

Huggett J, Dheda K, Bustin S, Zumla A. Real-time RT-PCR normalization: strategies and considerations. *Genes Immun.* 2005;6(4):279–84.

ICTV, 2009. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/Images/Murphy/Downloadable%20Graphics%20Files.htm> [2009 Jun 29].

Invitrogen. 2008. Disponível em: <http://www.invitrogen.com> [2009 abril 21].

Ivey-Hole M. Recombinant gene expression in cultured *Drosophila melanogaster* cells. *Curr Opin Biotechnol.* 1991a;2(5):704–7.

Ivey-Hoyle M, Culp JS, Chaikin MA, Hellmig BD, Matthews TJ, Sweet RW, Rosenberg M. Envelope glycoproteins from biologically diverse isolates of immunodeficiency viruses have widely different affinities for CD4. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991b;15(88):512–6.

Iwaki T, Figuera M, Ploplis VA, Castellino FJ. Rapid selection of *Drosophila* S2 cells with the puromycin resistance gene. *Biotechniques*. 2003;35(3):482-6.

Jennings NS, Smethurst PA, Knight CG, O'Connor MN, Joutsu-Korhonen L, Stafford P, Stephens J, Garner SF, Harmer IJ, Farndale RW, Watkins NA, Ouwehand WH. Production of calmodulin-tagged proteins in *Drosophila* Schneider S2 cells: a novel system for antigen production and phage antibody isolation. *J Immunol Methods*. 2006;316(1-2):75-83.

Johansson DX, Drakenberg K, Hopmann KH, Schmidt A, Yari F, Hinkula J, Persson MA. Efficient expression of recombinant human monoclonal antibodies in *Drosophila* S2 cells. *J Immunol Methods*. 2007;318(1-2):37-46.

Jorge SA, Hera C, Spina AM, Moreira RC, Pinho JR, Mench CF. Expression of the hepatitis B virus surface antigen in *ma* mMalian cells using an Epstein-barr-virus-derived vector. *Appl Microbiol Biotechnol*. 1996;46(5-6):533-37.

Kaur M, Rai A, Bhatnagar R. Rabies DNA vaccine: no impact of MHC class I and class II targeting sequences on *i* mMune response and protection against lethal challenge. *Vaccine*. 2009;27:2128-37.

Kawano S, Tajima K, Kono H, Numata Y, Yamashita H, Satoh Y, Munekata M. Regulation of Endoglucanase Gene (*cmca*) Expression in *Acetobacter xylinum*. *J Bioscienc Bioengin*. 2008;106(1):88-94.

Kim TK, Ryu JS, Chung JY, Kim MS, Lee GM. Osmoprotective effect of glycine betaine on thrombopoietin production in hyperosmotic Chinese hamster ovary cell culture: clonal variations. *Biotechnol Prog*. 2000;16(5):775-81.

Kim YK, Shin HS, Tomiya N, Lee YC, Betenbaugh MJ, Cha HJ. Production and N-glycan analysis of secreted human erythropoietin glycoprotein in stably transfected *Drosophila* S2 cells. *Biotechnol Bioeng*. 2005;20(4):452-61.

Kirkpatrick RB, Ganguly S, Angelichio M, Griego S, Shatzman A, Silverman C, Rosenberg M. Heavy chain dimers as well as complete antibodies are efficiently formed and secreted from *Drosophila* via a BiP-mediated pathway. *J Biol Chem*. 1995;270(34):19800-05.

Klimpi AH, Vaarti E, Lansink PO, Withoff S, Vries EGE, Scherphof GL, Wilschut J, Daemen T. Activation of peritoneal cells upon *in vivo* transfection with a recombinant alphavirus expressing GM-CSF. *Gen Ther*. 2001;8:300-7.

Lee JM, Jeon HB, Sohn BH, Chung IS. Functional expression of recombinant canstatin in stably transformed *Drosophila melanogaster* S2 cells. *Protein Expr Purif*. 2007;52(2):258-64.

Lemos MAN, Santos AS, Astray RM, Pereira CA, Jorge SAC. Rabies virus glycoprotein expression in *Drosophila* S2 cells. I. Design of expression/selection vectors, subpopulations selection and influence of sodium butyrate and culture medium on protein expression. *J Biotechnol* DOI 10.1016/j.jbiotec.2009.07.003 (**no prelo**)

Li B, Tsing S, Kosaka AH, Nguyen B, Osen EG, Bach C, Chan H, Barnett J. Expression of human dopamine beta-hydroxylase in *Drosophila* Schneider 2 cells. *Biochem J*. 1996;313:57-64.

Li HC, Huang CC, Chen SF, Chou MY. Assembly of homotrimeric type XXI minicollagen by coexpression of prolyl 4-hydroxylase in stably transfected *Drosophila melanogaster* S2 cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005;336(2):375-85.

Libus J, Štorchová H. Quantification of cDNA generated by reverse transcription of total RNA provides a simple alternative tool for quantitative RT-PCR normalization, *BioTechniques*. 2006;41:156-64.

Liljeström P, Garoff H. A new generation of animal cell expression vectors based on the Semliki Forest virus replicon. *Biotechnology (N Y)*. 1991;9(12):1356-61.

Lim HJ, Kim YK, Hwang DS, Cha HJ. Expression of functional human transferrin in stably transfected *Drosophila* S2 cells. *Biotechnol Prog*. 2004;20(4):1192-97.

Lo HR, Chao YC. Rapid titre determination of baculovirus by quantitative real-time polymerase chain reaction. *Biotechnol Prog*. 2004;20:354-60.

Lodish H, Bark A, Zipursky LS, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J. *Molecular cell biology*. New York: W.H. Freeman; 2000. 1246 p.

Lundstrom K. Semliki Forest virus vectors for rapid and high-level expression of integral membrane proteins, *Biochim Biophys Acta*. 2003a;1610:90– 96.

Lundstrom K, Abenavoli A, Malgaroli A, Ehrenguber MU. Novel Semliki Forest virus vectors with reduced cytotoxicity and temperature sensitivity for long term enhancement of transgene expression, *Mol Ther*. 2003b;7:202-9.

Lupberger J, Mund A, Kock J, Hildt E. Cultivation of HepG2.2.15 on Cytodex-3: Higher yield of hepatitis B virus and less subviral particles compared to conventional culture methods. *J Hep.* 2006;45:547–552.

Mallender WD, Yager D, Onstead L, Nichols MR, Eckman C, Sambamurti K, Kopcho LM, Marcinkeviciene J, Copeland RA, Rosenberry TL. Characterization of recombinant, soluble beta-secretase from an insect cell expression system. *Mol Pharmacol.* 2001;59(3): 619-26.

McCarrol L, King LA. Stable insect cell cultures for recombinant protein production. *Curr Opin Biotechnol.* 1997;8(5):590-4.

Mendonça RZ, Greco KN, Sousa APB, Moraes RHP, Astray RM, Pereira CA. Enhancing effect of a protein from *Lonomia obliqua* hemolymph on recombinant protein production. *Cytotechnology.* 2008;57:83-91.

Morimoto K, Hooper DG, Spitsin S, Koprowski H, Ditzschold B. Pathogenicity of different rabies virus variants inversely correlates with apoptosis and rabies virus glycoprotein expression in infected primary neuron cultures. *J Virol.* 1999;73(1):510-18.

Morsy El-Senousy W, Guix S, Abid I, Pintó RM, Bosch A. Removal of astrovirus from water and sewage treatment plants, evaluated by a competitive reverse transcription-PCR. *Appl Environ Microbiol.* 2007;73(1):164-67.

Niederhauser S, Bruegger D, Zahno ML, Vogt HR, Peterhans E, Zanoni R, Berton G. A synthetic peptide encompassing the G5 antigenic region of the rabies virus induces high avidity but poorly neutralizing antibody in immunized animals. *Vaccine.* 2008;26:6749-53.

Nilsen SL, Castellino FJ. Expression of human plasminogen in *Drosophila* Schneider S2 cells. *Protein Expr Purif.* 1999;16(1):136-43.

Nolan T, Hands RE, Bustin SA. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nature protocols.* 2006;(3):1559-82.

Oligoanalyzer, aplicativo eletrônico, disponível em:

<http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/Default.aspx> [2007 out 14].

Palomares LA, Estrada-Moncada S, Ramírez OT. Production of recombinant proteins: Challenges and solutions. In: Balbás P, Lorence A. *Recombinant Gene Expression: reviews and protocols*. 2nd ed. Totowa: Humana Press ; 2004. p. 15-52.

Perret B. Approches moléculaires du mode d'action des opioïdes: Étude structurale et fonctionnelle du récepteur humain des opioïdes de type mu exprimé en cellules d'insecte. Strasbourg: Université Louis Pasteur, Ecole Supérieure de Biotechnologie de Strasbourg, Illkirch; 2003. 241 p.

Perret BG, Wagner R, Lecat S, Brillet K, Rabut G, Bucher B, Pattus F. Expression of EGFP-amino-tagged human mu opioid receptor in *Drosophila* Schneider 2 cells: a potential expression system for large-scale production of G-protein coupled receptors. *Protein Expr Purif.* 2003;31(1):123-32.

Perrin P, Thibodeau L, Sureau P. Rabies i mMunosome (subunit vaccine) structure and i mMunogenicity. Pre- and post-exposure protection studies. *Vaccine.* 1985;(3):325-32.

Perrin P, Lafon M, Sureau P. Enzyme linked i mMuno-sorbent assay (ELISA) for the determination of glycoprotein content of rabies vaccines. In: Meslin FX, Kaplan MM, Koprowaski H. *Laboratory Techniques in Rabies.* Geneva: WHO. 1996. p. 383–8.

Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids Res.* 2001;29(900):2002-7.

Pfaffl MW, Hageleit M. Validities of mRNA quantification using recombinant RNA and recombinant DNA external calibration curves in real-time RT-PCR. *Biotechnol Letters.* 2001;23:275-82.

Pfaffl MW, Wittmann SL, Meyer HH, Bruckmaier RM. Gene expression of i mMunologically important factors in blood cells, milk cells, and ma mMary tissue of cows. *J Dairy Sci.* 2003;86(2):538-45.

Pfeifer TA, Hegedus DD, Grigliatti TA, Theimann DA. Baculovirus i mMediate-early promoter-mediated expression of the Zeocin resistance gene for use as a dominant selectable marker in dipteran and lepidopteran insect cell lines. *Gene.* 1997;188(2):183-90.

Piver E, Collin C, Diattai A, Vaudini P, Page JC. Cellular factors influencing Semliki Forest Virus vector biology. *Gen Ther.* 2005;12:S111-S117.

Piza AT, Pieri KMS, Lusa GM, Caporale G MM, Terreran MT, Machado LA, Zanetti CR. Effect of the Contents and Form of Rabies Glycoprotein on the Potency of Rabies Vaccination in Cattle. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2002;97(2):265-8.

Prehaud C, Takehara K, Flamand A, Bishop DH. Immunogenic and protective properties of rabies virus glycoprotein expressed by baculovirus vectors. *Virology*. 1989;173(2):390-9.

Rath A, Choudhury S, Batra D, Kapre SV, Rupprecht CE, Gupta SK. DNA vaccine for rabies: Relevance of the trans-membrane domain of the glycoprotein in generating an antibody response. *Virus Res*. 2005;113:143-52.

Riezebos-Brilman A, Mare A, Bungener L, Huckriede A, Wilschut J, Daemen T. Recombinant alphaviruses as vectors for anti-tumour and anti-microbial immunotherapy. *J Clin Virol*. 2006;35:233-43.

Rohr UP, Wulf MA, Stahn S, Steidl U, Haas R, Kronenwett R. Fast and reliable titration of recombinant adeno-associated virus type-2 using quantitative real-time PCR. *J Virol Methods* 2002;106:81-8.

Sambrook J, Russell DW. *Molecular Cloning: a laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001a. vol 1, p. A8.52.

Sambrook J, Russell DW. *Molecular Cloning: a laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2001b. vol 3, p. A9.28.

Sambrook J, Russell DW. *Molecular Cloning: a laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2001c. vol 3, p. 15.55.

Sambrook J, Russell DW. *Molecular Cloning: a laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2001d. vol 3, p. A8.20 – A8.21.

Schlesinger S, Schlesinger MJ Replication of Togaviridae and Flaviviridae. In: Fields BN, Knipe DM, Chanock RM, Melnick JL, Martin SH, Monath TP, Roizman B. *Fundamental Virology*. 2nd ed. New York: Raven Press; 1991. p. 453-67.

Schneider I. Cell lines derived from late embryonic stages of Drosophila melanogaster. *J Embryol Exp Morphol*. 1972;27:363-5.

Scotter AJ, Kuntz DA, Saul M, Graham LA, Davies PL, Rose DR. Expression and purification of sea raven type II antifreeze protein from *Drosophila melanogaster* S2 cells. *Protein Expr Purif*. 2006;47(2):374-83.

Servat A, Labadie A, Hamen A, Boue F, Cliquet F. Inter-laboratory trial to evaluate the reproducibility of a new ELISA to detect rabies antibodies in vaccinated domestic and wild carnivores. *Biologicals*. 2008;36:19-26.

Shin HS, Cha HJ. Statistical optimization for immobilized metal affinity purification of secreted human erythropoietin from *Drosophila* S2 cells. *Protein Expr Purif*. 2003;28(2):331-39.

Shukla AK, Haase W, Reinhart C, Michel H. Heterologous expression and comparative characterization of the human neuromedin U subtype II receptor using the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* and mammalian cells. *Int J Biochem Cell Biol*. 2007;39:931-42.

Shukla AK, Reinhart C, Michel H. Comparative analysis of the human angiotensin II type 1a receptor heterologously produced in insect cells and mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006;349(1):6-14.

Shvartsman I, Dvir T, Harel-Adar T, Cohen S. Perfusion Cell Seeding and Cultivation Induce the Assembly of Thick and Functional Hepatocellular Tissue-Like Construct. *Tissue Eng*. 2008;14(00):1-10.

Southon A, Burke R, Norgate M, Batterham P, Camakaris J. Copper homeostasis in *Drosophila melanogaster* S2 cells. *Biochem. J*. 2004;383:303-09.

Swiech K, Rossi N, Astray RM, Suazo CAT. Enhanced production of recombinant rabies virus glycoprotein (rRVGP) by *Drosophila melanogaster* S2 cells through control of culture conditions. *Cytotechnology*. 2008a;57:67-72.

Swiech K, Rossi N, Silva BG, Jorge SAC, Astray RM, Suazo, CAT. Bioreactor culture of recombinant *Drosophila melanogaster* S2 cells: characterization of metabolic features related to cell growth and production of the rabies virus glycoprotein. *Cytotechnology*. 2008a;57:61-6.

Swiech K, Silva CS, Arantes MK, Santos AS, Astray RM, Pereira CA, Suazo CAT. Characterization of growth and metabolism of *Drosophila melanogaster* cells transfected with the rabies virus glycoprotein gene. *Biotechnol Appl Biochem*. 2008c;49:41-9.

Tobin SL. *Drosophila* 42A gene for actin. 1990. GenBank/EMBL/DDBJ:X54848.

Tonje S, Steigedal L, Bruland T, Misund K, Thomsen L, Lægreid A. Inducible cAMP early repressor suppresses gastrin-mediated activation of cyclin D1 and *c-fos* gene expression. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2007;292:G1062-G1069.

Tordo N, Poch O, Ermine A, Keith G, Rougeon F. Walking along the rabies genome: is the large G-L intergenic region a remnant gene? *Proc Natl Acad Sci USA*. 1986;83(11):3914-18.

Tordo N, Poch O, Ermine A, Keith G, Rougeon F. Completion of the rabies virus genome sequence determination: highly conserved domains among the L (polymerase) proteins of unsegmented negative-strand RNA viruses. *Virology*. 1988;165(2):565-76.

Traul DL, Elias S, Taus NS, Herrmann LM, Oaks JL, Li H. A real-time PCR assay for measuring alcelaphine herpesvirus-1 DNA. *J Virol Methods*. 2005;129:186-90.

Uchio E, Fuchigami A, Kadonosono K, Hayashi A, Ishiko H, Aoki K, Ohno S. Anti-adenoviral effect of anti-HIV agents in vitro in serotypes inducing keratoconjunctivitis, Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol. 2007;245:1319-25.

Ulanova M, Tarkowski A, Hahn-Zoric M, Hansoni LA. The Co mMon Vaccine Adjuvant Aluminum Hydroxide Up-Regulates Accessory Properties of Human Monocytes via an Interleukin-4-Dependent Mechanism. *Infect Immun*. 2001;69(2):1151-9.

Wong LF, Medrano JL. Real-time PCR for mRNA quantification. *Biotechniques*. 2005;39:75-85.

Wahlfors J, Morgan RA. Viral Vectors for Gene Therapy: Methods and Protocols. In Wahlfors J, Morgan RA. *Methods in Molecular Medicine*. Totowa (NJ): C. A. Machida Humana Press Inc; 2002. p. 564-678.

Wiktor TJ. Production and control of rabies vaccines made on diploid cells. *Dev Biol Stand*. 1976;37:265-6.

World Health Organization. *Weekly Epidemiological Rec*. 2007;82(49/50):425-36.

Wikstrom I, Forssell J, Goncalves M, Colucci F, Holmberg D. E2-2 Regulates the Expansion of Pro-B Cells and Follicular versus Marginal Zone Decisions. *J Immunol*. 2006;177:6723-9.

Yang J, Hooper DC, Wunner WH, Koprowski H, Dietzschold B, Fu ZF. The specificity of rabies virus RNA encapsidation by nucleoprotein. *Virology*. 1998;242(1):107-17.

Yokomizo, Adriana Yurie. Expressão do gene da glicoproteína do vírus da raiva (GPV/PV) em células de *Drosophila melanogaster* (S2). Universidade de São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas; 2006.

Yokomizo, AY, Jorge SAC, Astray RM, Fernandes I, Ribeiro OG, Horton DSPQ, Tonso A, Tordo N, Pereira CA. Rabies virus glycoprotein expression in Drosophila S2 cells. I. Functional recombinant protein in stable co-transfected cell line. *Biotechnol J*. 2007;2:102–9.

Yoon SK, Song JY, Lee GM. Effect of Low Culture Temperature on Specific Productivity, Transcription Level, and Heterogeneity of Erythropoietin in Chinese Hamster Ovary Cells. *Biotech Bioeng*. 2003;82(3):289-98.

Zhang F, Ma W, Zhang L, Aasa-Chapman M, Zhang H. Expression of particulate-form of Japanese encephalitis virus envelope protein in a stably transfected *Drosophila* cell line. *Virol J*. 2007;26:4-17.

Zhang X, Wang X, Zhou G. A one-step real time RT-PCR assay for quantifying rice stripe virus in rice and in the small brown planthopper (*Laodelphax striatellus* Fallen). *J Virol Meth*. 2008;151:181-7.

Zhao X, Bailey MR, Emery WR, Lambooy PK, Chen D. Evaluation of viral removal by nanofiltration using real-time quantitative polymerase chain reaction. *Biotechnol Appl Biochem*. 2007;47:97-104.

Zusinaite E, Tints K, Kiiver K, Spuul P, Karo-Astover L, Merits A, Sarand I. Mutations at the palmitoylation site of non-structural protein nsP1 of Semliki Forest virus attenuate virus replication and cause accumulation of compensatory mutations. *J Gen Virol*. 2007;88:1977–85.

Zwart MP, Erro E, VanOers MM, Arjan J, Visser GM, Vlak JM. Low multiplicity of infection in vivo results in purifying selection against baculovirus deletion mutants. *J Gen Virol*. 2008;89:1220–24.

APÊNDICE A

Sistema de expressão SFV-RVGP

Obtenção de estoques virais

- 1- Preparação de células BHK-21 em confluência em um frasco T 25 cm²;
- 2- Linearização de 25 µg de cada vetor e transcrição *in vitro* (SP6);
- 3- Co-eletroporação de 50 µL e 25 µL dos mRNAs SFV e Helper respectivamente;
- 4- Incubação das células a 37°C durante 24 h;
- 5- Coleta das partículas virais inativadas e filtração por membrana 0,22 µm.
- 6- Armazenamento a -20°C.

Utilização do sistema para infecção celular

- 1- Preparação de células BHK-21 em frascos T ou placas de cultura;
- 2- Ativação viral com α -quimiotripsina, 30 minutos / temp. ambiente;
- 3- Inativação da α -quimiotripsina com aprotinina 5 minutos / temp. ambiente;
- 4- Inoculação das células com a quantidade de vírus desejada;
- 5- Incubação das células infectadas a 37°C em meio sem soro fetal bovino.
- 6- Amostragem e análise da expressão.

APÊNDICE B

Avaliação da especificidade dos primers para amplificação da RVGP pela PCR e Nested-PCR

Célula	Amostra	Procedimentos*	Linha	Resultados esperados	Resultados obtidos
S2AcGPV2k	RNA	DNase + RT	1	683bp ou -	-
		PCR	13	177bp	177bp
S2AcGPV2k	RNA	DNase	2	-	-
		Nested-PCR	14	-	-
S2AcGPV2k	DNA	PCR	5	683bp	683bp
		Nested-PCR	17	177bp	177bp
S2	DNA	PCR	3	-	-
		Nested-PCR	15	-	-
S2	RNA	DNase + RT	4	-	-
		Nested-PCR	16	-	-

* Foram utilizados os seguintes primers para cada procedimento: RT: RVGPr3; PCR: RVGP3 + RVGP1a; Nested-PCR: RVGPr1 + RVGP9. A nested-PCR foi realizada utilizando-se o produto da PCR.

Avaliação da especificidade dos primers para amplificação da Actina pela PCR e Nested-PCR

Célula	Amostra	Procedimentos*	Linha	Resultados esperados	Resultados obtidos
S2AcGPV2k	RNA	DNase + RT	7	105bp ou -	-
		Nested-PCR	19	105bp	105bp
S2AcGPV2k	RNA	DNase	6	-	-
		Nested-PCR	18	-	-
S2AcGPV2k	DNA	PCR	9	105bp ou -	-
		Nested-PCR	21	105bp	105bp
S2	DNA	PCR	10	105bp ou -	-
		Nested-PCR	22	105bp	105bp
S2	RNA	DNase + RT	8	105bp ou -	-
		Nested-PCR	20	105bp	105bp
S2	RNA (2x)	DNase + RT	11	105bp ou -	-
		Nested-PCR	23	105bp	105bp
S2	RNA	DNase	12	-	-
		Nested-PCR	24	-	-

* Foram utilizados os seguintes primers para cada procedimento: RT: Ac42r; PCR: Ac42f + Ac42r; Nested-PCR: Ac42f + Ac42r. A nested-PCR foi realizada utilizando-se o produto da PCR.

APÊNDICE C

Figura C.1 – Gel de agarose 1% mostrando os fragmentos dos cDNAs da actina (100bp) e da RVGP (583bp) obtidos por RT-PCR para clonagem em vetor.

Figura C.2 – Vetor de clonagem utilizado para a construção dos padrões. Fonte: <http://www.promega.com/tbs/tm042/tm042.pdf>

Figura C.3 – Clonagem do fragmento da RVGP. O fragmento da RVGP foi clonado no plasmídeo dando origem ao padrão pGem-T+GPV (3598bp). As setas indicam os plasmídeos candidatos à purificação.

Figura C.4 – Clonagem do fragmento da b-actina. O fragmento da actina foi clonado no plasmídeo, dando origem ao padrão pGem-T+Actina (3120bp). As setas indicam os plasmídeos candidatos à purificação.

Figura C.5 – Verificação e linearização dos padrões construídos. A digestão dos vetores obtidos após as etapas de purificação, com enzima de restrição EcoR I, demonstrou que ambos os padrões pGem-T+RVGP e pGem-T+Actina foram construídos adequadamente. Das duas enzimas testadas afim de definir a melhor para a linearização dos vetores, antes de suas quantificações, a enzima Adh I mostrou-se a mais promissora, já que a enzima Sca I apresentou atividade inespecífica.

Tabela C.1 – Obtenção dos padrões pGem-T+Actina em 5 diluições contendo de 30 a 300.000 cópias

Diluição	Concentração inicial (ng/μL)	Volume de plasmídeo (μL)	Volume de diluente (μL)	Volume final (μL)	Concentração final (ng/μL)	Número de cópias
estoque	51,69	5	495	500	5,17E-01	
1/100	5,17E-01	5	495	500	5,17E-03	
A	5,17E-03	39,46	160,54	200	1,03E-03	300.000
B	1,02E-03	20	180	200	1,03E-04	30.000
C	1,02E-04	20	180	200	1,03E-05	3.000
D	1,02E-05	20	180	200	1,03E-06	300
E	1,02E-06	20	180	200	1,03E-07	30

Tabela C.2 – Obtenção dos padrões pGem-T+RVGP em 5 diluições contendo de 30 a 300.000 cópias

Diluição	Concentração inicial (ng/μL)	Volume de plasmídeo (μL)	Volume de diluente (μL)	Volume final (μL)	Concentração final (ng/μL)	Número de cópias
estoque	844,81	5	495	500	8,44	
1/100	8,44	5	495	500	8,44E-02	
A	8,44E-02	2,8	197,2	200	1,18E-03	300.000
B	1,18E-03	20	180	200	1,18E-04	30.000
C	1,18E-04	20	180	200	1,18E-05	3.000
D	1,18E-05	20	180	200	1,18E-06	300
E	1,18E-06	20	180	200	1,18E-07	30

APÊNDICE D

Figura D – Fotos de células S2AcRVGP-2k por microscopia confocal. No canto superior esquerdo a profundidade do corte. A escala posicionada abaixo da célula no canto superior direito permite uma referência de tamanho da célula.

ANEXOS – TRABALHOS PUBLICADOS

Astray RM, Augusto EF, Yokomizo AY, Pereira CA Analytical approach for the extraction of recombinant membrane viral glycoprotein from stably transfected *Drosophila melanogaster* cells. Biotechnol J. 2008;3:98-103. (**Anexo A**)

Benmaamar R, Astray RM, Wagner R, Pereira CA. High-level expression of rabies virus glycoprotein with the RNA-based Semliki Forest Virus expression vector. J Biotechnol. 2009;139:283-290. (**Anexo B**)

Swiech K, Rossi N, Astray RM, Suazo CAT, Enhanced production of recombinant rabies virus glycoprotein (rRVGP) by *Drosophila melanogaster* S2 cells through control of culture conditions. Cytotechnology. 2008a;57:67-72. (**Anexo C**)

Swiech K, Rossi N, Silva BG, Jorge SAC, Astray RM, Suazo, CAT. Bioreactor culture of recombinant *Drosophila melanogaster* S2 cells: characterization of metabolic features related to cell growth and production of the rabies virus glycoprotein. Cytotechnology. 2008a;57:61-66. (**Anexo D**)

Swiech K, Silva CS, Arantes MK, Santos AS, Astray RM, Pereira CA, Suazo CAT. Characterization of growth and metabolism of *Drosophila melanogaster* cells transfected with the rabies vírus glycoprotein gene. Biotechnol Appl Biochem. 2008c;49:41-49. (**Anexo E**)

Mendonça RZ, Greco KN, Sousa APB, Moraes RHP, Astray RM, Pereira CA. Enhancing effect of a protein from *Lonomia obliqua* hemolymph on recombinant protein production. Cytotechnology. 2008;57:83-91. (**Anexo F**)

Galesi ALL, Aguiar MA, Astray RM, Augusto EFP, Moraes AM. Growth of recombinant *Drosophila melanogaster* Schneider 2 cells producing rabies virus glycoprotein in bioreactor employing serum-free medium. Cytotechnology. 2008;57:73-81. (**Anexo G**)

Research Article

Analytical approach for the extraction of recombinant membrane viral glycoprotein from stably transfected *Drosophila melanogaster* cells

Renato M. Astray¹, Elisabeth Augusto², Adriana Y. Yokomizo¹ and Carlos A. Pereira¹

¹ Laboratório de Imunologia Viral, Instituto Butantan, São Paulo, Brasil

² Laboratório de Biotecnologia Industrial, Instituto de Pesquisas Tecnológicas, São Paulo, Brasil

Parameters for storage, lysis and concentration of *Drosophila melanogaster* Schneider 2 (S2AcRVGP) cells expressing the recombinant rabies virus glycoprotein (RVGP) were studied with regard to RVGP quantification by ELISA, for productivity evaluation and future purification. Lysis buffers were formulated with Tris, NaCl, glycerol, EDTA, KCl, Na₂PO₄, MgCl₂, PMSF and NP-40 or CHAPS. S2AcRVGP cells (10⁷ cells at the exponential growth phase) were frozen at –20°C as a dry pellet, suspended in buffer (B) formulations or after treatment with lysis buffer (LB) formulations. They were then thawed as cell pellets or with B formulations or PBS at 4°C or at room temperature and then lysed with LB formulations. For RVGP quantification by ELISA, a protocol was chosen of cell preparation including cell freezing as dry pellet, cell thawing at 4°C with B4 (Tris, NaCl, MgCl₂, PMSF) and cell lysis with the LB4 (B4 + NP-40) since it fulfilled requirements of high RVGP detection, and was easily performed with mixtures freezing quickly, and a cost-saving LB formulation could be used. Using these established conditions, we examined the optimal cell concentration for RVGP quantification by ELISA. Results showed that an increase in the RVGP detection (from 62.5 to 1083 ng/10⁷ cells) paralleled a decrease in the cell number (3 × 10⁷ – 10⁵ cells) used. The NP-40 concentration present in the LB4 was further investigated as a function of the cell number used for sample preparation. Previous results were confirmed indicating that higher NP-40 concentrations led to a decreased detection of RVGP. Altogether our data clearly pointed out the crucial effects of cell freeze, thaw, lysis and concentration on immune detection of recombinant membrane glycoproteins and can be useful as a guideline for sample preparation for this purpose.

Received 6 August 2007
Revised 6 September 2007
Accepted 19 September 2007

Keywords: *Drosophila* Schneider 2 cells · Protein extraction · Virus glycoprotein

1 Introduction

Recombinant protein expression in animal cells represents a key technology for studying the structure and function of these molecules as well as for development of reagents for diagnostic kits and of immunobiologicals such as vaccines and biopharmaceuticals.

Among the most studied recombinant proteins are molecules with quite different physico-chemical properties and biological roles. Viral glycoproteins represent a key molecule responsible for generation of strong protective immune responses in natural conditions of viral infection. Most viral vac-

Correspondence: Dr. Carlos Augusto Pereira, Instituto Butantan, Laboratório de Imunologia Viral, Av. Vital Brasil 1500, 05503-900 São Paulo, Brasil
E-mail: grugel@butantan.gov.br
Fax: +55-11-37261505

Abbreviations: Ac, actin promoter; B, buffer; CHAPS, 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate; LB, lysis buffer; RVGP, rabies virus glycoprotein; S2, Schneider 2; S2AcRVGP2, selected S2 cell population

cines that are traditionally prepared with whole viral particles that have been inactivated or attenuated are evaluated for efficacy by its content on a specific glycoprotein. A new generation of viral vaccines is now envisaged using chemically defined recombinant viral glycoproteins. In addition, investigations are underway to develop new vaccines for viral infections for which no traditional vaccines are available, based on studies of viral glycoprotein candidates. Nevertheless, viral glycoproteins are rather complex molecules that are found on virions attached to the viral membrane and show oligomerization. Consequently, approaches for recombinant glycoprotein production in transfected animal cells encounter difficulties related to both cell membrane localization and proper oligomerization of the viral glycoproteins.

The rabies virus glycoprotein (RVGP) is a membrane glycoprotein showing a trimeric oligomerization and presenting a large ectodomain, a single transmembrane sequence and a small C-terminal end inside the viral membrane [1]. It is responsible for cellular receptor recognition [2, 3] and a target of neutralizing antibodies [4]. The antigenic properties of the RVGP are well recognized and major antigenic sites are described [5–10]. The native trimeric form of the RVGP is described to be important for functions such as cell receptor interaction [11] and protective immune responses [4, 12]. This trimeric form is not stable, showing a complex pH-dependent equilibrium with a monomeric fusion inactive form that is favored in a low pH environment, implicating conformational changes and different antigenic patterns [13].

In the present study, in view of future purification procedures, we show an analytical approach for proper recombinant RVGP measurement in *Drosophila melanogaster* Schneider 2 cells (S2AcRVGP) that had been transfected with the entire gene coding for RVGP and stably expressed the RVGP. Cell freeze, thaw and lysis procedures were studied using chemical and physical parameters and the proper RVGP quantification was carried out using an ELISA with an mAb against the RVGP that only recognizes its trimeric form.

2 Material and methods

2.1 Recombinant *D. melanogaster* cell line

D. melanogaster Schneider 2 (S2) cells (Invitrogen) transfected with the RVGP gene (Pasteur strain) and resistant to hygromycin B (S2AcRVGP) [14] were grown in T-flasks containing SF900II medium (Invitrogen) for 5 days. An initial selected cell

population (S2AcRVGP2) and a subpopulation (S2AcRVGP2K) were used in this study. The cell cultivation was stopped at the exponential phase, the cells detached and transferred to a centrifuge tube. After centrifugation at $100 \times g$ for 5 min, the pellet was resuspended with PBS (pH 7.4) and the viable cell concentration determined by cell counting in a hemocytometer with trypan blue exclusion. Aliquots with different cell quantities from the same batch were distributed in microtubes. Cell suspensions were then centrifuged at $900 \times g$ for 3 min and the supernatant discarded. As indicated below, samples were frozen at -20°C , as dry cell pellets or cells suspended in buffers (B1 to B4) or cells lysed with lysis buffers (LB1 to LB4).

2.2 Chemical cell lysis

Chemical cell lysis was performed using lysis buffers, chosen based on data of cell lysis and protein extraction from S2 cells or RVGP extraction from animal cell production systems described in the literature [15–17]; the compositions are indicated in Table 1. Lysis was performed, as indicated in Table 2, using four different methods: (i) Samples of frozen cell pellets were thawed by the incubation with 0.5 mL of the indicated cold buffer (B1–B4) for 1 min, followed by the addition of 0.5 mL of the corresponding cold lysis buffer (LB1–LB4) with a 2 $\times$ detergent concentration; (ii) samples of frozen cell pellets were thawed at room temperature for a few seconds followed by the addition of 1 mL of the indicated cold (4°C) lysis buffer (LB1–LB4); (iii) samples of cells frozen with buffer (B1–B4) were thawed at room temperature, followed by the addition of 0.5 mL of the corresponding cold lysis buffer (LB1–LB4) with 2 $\times$ detergent concentrated; or (iv) samples of cell lysates were thawed at 4°C . All samples were homogenized for 10 s and kept at 4°C for 1 h, with periodical mixing at each 15 min. Following the lysis process, samples were centrifuged at $10\,000 \times g$ for 5 min and the supernatants analyzed for RVGP concentration.

2.3 Physical cell lysis by sonication

Samples of frozen cell pellets were thawed by the addition of cold PBS plus 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), briefly homogenized and submitted to three sonication pulses of 6 s each at 75 Hz (Vibra Cell - Sonics & Materials), separated by cooling in an ice bath for 30 s (Method E, Table 2). The sonication protocol was optimized by following the cell lysis by optical microscopy. After cell lysis, the samples were centrifuged at $10\,000 \times g$ for

Table 1. Lysis buffers

Lysis buffer (LB)			
	Buffer (B)	Detergent (%)	Reference
i	50 mM Tris, 150 mM NaCl, 10% glycerol, 4 mM EDTA, 1 mM PMSF, pH 7.4	CHAPS (1%)	[15]
ii	50 mM Tris, 150 mM NaCl, 1 mM PMSF, pH 7.4	NP40 (1%)	RIPA (modified)
iii	25 mM Tris-HCl, 137 mM NaCl, 5 mM KCl, 0.7 mM Na ₂ PO ₄ , 1 mM PMSF, pH 7.4	CHAPS (1%)	[16]
iv	25 mM Tris, 25 mM NaCl, 5 mM MgCl ₂ , 1 mM PMSF, pH 7.4	NP-40 (0.2%)	[17]

Table 2. S2AcRVGP2 cell storage, lysis treatment and RVGP^{a)}

Cell treatment		RVGP quantification			
Method	Freeze	Thaw (T°C)	Lysis [c]	OD ± SD	ng/10 ⁷ cells
A	Cells (dry pellet)	0.5 mL B1 (4°C)	0.5 mL LB1 [2x]	0.359±0.003	40.94
		0.5 mL B2 (4°C)	0.5 mL LB2 [2x]	0.143±0.000	12.66
		0.5 mL B3 (4°C)	0.5 mL LB3 [2x]	0.350±0.030	39.54
		0.5 mL B4 (4°C)	0.5 mL LB4 [2x]	0.412±0.003	48.42
B	Cells (dry pellet)	(Rt)	1.0 mL LB1	0.194±0.003	19.01
			1.0 mL LB2	0.113±0.013	9.02
			1.0 mL LB3	0.212±0.030	21.16
			1.0 mL LB4	0.311±0.019	34.24
C	Cells (0.5 mL B1)	(Rt)	0.5 mL LB1 [2x]	0.357±0.014	40.59
	Cells (0.5 mL B2)		0.5 mL LB2 [2x]	0.163±0.000	15.10
	Cells (0.5 mL B3)		0.5 mL LB3 [2x]	0.427±0.059	50.61
	Cells (0.5 mL B4)		0.5 mL LB4 [2x]	0.402±0.009	46.98
D	Cell Lysate (1.0 mL B1)	(4°C)		0.173±0.010	16.27
	Cell Lysate (1.0 mL B2)			0.115±0.019	9.31
	Cell Lysate (1.0 mL B3)			0.090±0.002	6.32
	Cell Lysate (1.0 mL B4)			0.133±0.007	11.46
E	Cells (dry pellet)	1.0 mL PBS (4°C)	Sonication	0.267±0.052	28.34
F	Cells (dry pellet)	1.0 mL PBS (4°C)	Freeze-thaw	0.160±0.022	14.73

a) 10⁷ viable S2AcRVGP2 cells were harvested at the exponential growth phase during culture, treated as indicated and freeze at −20°C. They were thawed as indicated and lysed with LB, by two freeze-thawing cycles in N₂ and at 42°C for 2 min and 5 min or by sonication with three pulses for 6 s each. Samples were then submitted to RVGP quantification by ELISA. The results are expressed by the OD ± SD as mean values of two determinations and ng RVGP/10⁷ cells. Rt, room temperature.

5 min and the supernatants analyzed for RVGP concentration.

2.4 Physical cell lysis by freeze-thawing

Samples of frozen cells were thawed by addition of cold buffer (50 mM NaH₂PO₄, 500 mM NaCl, 1 mM PMSF, pH 8). Samples were then submerged in liquid N₂ for 2 min and then in a water bath at 42°C for 5 min (Method F, Table 2). The process was repeated twice, the samples centrifuged at 10 000 × *g* for 5 min and the supernatants analyzed for RVGP concentration.

2.5 Analysis RVGP concentration by ELISA

The RVGP concentration in the S2AcRVGP cell lysates was estimated by ELISA (Institut Pasteur)

as already described [18]. Briefly, microplates were sensitized (3 h at 37°C) with mAb specific to the trimeric form of RVGP and blocked with BSA (0.3%) and sucrose (5%) in carbonate buffer pH 9.6 (0.05 M) (30 min at 37°C). The samples, the negative control (S2 cell lysate) and purified RVGP, diluted in PBS pH 7.0 + 0.05% tween + 0.5% BSA, in the range of 7.8 ng/mL to 500 ng/mL were added and the plate incubated 1 h at 37°C. After washing, samples and controls were incubated with the same antibody labeled with peroxidase for 1 h at 37°C. After washing, the chromogen (o-phenylenediamine) was added in presence of the hydrogen peroxide in citrate buffer pH 5.6 (0.05 M) for 30 min at 22°C, developing a yellow-orange color proportional to the amount of captured RVGP present in the sample. After interrupting the reaction with 4 N sulfuric acid, absorbance (OD) was measured at 492 nm in

an absorbance microplate reader (Multiskan EX, MJ-Labsystems). The RVGP contents, expressed in ng/10⁷ cells, were calculated by comparison of the OD measured for samples with the OD measured for purified RVGP curve.

2.6 Analysis of RVGP membrane expression by immunofluorescence

The S2AcRVGP (10⁷ cells/mL) from the same batch were placed on glass slides and washed with PBS after cell adhesion. Samples were treated with cold acetone (80%) for 10 min at 4°C. The acetone was removed and the immunofluorescence reaction was performed with FITC-labeled D1 mAb anti-RVGP diluted in Evans Blue (1:400) for 1 h at 37°C and observed under microscope (Olympus).

3 Results

S2AcRVGP2 cells expressing the recombinant RVGP on their membrane as assayed by direct immunofluorescence labeling (Fig. 1) were collected at the exponential growth phase; 10⁷ cells were submitted to cell freezing, thawing and lysis as indicated (Table 2). Cell lysates were then analyzed by ELISA for its content of RVGP. Data in Table 2 show that, depending on the protocol for cell treatment, RVGP ELISA OD values varied from 0.090 to 0.427 and from 6.32 to 50.61 ng/10⁷ cells. These results indicate an eightfold variation in the quantification of RVGP. Regardless of the buffer used for freezing, thawing or lysis, lower RVGP values were always obtained in samples where lysis were carried out before freezing (6.32–16.27 ng/10⁷ cells) (Method D, Table 2) when compared to samples submitted to lysis after freezing and thawing (9.02–50.61 ng/10⁷ cells) (Methods A–C, Table 2). RVGP values were comparable for methods A and C: samples submitted, respectively, to cell freezing as dry pellet or suspended in a buffer and thawed at 4°C in buffer or at room temperature. Cell lysis performed with LB2, which had the poorest composition (Tris, NaCl, PMSF), led always to cell lysates with lower RVGP values in ELISA (9.02–15.1 ng/10⁷ cells) when compared to samples submitted to cell lysis with richer lysis buffers (LB1, LB3, LB4) (19.01–50.61 ng/10⁷ cells). LB4 cell lysates often showed slightly lower SDs in the OD measured. Both detergents, NP-40 or 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate (CHAPS) used for cell treatment in lysis buffers (LB) led to comparable values of RVGP in ELISA. No competing effect was observed in ELISA control assays (data not shown). Both physical pro-

Figure 1. Immunofluorescence of S2AcRVGP2 cells. S2AcRVGP2 cells were submitted to direct immunofluorescence using labeled antibodies recognizing the trimeric form of RVGP. $\times 2500$.

ocols tested for cell lysis, sonication (Method E, Table 2) and freezing-thawing (Method F, Table 2), led to lower RVGP values in ELISA (sonication: 28.3 ng/10⁷ cells and freezing-thawing: 14.7 ng/10⁷ cells) than those obtained with most chemical protocols of cell treatment. These cell lysates always showed higher SDs in OD measured in ELISA.

A second set of experiments was carried out with the elected protocol of cell treatment: Method A with B4 and LB4. A higher RVGP producer cell line (S2AcRVGP2k) was used to assay the optimal cell number and NP-40 concentration to be used for RVGP quantification by ELISA. Data shown in Fig. 2 indicate that the lower the cell number submitted to lysis, the higher the RVGP quantification. For 3×10^7 cells, we detected 62.4 ng/10⁷ cells and for 10⁵ cells we detected 1083 ng/10⁷ cells. Cell numbers lower than 10⁵ cells were not suitable for handling and gave quite variable results (data not shown).

The conclusions from these experiment were confirmed using assays to test the optimal concen-

Figure 2. RVGP quantification depending on the cell concentration. Different concentrations of viable S2AcRVGP2k cell were harvested at the exponential growth phase of culture, frozen to a dry pellet, thawed at room temperature, lysed with 1 mL of LB4 and submitted to RVGP quantification by ELISA. Results are expressed in ng RVGP/10⁷ cells as the mean values of three determinations.

Figure 3. RVGP quantification depending on the NP-40 concentration. Different concentrations of viable S2AcRVGP2k cell (n) were harvested at the exponential growth phase of culture, frozen as dry pellet, thawed at room temperature, lysed with 1 mL of LB 4 containing different concentrations [C] of NP-40 (0.2%, 0.5% or 1%) and submitted to RVGP quantification by ELISA. Results are expressed in ng of RVGP/10⁷ cells as the mean values of three determinations.

tration of NP-40 to be used in the lysis buffer. For this parameter, as shown in Fig. 3, the lower the NP-40 used (from 0.2% to 1%), the higher the RVGP quantification. For 5×10^6 cells, we obtained RVGP values of 353, 308 and 259 for a lysis buffer containing, respectively, 0.2, 0.5 and 1% NP-40.

4 Discussion

A crucial step for determining recombinant protein expression in the membrane of transfected animal cells is its extraction. Depending on this procedure the protein conformation can be preserved, which is essential for its biological activity. Several attempts to synthesize recombinant viral membrane glycoproteins for immunization purposes have failed because of difficulties in properly isolating them from the cell membrane.

Using S2AcRVGP2 and S2AcRVGP2k cells transfected with the whole sequence of RVGP gene and selected for stable expression of this membrane protein [1], we designed an analytical study for investigation of protocols for cell freeze, thaw, lysis and concentration because of the need for accurate RVGP quantification by ELISA to guide future purification steps. The ELISA, as it was performed, assured the RVGP quantification in its proper oligomerization due to the use of mAb that recognized only the site II of the trimeric form of the RVGP [2, 19]. Furthermore, the integrity of RVGP antigenic sites was favored using buffers at pH 7.4 [5, 20].

Data obtained in experiments using a low producer cell line (S2AcRVGP2) showed that best conditions of cell freezing were represented by entire

cells as dry pellets or cells suspended in buffer. Freezing of cell lysates did not lead to proper preservation of RVGP. Cell thawing carried out at room temperature or in the presence of a buffer showed better results. Both detergents used in the lysis buffers (NP-40 or CHAPS) allowed good RVGP quantification and have their own advantages, the NP-40 being cost effective and the CHAPS with a high critical micelle concentration (CMC), allowing a lower sample dilution to disrupt the micelles and consequently an easy removal from the protein-detergent complexes in a dialysis purification [21]. RVGP isolation for purification purposes is frequently performed using the zwitterionic detergent as CHAPS [17], but nonionic detergents have also been assayed [4]. Chemical approaches have been successfully used to extract the glycoproteins from virus particles and mammalian cells [22, 23].

For lysing cells, LB2 did not lead to good performances in RVGP quantification, possibly due to (i) its poor ionic strength (150 mM NaCl), which may lead to a higher content of solubilized RVGP and (ii) its higher detergent content (1% NP-40), which may lead to a higher protein inactivation. Using LB4, a slightly lower SD was observed in the RVGP quantifications. Although our assay protocols could detect RVGP in the low producer cell line (S2AcRVGP2), RVGP values differed by eightfold (from 6.32 to 50.62 ng/10⁷ cells) depending on the protocol used.

Physical procedures for cell lysis, freezing-thawing and sonication, did not lead to good performances in RVGP quantification, showing a higher SD in OD measured. Thus, based on the above-described experiments, we elected to use the RVGP extraction protocol consisting of cell freezing as dry pellet, cell thawing at 4°C with 0.5 mL B4 containing 25 mM Tris, 25 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM PMSF and cell lysing with 0.5 mL B4 containing 0.4% NP-40 (LB4).

Further analytical studies were performed with a higher RVGP producer cell line (S2AcRVGP2k). These experiments were carried out following the cell freezing, thawing and lysis as above described (Method A with LB4), in the aim of investigating the optimal cell number and NP-40 concentration in lysis buffer (LB4). Data show that a better RVGP quantification was obtained with lower cell number and lower concentration of NP-40 (0.2%). RVGP values ranged by 5.5-fold from 147 to 818 ng/10⁷ cells. This may be explained by an inefficient recombinant protein extraction due to cell aggregation that may occur in cell populations expressing recombinant membrane proteins. Scaling-up studies of RVGP quantification are underway to estab-

lish protocols for RVGP purification from large amounts S2AcRVGP2k cells.

In spite of using heterogeneous cell populations, in terms of cells expressing the recombinant RVGP, the overall data show a high degree of reproducibility.

In conclusion, these analytical studies show an important variation in the detection of the trimeric form of RVGP, depending on the protocol used for cell treatment. Furthermore, we propose, as a basis for scaling-up studies, a methodology for cell freezing, thawing and lysis that provides a significant improvement in the extraction of a recombinant membrane viral glycoprotein that can be used for assaying other membrane proteins.

This work was supported in part by grants from FAPESP (02/09482-3, 06/50338-4) and Fundação Butantan. C. A. Pereira is recipient of a CNPq senior 1A research fellowship. The authors are grateful to Angela Moraes and the research group of the FAPESP 02/09482-3 project for critical feedback during manuscript preparation.

The authors have declared no conflict of interest.

5 References

- [1] Gaudin, Y., Ruigrok, R. W., Tuffereau, C., Knossow, M., Flamand, A., Rabies virus glycoprotein is a trimer. *Virology* 1992, 187, 627–632.
- [2] Thoulouze, M. I., Lafage, M., Schachner, M., Hartmann, U. *et al.*, The neural cell adhesion molecule is a receptor for rabies virus. *J. Virol.* 1998, 72, 7181–7190.
- [3] Tuffereau, C., Bénéjean, J., Blondel, D., Kieffer, B., Flamand, A., Low-affinity nerve-growth factor receptor (P75NTR) can serve as a receptor for rabies virus. *EMBO J.* 1998, 17, 7250–7259.
- [4] Cox, J. H., Dietzschold, B., Schneider, L. G., Rabies virus glycoprotein. II. Biological and serological characterization. *Infect. Immun.* 1997, 16, 754–759.
- [5] Lafon, M., Wiktor, T. J., Macfarlan, R. I., Antigenic site on the CVS rabies virus glycoprotein: Analysis with monoclonal antibodies. *J. Gen. Virol.* 1983, 64, 843–851.
- [6] Seif, I., Coulon, P., Rollin, P. E., Flamand, A., Rabies virulence: Effect on pathogenicity and sequence characterization of rabies virus mutations affecting antigenic site III of the glycoprotein. *J. Virol.* 1985, 53, 926–934.
- [7] Prehaud, C., Coulon, P., LaFay, F., Thiers, C., Flamand, A., Antigenic site II of the rabies virus glycoprotein: Structure and role in viral virulence. *J. Virol.* 1988, 62, 1–7.
- [8] Dietzschold, B., Gore, M., Marchadier, D., Niu, H. S. *et al.*, Structural and immunological characterization of a linear virus neutralizing epitope of the rabies virus glycoprotein and its possible use in a synthetic vaccine. *J. Virol.* 1990, 64, 3804–3809.
- [9] Benmansour, A., Leblois, H., Coulon, P., Tuffereau, C. *et al.*, Antigenicity of rabies virus glycoprotein. *J. Virol.* 1991, 65, 4198–4203.
- [10] Lafay, F., Benmansour, A., Chebli, K., Flamand, A., Immunodominant epitopes defined by a yeast-expressed library of random fragments of the rabies virus glycoprotein map outside major antigenic sites. *J. Gen. Virol.* 1996, 77, 339–346.
- [11] Sissoeff, L., Mousli, M., England, P., Tuffereau, C., Stable trimerization of recombinant rabies virus glycoprotein ectodomain is required for interaction with the p75^{NTR} receptor. *J. Gen. Virol.* 2005, 86, 2543–2552.
- [12] Perrin, P., Joffret, M. L., Oth, D., Leclerc, C. *et al.*, Interleukin-2 production *in vitro*: A new approach to the study of rabies vaccine immunogenicity as appraised by testing different glycoprotein presentations. *Vaccine* 1988, 6, 331–338.
- [13] Gaudin, Y., Ruigrok, R. W., Knossow, M., Flamand, A., Low-pH conformational changes of rabies virus glycoprotein and their role in membrane fusion. *J. Virol.* 1993, 67, 1365–1372.
- [14] Yokomizo, A. Y., Jorge, S. A. C., Astray, R. M., Fernandes, I. *et al.*, Rabies virus glycoprotein expression in *Drosophila* S2 cells. I. Functional recombinant protein in stable co-transfected cell line. *Biotechnol. J.* 2007, 2, 102–109.
- [15] Perret, B., Approches moléculaires du mode d'action des opioïdes: Étude structurale et fonctionnelle du récepteur humain des opioïdes de type mu exprimé en cellules d'insecte, 26/06/2003, PhD thesis, Université Louis Pasteur, Ecole Supérieure de Biotechnologie de Strasbourg, Illkirch.
- [16] Gaudin, Y., Moreira, S., Benejean, J., Blondel, D. *et al.*, Soluble ectodomain of rabies virus glycoprotein expressed in eukaryotic cells folds in a monomeric conformation that is antigenically distinct from the native state of the complete, membrane-anchored glycoprotein. *J. Gen. Virol.* 1999, 80, 1647–1656.
- [17] Courgeon, A. M., Maingourd, M., Maisonhaute, C., Montmory, C. *et al.*, Effect of hydrogen peroxide on cytoskeletal proteins of *Drosophila* cells: Comparison with heat shock and other stresses. *Exp. Cell Res.* 1993, 204, 30–37.
- [18] Perrin, P., Lafon, M., Sureau, P., Enzyme linked immuno-sorbent assay (ELISA) for the determination of glycoprotein content of rabies vaccines, in: Meslin, F. X., Kaplan, M. M., Kowrowski, H. (Eds.), *Laboratory Techniques in Rabies*, WHO, Geneva 1996, pp. 383–388.
- [19] Gaudin, Y., Tuffereau, C., Durrer, P., Brunner, J. *et al.*, Rabies virus-induced membrane fusion. *Mol. Membr. Biol.* 1999, 16, 21–31.
- [20] Roche, S., Gaudin, Y., Characterization of the equilibrium between the native and fusion-inactive conformation of rabies virus glycoprotein indicates that the fusion complex is made of several trimers. *Virology* 2002, 297, 128–135.
- [21] Rosenberg, I. M., Membrane and particulate-associated proteins, in: Rosenberg, I. M. (Ed.), *Protein Analysis and Purification: Benchtop Techniques*, Birkhauser, Boston 1996, pp. 135–152.
- [22] Maillard, A. P., Gaudin, Y., Rabies virus glycoprotein can fold in two alternative, antigenically distinct conformations depending on membrane-anchor type. *J. Gen. Virol.* 2002, 83, 1465–1476.
- [23] Langevin, C., Jaaro, H., Bressanelli, S., Fainzilber, M., Tuffereau, C., Rabies virus glycoprotein (RVG) is a trimeric ligand for the N-terminal cysteine-rich domain of the mammalian p75 neurotrophin receptor. *J. Biol. Chem.* 2002, 277, 37655–37662.

This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/copyright>

Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Biotechnology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jbiotec

High-level expression of rabies virus glycoprotein with the RNA-based Semliki Forest Virus expression vector

Rim Benmaamar^{a,b,1}, Renato Mancini Astray^{c,1}, Renaud Wagner^a, Carlos Augusto Pereira^{c,*}

^a Dpt Récepteurs et Protéines Membranaires, CNRS-UMR7175, Illkirch, France

^b Bio-Xtal, Chemin des Croisettes 22, CH-1006, Epalinges, Switzerland

^c Laboratório de Imunologia Viral, Instituto Butantan, São Paulo, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 31 July 2008

Received in revised form 4 December 2008

Accepted 12 December 2008

Keywords:

Rabies virus

Rabies virus glycoprotein (RVGP)

Semliki Forest Virus (SFV)

ABSTRACT

Rabies is to this date one of the most important death causing zoonotic viral diseases, with 98% of deaths reported in developing countries, where access to modern vaccines and tools for efficient diagnostic remain unaffordable. In this paper, we describe a newly engineered RNA-based rabies virus glycoprotein (RVGP) expression vector based on the Semliki Forest Virus (SFV) system. A recombinant SFV carrying an RNA coding for RVGP (SFV-RVGP) was constructed and the RVGP expression was evaluated in animal cell cultures. The mRNA coding for RVGP and the RVGP itself were assessed by qPCR, Western-blotting, confocal microscopy, flow cytometry and ELISA. Moreover, SFV-RVGP was proven to be highly efficient in expressing the functionally trimeric RVGP. SFV-RVGP is easy to produce and efficient in different cell lines, making it an interesting candidate for efficient and functional viral glycoprotein expression.

© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Rabies is a zoonotic viral disease which infects domestic and wild animals. It is transmitted to other animals and humans through close contact with saliva from infected animals (i.e. bites, scratches, licks on broken skin and mucous membranes). Once symptoms of the disease develop, rabies is fatal to both animals and humans, with death occurring during the first seven days of illness if intensive care is not employed (Soulebot et al., 1982). About 98% of human rabies occurs in developing countries with considerable numbers of both stray and domestic dogs (NASPHV, 2007). Most of the 60,000 deaths from rabies reported annually around the world occur in Asia (especially in India and China) (Sudarshan et al., 2007; Zhang et al., 2005), Africa and Latin America (Knobel et al., 2005; Schneider et al., 2007), with 30–50% of the reported cases of rabies, and therefore deaths, occurring in children under 15 years of age (WHO, 2002). In contrast, in North America and Europe, most documented human rabies deaths occurred as a result of infection from the silver-haired bat rabies virus variant (Warrell and Warrell, 2004; Van der Poel et al., 2006) and in Australia at least two human deaths have occurred from exposure to a previously unrecognized rabies virus (Warrilow, 2005).

The rabies virus (RV) is a single-stranded, enveloped RNA virus that belongs to the *Lyssavirus* genus of the *Rhabdoviridae* family (Gaudin et al., 1992). The RV and other lyssaviruses are highly neurotrophic, targeting principally neuronal cells, and consequently leading to fatal encephalitis in infected mammals (Charlton, 1994). The RV envelope is composed of a unique type I glycoprotein of 65 kDa which is anchored within the viral membrane through a single transmembrane domain. The ectodomain, however, is organized as a trimer (3×65 kDa) that is responsible for recognition and binding of the virus to target cells, as well as low-pH fusion of the viral envelope with the host endosomal membranes (Whitt et al., 1991). The rabies viral glycoprotein, rabies virus glycoprotein (RVGP), has been shown to interact with the murine p75 neurotrophin receptor in neuronal cells through its ectodomain (Langevin et al., 2002) and that stable trimerization is required for efficient p75 interaction (Sissoëff et al., 2005). RVGP is also the target of neutralizing antibodies (Cox et al., 1977; Jallet et al., 1999; Maillard and Gaudin, 2002) and its antigenicity has been extensively studied and exploited in vaccine development in the past decades (Perrin et al., 1988). Thereby, it is mandatory to provide expression tools in which the RVGP protein is stably expressed under its antigenic form in order to induce efficient priming of the immune responses.

The Semliki Forest Virus, SFV, system has gained increasing interest over the past few decades due to its efficiency in heterologous protein expression, and notably the high-level expression of functional membrane proteins and receptors (Forsell et al., 2005; Lundström, 2003; Lundström et al., 1994; Hassaine et al., 2006). Moreover, its increased biosafety handling (Berglund et al., 1993; Smerdou and Liljeström, 1999) has rendered it more appealing for

* Corresponding author at: Instituto Butantan, Laboratório de Imunologia Viral, Av. Vital Brasil 1500, 05503-900 São Paulo, Brazil. Tel.: +55 11 37267222; fax: +55 11 37261505.

E-mail address: grugel@butantan.gov.br (C.A. Pereira).

¹ Both authors contributed equally to this work.

several receptor related applications (Lundström, 2002). In the SFV vector system, the structural protein genes encoding the capsid and spike (C-p62-k-E1) polypeptides are replaced by the foreign gene that is placed under the control of the strong subgenomic 26S viral promoter. The structural proteins are, on the other hand, expressed *in trans* from a helper RNA (Berglund et al., 1993; Liljeström and Garoff, 1991). Since the helper RNA lacks the sequence needed for its packaging into nucleocapsids, only recombinant RNAs are packaged and the resulting recombinant SFV particles are therefore replication-deficient. To further enhance this vector's biosafety features, a mutation was introduced in the region encoding the viral spike proteins leading to inhibition of host entry by the synthesized recombinant SFV. Hence, the recombinant stock is non-infectious and may only be activated *in vitro* by cleavage with α -chymotrypsin (Berglund et al., 1993).

In this study, new RVGP expression trials were conducted using a recombinant RNA-based SFV system. We engineered replication-deficient recombinant SFV particles, SFV-RVGP, in which the RVGP coding gene is fused to a FLAG-tag sequence and is under the control of the strong 26S subgenomic promoter (Hassaine et al., 2006). RVGP expression in this system was analyzed in mammalian cells by quantitative polymerase chain reaction (qPCR) and a series of immunodetection assays. We demonstrate in this study that high-level expression of the RVGP is attained after only short periods of infection by SFV-RVGP particles. Moreover, stable trimeric folding of the expressed RVGP is observed, indicating the SFV vector's ability in expressing functional RVGP. Altogether, these data demonstrate that the newly engineered SFV-RVGP is an easy to produce and efficient candidate for safe, cost-effective and functional expression of the RVGP in animal cell culture systems.

2. Material and methods

2.1. Animal cell culture

BHK-21 (baby hamster kidney), HEK-293 (human embryonic kidney), Huh-7 (human hepatoma), VERO (green monkey kidney) cells were used in this study. Cells were cultured either in α -MEM (Invitrogen) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (Cultilab) or in a 1:1 mixture of Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Sigma) and Iscove's Modified Dulbecco Medium (Sigma), supplemented with 10% FBS (Sigma) and 4 mM L-glutamine (Sigma) and grown at 37 °C, 5% CO₂ until they reach 70–90% confluence. During the entire virus infection period, cells were cultivated in respective serum-free media.

2.2. PCR amplification and molecular cloning

PCR amplifications were performed in standard conditions using a PCR master mix containing specific primers (Sigma-Genosys) and a proofreading PrimeSTAR HS DNA polymerase from Takara. The RVGP ORF was PCR-amplified using specific primers in which a unique *Bam*HI and type IIS restriction endonuclease *Esp*3I restriction sites were inserted at the 5' and 3' ends of the gene, respectively. The amplified fragment was subcloned into the pCR4[®]Blunt-TOPO[®] vector (Invitrogen) and the accuracy of the sequence was verified. After enzymatic restriction (Fermentas), the obtained *Bam*HI/*Spe*I fragment was subcloned into the pSFV-2genC plasmid (Hassaine et al., 2006) resulting in the pSFV-RVGP construct, in which the RVGP gene was placed under the control of the strong 26S promoter, such that the recombinant RVGP protein would be over-expressed with a FLAG-tag fused to its N-terminal end. The pSFV-Helper2 plasmid, on the other hand, was obtained by cloning the SFV structural capsid and envelope genes under the con-

trol of the viral 26S subgenomic promoter, as previously described (Berglund et al., 1993).

For DNA propagation, heat-shock transformation of a chemically competent *E. coli* TOP10 strain was performed according to instructions from Invitrogen and DNA was extracted according to instructions from the Nucleospin DNA purification kit (Macherey-Nagel). DNA concentration was measured either semi-quantitatively by comparing the intensity of ethidium bromide fluorescence against that of commercially available DNA marker standards (GeneRuler[™] 1 kb DNA Ladder, Fermentas), or quantitatively, by measuring optical density values at 260 nm (OD₂₆₀) on a UV spectrophotometer (Pharmacia).

2.3. *In vitro* transcription for recombinant viral RNA production

RNA-free DNA was obtained according to instructions from QIAfilter Plasmid Midi Kit (QIAGEN). Plasmids (5 μ g DNA) were first linearized by enzymatic digestion in a 50 μ l final volume mix for 2 h at 37 °C according to instructions from Fermentas; pSFV-RVGP was linearized by *Nru*I, whereas pSFV-Helper2 was digested by *Spe*I, in their corresponding buffers. *In vitro* transcription was then performed using SP6 RNA polymerase according to instructions from Takara. Briefly, 2.5 μ g linearized DNA was applied in a 50 μ l mix containing 1 μ l 50 U/ μ l SP6 polymerase, 5 μ l 10 $\times$ SP6 Buffer, 5 μ l 0.1% BSA, 5 μ l 100 mM DTT, 5 μ l 100 mM 7 mG (ppp) G RNA CAP (Biolabs), 5 μ l NTP mix (10 mM ATP, CTP, UTP each and 5 mM GTP) and 1 μ l 40 U/ μ l RNase Inhibitor (Roche). *In vitro* transcription was performed at 40 °C for 2 h. Appropriated controls on 1% agarose gels were performed at each step.

2.4. Recombinant SFV-RVGP production

BHK-21 cells were cultivated in T-175 cm² flasks (Nunc) until approximately 70% confluence. Cells were washed once with PBS (Sigma) then detached by trypsin (Sigma) treatment and centrifuged at 405 $\times$ g for 5 min. Cells were resuspended in 400 μ l PBS to which 50 μ l pSFV-RVGP RNA and 25 μ l pSFV-Helper2 mRNA were added. Co-electroporation was performed by two consecutive pulses at 360 kV, 75 μ F and ∞ Ω in a GenePulser I system (Bio-Rad), after which the cells were cultured in 10 ml medium at 37 °C, 5% CO₂ for 24 h. Single-round infectious recombinant viral particles, rSFV-RVGP, were released into the culture medium and collected 24 h post electroporation. Recombinant particles were filtered through a Millex[®] PES 0.22 μ m membrane (Millipore) and viral activation was achieved with 25 μ l α -chemotrypsin 20 mg/ml (Sigma) for 25 min at room temperature, followed by 25 μ l aprotinin 10 mg/ml (Sigma) incubation for 5 min at room temperature (for α -chemotrypsin inhibition). Activated recombinant SFV-RVGP aliquots were kept at –80 °C for prolonged storage.

SFV-RVGP titration was estimated by flow cytometry from cell samples infected with both 10 and 20 μ l SFV-RVGP. At 24 h post-infection, cells were harvested, counted and labeled for flow cytometry analysis, as described above. According to the hypothesis that cells are infected by one and only one viral particle per cell, the percentage of fluorescent cells was therefore directly correlated to the quantity of infectious particles present in the viral preparation. Viral titration was estimated to be 8 $\times$ 10⁷ infectious particles per ml.

2.5. Cell infection

For RVGP expression in different cell lines, 5 $\times$ 10⁴ cells were plated per well in 12-well culture plates and infected the next day when they reached 80–90% confluence. Briefly, the supernatant was discarded and the cells were infected with 10 μ l of activated SFV-RVGP in 3 ml culture medium without FBS, as recommended by SFV

Table 1

Primer sequences for RT-PCR, PCR and qRT-PCR.

Gene	Primer	Sequence	PCR fragment size
RVGP	RVGP1a	5'-TGGTTCCTCAGGCTCTCC-3'	RVGP1a + RVGPPr3 (683 bp)
	RVGP9	5'-CTGACTACCACTGGCTTCG-3'	RVGP9 + RVGPPr3 (276 bp)
	RVGPPr1	5'-TGTAATCGTGGTTAGTGAGC-3'	RVGP9 + RVGPPr1 (177 bp)
	RVGPPr3	5'-AGCCGCAAGTCTCACTCCC-3'	
Actin	42F	5'-GCTTCGCTGTCTACTTTCCA-3'	42F + 42R (105 bp)
	42R	5'-CAGCCCCGACTACTGCTTAGA-3'	
SFV	F-I-2	5'-ACAGACTGTCACTGAGCAG-3'	F-I-2 + R-I-2 (145 bp)
	R-I-2	5'-TCTCTGCAGTAGATGGTCAC-3'	
	R-E-2	5'-AGTCCACGTCATCATTGAG-3'	

Gene Expression System – Instruction Manual (GibcoBRL®). Cells were incubated at 37 °C with 5% CO₂ for the required assay period. RVGP expression was assessed by a series of different immunodetection methods.

2.6. Reverse transcriptase-PCR (RT-PCR) assays

Cell RNA was obtained from cell pellets, which were prepared as described above, in a 20 µl final volume following TRIZOL (Invitrogen) treatment according to the manufacturer's instructions. Viral RNA was recovered in an 80 µl final volume from 500 µl SFV-RVGP viral aliquots according to instructions from QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen). Total cell and viral RNA were quantified by conventional spectrophotometer measurement at OD 260 nm as well as precise fluorometer measures (Qubit™ Fluorometer, Invitrogen). Carry-over DNA was eliminated from the RNA samples using RQ1 RNase-free DNase (PROMEGA) 1 U/µg RNA, in the presence of Recombinant Ribonuclease Inhibitor (Invitrogen), according to the manufacturer's instructions. SFV, RVGP and *actin* cDNA were produced from 0.5 µg RNA using 2 pM specific primers from IDT, Coralville, USA (Table 1) and M-MLV reverse transcriptase (Invitrogen) in a 20 µl reaction, according to the manufacturer's instructions, and incubated as follows: 5 min at 65 °C, 50 min at 37 °C and 15 min at 70 °C. Internal controls for the RT-PCR included samples with either no RNA template, no reverse transcriptase (RT) step or no DNase treatment.

The amplified cDNA (3 µl) was set up in a 25 µl PCR reaction, according to instructions from Invitrogen, containing either SFV, RVGP or *actin* 0.2 pM forward and reverse specific primers (Table 1). PCR was performed on the cDNA using Platinum® Taq DNA polymerase (Invitrogen) with the following temperature profile: 1 min at 94 °C followed by 30 incubation cycles of 30 s at 94 °C, 30 s at 53 °C and 30 s at 72 °C and a final extension of 5 min at 72 °C. Positive control cDNA for RVGP and SFV amplifications was obtained from S2AcRVGP cells (Swiech et al., 2008) and SFV-RVGP viral aliquots, respectively, whereas negative control samples contained cDNA from BHK-21 non-infected cells. The SFV specific primers were designed from the *nsp1* region (Table 1). The amplified products were analyzed on 1% agarose gels stained with ethidium bromide and visualized under UV light.

2.7. Quantitative real-time PCR assays

Quantitative real-time PCR (qPCR) was assessed in a CHROMO4 Continuous Fluorescence Detector–Peltier Thermal Cycler-200 (MJ Research) apparatus. cDNA quantification was performed using the Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. Briefly, different concentrations of viral cDNA (3 µl) were set up in a 12.5 µl qPCR reaction containing either RVGP or *actin* specific forward and reverse primers (7.5 pmol/µl each). qPCR was performed using the following temperature profile: 2 min at 50 °C, 2 min at 95 °C, 15 s at

95 °C, 30 s at 53 °C, 30 s at 72 °C, 5 s at 80 °C (for sample value reading); steps 3–6 were repeated 45 times and the melting curve was measured from 60 °C to 90 °C. Relative quantification (*R*) of RVGP cDNA was determined by the following equation (Pfaffl, 2001):

$$R = \frac{E_{RVGP}^{(Ct_{calibrator} - Ct_{sample})}}{E_{Ref}^{(Ct_{calibrator} - Ct_{sample})}}$$

where E_{RVGP} and E_{Ref} are the efficiencies of RVGP and *actin* cDNA amplifications ($E_{RVGP} = 2.22$; $E_{Ref} = 2.02$); $Ct_{calibrator}$ and Ct_{sample} are the cycles where the exponential curves of the calibrator and the sample fluorescences cross the defined threshold, respectively.

The efficiencies were calculated from a cDNA standard dilution curve based on serial log dilutions (100 ng, 10 ng, 0.1 ng, 0.01 ng, 0.001 ng) of RVGP or *actin* cDNAs. The established qPCR protocol was performed in triplicates for each dilution in order to obtain the Ct values. Ct s were then plotted against the logarithmic values of the above dilutions and the slope of the resulting semi-log regression line was used to determine the PCR efficiencies by using the formula: $E = 10^{(-1/S)} - 1$, where E is the efficiency and S is the slope.

2.8. Western-blotting assay

Protein expression was assessed by using either mouse M2-anti FLAG (Sigma–Aldrich) or FITC-conjugated goat polyclonal anti-rabbit anti-RVGP whole antibody (Invitrogen) provided by Institut Pasteur. Cells were grown in 24-well plates and infected with 10 µl of SFV-RVGP for 24 h and 48 h to test for protein expression. Culture medium was discarded at each time-point and cells were harvested in 0.5 ml of lyses buffer (200 mM Tris–HCl pH 8.8, 20% glycerol, 5 mM EDTA, 20% SDS, 0.5 mM DTT, 0.02% Bromophenol Blue). 40 µl of the lysed cell samples were run onto a 12% polyacrylamide gel (300 V, 40 mA for 2 h and then 90 mA for 2 h in a Bio-Rad apparatus) (Zeder-Lutz et al., 2006) and proteins were transferred overnight onto a nitrocellulose membrane (Millipore) following standard procedure (Towbin et al., 1992). Briefly, after electroblotting at the constant current of 30 mA per gel in transfer buffer (2.5 mM Tris, 19 mM glycine, 0.02% SDS, 20% methanol), the membrane was blocked in PBS-TM [10 mM Na₂HPO₄, 1.8 mM K₂HPO₄, pH 7.4, 140 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 0.05% Tween 20, 3% skimmed milk powder] for 2 h at room temperature. Transferred proteins were then labeled with either M2 anti-FLAG antibody (diluted 1:8000 in PBS-TM) or anti-RVGP antibody (diluted 1:4000 in PBS-TM) for 2 h at room temperature, washed three times for 5 min with PBS-T [10 mM Na₂HPO₄, 1.8 mM K₂HPO₄, pH 7.4, 140 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 0.05% Tween 20], and incubated with sheep anti-mouse IgG-HRP conjugated antibody (GE Healthcare) (diluted 1:10,000 in PBS-TM) or goat anti-rabbit IgG-HRP (Sigma) (diluted 1:10,000 in PBS-TM), respectively. Membranes were washed twice with PBS-T, then once with PBS [10 mM Na₂HPO₄, 1.8 mM K₂HPO₄, pH 7.4, 140 mM NaCl, 2.7 mM KCl]. The immunoblot bands were visualized using an enhanced chemiluminescence reagent (SuperSignal West Pico Kit, Pierce) according to the manufacturer's instructions.

2.9. Flow cytometry assays

Samples were measured by flow cytometry in a FACS apparatus (Becton Dickinson FACSCalibur™, Multipurpose flow cytometer). Fluorescence was measured using a 530-nm filter and the data were processed with the Cell Quest software (Becton Dickinson). Cells were labeled, as previously described, with a fluorescent FITC-labeled D1 mAb anti-RVGP (Institut Pasteur) diluted in PBS (1:400) (Yokomizo et al., 2007). The culture medium was discarded and the cells washed once with 1 ml PBS then detached with 0.5 ml of PBS – 5 mM EDTA (10 min incubation at 37 °C). After centrifugation, cells were resuspended in 50 µl of PBS and 50 µl of diluted

RVGP-FITC antibody. Labeling was performed at 4 °C for 30 min. Cells were centrifuged at $10,600 \times g$ for 5 min and resuspended in 500 μ l PBS–paraformaldehyde 2%. Samples were stored at 4 °C and protected from light until FACS analysis performed on 10,000 gated events.

2.10. Confocal microscopy assay

Fluorescence was assessed by means of a Zeiss LSM 510 Meta confocal microscope. Cells were cultured on glass cover slips placed at the bottom of wells. Culture medium was discarded and the cells washed with 1 ml PBS. Cells were fixed with cold 80% acetone for 10 min, washed with PBS and labeled with FITC-conjugated D1 mAb anti-RVGP diluted (1:400) in an Evans blue/PBS solution (1:100). Labeling was performed for 1 h at 37 °C. Cells were then fixed in PBS – 30% glycerol and kept at 4 °C, in the dark, until analysis.

2.11. ELISA

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was performed according to instructions from the Rabies Virus Glycoprotein Enzyme Immunoassay Kit–Institut Pasteur, France. 96-well ELISA plates (Corning, Costar) were first coated with the anti-RVGP monoclonal Ab for 3 h at 37 °C then overnight at 4 °C. Both culture medium and cell contents, derived from 3×10^5 cells, were analyzed for RVGP expression. Samples were read at an OD of 492 nm with a LabSystems MultiSkan MS photometer. Briefly, cell samples were centrifuged for 5 min at $10,600 \times g$ and cell pellets, as well as 300 μ l cell supernatant aliquots, were frozen at –20 °C. ELISA samples were prepared as previously described (Perrin et al., 1996). Briefly, samples were first resuspended in 1 ml of lyses Buffer (Tris pH 7.4, 25 mM, NaCl 25 mM, $MgCl_2$ 5 mM) containing 0.2% Nonidet P-40 detergent (Fluka). Samples were vortexed every 15 min during the total incubation period (1 h at 4 °C) then centrifuged 5 min at $10,600 \times g$ to sediment cell debris. ELISA was performed in duplicates using 200 μ l supernatants per assay. The RVGP content was calculated against a calibrated standard curve obtained from purified RVGP supplied with the RVGP ELISA kit.

3. Results

3.1. SFV and RVGP RNA expression in SFV-RVGP and in SFV-RVGP infected BHK-21 cells

RT-PCR amplifications were performed with optimized *SFV nsp1* and *RVGP* primers in order to evaluate the presence of the *SFV nsp1* and *RVGP* mRNA in the SFV-RVGP particles as well as in SFV-RVGP infected BHK-21 cells. Non-infected cells were used as negative controls. As shown in Fig. 1, RT-PCR amplifications yielded specific bands at the expected sizes for both *SFV* (145 bp) and *RVGP* (276 bp) genes in both SFV-RVGP particles and in BHK-21 infected cells. On one hand, these data confirm that both the *SFV nsp1* and the *RVGP* RNAs are present in the engineered SFV-RVGP particles and that, on the other hand, both RNAs are efficiently transcribed within the infected cells. Band sizes were analyzed separately by direct amplifications of plasmid DNA using the same sets of primers (data not shown).

3.2. RVGP detection in SFV-RVGP infected BHK-21 cells

Fig. 2 shows that, in Western-blotting assays, a significant level of RVGP expression was observed in BHK-21 cells infected with SFV-RVGP, at 24 and 48 h. Expression could be monitored by using antibodies against RVGP itself or against the M2-FLAG-tag expressed in fusion with the N-terminal RVGP end. The synthesized RVGP exhibited the expected molecular mass of 80 kDa which

Fig. 1. RT-PCR of *SFV* and *RVGP* transcription. RNA was extracted from recombinant SFV-RVGP particles, or from BHK-21 cells infected for 24 h with SFV-RVGP, and submitted to RT-PCR for detection of RNA coding for *SFV nsp1* or *RVGP*. Lanes: M, molecular weight; 1, SFV-RVGP cDNA submitted to RT-PCR with *RVGP* primers; 2, SFV-RVGP cDNA submitted to RT-PCR with *SFV nsp1* primers; 3, cDNA from SFV-RVGP infected BHK-21 cells submitted to RT-PCR with *RVGP* primers; 4, cDNA from SFV-RVGP infected BHK-21 cells submitted to RT-PCR with *SFV nsp1* primers; 5, cDNA from non-infected control BHK-21 cells submitted to RT-PCR with *RVGP* primers; 6, cDNA from non-infected control BHK-21 cells submitted to RT-PCR with *SFV nsp1* primers.

corresponds to the recombinant 65 kDa RVGP protein with the additional 15 kDa fusion tags. A lower molecular weight band observed in M2-FLAG-tag expression at 24 h of infection can be attributed to an immature form RVGP labeling during synthesis process.

3.3. Kinetics of RVGP mRNA and RVGP expression during BHK-21 infection with SFV-RVGP

Kinetic studies of RVGP expression were performed in SFV-RVGP infected BHK-21 cells (Fig. 3). Cell samples were periodically assessed by qPCR for RVGP mRNA transcription. mRNA increases sharply after infection, with high RVGP levels detected as early as 4 h post-infection and attaining a peak level after 12 h of infection before slightly decreasing afterwards. The mRNA synthesis was followed closely by RVGP translation and its accumulation in infected cells, as shown by cell flow cytometry. BHK-21 cells expressing RVGP on their membrane could already be detected as early as 4 h after SFV-RVGP infection. From 4 h to 24 h post-infection, the percentage of membrane localized RVGP cells increased from 1.4 to 81%.

The RVGP content of SFV-RVGP infected BHK-21 cells, as confirmed by ELISA assays, mirrored the high level of recombinant RVGP cell expression. Indeed, RVGP could be detected by ELISA as early as 12 h after SFV-RVGP infection ($0.31 \mu\text{g}/10^6$ cells), attaining maximum levels at 24–48 h ($1.8\text{--}2.2 \mu\text{g}/10^6$ cells). In later periods of infection the morphologically observed cell detachment and lyses were accompanied by both a drop in the RVGP cell content and its subsequent release into the supernatant fraction. Flow cytometry analysis of RVGP expression in cell membranes at late periods of infection, was therefore not reliable as cells started to undergo lyses.

As shown in Fig. 4, confocal microscopy examination revealed that RVGP appears to be solely membrane-located in the infected cells. However, in later periods of infection (48 h), cells demonstrating high levels of RVGP expression still undergo substantial morphological cell damage due to the excessive and prolonged infection. Differences in cell morphology were already visible at 24 h post-infection where cells clumped, died and detached more

Fig. 2. RVGP expression analysis by Western-blotting assay. Proteins were extracted from BHK-21 cells 24 and 48 h after infection, or from non-infected control BHK-21 cells, and were submitted to Western-blotting assay. RVGP was detected by using anti-RVGP antibodies (A) or anti-M2-FLAG antibodies (B). Arrows indicate the molecular weight of the detected protein at the expected size of 80 kDa.

Fig. 3. Kinetics of RVGP mRNA and RVGP expression in SFV-RVGP infected BHK-21 cells. Cells were infected with SFV-RVGP and RNA was extracted at different time points for qPCR evaluation of RVGP mRNA synthesis (◆). Cells were, in parallel, submitted to flow cytometry analysis for evaluation of RVGP positive cells (open bars). Both cell extracts (▼) and supernatants (■) were analyzed by ELISA for RVGP quantification. Absolute values of RVGP mRNA are shown. Standard deviations were calculated but were insignificant.

readily than during the earlier hours of infection (4 h, 8 h and 12 h; data not shown).

In a parallel study, we assayed the efficiency of the recombinant SFV-RVGP particles to infect and induce RVGP mRNA and RVGP expression in various cell lines (BHK-21, Huh-7, HEK-293 and VERO cells). As shown in Fig. 5, after 24 h of SFV-RVGP infection RVGP mRNA could be detected in all cell cultures, but at 48 h of

infection RVGP mRNA was found in BHK-21, Huh-7 and VERO cells, indicating an efficient RNA transcription in these cells upon prolonged SFV-RVGP infection. Although the RVGP mRNA detection at 24 h in HEK-293 cells can be attributed to RNA present in the viral preparation used for infection, the data suggest an impairment of RVGP RNA transcription in HEK-293 cells, in contrast to a productive RVGP RNA transcription in the other cell substrates, upon prolonged

Fig. 4. Confocal analysis of SFV-RVGP infected BHK-21 cells. Cells infected with SFV-RVGP were fixed and treated with FITC-labeled anti-RVGP antibodies and examined in a confocal microscope. Non-infected cells were used as controls. (A) Non-infected BHK-21 cells; (B) BHK-21 cells infected with SFV-RVGP for 24 h; (C) BHK-21 cells infected with SFV-RVGP for 48 h. Stack sizes for images: 460.7 μm × 460.7 μm × 0.0 μm.

Fig. 5. RVGP expression in different mammalian cell cultures. BHK-21, Huh-7, HEK-293 and VERO cells were infected with low MOI of the SFV-RVGP; (A) mRNA was evaluated by RT-PCR at 24 and 48 h. Lanes: M, molecular weight; 1, BHK-21 cells; 2, Huh-7 cells; 3, HEK-293 cells and 4, VERO cells. (B) RVGP expression was evaluated by both flow cytometry and ELISA at 24, 48 and 72 h. The % of RVGP fluorescent cells was determined for HUH-7 (▨) and BHK-21 (■) cells by flow cytometry. RVGP from cell fractions was assessed for HUH-7 (▲) and BHK-21 (◇) cells by ELISA. Standard deviations were calculated but were insignificant.

SFV-RVGP infection. Both BHK-21 and Huh-7 cells were capable of synthesizing RVGP as shown by ELISA and flow cytometry analysis. Nevertheless, the infection kinetics showed a higher ability of BHK-21 cells to express the RVGP. In this assay, the lower SFV-RVGP multiplicity of infection (MOI) used, as compared to the previous assay (Fig. 3), led to a delayed RVGP expression but the kinetics pattern of expression remained comparable. Of notice was the finding that in later stages of infection (72 h), we observed an important accumulation of RVGP in the BHK-21 supernatant fraction (50% of RVGP fluorescent cells and $0.56 \mu\text{g}/10^6$ cells) in contrast to data observed for Huh-7 cells (6% of RVGP fluorescent cells and no detection of RVGP in supernatant) in the same conditions (data not shown). It may be explained by enhanced cell/membrane lyses in the BHK-21 cell cultures and hence loss of RVGP oligomerization, as compared to the Huh-7 cell cultures, due to differences in cell characteristics. On the other hand, SFV-RVGP infection of VERO and HEK-293 cells led to no RVGP expression (data not shown) indicating that in VERO cells, although the RVGP mRNA transcription occurred, either no RVGP translation took place, or that the produced RVGP was unable to oligomerize in the cell membrane, or that it had undergone rapid degradation.

Nevertheless, BHK-21 cells used throughout this study, to assess the newly engineered SFV-RVGP recombinant system, proved to be highly efficient in yielding a properly folded heterologous RVGP, as successfully demonstrated by conformational monoclonal antibodies used in ELISA, flow cytometry and confocal microscopy studies.

4. Discussion

Rabies is currently an incurable disease with a mortality rate of 100%, if not immediately treated after the first debilitating nervous symptoms, making it one of the most dangerous zoonotic viral diseases to both humans and animals (NASPHV, 2007; Sudarshan et al., 2007; Zhang et al., 2005; Knobel et al., 2005; Schneider et

al., 2007; WHO, 2002). Yet, efficient diagnostic and safe treatment remains unaffordable in regions where it is most endemic. Recent development in vaccinology includes the use of genetic vaccines based on DNA vectors encoding viral antigens. Nevertheless, better knowledge of the structure and function of viral antigen candidates remains a prerequisite for better vaccine development.

Since the rabies virus glycoprotein (RVGP) is the main mediator responsible not only for virus entry into neuronal cells, but also for triggering protective immune responses, it has been a target of increasing interest in gene expression studies in different cell systems. Recombinant RVGP is, in this way, an outstanding candidate not only for immunization studies, but also as a key reagent in diagnostic assays aiming at immune response evaluation. Thereby, it is mandatory to develop efficient expression tools in which the RVGP protein is expressed under its functionally antigenic form.

With the present advances in the fields of molecular biology and gene expression, new animal cell technologies are driving studies towards the establishment of bioprocesses capable of addressing both qualitative and quantitative requirements for recombinant virus specific immunobiologicals. Gene expression in host cells may address these requirements and several technological approaches are now available. In this sense, different gene expression systems have been employed to study the RVGP (Whitt et al., 1991; Langevin et al., 2002; Sissoëff et al., 2005; Cox et al., 1977) and recently, we have described the expression of RVGP in stable transfected *Drosophila* S2 cells (Yokomizo et al., 2007; Astray et al., 2008).

The replication-deficient RNA-based SFV vectors have, in previous studies, proven to be highly efficient for heterologous recombinant protein expression in different cell substrates (Kohl et al., 1999). Moreover, recombinant SFV particles are easy to produce and is functional in different cell lines making this approach an efficient and flexible system not only to be used for recombinant protein synthesis in animal cell cultures, but also to be used “*in vivo*”

for immunization purposes. We therefore investigated the effectiveness of the recombinant SFV system in expressing the RVGP. Recombinant SFV-RVGP constructs were monitored for the presence of expected RNA sequences coding for *SFV nsp1* and *RVGP* in their genome (Fig. 1). Upon cell infection with SFV-RVGP, the kinetics of *RVGP* mRNA expression was assessed by qPCR and that of *RVGP* expression was evaluated by various immunodetection assays (Western-blotting, flow cytometry, confocal microscopy and ELISA). Western-blotting assays, performed with antibodies against *RVGP* revealed a single protein band at the expected 80 kDa size, which corresponds to the recombinant *RVGP* protein (65 kDa) fused to the expression tags (15 kDa). The assay with highly sensitive M2-FLAG-tag, revealed other than the 80 kDa *RVGP*, a lower molecular weight band at 24 h of infection which can be attributed to an immature form of *RVGP* labeling during synthesis process (Fig. 2).

Moreover, kinetics studies showed that *RVGP* mRNA synthesis, detected as early as 4 h post SFV-RVGP infection by RT-PCR, was followed by a sharp increase in the number of cells expressing the *RVGP* over a period of 24 h (as assessed by ELISA and flow cytometry). Since prolonged SFV-RVGP infection leads to cell lyses, *RVGP* found in cell supernatants was possibly associated with membrane debris released into the culture medium (Fig. 3). Furthermore, fluorescence data indicated that the expressed *RVGP* in BHK-21 cells seemed to be not only trimeric, but exclusively membrane localized (Fig. 4).

The *RVGP* expression in this system was also shown to be dependent on the MOI used for infection, although the basic kinetics pattern remained the same (Fig. 5). Depending on the cell substrate, *RVGP* mRNA transcription, *RVGP* expression magnitude and *RVGP* degradation/preservation in later stages of infection varied significantly (Fig. 5).

Throughout this study, we used a conformational antibody that specifically and uniquely recognizes the trimeric form of *RVGP* (ELISA, flow cytometry and confocal microscopy assays). We therefore continually ensured the proper folding of the *RVGP* into a functionally trimeric form when synthesized in SFV-RVGP infected cells.

Another interesting characteristic of the SFV-RVGP is that viral preparations can withstand long storage periods without undergoing degradation. Different viral preparations, produced and activated at different times, were stored either at -20°C or -80°C for over one year. Comparable *RVGP* expression levels were observed in all preparations. Although SFV titers are generally proved to decrease after a couple of freezing/thawing cycles, we observed significantly similar *RVGP* expression levels in cells infected by recombinant SFV-RVGP particles after two to three freezing/thawing cycles (data not shown).

The fact that SFV has a broad host range and is known to infect a number of animal cells, including various mammalian and mosquito cell lines (Kohl et al., 1999) opens a great possibility of bioprocess studies using different cell substrates.

We can therefore conclude that our SFV-RVGP preparations are highly productive, stable and reproducible and could be stored for long periods of time without succumbing to RNA degradation. Studies are also ongoing to investigate further bioprocess developments in view of optimizing the *RVGP* expression and hence envisaging large-scale production of purified and highly antigenic recombinant *RVGP*.

Although both, *Drosophila* S2 cells (Astray et al., 2008) and SFV systems have recently been shown to be efficient for *RVGP* expression, they differ significantly in their basic properties. S2 cells constitute stably transfected cell lines expressing the *RVGP*, which in turn can be used for protein immunization whereas SFV-RVGP constitute “suicidal” virus particles which can be used for *RVGP* expression upon infection of different cell substrate and also be used for *RVGP*-RNA immunization

Acknowledgements

We thank Dr. George Mário da Costa Ferreira Jr., Laboratório de Imunoquímica, Instituto Butantan, Sao Paulo – SP, Brasil, for granting us access to FACSCalibur cytometry analysis. Many thanks to Alexander Seixas de Souza, Instituto Butantan, Laboratório de Parasitologia/Malacologia, for according us access to confocal microscopy. This work was financially supported by grants from CNRS – FAPESP agreement (06/50338–4). C.A. Pereira is the recipient of a CNPq IA senior research fellowship.

References

- Astray, R.M., Augusto, E., Yokomizo, A.Y., Pereira, C.A., 2008. Analytical approach for the extraction of recombinant membrane viral glycoprotein from stably transfected *Drosophila melanogaster* cells. *Biotechnol. J.* 3, 98–103.
- Berglund, P., Sjöberg, M., Garoff, H., Atkins, G.J., Sheahan, B.J., Liljeström, P., 1993. Semliki Forest virus expression system: production of conditionally infectious recombinant particles. *Biotechnology* 11, 916–920.
- Charlton, K.M., 1994. The pathogenesis of rabies and other lyssaviral infections: recent studies. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 187, 95–119.
- Cox, J.H., Dietzschold, B., Schneider, L.G., 1977. Rabies virus glycoprotein. II. Biological and serological characterization. *Infect. Immun.* 16, 754–759.
- Forsell, M.N., Li, Y., Sundbäck, M., Svehla, K., Liljeström, P., Mascola, J.R., Wyatt, R., Karlsson Hedestam, G.B., 2005. Biochemical and immunogenic characterization of soluble human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein trimers expressed by Semliki Forest Virus. *J. Virol.* 79, 10902–10914.
- Gaudin, Y., Ruigrok, R.W., Tuffereau, C., Knossow, M., Flamand, A., 1992. Rabies virus glycoprotein is a trimer. *Virology* 187, 627–632.
- Hassaine, G., Wagner, R., Kempf, J., Cherouati, N., Hassaine, N., Prual, C., André, N., Reinhart, C., Pattus, F., Lundström, K., 2006. Semliki forest virus vectors for over-expression of 101 G protein-coupled receptors in mammalian host cells. *Protein Expr. Purif.* 45, 343–351.
- Jallet, C., Jacob, Y., Bahloul, C., Drings, A., Desmezieres, E., Tordo, N., Perrin, P., 1999. Chimeric lyssavirus glycoproteins with increased immunological potential. *J. Virol.* 73, 225–233.
- Knobel, D.L., Cleaveland, S., Coleman, P.G., Fèvre, E.M., Meltzer, M.I., Miranda, M.E., Shaw, A., Zinsstag, J., Meslin, F.X., 2005. Re-evaluating the burden of rabies in Africa and Asia. *Bull. World Health Organ.* 83, 360–368.
- Kohl, A., Billecoq, A., Préhaud, C., Yadani, F.Z., Bouloy, M., 1999. Transient gene expression in mammalian and mosquito cells using a recombinant Semliki Forest virus expressing T7 RNA polymerase. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 53, 51–56.
- Langevin, C., Jaaro, H., Bressanelli, S., Fainzilber, M., Tuffereau, C., 2002. Rabies virus glycoprotein (RVG) is a trimeric ligand for the N-terminal cysteine-rich domain of the mammalian p75 neurotrophin receptor. *J. Biol. Chem.* 277, 37655–37662.
- Liljeström, P., Garoff, H., 1991. A new generation of animal cell expression vectors based on the Semliki Forest virus replicon. *Biotechnology* 9, 1356–1361.
- Lundström, K., Mills, A., Buell, G., Allet, E., Adami, N., Liljeström, P., 1994. High-level expression of the human neurokinin-1 receptor in mammalian cell lines using the Semliki Forest virus expression system. *Eur. J. Biochem.* 224, 917–921.
- Lundström, K., 2002. Semliki forest virus-based expression for versatile use in receptor research. *J. Recept. Signal. Transduct. Res.* 22, 229–240.
- Lundström, K., 2003. Semliki Forest virus vectors for rapid and high-level expression of integral membrane proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1610, 90–96.
- Maillard, A.P., Gaudin, Y., 2002. Rabies virus glycoprotein can fold in two alternative, antigenically distinct conformations depending on membrane-anchor type. *J. Gen. Virol.* 83, 1465–1476.
- National Association of State Public Health Veterinarians, Inc. (NASPHV); Centers for Disease Control and Prevention (CDC); Council of State and Territorial Epidemiologists; American Veterinary Medical Association, 2007. Compendium of measures to prevent disease associated with animals in public settings: National Association of State Public Health Veterinarians, Inc. (NASPHV), vol. 56, pp. 1–14.
- Perrin, P., Joffret, M.L., Oth, D., Leclerc, C., Sureau, P., Thibodeau, L., 1988. Interleukin-2 production in vitro: a new approach to the study of rabies vaccine immunogenicity as appraised by testing different glycoprotein presentations. *Vaccine* 6, 331–338.
- Perrin, P., Lafon, M., Sureau, P., 1996. Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for the determination of glycoprotein content of rabies vaccines. In: Meslin, F.X., Kaplan, M.M., Koprowski, H. (Eds.), *Laboratory Techniques in Rabies*, 4th ed. WHO, Geneva, pp. 383–388.
- Pfaffl, M.W., 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29, e45.
- Schneider, M.C., Belotto, A., Adé, M.P., Hendrickx, S., Leanes, L.F., Rodrigues, M.J., Medina, G., Correa, E., 2007. Current status of human rabies transmitted by dogs in Latin America. *Cad Saude Publica* 23, 2049–2063.
- Sissoëff, L., Mousli, M., England, P., Tuffereau, C., 2005. Stable trimerization of recombinant rabies virus glycoprotein ectodomain is required for interaction with the p75NTR receptor. *J. Gen. Virol.* 86, 2543–2552.
- Smerdou, C., Liljeström, P., 1999. Two-helper RNA system for production of recombinant Semliki forest virus particles. *J. Virol.* 73, 1092–1098.

- Soulebot, J.P., Brun, A., Chappuis, G., Guillemin, F., Tixier, G., 1982. Rabies virus pathogenicity and challenge. Influence of the method of preparation, the route of inoculation, and the species. Comparison of the characteristics of the modified, fixed and wild strains. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 5, 71–78.
- Sudarshan, M.K., Madhusudana, S.N., Mahendra, B.J., Rao, N.S., Ashwath Narayana, D.H., Abdul Rahman, S., Meslin, F.X., Lobo, D., Ravikumar, K., Gangaboraiah, 2007. Assessing the burden of human rabies in India: results of a national multi-center epidemiological survey. *Int. J. Infect. Dis.* 11, 29–35.
- Swiech, K., da Silva, C.S., Arantes, M.K., dos Santos, A.S., Astray, R.M., Pereira, C.A., Suazo, C.A., 2008. Characterization of growth and metabolism of *Drosophila melanogaster* cells transfected with the rabies-virus glycoprotein gene. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 49, 41–49.
- Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J., 1992. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Biotechnology* 24, 145–149.
- Van der Poel, W.H., Lina, P.H., Kramps, J.A., 2006. Public health awareness of emerging zoonotic viruses of bats: a European perspective. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 6, 315–324.
- Warrell, M.J., Warrell, D.A., 2004. Rabies and other lyssavirus diseases. *Lancet* 363 (9413), 959–969.
- Warrilow, D., 2005. Australian bat lyssavirus: a recently discovered new rhabdovirus. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 292, 25–44.
- Whitt, M.A., Buonocore, L., Prehaud, C., Rose, J.K., 1991. Membrane fusion activity, oligomerization, and assembly of the rabies virus glycoprotein. *Virology* 185, 681–688.
- WHO position paper. Rabies vaccines, 2002. *Wkly. Epidemiol. Rec.* 77, 109–119.
- Yokomizo, A.Y., Jorge, S.A., Astray, R.M., Fernandes, I., Ribeiro, O.G., Horton, D.S., Tonso, A., Tordo, N., Pereira, C.A., 2007. Rabies virus glycoprotein expression in *Drosophila* S2 cells. I. Functional recombinant protein in stable co-transfected cell line. *Biotechnol. J.* 2, 102–109.
- Zeder-Lutz, G., Cherouati, N., Reinhart, C., Pattus, F., Wagner, R., 2006. Dot-blot immunodetection as a versatile and high-throughput assay to evaluate recombinant GPCRs produced in the yeast *Pichia pastoris*. *Protein Expr. Purif.* 50, 118–127.
- Zhang, Y.Z., Xiong, C.L., Xiao, D.L., Jiang, R.J., Wang, Z.X., Zhang, L.Z., Fu, Z.F., 2005. Human rabies in China. *Emerg. Infect. Dis.* 11, 1983–1984.

Enhanced production of recombinant rabies virus glycoprotein (rRVGP) by *Drosophila melanogaster* S2 cells through control of culture conditions

Kamilla Swiech · Nickeli Rossi · Renato M. Astray ·
Cláudio A. T. Suazo

Received: 5 December 2007 / Accepted: 4 February 2008 / Published online: 24 February 2008
© Springer Science+Business Media B.V. 2008

Abstract Culture conditions that affect product quality are important to the successful operation and optimization of recombinant protein production. The objective of this study was to optimize culture conditions for growth of recombinant *Drosophila melanogaster* S2 cells (S2AcRVGP) in order to enhance the production of rRVGP. The addition of DMSO and glycerol to the medium and growth at a reduced temperature (22 °C) were the culture condition variations selected to be tested. Experimental cultures were first performed in serum-free Sf900 II medium in 250 ml Schott flasks. The most promising conditions identified in these experiments were also tested on a higher scale in a 3l bioreactor. In the Schott flasks experiments, all the changes in culture conditions resulted in an increase of rRVGP production. The protein concentration was 3.6-fold higher with addition of 1% DMSO and 1% glycerol and 9.3-fold higher when the cells were cultured at 22 °C instead of the standard 28 °C. The maximum concentration of rRVGP reached was 591 $\mu\text{g l}^{-1}$. In bioreactor experiments, with control of pH at 6.20

and DO at 50%, the reduced culture temperature (22 °C) was the strategy that promoted the highest glycoprotein production, 928 $\mu\text{g l}^{-1}$.

Keywords *Drosophila melanogaster* S2 cells · Dimethyl sulfoxide · Glycerol · Rabies virus glycoprotein · Recombinant protein production · Reduced temperature cultivation

Abbreviations

rRVGP	Recombinant rabies virus glycoprotein
μ_{max}	Maximum specific growth rate (h^{-1})
X_{max}	Maximum cell density (cell ml^{-1})
P_{max}^X	Maximum cell productivity ($10^5 \text{cell ml}^{-1} \text{h}^{-1}$)
$C_{\text{max}}^{\text{rRVGP}}$	Maximum rRVGP concentration ($\mu\text{g l}^{-1}$)
$\bar{q}_{\text{rRVGP}}$	Specific production rate of rRVGP ($\mu\text{g } 10^{-6} \text{cell h}^{-1}$)
$P_{\text{max}}^{\text{rRVGP}}$	Maximum rRVGP productivity ($\mu\text{g l}^{-1} \text{h}^{-1}$)

K. Swiech · N. Rossi · C. A. T. Suazo (✉)
Departamento de Engenharia Química, Universidade
Federal de São Carlos, Via Washington Luis, Km 235,
CEP 13565-905 São Carlos, SP, Brazil
e-mail: claudio@power.ufscar.br

R. M. Astray
Laboratório de Imunologia Viral, Instituto Butantan,
Av. Vital Brasil, 1500, CEP 05503-900 São Paulo, Brasil

Introduction

Many culture strategies are being used to improve the productivity of insect cell bioprocesses for recombinant protein production (Li et al. 2006a). One such strategy, the addition of supplements to the medium is effective, convenient and quick. Dimethyl sulfoxide

(DMSO) and glycerol have been used as additives in cell culture systems. Both compounds have been shown to act as chaperones, stabilizing proteins during protein folding (Yoshida et al. 2002). Fiore and Degraasi (1999) reported that DMSO caused CHO cell growth arrest, prevented apoptosis, and promoted protein production. Glycerol has been used extensively in the pharmaceutical and biotechnological industry as a protein stabilizer. It can form hydrogen bonds and aid the formation of a solvent shell around protein molecules (Fagain 1997).

In recent years there have been a growing number of reports on the use of low temperature culture (cold-shock) of mammalian cells for the enhanced production of recombinant proteins (Al-Fageeh et al. 2006). Among other beneficial physiological effects, this technique results in prolonged generation time, maintenance of high cell viability and reduced protease activity (Yoon et al. 2003).

The rRVGP has been produced in several expression systems: [transgenic plants (Ashraf et al. 2005), yeast cells (Sakamoto et al. 1999), mammalian cells (Kankanamage et al. 2003), and insect Sf9 cells infected with baculovirus (Drings et al. 1999)]. However, these reports have focused on the immunogenicity and antigenicity characteristics and also on the conformational structure of the protein, providing little satisfactory information about expression levels, which is important for developing a bioprocess for production of large quantities of protein.

In this study we have investigated the effects of culture conditions on rRVGP production and S2Ac-RVGP cell growth in small scale flasks as well as in a bioreactor. The immunogenicity and antigenicity of the rRVGP produced in S2 cells were characterized by Yokomizo et al. (2007), who demonstrated that the protein is immunogenic and induces protection against experimental rabies virus infection. The data obtained by these authors encouraged this quantitative study of rRVGP expression in S2 cells for production of a biomolecule that can be biologically characterized and used as an efficient rabies vaccine. Besides, no report has been published on the improvement of recombinant protein production with the *Drosophila* expression system. Three strategies were tested with the aim of enhancing rRVGP production: the addition of DMSO and glycerol at levels around 1% v/v and culturing the cells at reduced temperature (22 °C). These methods were

selected, since they have been reported to improve glycoprotein production in mammalian cells (Yoon et al. 2003; Fox et al. 2004; Rodriguez et al. 2005).

Materials and methods

Cells and culture conditions

Recombinant S2 cells transfected by Yokomizo et al. (2007) (S2AcRVGP) for rRVGP production and stored in liquid nitrogen at −196 °C were used. The cells were cultured in the serum-free medium Sf900 II (Gibco BRL) in 250 ml Schott flasks and a 3l bioreactor. Experiments on the small scale were conducted in Schott flasks containing 30 ml medium with an initial cell seeding of 5×10^5 cells ml^{−1}, at 100 rpm and 28 °C.

Large-scale cultures were carried out in a 3l Bioflo 110 bioreactor (New Brunswick Scientific, NJ, USA) with 1 l of working volume, equipped with a pitched-blade impeller, pH control at 6.20 and dissolved oxygen (DO) control at 50% air saturation, oxygenation being carried out by diffusion through a silicon membrane and increasing the stirring speed (15 rpm day^{−1}), starting at 100 rpm, up to a maximum of 250 rpm. The experiments were done at 28 °C with an initial cell seeding of 5×10^5 cell ml^{−1}, the cells being transferred from a mid-exponential 500 ml spinner flask (Wheaton®) culture. Exceptionally, an experiment carried out at 22 °C was inoculated with 10^6 cell ml^{−1}.

Analytical methods

The total cell density was determined with a hemacytometer and the viability by the trypan blue exclusion method (Doyle and Griffiths 1998). The rRVGP is a transmembrane protein present in cell lysates which were evaluated by ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) with immunoglobulin (IgG) against rabies glycoprotein (RVGP), purified from the serum of rabbits immunized with purified RVGP from rabies virus (Pasteur lineage) propagated on Vero cells, as a cover antibody. The cover antibody labeled with peroxidase was used to detect bound rRVGP antigen as described by Astray et al. (2008). The accuracy of the assay is set to 10 µg l^{−1}. The kinetic parameters were evaluated in agreement with Doyle and Griffiths (1998).

Results and discussion

In an attempt to increase recombinant rRVGP production by an insect cell line, some culture strategies were tested about which little has been published. Firstly, the effect of supplementing the medium with glycerol and DMSO and, secondly, the effect of temperature, were evaluated in Schott flask cultures. The most promising conditions identified in Schott flasks experiments were also tested on a higher scale in a stirred tank 3l bioreactor.

Cultures in Schott flasks

Figure 1 shows the cell performance and rRVGP production in Schott flasks experiments and Table 1 the kinetic parameters for the culture strategies tested.

- **Effect of glycerol.** The addition of 1% glycerol practically did not modify cell growth. The specific growth rate ($\mu_{\max}$) and maximum cell density ($X_{\max}$) were similar to control cultures. However, the rRVGP concentration ($C_{\max}^{\text{RVGP}}$) was 3.6-fold higher than in the control culture, reaching $232 \mu\text{g l}^{-1}$. The specific production ($\bar{q}_{\text{RVGP}}$) rate and maximum productivity ($P_{\max}^{\text{RVGP}}$) were also higher, 5.3 and 4.6-fold, respectively. However, a high drop in protein concentration was observed in the experiment with added glycerol. The rRVGP concentration started to fall after 4 days of culture. Analysis of amino acids (results not shown) revealed the exhaustion of cysteine by that time. As this amino acid is well known for its role in the formation of covalent sulfur bridges that are of crucial importance in protein stabilization (Freedman 1984), its lack could be the cause of the intense degradation of the glycoprotein.
- **Effect of DMSO.** In the Schott culture supplemented with 1% DMSO, $\mu_{\max}$ and $X_{\max}$ were 18 and 10% lower, respectively, than in the control culture. Although the specific production rate of rRVGP in the presence of 1% DMSO was not enhanced as reported in the literature on recombinant protein production by mammalian cells (Rodriguez et al. 2005; Li et al. 2006a, b), the volumetric concentration and maximum productivity were 3.6 and 1.9-fold higher, respectively.

Fig. 1 (a) Growth of S2AcRVGP cells and (b) rRVGP production in 250 ml Schott culture experiments in shaker at 100 rpm. In the control culture and in the experiment at 22 °C just Sf900 II medium was utilized. In the other two experiments supplements were added in the concentrations indicated. The bars represent the SE

Also, no drop of rRVGP concentration was observed in the experiment with added DMSO.

- **Effect of temperature.** Despite the fact that culture at reduced temperature has been widely used in the production of recombinant products from mammalian cells (Al-Fageeh et al. 2006), this strategy has not been employed yet to enhance protein production in insect cells. The culture of S2AcRVGP cells at reduced temperature (22 °C) resulted in significant reduction in cell growth. The $\mu_{\max}$ value was approximately twofold lower in the culture at 22 °C than in the control culture at 28 °C and $X_{\max}$ was considerably reduced by about 22%. As a result of the reduction in cell growth, there was a large increase in rRVGP production. The rRVGP concentration increased about 10 times, $\bar{q}_{\text{RVGP}}$ and $P_{\max}^{\text{RVGP}}$ about 5.3 and 4

Table 1 Kinetic parameters for S2AcRVGP cell growth and rRVGP production in Schott flask at 100 rpm in Sf900 II medium

	Growth ^a			rRVGP production ^a		
	$\mu_{\max}$ (h ⁻¹)	$X_{\max}$ (10 ⁶ cell ml ⁻¹)	$P_{\max}^X$ (10 ³ cell ml ⁻¹ h ⁻¹)	$C_{\max}^{\text{rRVGP}}$ (μg l ⁻¹)	$\bar{q}_{\text{rRVGP}}$ (μg 10 ⁻⁶ cell h ⁻¹)	$P_{\max}^{\text{rRVGP}}$ (μg l ⁻¹ h ⁻¹)
Control	0.034 ± 0.003	17.8	1.05	63.8	0.04	0.53
Glycerol 1%	0.039 ± 0.003	16.1	1.37	232	0.21	2.45
DMSO 1%	0.028 ± 0.001	16.8	0.88	227	0.05	1.02
$T = 22^{\circ}\text{C}$	0.015 ± 0.001	13.9	0.45	591	0.21	2.05

^a $P_{\max}^{\text{rRVGP}}$ and $\bar{q}_{\text{rRVGP}}$ were calculated only in the increasing rRVGP concentration region

times, respectively. The reduction in the volumetric concentration of recombinant protein, frequently reported in literature as a result of the reduced cell growth (Al-Fageeh et al. 2006), was not observed in the present study.

Analyzing the results of the Schott flasks experiments, it could be seen that the addition of 1% glycerol and performing the culture at reduced temperature were the strategies that gave the most satisfactory increases in the rRVGP production. However, the addition of glycerol was not efficient at preventing protein degradation.

The DMSO supplementation resulted in an increase in the volumetric concentration and productivity and, most importantly, the rRVGP degradation was not observed. The strategy that promoted the highest rRVGP production was the low temperature culture, which resulted in a low cell growth-rate and a considerable increase in protein production parameters. The rRVGP concentration was almost 10 times higher in the culture grown at 22 °C than in the culture at standard culture temperature, 28 °C, resulting in a substantial improvement of the bioprocess for rRVGP production. Therefore, the addition of 1% DMSO and the culture at reduced temperature were the strategies chosen to be tested in the bioreactor, in a more controlled culture environment.

The rRVGP levels produced in Schott flasks in this work (64–590 μg l⁻¹) were similar to the produced by Yokomizo et al. (2007), using the same culture conditions, where the rRVGP expression in cell lysates and supernatants attaining concentrations of 300 μg l⁻¹. Galesi et al. (2007) evaluated the rRVGP production in serum-free media especially designed for *Drosophila* cell growth (TC-100 supplemented with glucose, glutamine, lipid emulsion, Pluronic

F68, yeastolate and soy hidrolysate) and found expression levels near 10 μg l⁻¹.

Cultures in bioreactor

Figure 2 shows the profiles of cell growth and rRVGP production and Table 2 the kinetic parameters determined in bioreactor experiments.

- **Effect of DMSO.** The addition of 1% DMSO to the bioreactor with control of pH at 6.2 and DO = 50%, as in the Schott flasks, resulted in a reduction of $\mu_{\max}$ from 0.049 to 0.036 h⁻¹; $X_{\max}$ was also lower (equal to 1.76×10^7 cell ml⁻¹), than in the control experiment, in which it reached 2.10×10^7 cell ml⁻¹, as can be observed in Fig. 2. Despite the reduction in cell growth, the DMSO addition did not result in an increase of rRVGP production, contrary to what was observed in the Schott experiments. In the bioreactor, this culture strategy only enhanced the specific rRVGP production. In a more controlled culture environment, provided by the bioreactor, the effect of DMSO on protein production was quite different than that obtained in Schott flasks without pH and DO control.
- **Effect of temperature.** When subjected to sub-physiological culture temperature, S2AcRVGP cell growth was suppressed, reducing the $\mu_{\max}$ -value from 0.049 to 0.026 h⁻¹. To avoid the prolonged lag phase observed in the experiment carried out in Schott flasks at 22 °C, the inoculum cell density in the bioreactor experiment was enhanced from 5.0×10^5 to 10.0×10^5 cell ml⁻¹. With this high inoculum cell density, the cells at 22 °C started to grow exponentially without a lag period and reached a maximum viable density of 16.1×10^6 cell ml⁻¹. In the

Fig. 2 (a) Growth of S2AcRVGP cells and (b) rRVGP production in bioreactor experiments with Sf900 II medium, pH = 6.2, DO = 50% and increasing stirring speed (15 rpm day⁻¹), starting at 100 rpm until a maximum of 250 rpm

control culture at 28 °C, with an inoculum density of 5.0×10^5 cell mL⁻¹, the cells reached a maximum viable density of 20.0×10^6 cell mL⁻¹, also without a lag period. Focusing on trends rather than on absolute values, in view of the enhanced inoculum size used at 22 °C, it can be said that, as in the Schott flask experiment, the

values of $\mu_{\max}$ and $\bar{q}_{\text{rRVGP}}$ in the bioreactor showed similar behavior at both temperatures: reduced specific cell growth in favor of a marked rise in specific production of glycoprotein. The rapidly decreasing titer of rRVGP from 5 days may be a consequence of the depletion of cysteine and other amino acids, which should be due mainly to the high production of rRVGP, differently from what was observed in the case of addition of glycerol to Schott flasks cultures, in which the early exhaustion of amino acids was caused by high cell growth.

The notable differences observed in cell growth and rRVGP production between the cultures in Schott flasks and bioreactor can be explained by the better controlled conditions (pH and DO) attained in the bioreactor.

Conclusions

In this study, we explore three culture strategies in an attempt to enhance rRVGP production: addition of DMSO and glycerol and culture at a reduced temperature (22 °C). In small scale experiments (Schott flasks), the addition of DMSO and culture at 22 °C were the strategies that afforded the most satisfactory results. The protein expression was 3.6 and tenfold higher in the culture with DMSO and culture at 22 °C, respectively. There was also no degradation of rRVGP under those conditions. The culture of S2AcRVGP cells at 22 °C in the bioreactor gave rise to lower values of $\mu_{\max}$ and to higher values of $\bar{q}_{\text{rRVGP}}$ than that at 28 °C. Even though the comparison of the strategies was not made at their optimal values, reducing the temperature can be

Table 2 Kinetic parameters determined in bioreactor experiments with S2AcRVGP cells for growth and rRVGP production

	Growth ^a			rRVGP Production ^a		
	$\mu_{\max}$ (h ⁻¹)	$X_{\max}$ (10 ⁶ cell mL ⁻¹)	$P_{\max}^X$ (10 ³ cell mL ⁻¹ h ⁻¹)	$C_{\max}^{\text{rRVGP}}$ (μg l ⁻¹)	$\bar{q}_{\text{rRVGP}}$ (μg 10 ⁻⁶ cell h ⁻¹)	$P_{\max}^{\text{rRVGP}}$ (μg l ⁻¹ h ⁻¹)
Control	0.044 ± 0.001	20.0	1.90	138	0.12	1.32
DMSO	0.051 ± 0.003	17.6	0.95	114	0.32	1.30
22 °C	0.037 ± 0.003	16.1	1.26	928	0.73	7.20

^a $P_{\max}^{\text{rRVGP}}$ and $\bar{q}_{\text{rRVGP}}$ were calculated only in the increasing rRVGP concentration region

considered the most attractive. Similarly, compared to other strategies of growth regulation, low temperature cultivation has been proved to be the most reliable and efficient for CHO cells (Kumar et al. 2007). A more complete study of the effect of reduced temperature cultivation on S2AcRVGP cells, to find the optimal temperature for rRVGP is being conducted in our laboratory.

Acknowledgments This work was supported in part by grants from the FAPESP (02/09482-3, 01/09038-3, 01/08914-4) and CNPq (141099/2003-8).

References

- Al-Fageeh MB, Marchant RJ, Carden MJ et al (2006) The cold-shock response in cultured mammalian cells: harnessing the response for the improvement of recombinant protein production. *Biotechnol Bioeng* 93:829–835
- Ashraf S, Singh PK, Yadav DK et al (2005) High level expression of surface glycoprotein of rabies virus in tobacco leaves and its immunoprotective activity in mice. *J Biotechnol* 119:1–14
- Astray RM, Augusto E, Yokomizo AY et al (2008) Analytical approach for the extraction of recombinant membrane viral glycoprotein from stably transfected *Drosophila melanogaster* cells. *Biotech J* 3:98–103
- Doyle A, Griffiths JB (1998) *Cell and tissue culture: laboratory procedures in biotechnology*. Hardcover, England
- Drings A, Jallet C, Chambert B et al (1999) Is there an advantage to including the nucleoprotein in a rabies glycoprotein subunit vaccine? *Vaccine* 17:1549–1557
- Fagain CO (1997) *Stabilizing protein function*. Springer, New York
- Fiore M, Degraffi F (1999) Dimethyl sulfoxide restores contact inhibition-induced growth arrest and inhibits cell-dependent apoptosis in hamsters cells. *Exp Cell Research* 25:102–110
- Fox SR, Patel UA, Yap MGS et al (2004) Maximizing interferon-gamma production by Chinese hamster ovary cells through temperature shift optimization: experimental and modeling. *Biotechnol Bioeng* 85:177–184
- Freedman R (1984) Native disulphide bond formation in protein biosynthesis: evidence for the role of protein disulphide isomerase. *Trends Biochem Sci* 9:438–441
- Galesi ALL, Pereira CA, Moraes AM (2007) Culture of transgenic *Drosophila melanogaster* Schneider 2 cells in serum-free media based on TC100 basal medium. *Biotechnol J* 2:1399–1407
- Kankanamge PJ, Irie T, Shoji J et al (2003) Further characterization of the rabies virus glycoprotein produced by virus-infected and G cDNA-transfected cells using a monoclonal antibody, #1-30-44, which recognizes an acid-sensitive epitope. *Microbiol Immunol* 47:337–349
- Kumar N, Gammell P, Clynes M (2007) Proliferation control strategies to improve productivity and survival during CHO based production culture. *Cytotechnology* 53:33–46
- Li J, Huang Z, Sun X et al (2006a) Understanding the enhanced effect of dimethyl sulfoxide on hepatitis B surface antigen in the culture of Chinese hamster ovary cells on the basis of proteome analysis. *Enzyme microbial technol* 38:372–380
- Li J, Sun X, Zhang Y (2006b) Improvement of hepatitis B surface antigen expression by dimethyl sulfoxide in the culture of recombinant Chinese hamster ovary cells. *Proc Biochem* 41:317–322
- Rodriguez J, Spearman M, Huzel N et al (2005) Enhanced production of monomeric interferon- β by CHO cells through the control of culture conditions. *Biotechnol Prog* 21:22–30
- Sakamoto S, Ide T, Tokiyoshi S et al (1999) Studies on the structures and antigenic properties of rabies virus glycoprotein analogues produced in yeast cells. *Vaccine* 17:205–218
- Yokomizo AY, Jorge SAC, Astray RM et al (2007) Rabies virus glycoprotein expression in *Drosophila* S2 cells. I. Functional recombinant protein in stable co-transfected cell line. *Biotechnol J* 2:102–109
- Yoon SK, Song JY, Lee GM (2003) Effect of low culture temperature on specific productivity, transcription level, and heterogeneity of erythropoietin in Chinese hamster ovary cells. *Biotechnol Bioeng* 82:289–298
- Yoshida H, Yoshizawa T, Shibasaki F et al (2002) Chemical chaperones reduce aggregate formation and cell death caused by the truncated Machado Joseph disease gene product with an expanded polyglutamine stretch. *Neurobiological Diseases* 10:88–99

Bioreactor culture of recombinant *Drosophila melanogaster* S2 cells: characterization of metabolic features related to cell growth and production of the rabies virus glycoprotein

Kamilla Swiech · Nickeli Rossi · Bruna Gabriela Silva · Soraia A. C. Jorge · Renato Mancini Astray · Cláudio Alberto Torres Suazo

Received: 12 November 2007 / Accepted: 21 January 2008 / Published online: 19 February 2008
© Springer Science+Business Media B.V. 2008

Abstract Although several reports have been published on recombinant protein expression using *Drosophila* cells, information on their metabolism and growth in vitro is relatively scarce. In the present study, we have analyzed the growth and metabolism of transfected S2 cells (S2AcRVGP) in bioreactor cultures with serum-free medium Sf900 II, to evaluate its potential for mass production of a rabies virus glycoprotein (RVGP). Cells were cultured in a 3 l stirred-tank bioreactor at 28 °C with pH controlled at 6.2 and dissolved oxygen at 50% air saturation. The cells attained a specific growth rate and maximum cell density as high as 0.084 h⁻¹ and 2.3 × 10⁷ cell ml⁻¹, respectively. The main substrates consumed during this rapid growth phase were glucose, glutamine and proline. An atypical accumulation of ammonia and alanine was observed in the culture medium, up to 62 mM and 47 mM, respectively, but lactate was produced in low levels. After exhaustion of glutamine and proline as energy sources, alanine was consumed and production of ammonia increased. The production of recombinant RVGP reached concentrations as high

as 178 µg l⁻¹. Premature exhaustion of glutamine, serine and cysteine could be related to degradation of the recombinant glycoprotein. In general, the results demonstrated that S2AcRVGP can be considered an effective vehicle for large-scale recombinant glycoprotein expression and that several critical factors of the bioprocess could be optimized to increase the quality and productivity of the RVGP.

Keywords Bioreactors · *Drosophila melanogaster* · Growth · Metabolism · Rabies virus glycoprotein · Recombinant S2 cells

Introduction

In the last six years the *Drosophila* S2 protein expression system has been successfully used to produce a series of complex recombinant proteins (Kim et al 2008; Johansson et al 2007; Lim and Cha 2006; Cha et al 2005; Perret et al 2003; Cho et al 2004; Valle et al 2001). An analysis of the literature reveals that the major concern of researchers dealing with S2 cells has been the expression of high levels of the recombinant proteins, while there has little emphasis on collecting information about the influence of key factors such as cell metabolism or the composition of the medium on cell growth and biosynthesis of the recombinant protein. In this scenario, increasing our knowledge of the performance of S2 cells would be of use in the control and optimization of culture

K. Swiech · N. Rossi · B. G. Silva · C. A. T. Suazo (✉)
Departamento de Engenharia Química, Universidade
Federal de São Carlos, Via Washington Luis Km 235,
CEP 13565-905 São Carlos, SP, Brasil
e-mail: claudio@power.ufscar.br

S. A. C. Jorge · R. M. Astray
Laboratório de Imunologia Viral, Instituto Butantan, Av.
Vital Brasil, 1500, CEP 05503-900 São Paulo, Brasil

parameters, so as to meet the needs of the cells and maximize the yield and quality of the end product.

In this study, some important features of the culture of recombinant *Drosophila* S2 cells in bioreactor expressing the rabies virus glycoprotein (RVGP), which influence strongly the performance of the bioprocess have been identified and quantified in order to improve the large-scale RVGP production.

Materials and methods

Cells and culture conditions

Recombinant S2 cells (S2AcRVGP) for production of RVGP, transfected according to Yokomizo et al. (2007), were used. The cells were cultured at 28 °C in serum-free Sf900 II medium (Gibco®/Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA) in a 3L Bioflo 110 bioreactor (New Brunswick Scientific, USA) with 1 l of working volume, equipped with a pitched-blade impeller, pH being controlled at 6.20 through the addition of NaOH 0.5 M and H₂SO₄ 8% and dissolved oxygen (DO) at 50% air saturation, oxygenation carried out by diffusion through a silicon membrane (7.84 m). The bioreactor was initially seeded at 28 °C and 5×10^5 cell ml⁻¹ with cells

taken from a mid-exponential 500 ml spinner flask (Wheaton®) culture at 100 rpm and 28 °C.

For the evaluation of S2AcRVGP cell performance in serum-free Sf900 II medium several experiments were run in the bioreactor under four different culture conditions, as described in Table 1.

Analytical methods

Cell counts

The total cell density was determined with a hemacytometer and the viability by the trypan blue exclusion method (Doyle and Griffiths 1998). The lysed cell density was estimated from the activity of LDH, released from these cells into the supernatant, employing an enzyme assay kit (Tox-7) from Sigma Aldrich Co.

Nutrients and metabolite analysis

The concentrations of glucose, lactate and glutamine in the culture supernatants were determined enzymatically with a YSI Biochemical Analyzer (model 2700) after sample centrifugation at 200 g for 5 min. Amino acid concentrations in the culture supernatants were analyzed by the Pico-tag system, using a

Table 1 Bioreactor experiments to analyze the growth and metabolism of S2AcRVGP cells in Sf900 II medium

Expt.	Description	Observations
Bio-1	Batch mode, with increasing stirring (15 rpm/day), from 100 to 240 rpm. Medium Sf900 II	To evaluate the possibility of using higher stirring speeds than in the previous report (Swiech et al. 2008), in order to improve homogenization of the bubble-free culture in the bioreactor without damaging the cells.
Bio-2	Batch mode, with increasing stirring (15 rpm/day), from 100 to 240 rpm. Medium Sf900 II supplemented with 8.7 mM Pro	In order to analyze the effects of proline as energy source, on growth and expression of RVGP in a homogenized bioreactor.
Bio-3 ^a	Fed-batch mode: F = 4 ml h ⁻¹ , V ₀ = 800 ml and V _F = 1,400 ml. Accelerating stirring, starting at 100 rpm and rising 8 rpm /day for the first 4 days, 30 rpm/day for the last two days. Feed medium: Sf900 II + 15.6 mM Pro; 0.6 mM Ser; 8.6 mM Gln, 0.005 mM Cys	The feeding strategy was aimed at gradual addition of the aminoacids prematurely depleted in batch mode. When Cys was added at the higher concentration of 1 mM, cell growth was strongly inhibited (data not shown). The initial stirring speed was low to avoid shear damage to cells due to excessive volumetric energy input in a small volume.
Bio-4	Batch mode, constant stirring rate at 150 rpm. Medium Sf-900 II	To evaluate the use of an intermediate, constant stirring rate, sufficiently high to prevent poor mixing but not too high, to avoid shear damage to cells.

^a F, volumetric flow rate; V₀, initial bioreactor volume; V_F, final bioreactor volume

reverse-phase HPLC column (Waters Sweden, Sollentuna, Sweden) (Bidleingmeyer et al. 1985). Ammonia was determined through a 95–12 Orion Probe Analyzer (Orion), and a SA720 Procyon potentiometer.

RVGP concentration

The RVGP is a transmembrane protein present in cell lysates which were evaluated by ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) with immunoglobulin (IgG) against rabies glycoprotein (RVGP), purified from the serum of rabbits immunized with purified RVGP from rabies virus (Pasteur lineage) propagated on Vero cells, as a cover antibody. The cover antibody labeled with peroxidase was used to detect bound RVGP antigen as described by Astray et al. (2008).

Results and discussion

Cell growth and metabolism

As can be observed in Fig. 1a and in Table 2 the growth parameters of S2AcRVGP cell are higher than reported in cultures of lepidopteran cell lines (Schmid 1996) and higher than obtained in S2AcRVGP cell culture in Schott flasks (Yokomizo et al 2007) and bioreactor without oxygen control (Swiech et al. 2008). Even so, some modifications seem to be necessary for optimization of S2 cell growth and production of the RVGP, as will be shown ahead.

The three more consumed substrates during cell growth were glucose, glutamine and proline, as can be seen by Fig. 1b, c. The first two substrates are known to play key roles as energy sources and as precursors for biomass synthesis in animal cell culture. On the other hand, the role of proline as an energy source has been reported in a previous article to be a peculiar metabolic feature of some types of insects (Swiech et al 2008). Comparison of experiments Bio-1 and Bio-2 reveals a strong dependence of the specific growth rate of S2AvRVGP cells on the concentration of proline, being for that reason considered an energy source. With the addition of 8.7 mM of proline, Bio-2 reached $\mu_{\max} = 0.084 \text{ h}^{-1}$, almost twice the value attained in experiment Bio-1 (0.048 h^{-1}). The substantial difference in $\mu_{\max}$

between the two experiments could be attributed to the higher quantity of this amino acid in Bio-2. The addition of proline and glutamine in experiment Bio-3 favored the growth in terms of maximum cell concentration but not in specific growth rate because the concentrations of these nutrients were maintained at levels similar to those of fresh Sf900 II medium by gradual feeding of the batch.

The experiment Bio-4, with constant stirring at 150 rpm, did not show any lag phase in cell growth as response to higher shear stress, suggesting that the stirring at around 100 rpm during the first hours of the other three experiments may have resulted in a heterogeneous and oxygen-transfer limited environment. In such favorable conditions the maximum cell density reached in experiment Bio-4 was $2.3 \times 10^7 \text{ cell ml}^{-1}$. As the cell death rate in this experiment was still as low as in the others, the stirring rate of 150 rpm can be recommended as a minimum for S2 cell culture in the bioreactor set-up described.

Regarding glutamine consumption in the four experiments, it is clear in the growth curves that when the concentration fell below about 2 mM, a significant reduction in the growth rates occurred. Additionally, after the exhaustion of glutamine, similarly to what happens in mammalian cell cultures, viable cell growth ceased and the cell density started to decline.

The low values of LDH activity assayed throughout the whole culture, including the declining phase, suggest that little cell lysis occurred. The high values of $\mu_{\max}$ (0.084 h^{-1}) in experiment Bio-2 and of $X_{V\max}$ ($2.3 \times 10^7 \text{ cells.ml}^{-1}$) in experiment Bio-4 provide an illustration picture of the potential for growth of *Drosophila melanogaster* S2 cells in stirred tank bioreactors.

Despite the high concentrations of amino acid of medium Sf900 II, some of them (glutamine, proline, cysteine and serine), were exhausted prematurely during the cultures. Proline was an amino acid also utilized as an energy source, when added in experiment Bio-2, it increased the $\mu_{\max}$ to 0.084 h^{-1} , a value rarely seen in animal cell culture. The main products of glutamine and proline metabolism were ammonia and alanine. Alanine was produced in considerable amounts in all the experiments, reaching levels as high as 47 mM in experiment Bio-2, in which Sf900 II medium was supplemented with

Fig. 1 Results of growth and metabolism of S2AcRVGP cells cultured in a stirred tank bioreactor with Sf900 II medium at 28 °C, DO = 50% and pH = 6.20. The bars represent the standard error

8.7 mM proline. Most of the serine and cysteine was consumed for protein synthesis, as will be discussed later. Other amino acids, especially alanine, asparagine and glutamate, were consumed only after exhaustion of glutamine and proline, possibly as

new energy sources. This amino acid degradation should be responsible for the high accumulation of ammonia after glutamine exhaustion. In experiment Bio-4, in which the highest cell density was produced, the level of ammonia reached 62 mM. Until

Table 2 Summary of parameters for S2AcRVGP cell growth in the experiments in bioreactor described in Fig. 1

	$\mu_{\max}$ (h^{-1})	$X_{V\max}$ (cell ml^{-1})
Bio-1	0.048 ± 0.003 ($R = 0.993$)	1.88×10^7
Bio-2	0.084 ± 0.006 ($R = 0.995$)	1.76×10^7
Bio-3	0.035 ± 0.001 ($R = 0.999$)	2.31×10^7
Bio-4	0.059 ± 0.005 ($R = 0.991$)	2.30×10^7

R, correlation coefficient of semilog plot of cell density vs. time in the exponential phase

now, such a high ammonia concentration has never been reported in animal cell culture, indicating that these cells are very resistant to high levels of ammonia. Interestingly, Borash et al (2000) have shown that the insect *Drosophila melanogaster* also has a high tolerance to ammonia. Lactate was present in very low concentrations in all the experiments.

The sequential behavior of S2AcRVGP cells, involving glutamine degradation and alanine accumulation followed by a switch to consumption of amino acids, including alanine, marked by high production of ammonia under glutamine limitation, is somewhat similar to the behavior of Sf-9 cells under glucose limitation observed by Öhman et al (1995). The differences that exist may be due to the existence of different networks for glucose and glutamine metabolisms in *Spodoptera frugiperda* and *Drosophila melanogaster* cells.

RVGP production

The time course of the biosynthesis of the glycoprotein RVGP during the four experiments in bioreactor can be seen in Fig. 2. As expected, being the RVGP a membrane protein, its biosynthesis can be growth associated. The cell-lysate expression levels reached values up to $178 \mu\text{g l}^{-1}$, as can be seen more precisely in Table 3. In experiment Bio-2, the production of RVGP was very low because of the addition of proline, which favored the utilization of the metabolic machinery for cell proliferation. Although production was very high in the other experiments, in experiments Bio-1 and Bio-4 an accentuated drop in RVGP concentration is seen after approximately 5 days of culture. This drop reflects the degradation of this protein, a phenomenon that may be explained by the depletion of glutamine,

Fig. 2 RVGP production in the four bioreactor experiments with S2AcRVGP cells**Table 3** RVGP production parameters in the four bioreactor experiments with S2AcRVGP cells

	$C_{\max}^{RVGP}$ ($\mu\text{g l}^{-1}$)	$p_{\max}^{RVGP}$ ($\mu\text{g l}^{-1} \text{h}^{-1}$)
Bio-1	138.7	1.33
Bio-2	29.4	0.20
Bio-3	140.5	1.03
Bio-4	178.1	1.54

serine and cysteine, two of which are directly involved in protein structure folding and stabilization. The serine participates intensively in protein processing through glycosylation of its side chains serving, one purpose of which is to assist in proper folding and to protect the biomolecule from protease degradation (Jentoft 1990). On the other hand, cysteine is well known for its role in the formation of covalent sulfur bridges that play a crucial role in the stabilization of proteins (Freedman 1984). Strong evidence in favor of this hypothesis is the result obtained in experiment Bio-3, in which the continuous feeding of the amino acids prevented RVGP depletion and, therefore, any degradation of the glycoprotein. It is evident from these results that the medium Sf900 II has to be fed with these three amino acids in order to accomplish optimal productivity of a stable recombinant RVGP. It will also be necessary to define the feeding strategies, coordinated with the addition of proline, that allow non-limited and robust cell growth.

Conclusions

Taken together, the results presented here show that S2AcRVGP cells can be successfully used in large-scale cultures in a serum-free medium for recombinant RVGP production. The cells achieved high specific growth rates and cell densities, as well as a notable tolerance to the adverse conditions normally present in bioreactor cell cultures. In addition, S2AcRVGP cells were able to synthesize fair quantities of RVGP and represent an attractive alternative source for its production. This study also identified some critical bioprocess factors that still need to be optimized, in the formulation of culture medium and the operating strategy of the stirred-tank bioreactor.

Acknowledgements This work was supported in part by grants from FAPESP (02/09482-3, 01/09038-3, 01/08914-4), Fundação Butantan and CNPq (141099/2003-8).

References

- Astray RM, Augusto E, Yokomizo AY et al (2008) Analytical approach for the extraction of recombinant membrane viral glycoprotein from stably transfected *Drosophila melanogaster* cells. *Biotechnol J* 3:98–103
- Bidlingmeyer BA, Cohen SA, Tarvin TL (1985) Rapid analysis of amino acids using precolumn derivatization. *J Chromatogr* 336:93–104
- Borash DJ, Pierce VA, Gibbs AG et al (2000) Evolution of ammonia and urea tolerance in *Drosophila melanogaster*: resistance and cross-tolerance. *J Insect Physiol* 46:763–769
- Cha HJ, Shin HS, Lim HJ et al (2005) Comparative production of human interleukin-2 fused with green fluorescent protein in several recombinant expression systems. *Biochem Eng J* 24:225–233
- Cho HS, Kim YK, Cha HJ (2004) Expression of double foreign protein types following recombinant baculovirus infection of stably transfected *Drosophila* S2 cells. *Enzyme Microbial Technol* 35:525–531
- Doyle A, Griffiths JB (1998) Cell and tissue culture: laboratory procedures in biotechnology. Hardcover, England
- Freedman R. (1984) Native disulphide bond formation in protein biosynthesis: evidence for the role of protein disulphide isomerase. *Trends Biochem Sci* 9:438–441
- Jentoft N (1990) Why are proteins O-glycosylated? *Trends Biochem Sci* 15:291–294
- Johansson DX, Drakenberg K, Hopmann KH et al (2007) Efficient expression of recombinant human monoclonal antibodies in *Drosophila* S2 cells. *J Immunol Methods* 318:37–46
- Kim KR, Kim YK, Cha HJ (2008) Recombinant baculovirus-based multiple protein expression platform for *Drosophila* S2 cell culture. *J Biotechnol* 133:116–122
- Lim HJ, Cha HJ (2006) Observation and modeling of induction effect on human transferring production from stably transfected *Drosophila* S2 cells culture. *Enzyme Microb Technol* 39:208–214
- Öhman L, Ljunggren J, Häggström L (1995) Introduction of a metabolic switch in insect cells by substrate-limited fed-batch cultures. *Appl Microbiol Biotechnol* 43:1–8
- Perret BG, Wagner R, Lecat S et al (2003) Expression of EGFP-amino-tagged human mu opioid receptor in *Drosophila* Schneider 2 cells: a potential expression system for large-scale production of G-protein coupled receptors. *Protein Expr Purif* 31:123–132
- Schmid G (1996) Insect cell cultivation: growth and kinetics. *Cytotechnology* 20:43–56
- Swiech K, Silva CS, Arantes MK et al (2008) Characterization of growth and metabolism of *Drosophila Melanogaster* cells transfected with the rabies virus glycoprotein gene. *Biotechnol Appl Biochem* 49:41–49
- Valle MA, Kester MB, Burns AL et al (2001) Production and purification of human menin from *Drosophila melanogaster* S2 cells using stirred tank reactor. *Cytotechnology* 35:127–135
- Yokomizo AY, Jorge SAC, Astray RM et al (2007) Rabies virus glycoprotein expression in *Drosophila* S2 cells. I. functional recombinant protein in stable co-transfected cell line. *Biotechnol J* 2:102–109

Characterization of growth and metabolism of *Drosophila melanogaster* cells transfected with the rabies-virus glycoprotein gene

Kamilla Swiech*, Clóvis S. da Silva*, Mabel K. Arantes*, Alexandra S. dos Santos†, Renato M. Astray†, Carlos A. Pereira† and Cláudio A. T. Suazo*¹

*Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, Via Washington Luis, Km 235, CEP 13565-905, São Carlos-SP, Brazil, and †Laboratório de Imunologia Viral, Instituto Butantan, Av. Vital Brasil, 1500 CEP 05503-900, São Paulo, Brazil

In the present study, the growth and key metabolic features of a gene-transfected *Drosophila melanogaster* (fruitfly) S2 (Schneider 2) cell population (S2AcRVGP cells), cultured in Sf900-II medium, have been evaluated to provide substantial support for the development of a bioprocess to produce RVGP (rabies-virus glycoprotein). Experimental cultures were grown both in a 100 ml Schott flask incubated in a shaker at 28 °C and 100 rev./min and in a 3 litre stirred-tank bioreactor at 28 °C, with increasing agitation. In small-scale culture, S2AcRVGP cells reached a maximum cell concentration of 1.13×10^7 cell/ml, presented a $\mu_{\max}$ (maximum specific growth rate) of 0.037 h^{-1} and the growth was limited by oxygen deprivation. An early and remarkably long stationary phase was observed under hypoxia. Cell cultures grown in the bioreactor without oxygen limitation exhibited a maximum cell concentration of 2.2×10^7 cells/ml and $\mu_{\max}$ values as high as 0.048 h^{-1} . The main substrate consumed in order to reach such a high growth rate was the amino acid proline, which seems to play an important role as a source of metabolic energy in the culture of S2AcRVGP cells. Under conditions of hypoxia, the cells were able to survive for 15 h without apparent damage, recovering their previous metabolic activity.

Introduction

The development of improved expression systems for high-level production of recombinant gene products, especially proteins, has been the goal of many researchers in recent years. Production of recombinant proteins as found in higher organisms often requires eukaryotic host cells in order to retain their biological activity [1].

Insect cell lines are gaining prominence as an alternative eukaryotic system for protein expression, since they have a number of potential advantages over mammalian cell lines as protein production systems. These include a lower growth temperature, less complex environmental conditions for

growth, long-term continuous culture, adaptability to large-scale bioreactors, post-translational processing abilities and efficient quantitative and qualitative recombinant protein expression [2].

There are many lines of evidence showing that nuclear and cytoplasmic proteins are usually expressed at very high levels by recombinant baculoviruses (up to 200 mg/l of infected cells) [1]. Virus infection, however, induces cell lysis, which affects the integrity of the plasma membrane [3]. Also, the discontinuous nature of virus infection does not allow the development of a continuous cell culture bioprocess. Attempts to overcome some of these problems have led to the development of stable expression systems [4], supporting a continuous protein production, in insect (such as lepidopteran and dipteran) cell lines. The expression system of the fruitfly *Drosophila* has shown promising results in achieving high-level production of a number of recombinant proteins [5–7]. This is largely due to the use of efficient promoters, coupled with the ability of *Drosophila* cells to generate high copy numbers of the introduced plasmids [1], as well as to the inherent features of *Drosophila* cells, which attain a cell density in suspended culture higher than that observed for lepidopteran cells.

Even though suspension cultures of Sf9 [*Spodoptera frugiperda* (fall armyworm)] cells have been successful on a commercial scale, the evolution towards culture systems of alternative insect cell lines is being hampered by a lack of information on the physiology of these cells. Since the data on *Drosophila melanogaster* S2 (Schneider 2) cells in this respect is very scarce, a better understanding of S2 cell physiology is relevant, not only to know the rate-limiting biochemical processes that govern the growth and harvest of recombinant proteins produced in the culture, but also

Key words: *Drosophila melanogaster*, fruitfly, insect cells, rabies-virus glycoprotein gene, recombinant, Schneider 2 (S2) cell.

Abbreviations used: DO, dissolved oxygen; RVGP, rabies-virus glycoprotein; S2, Schneider 2; Sf9 cells, *Spodoptera frugiperda* (fall armyworm) cells.

¹ To whom correspondence should be addressed (email claudio@power.ufscar.br).

to support developing strategies that lead to an optimized large-volume process design.

In the present study, a stable transfected population of *D. melanogaster* S2 cells (S2AcRVGP) [8], cultured in the serum-free medium Sf900-II, has been characterized in terms of growth and metabolism with the aim of assessing its potential for use in large-scale culture to produce a recombinant RVGP (rabies-virus glycoprotein).

Materials and methods

Cells and culture conditions

To construct the recombinant S2 cells (S2AcRVGP cells), *Drosophila* S2 cells were transfected with the pCoHygro vector (Invitrogen) and also co-transfected with a vector containing a plasmid encoding the RVGP sequence (pAc/RVGP), in the ratio of 1:20, under the control of *D. melanogaster* actin promoter with Cellfectin (Invitrogen) [8]. After selection with hygromycin, S2AcRVGP cells were cultured in T-flasks (Nunc) and Schott flasks with Sf900-II medium. Experiments on a small scale were conducted to analyse cell growth and glucose, glutamine, lactate and amino acid metabolism and apoptosis, under the same conditions: initial cell seeding of 5×10^5 cells/ml in 100 ml Schott flasks containing 20 ml of medium at 100 rev./min and 28°C.

The cell performance on a large scale was also evaluated. Large-scale cultures were grown in a 3 litre bioreactor (working volume, 750 ml) from Applikon under the following conditions: temperature 28°C, initial stirring rate of 100 rev./min (marine impeller) being progressively increased during the culture to 200 rev./min and oxygenation was carried out through a silicone membrane with an air (or air/oxygen) flow rate of 2 v.v.m (vol/min per vol). Experiments were performed without oxygen control and with the oxygen maintained at approx. 50% of air saturation. The medium used was the same as that of small-scale experiments.

Analytical methods

Cell concentration The total cell density was determined with a haemocytometer and the viability by the Trypan Blue exclusion method [9].

Nutrients and metabolite analysis The concentrations of glucose, lactate and glutamine in the culture supernatants were determined enzymatically with a YSI biochemical analyser (model 2700) after sample centrifugation at 200 g for 5 min. Amino acid concentrations in the culture supernatants were analysed by the Pico-tag system, using a reverse-phase HPLC column (Waters).

Estimation of apoptotic cell death The percentage of apoptotic dead cells was measured in both cell populations by staining with fluorescent dyes. Cells were stained with AO

(Acridine Orange) and EB (ethidium bromide) and classified by visual examination under a fluorescent microscope as described by Mercille and Massie [10]. A 470–490 nm (excitation) band-pass filter, a 500 nm dichroic mirror and a 515 nm (emission) band-pass filter were used.

Determination of specific oxygen consumption rate (q_{O_2}) The dynamic method for the determination of $k_L a$ and q_{O_2} is based on an oxygen material balance [11]:

$$dC/dt = k_L a(C^* - C) - q_{O_2} X \quad (1)$$

where $k_L a$ is the volumetric oxygen transfer coefficient (h^{-1}), C^* the oxygen concentration in the medium at equilibrium with air (mmol/l), C the oxygen concentration in a medium (mmol/l), C^* the specific oxygen consumption rate ($mmol \cdot h^{-1} \cdot cell^{-1}$) and X the viable cell concentration (cell/ml). If the oxygen supply is stopped, then $k_L a = 0$ in eqn (1) and the q_{O_2} can be calculated as the slope of the graph relating C and t , for a known value for the cellular concentration.

RVGP concentration The RVGP content in cell cultures was evaluated by Western blotting and immunofluorescence assays. The samples for protein analysis by Western blotting were first separated by SDS/PAGE (12.5% acrylamide resolution gels) and transferred to a nitrocellulose membrane. After blocking, the membrane was incubated with serum antibodies of rabies-immunized rabbits (1:100). The immunoreactive proteins were then detected by the use of ECL[®] (enhanced chemiluminescence) anti-rabbit IgG peroxidase-labelled species-specific whole antibody (1:2000) (Amersham Biosciences). The reaction was developed with 0.05% 4-chloro-1-naphthol in 15% (v/v) methanol, in the presence of 0.03% H_2O_2 . As a standard, purified Pasteur rabies virus was used.

Immunofluorescence and flow-cytometric assays were performed with 10^7 S2AcRVGP or S2 cells (wild-type)/ml. They were washed twice with PBS and centrifuged at 1000 rev./min for 5 min. The immunofluorescence reaction was performed with FITC-labelled D1 anti-RVGP monoclonal antibodies (1:400) for 1 h at 37°C and fluorescence was observed under the microscope. For flow-cytometric analysis, cells were incubated with mouse anti-(rabies vaccine) antibodies or normal mouse serum, as a control, for 30 min at 4°C. After washing twice at 1000 rev./min for 5 min with PBS, the cells were incubated with FITC-conjugated F(ab)₂ (an antibody fragment) goat anti-mouse IgG (H + L) (Jackson ImmunoResearch Laboratories) for 30 min at 4°C. The samples were then submitted to flow-cytometric analysis, performed using a Becton Dickinson FACSCalibur[™] equipment and the data were analysed with CELLQuest software (Becton Dickinson). Fluorescence was collected using a 530 nm filter. A total of 10 000 cells per sample were analysed.

Figure 1 RVGP expression determined by Western blotting (A) and immunofluorescence (B) assays

In (A), S2 refers to wild-type cells and S2AcRVGP to recombinant S2 cells expressing RVGP. For further details about (B), see the text

The RVGP content in cell lysates and supernatants were also evaluated by ELISA with IgG against RVGP, purified from the serum of rabbits immunized with purified guinea-pig virus (Pasteur lineage) propagated on Vero cells, as a cover antibody. The cover antibody labelled with peroxidase was used to detect bound RVGP antigen.

Results and discussion

Recombinant protein expression

The recombinant S2 (S2AcRVGP) cell population was established by co-transfection with pCoHygro and pAc/RVGP vectors and selected with hygromycin. Figures 1(A) and 1(B) present RVGP expression as indicated by Western blotting and immunofluorescence assays. As shown in Figure 1(A), although the synthesized RVGP exhibited the expected molecular mass of 65 kDa, the bands at slightly different kDa values observed in the Western blotting indicate post-translational modifications taking place during protein synthesis. Detailed qualitative studies of the RVGP synthesized by S2AcRVGP cells are under investigation. In Figure 1(B), it can be seen that approx. 32% of the cell population expressed the RVGP protein. The S2AcRVGP cell cultures are capable of producing, both in supernatants and cell lysates, 150–300 ng/ml of RVGP at 72 h of culture as evaluated by ELISA assay [8].

Cultures in Schott flasks

Cell growth The cell cultures in Schott flasks started with an exponential growth phase, followed by a decreasing growth rate phase and a long stationary phase at day 6 of culture. This long-lasting plateau is rarely seen in animal cell culture and, as discussed later on, may be due to a remarkable adaptation of the S2 cells to a low oxygen concentration (hypoxia). The cell cultures reached a maximum cell concentration of 1.13×10^7 cells/ml with a $\mu_{\max}$ (maximum specific growth rate) of $0.0368 \pm 0.0002 \text{ h}^{-1}$, as shown in

Figure 2(A). Accordingly, our $\mu_{\max}$ value for S2AcRVGP cells cultures is very close to that cited by Valle et al. [12], namely $0.03\text{--}0.04 \text{ h}^{-1}$, in S2 cell cultures producing human menin in a bench-top bioreactor.

The prolonged stationary phase can be explained by the fact that *D. melanogaster* shows a remarkable resistance to hypoxia, which is the predominant condition in this phase. The mechanisms underlying susceptibility or tolerance to O_2 deprivation are not well understood. It has recently been demonstrated that the *D. melanogaster* embryo has natural mechanisms that protects the cells against stress caused by hypoxia [13,14]. Thus the S2 cells may be expected to show enhanced tolerance to oxygen deprivation in the stationary phase.

Cell metabolism As shown in Figure 2(C), the glucose and glutamine consumption profiles were very similar; the point of complete exhaustion was not reached. Lactate production was appreciably low, even after oxygen deprivation. The maximum lactate concentrations reached 0.057 g/l. It can also be observed that neither glucose nor glutamine limited cell growth. When the culture reached the stationary phase, at day 6 of culture, the glucose and glutamine concentrations were approx. 6 and 2 g/l respectively. The S2AcRVGP cell growth in Sf900-II medium in Schott flasks was limited by oxygen deprivation. Figure 2(B) shows a typical DO (dissolved oxygen) profile measured in a parallel culture realized in a Schott flask with an oxygen probe mounted in its cap.

Figure 3 shows the amino acid profiles, where the most consumed were cysteine, serine, glycine and proline. Alanine was produced in great amounts, reaching 2.7 g/l at day 10 of culture. According to Bhatia et al. [15], alanine production is shown in cultures with a high initial glucose concentration, which was the case in our study (Sf900-II medium with 10 g/l of glucose).

Cell death The use of fluorescence microscopy allows discrimination between apoptotic and necrotic cell death, thus revealing important nutritional and physical factors

Figure 2 (A) Cell growth, (B) DO profile and lactate production and (C) glucose and glutamine consumption of S2AcRVGP cells cultured in Sf900-II medium in a shaker at 100 rev/min and 28 °C

The vertical dotted line corresponds to the end of exponential growth. The experiments were performed in duplicate and the results are presented as the means for the two cultures. Each bar represents the S.D.

Figure 3 Amino acids produced or consumed relative to initial contents in S2AcRVGP culture in Sf900-II medium in 100 ml Schott flasks at 28 °C and 100 rev/min

The relative concentration C_t of an amino acid is the ratio of its concentration at time t (C_t) to that at zero time (C_0).

with strong effects on the viability of a cell culture. By adopting the cell death classification of Mercille and Massie [10], in which viable cells displayed a bright green fluorescence, whereas apoptotic nuclei stained bright orange and necrotic cells presented orange-stained nuclei, our data indicated that a small percentage of cells in the culture suffered apoptotic or necrotic death during cell

growth in Schott flasks. Analysing the death profile of cells (Figure 4), it can be observed that, during the first 7 days of culture, the percentage of death cells is below 5%. This low cell death percentage is in agreement with viabilities (95%) determined by Trypan Blue. From day 7 onwards, the apoptotic and necrotic cell death increased. The apoptotic death cannot be associated with the exhaustion of glucose

Figure 4 Quantification of apoptosis levels in S2AcRVGP cell cultures performed in 100 ml Schott flasks with Sf900-II medium at 28 °C and 100 rev/min

Figure 5 (A) Cell growth, (B) pH, DO and stirring profile and (C) nutrients profile of S2AcRVGP cells in the bioreactor without oxygen control

The culture conditions were: 28 °C, aeration of 2 v.v.m. and increasing agitation from 100 to 200 rev/min. The vertical dotted line corresponds to the end of exponential growth. Oxygen control was not implemented in this experiment.

and glutamine, since during the culture the levels of both substrates were high. The apoptotic cell death could be associated with the starvation of serine, glycine, proline and cysteine, which coincided with the appearance of apoptosis.

Cultures in the bioreactor

Culture in the bioreactor without oxygen control Figure 5 shows the growth and metabolism of the S2AcRVGP cells in the bioreactor. Their growth had a longer lag phase, approx. 48 h, than that observed in Schott flasks, where the lag phase lasted less than 24 h. It is probably due to cell adaptation to a new culture environment, where they face

higher shear stresses caused by the new stirring system (marine impeller), as well as the presence of the probes and the grid in which the silicone membrane was held. After an exponential phase, with a maximum specific growth rate ($\mu_{\max}$) of $0.035 \pm 0.002 \text{ h}^{-1}$, the growth was limited by oxygen deprivation, as in the Schott flask cultures. After 6 days of culture, the DO concentration decreased to zero. In spite of such an adverse situation, the cells not only managed to grow, but also maintained a high viability. Again, this behaviour can be attributed to the notable adaptation of *D. melanogaster* cells to the hypoxic conditions that predominate at the end of the exponential phase.

Figure 6 Amino acids consumed or produced by S2AcRVGP cells in the bioreactor without oxygen control

The relative concentration C_t of an amino acid is the ratio of its concentration at time t (C_t) to that at zero time (C_0).

The increase in pH observed in the stationary growth phase, which is possibly associated with the consumption of amino acids, did not reach toxic levels, since the viability remained high. On the other hand, the gradual rise in stirring rate contributed to an increased growth of cells, postponing the beginning of the stationary growth phase. Even at an impeller rate as high as 200 rev./min, the S2AcRVGP cells did not suffer a noticeable fall in viability, indicating that these cells possess a good ability to adapt to the rising shear stress.

With regard to the metabolism of the amino acids, Figure 6 shows that none of the amino acids was totally consumed. The most consumed amino acids were serine, proline and cysteine. Alanine was produced in large amounts, as in experiments in Schott flasks.

Culture in the bioreactor with oxygen control The experiment was repeated with an attempt to prevent oxygen deprivation by means of aeration with a mixture of air and oxygen. By making the cells adapt to increasing agitation during the first 24 h of culture (see Figure 7), it was possible to reduce the lag phase observed in previous experiment, from 48 h to approx. 24 h. The DO was controlled at 50%, resulting in a higher $\mu_{\max}$ ($0.048 \pm 0.002 \text{ h}^{-1}$) and higher cell concentrations ($1.3 \times 10^7 \text{ cell/ml}$). The growth limitation in this experiment was not due to oxygen, but to proline exhaustion, as can be confirmed with the data in Figure 8. The glucose and amino acid profiles can be observed in Figures 7 and 8 respectively. The glucose consumption increased after proline deprivation, indicating that this amino acid is the preferred metabolic energy source. The most consumed amino acids during the experiment

were serine, threonine, proline and cysteine, while serine, threonine and proline were completely depleted.

The peculiar metabolism of the S2AcRVGP cells with regard to limiting substrates can be explained in terms of the insect physiology. Proline is an important metabolic energy source in many insects, and in dipterans (flies) this amino acid appears to be preferentially oxidized for energy production in flight muscle [16]. Additionally, in species such as dipterans, beetles (coleopterans) and crickets (longhorn orthopterans), cold acclimatization and cold tolerance are significantly correlated with increases in proline levels [17–19].

Several studies in a variety of insect species suggest that amino acids, especially proline, can be used as an energy substrate in flight muscle. Proline is converted into glutamate and then to α -oxoglutarate, which is oxidized in the tricarboxylic acid cycle to produce ATP [20]. Proline is unique among energy substrates because its storage, transport and metabolic forms are all the same (<http://entomology.unl.edu/ent801/metabolism.html>). The energy yield from partial oxidation of proline (0.52 mol of ATP/g) is only slightly lower than that of lipids (0.65 mol of ATP/g), but is much higher than that of glucose (0.18 mol of ATP/g) [22].

In order to verify the *Drosophila* cell resistance to periods of hypoxia, the culture was maintained for approx. 15 h at $\text{DO} = 0\%$ by interrupting the oxygen supply. Although the oxygen concentration decreased from 50 to 0%, cell viability was not altered to a significant extent, remaining at 93%. Moreover, the cells kept their normal spherical shape and could rapidly recover the metabolic activity, as measured

Figure 7 (A) Cell growth, (B) pH, DO and stirring profile and (C) nutrients profile of S2AcRVGP cells in the bioreactor with oxygen control

The culture conditions were: 28°C , aeration of 2 v.v.m. with a mixture of air and oxygen and with increasing stirring rate. The DO concentration was maintained at approx. 50% air saturation throughout the experiment. The vertical dotted line corresponds to the end of exponential growth.

Figure 8 Amino acids consumed and produced by S2AcRVGP cells in the bioreactor with oxygen control

The relative concentration C_t of an amino acid is the ratio of its concentration at time t (C_t) to that at zero time (C_0).

in terms of specific oxygen consumption rate, upon culture re-oxygenation (Figure 9). Huhtala et al. [23], studying the effect of stress on growth and protein production in Sf9 cell cultures, found that, after an anoxic period of 15 h, the cell viability decreased to 80% and the cells started to change morphology. Douglas et al. [24], studying the effect of hypoxia on cell cycle kinetics and protein expression in *Drosophila* embryos, found that exposure to hypoxic

conditions (2 and 5% O_2) led the embryos to slow their rate of cell cycle progression, without, however, complete cessation of cell cycle activity or other abnormalities. Switching back to a normoxic perfusate allowed the embryos to rapidly resume their original cell cycle programme.

Another line of evidence of S2AcRVGP cell resistance to hypoxia has been observed in cultures carried out in Schott flasks, where very low concentrations of oxygen

Figure 9 Specific oxygen consumption rate and DO evolution of S2AcRVGP cells cultured in the bioreactor with oxygen control

The oxygen supply was interrupted during 15 h (DO=0) and then resumed to observe the recovery of cell activity.

were reached after 4 days, in a similar way to that shown in Figure 2. When cells taken from the hypoxic stationary phase were inoculated into fresh Sf900-II medium, they were seen to recover the normal growth, with little or no loss of viability, after a brief lag phase.

The behaviour of S2 cells as observed here and reported in studies presented in the literature sustains the hypothesis that the metabolism of *Drosophila* is especially adaptable to hypoxic conditions, as proposed above, without significant cell damage.

Conclusions

In Schott-flask cultures, S2AcRVGP cells showed specific growth rates of 0.037 h^{-1} , growth limitation due to oxygen deprivation and a long stationary phase with high cell viability level, even at oxygen concentrations near zero. The most consumed amino acids were cysteine, serine, glycine and proline, while alanine was generated in large amounts. In bioreactor cultures, oxygen deprivation could be avoided by membrane aeration with a mixture of air and oxygen, resulting in a higher cell growth rate (0.048 h^{-1}) than in the Schott-flask cultures. The growth in the bioreactor, with DO controlled at 50% of air saturation, was limited by proline deprivation. The cells showed good adaptation to stirring rates of 200 rev./min and also to a hypoxic period of 15 h, without showing apparent damage. The characteristics of S2 cells such as easy adaptation to hypoxia and shear stress, as well as their versatile metabolism, make these cells very promising for scaling up the production of recombinant

RVGP. The results obtained will be useful to support future developments on culture strategies with improved S2AcRVGP lineages for enhanced production of the RVGP.

Acknowledgments

This work was supported by Fundação Butantan and by grants from the Brazilian research funding agencies, FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) (02/09482-3, 01/09038-3 and 01/08914-4) and CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) (141099/2003-8). C.A.P. is a recipient of a CNPq research fellowship.

References

- 1 McCarroll, L. and King, L. A. (1997) *Curr. Opin. Biotechnol.* **8**, 590–594
- 2 Pfeifer, T. A. (1998) *Curr. Opin. Biotechnol.* **9**, 518–521
- 3 Henderson, J., Atkinson, A. E., Lazarus, C. M., Hawes, C. R., Napier, R. M., MacDonald, H. and King, L. A. (1995) *FEBS Lett.* **371**, 293–296
- 4 Shotkoski, F., Zhang, H. G., Jackson, M. B. and French-Constant, R. H. (1996) *FEBS Lett.* **380**, 257–262
- 5 Brighty, D. W., Rosenberg, M., Chen, I. S. Y. and Ivey-Hoyle, M. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **88**, 7802–7805
- 6 Buckingham, S. D., Matsuda, K., Hosie, A. M., Baylis, H. A., Squire, M. D., Landsdell, S. J., Millar, N. S. and Satelle, D. B. (1996) *Neuropharmacology* **35**, 1393–1401

- 7 Perret, B. G., Wagner, R., Lecat, S., Brillet, K., Rabut, G., Bucher, B. and Pattus, F. (2003) *Protein Expression Purif.* **31**, 123–132
- 8 Yokomizo, A. Y., Jorge, S. A. C., Astray, R. M., Fernandes, I., Ribeiro, O. G., Horton, D. S. P. Q., Tonso, A., Tordo, N. and Pereira, C. A. (2007) *Biotechnol. J.* **2**, 102–109
- 9 Doyle, A. and Griffiths, J. B. (1998) *Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures in Biotechnology*, John Wiley and Sons, New York.
- 10 Mercille, S. and GMassie, B. (1994) *Biotechnol. Bioeng.* **44**, 1140–1154
- 11 Blanch, H. W. and Clark, D. S. (1997) *Biochemical Engineering*, Marcel Dekker; New York.
- 12 Valle, M. A., Kester, M. B., Burns, A. L., Marx, S. J., Spiegel, A. M. and Shiloach, J. (2001) *Cytotechnology* **35**, 127–135
- 13 Chen, Q., Ma, E., Behar, K. L., Xu, T. and Haddad, G. G. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 3274–3279
- 14 Chen, O., Behar, K. L., Xu, T., Fan, C. and Haddad, G. G. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 49113–49118
- 15 Bhatia, R., Jesionowski, G., Ferrance, J. and Ataai, M. M. (1997) *Cytotechnology* **24**, 1–9
- 16 Bursell, E. and Slack, E. (1976) *Insect Biochem.* **6**, 159–167
- 17 Fields, P. G., Fleurat-Lessard, F., Lavenseau, L., Febvay, G., Peypelut, L. and Bonnot, G. (1998) *J. Insect Physiol.* **44**, 955–965
- 18 Ramlov, H. (1999) *J. Comp. Physiol.* **169**, 224–235
- 19 Misener, S. R., Chen, C. P. and Walker, V. K. (2001) *J. Insect Physiol.* **47**, 393–400
- 20 Scaraffia, P. Y. and Wells, M. A. (2003) *J. Insect Physiol.* **49**, 591–601
- 21 Reference deleted
- 22 Gäde, G. and Auerswald, L. (2002) *Comp. Biochem. Physiol.* **132**, 117–129
- 23 Huhtala, A., Linko, P. and Mutharasan, R. (2005) *J. Biotechnol.* **118**, 278–289
- 24 Douglas, R. M., Farahani, R., Morcillo, P., Kanaan, A., Xu, T. and Haddad, G. G. (2005) *Am. J. Physiol. Regulatory Integrative Comp. Physiol.* **288**, 511–521

Received 7 August 2006/9 May 2007; accepted 14 June 2007

Published as Immediate Publication 14 June 2007, doi:10.1042/BA20060148

Enhancing effect of a protein from *Lonomia obliqua* hemolymph on recombinant protein production

Ronaldo Z. Mendonça · Katia N. Greco · Alvaro P. B. Sousa · Roberto H. P. Moraes · Renato M. Astray · Carlos A. Pereira

Received: 7 December 2007 / Accepted: 15 February 2008 / Published online: 2 March 2008
© Springer Science+Business Media B.V. 2008

Abstract Gene expression in animal cells allows large scale production of proteins used for either structure and function studies or therapeutic purposes. Maximizing recombinant protein production is necessary to optimize cell growth and protein expression. Some studies have demonstrated the presence of pharmacologically active substances in insect hemolymph. In this work, we have identified and purified a protein from *Lonomia obliqua* hemolymph able to increase the production of the rabies virus glycoprotein, expressed in *Drosophila melanogaster* S2 cells, by about 59%.

Keywords Insect cells · Recombinant · *Lonomia obliqua* · Purification · Rabies · Hemolymph

Abbreviations

FACS Fluorescence-assisted cell sorting
FBS Fetal bovine serum
rRVGP Recombinant rabies virus glycoprotein

Introduction

Gene expression in animal cells allows production of proteins used for either structure and function studies or therapeutic purposes. The optimization of cell growth and protein expression requires maximizing recombinant protein production, which has been carried out using several strategies, such as the addition of selective nutrients, stimulating agents and genetic and metabolic manipulation. However, these systems can be quite costly. Process costs can be reduced by either replacing certain components of the culture medium, which will result in high cell densities at lower costs and less operation complexity, or by using substances which promote cell growth, cell protection or even cell productivity. Some studies have demonstrated the presence of pharmacologically active substances in insect hemolymph (Shiotsuki et al. 2000; Yamamoto et al. 1999; Guerrero et al. 1999; Jiang et al. 1999; Rosenfeld and Vanderberg 1998; Hamdaoui et al. 1998; Maranga et al. 2003; Huberman et al. 1979; Lin et al. 1998; Kurata et al. 1994; Jones et al. 1993; Zhu et al. 2000; Lowenberger et al. 1999; Lamberty et al. 1999; Gross et al. 1998; Johns et al. 1998; Lanz-Mendoza et al. 1996; Peters et al. 1993; Souza et al. 2005). The supplementation of cultures with hemolymph proteins has had a positive effect on viral replication (Souza et al. 2005; Rhee and Park 2000; Kanaya and Kobayashi 2000) and recombinant protein production (Woo et al. 1997). Recently, Kanaya and Kobayashi

R. Z. Mendonça (✉) · K. N. Greco ·
A. P. B. Sousa · R. M. Astray · C. A. Pereira
Laboratório de Imunologia Viral, Instituto Butantan, Av.
Vital Brasil 1500, 05503-900 São Paulo, Brasil
e-mail: zucatelli@uol.com.br

R. H. P. Moraes
Laboratório de Parasitologia, Instituto Butantan, São
Paulo, Brasil

(2000), isolated and characterized a protein from silkworm hemolymph, able to increase the activity of a recombinant protein (luciferase) by approximately 6,000 times. Nevertheless, few studies have succeeded in isolating and characterizing the factors involved in these effects (Nussbaumer et al. 2000; Shishikura et al. 1996, 1997; Moon et al. 1995; Ochanda et al. 1992). These factors, once identified and isolated, can be of great importance in the optimization of cell growth, viral replication or recombinant protein production, leading to more efficient cell cultivations and to final products at lower costs. The objective of this work was to identify, isolate and characterize the protein(s) of the hemolymph from *Lonomia obliqua* that are likely to influence cell growth and recombinant rabies glycoprotein production in cultures of transfected S2 cells.

Materials and methods

Cell line and culture conditions

Drosophila melanogaster Schneider 2 (S2) cells expressing recombinant rabies virus glycoprotein (rRVGP) were grown in 100 ml Schott flasks containing TC-100 medium (Gibco), supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), or SF-900 serum free medium. The flasks were inoculated with S2 cells to provide an initial concentration of $0.5\text{--}1 \times 10^6$ cells/ml (TC-100 medium) or 5×10^6 cells/ml (SF-900 medium). The cultures were then incubated at 29°C and at 100 rpm in a incubator shaker. S2 cells expressing rRVGP was kindly provided by Yokomizo et al. (2007).

Hemolymph collection

The hemolymph of *Lonomia obliqua* was collected from sixth instar larvae after setae had been cut off. The collected hemolymph was clarified by centrifugation at 1,000 g for 10 min. Afterwards, the supernatant was heat-treated at 60°C for 30 min. The heat-treated hemolymph was then filtered through a 0.2 µm membrane and stored at 4°C.

Hemolymph fractionation by chromatography

After centrifugation and filtration, 6 ml of hemolymph were further fractionated by gel filtration

chromatography using an AKTA Purifier chromatography system equipped with a Hi-prep 26/60 Sephacryl 200 column (Amersham Pharmacia Biotech) at a flow rate of 1 ml/min. The elution was monitored at 280 nm and 120 fractions (4 ml each) were collected. The fractions were then analyzed by SDS-PAGE and added to transfected S2 cell cultures for studies on cell growth and recombinant protein production.

Enhancing effect of hemolymph on recombinant protein production

In order to investigate the enhancing effect of hemolymph on recombinant protein production, whole hemolymph and hemolymph protein fractions were added to the culture medium to a final concentration of 1% (v/v) at the time of inoculation. Culture samples were taken daily and examined by FACS and confocal microscopy to determine the percentage of rRVGP-expressing cells and by ELISA to quantify the amount of protein produced.

Analytical procedures

Flow cytometry

Recombinant protein expression was quantitatively evaluated by flow cytometry. On a daily basis, samples of cultures containing transfected or non-transfected S2 cells, supplemented or non-supplemented with hemolymph (whole or fractions) were collected, washed twice with PBS (pH 7.4) and centrifuged at 800 g for 5 min. The pellet was stained with IgG anti-GPV antibody (Institute Pasteur). After 10 min, cells were centrifuged (1,000 g/5 min) and the pellet was resuspended in 1 ml of FACS buffer. Samples were processed on a Becton Dickinson FACSort equipped with an Ar laser (excitation and emission wavelengths were 488 and 620 nm, respectively). Ten thousand events were analyzed per sample.

rRVGP expression analysis by ELISA

The recombinant GPV levels produced by S2Ac-GPV2 cells were estimated by ELISA (Institute Pasteur, Paris) as described by Perrin et al. (1996). Transfected S2 cells expressing recombinant GPV

were centrifuged at 1,000 rpm for 5 min. The cell pellet was recovered and the cells were lysed with a lysing buffer. The lysate was then centrifuged at 10,000 rpm for 10 min and the supernatant was used to detect and quantify the protein. The immunofluorescence reaction was performed with FITC-labeled D1 mAB anti-RGPV (1:400) for 1 h at 37°C.

Determination of rRVGP-expressing S2 cells by Confocal microscopy

S2 cells, stained with anti-GPV antibody, were analyzed using a Bio-rad MRC-600 microscope equipped with a Kr/Ar Laser (1% laser transmission, 60% confocal aperture and 10× and 40× objectives). Excitation filters for 488 and 543 nm as well as emission filters for 505 nm were used.

Measurement of cell viability

Culture samples were taken daily and cell concentration was measured using a hemocytometer. Cell

viability was determined by the trypan blue exclusion test under light microscopy.

Results

Hemolymph effect on cell growth

One of the main objectives of this work was to observe the effect of hemolymph supplementation on S2 cell growth. S2 cells were initially adapted to growth in SF-900 serum free medium or in TC-100 culture medium supplemented with bovine fetal serum. While SF-900, a high-cost complex medium, was chosen for being able to maintain high cellular densities (2×10^7 cells/ml), TC-100 basic medium was chosen for this study so that interference of medium components in rRVGP production would be minimized.

Figure 1a shows the growth profiles of non-transfected S2 cells grown in whole hemolymph supplemented (1% v/v) and non-supplemented culture media. As it can

Fig. 1 Kinetics of S2 cell cultures performed in Schott flasks with TC-100 (a, b) and SF-900 (c) media. Flasks were inoculated with non-transfected (a) and transfected (b, c) S2 cells to provide an initial concentration of $0.5\text{--}1 \times 10^6$ cells/ml (a, b) or 5×10^6 cells/ml (c). Whole hemolymph (1% v/v) was added to the cultures at the time of inoculation. The cultures were conducted at 100 rpm and 29°C. Samples were taken daily and the viable cell number was determined using the trypan blue exclusion test

Fig. 2 Flow cytometric analysis of transfected S2 cells expressing the rabies virus glycoprotein. Flasks containing TC-100 medium were inoculated with transfected S2 cells to provide an initial concentration of 0.5×10^6 cells/ml. Samples were taken at 72 h after inoculation and cells were stained with anti-

glycoprotein antibody conjugated to fluorescein. **(a)** Control (non-stained transfected cells); **(b)** transfected cells stained with antibody; **(c)** transfected cells grown in whole hemolymph (1% v/v) supplemented medium and stained with antibody

Fig. 3 Confocal images (magnification $\times 10$) of transfected S2 cells expressing the rabies virus glycoprotein (GPV/PV), showing several degrees of expression intensity. Flasks containing TC-100 medium were inoculated with transfected S2 cells to provide an initial concentration of 0.5×10^6 cells/

ml. Samples were taken at 72 h after inoculation and cells were stained with anti-glycoprotein antibody conjugated to fluorescein. **(a)** Control (transfected cells stained with antibody); **(b)** transfected cells grown in whole hemolymph (1% v/v) supplemented medium and stained with antibody

be observed, hemolymph addition increased cellular yields from 5.8×10^6 to 7.2×10^6 cells/ml, representing an increase of approximately 24%. No adverse effects of the hemolymph on cell growth seem to have taken place since both cultures displayed similar morphology throughout the experiments. The effect of whole hemolymph (1% v/v) on the cell growth of transfected S2 cells expressing the rabies virus glycoprotein (GPV/PV) can be seen in Fig. 1b. The addition of whole hemolymph led to slightly lower cell growth in transfected S2 cultures (19% increase) in comparison with non-transfected S2 cell cultures (Fig. 1a). Consequently, a lower final cell yield (6.0×10^6 cells/ml) was achieved. TC-100 culture medium was employed in the experiments depicted in Fig. 1a and b. When SF-900

ml. Samples were taken at 72 h after inoculation and cells were stained with anti-glycoprotein antibody conjugated to fluorescein. **(a)** Control (transfected cells stained with antibody); **(b)** transfected cells grown in whole hemolymph (1% v/v) supplemented medium and stained with antibody

culture medium was used, no significant effect of the hemolymph on cell growth was observed (Fig. 1c).

Hemolymph effect on recombinant protein production (S2AcGPV)

In order to determine the hemolymph effect on recombinant protein production, cells were stained with fluorescent antibody and the cell number was determined by different techniques (FACS, confocal microscopy and ELISA). The flow cytometric analysis of transfected S2 cells (Fig. 2) shows that the number of fluorescent cells increased from 25.19% (Fig. 2a) to 42.54% (Fig. 2b) when the culture

Fig. 4 Effect of culture medium on GPV production. S2 Cells were grown in TC-100 and SF-900 media. Control non-supplemented cultures and whole hemolymph supplemented cultures (1% v/v) were performed. Samples were taken daily, and the amount of glycoprotein in trimeric form was determined by ELISA. The results were expressed as ng GPV/ 10^6 cells

medium was supplemented with whole hemolymph (1% v/v), which corresponds to an increase of 68.8%.

Fluorescence of transfected S2 cells, cultivated in hemolymph supplemented and non-supplemented culture media, was also visualized by confocal microscopy (Fig. 3). Fluorescence intensity was greater in cells grown in hemolymph enriched cultures (58%) compared with cells grown in non-enriched cultures (20.14%).

Effect of culture medium on GPV production

S2 cell cultures (S2AcGPV) were conducted in Schott flasks (20 ml working volume) containing

Fig. 5 Kinetics of GPV production in cultures of transfected S2 cells expressing the rabies virus G glycoprotein (GPV/PV). Flasks were inoculated with transfected S2 cells to provide an initial concentration of 1×10^6 cells/ml and whole hemolymph (1% v/v) was added to one of the cultures. Samples were taken daily, stained with anti-rabies G glycoprotein antibody and protein levels were quantified by ELISA. The results were expressed as ng GPV/ 10^6 cells

TC-100 and SF-900 media and the amount of proteins produced per cell was determined by ELISA. Even though cell number in SF-900 medium cultures was two to three times higher, the amount of GPV produced per cell was lower than in TC-100 medium cultures. Hemolymph addition to both cultures increased GPV production by an average of 42.8% (SF-900) to 59% (TC-100) (Fig. 4).

The kinetics of GPV production is depicted in Fig. 5. As illustrated, GPV production increased and achieved its maximum level during the exponential phase (at 48 h after inoculation) and decreased as the culture entered the stationary phase (Fig. 6), indicating that protein production may require cell mechanisms that are active during the cell growth phase.

Purification of hemolymph by gel filtration chromatography

Whole hemolymph was purified by gel filtration chromatography to determine the protein(s) involved

Fig. 6 Relationship between cellular growth and GPV production. Whole hemolymph (1% v/v) was added to one of the cultures. Samples were taken daily. Cells were stained with anti-rabies G glycoprotein antibody and protein levels were quantified by ELISA. The results were expressed as ng GPV/ 10^6 cells

Fig. 7 Gel filtration chromatography of *Lonomia obliqua* hemolymph carried out in an AKTA Purifier chromatography system equipped with a Hi-prep 26/60 Sephacryl 200 column (Amersham Pharmacia Biotech) at a flow rate of 1 ml/min

Fig. 8 Percentage of fluorescent S2 cells (a) and GPV production levels (b) after transfection with the gene of the rabies virus G glycoprotein (GPV/PV). The initial concentration of the cultures was 1×10^6 cells/ml. Cultures were supplemented with 1% (v/v) of whole hemolymph and 2% (v/v) of purified hemolymph fractions. Control non-supplemented cultures were also performed. Samples were taken after 72 h and cells were stained with anti-rabies G glycoprotein antibody. The percentage of fluorescent cells was determined by flow cytometry (FACS) and the amount of GPV was quantified by ELISA

in the enhancement of recombinant protein production. Six milliliter of whole hemolymph were loaded onto a Sephacryl S200 gel filtration column and the collected fractions were then tested in transfected S2 cell cultures. Figure 7 depicts the chromatographic profile.

Effect of the hemolymph fractions on GPV production

Figure 8 shows GPV production (after 72 h) in cultures supplemented with whole hemolymph or its fractions, added at the time of inoculation. Samples

Fig. 9 Production of GPV/ml (a) and production of GPV/cell (b) by transfected S2 cells expressing the rabies virus G glycoprotein (GPV/PV). The cultures were supplemented with 2% (v/v) of purified hemolymph fractions (pool 1). Samples were taken daily and cells were stained with anti-rabies G glycoprotein antibody. The amount of GPV produced was quantified by ELISA

were taken daily, beginning 72 h after inoculation. The percentage of fluorescent cells was determined by confocal microscopy and GPV production was determined by ELISA. As shown in Fig. 8, GPV production is directly proportional to the fluorescent cell number. While the addition of pools 2 and 3 resulted in poor performances in terms of GPV production, pool 1 supplemented culture yielded protein levels 34.8% higher than those observed in the control experiment. This is a useful observation since the use of higher concentrations of the semi-purified protein may lead to even better GPV production performances.

The time courses of the amount of protein produced per cell and per ml are shown in Fig. 9. It can be observed that while the amount of GPV produced per cell remained practically unchanged between day 2 and day 5, the amount of GPV per ml increased in association with cell growth.

Discussion

In this article, we have identified and purified a protein from *Lonomia obliqua* hemolymph capable of stimulating the production of the rabies G glycoprotein, expressed in *Drosophila melanogaster* S2 cells. This is in agreement with the data published by Kanaya and Kobayashi (2000), showing that supplementation of the culture medium with *Bombyx mori* hemolymph led to an increase in recombinant luciferase production of up to 6,000 times in a polyhedrin-baculovirus system. According to Kanaya and Kobayashi (2000), the increase in recombinant protein production could be related to the increase in the baculovirus replication (10,000 times). Several proteins that stimulate viral replication have been described in the literature (Tanada et al. 1973; Hukuhara et al. 1987; Derksen and Granados 1988; Gallo et al. 1991; Xu and Hukuhara 1994). Nevertheless, the mechanism of action of the protein from *Lonomia obliqua* hemolymph may be different from the one of the protein from *Bombyx mori* hemolymph since the gene of GPV was transfected into S2 cells rather than expressed in a baculovirus system. The enhancing effect of some substances, such as sodium butyrate, on recombinant protein production has been attributed to direct action on DNA (Dorner et al. 1989; Palermo et al. 1991; Chang et al. 1999; Choi et al. 2005). However, the mechanism by which the protein in our study promotes GPV production remains to be solved. Previously, we isolated an anti-apoptotic protein from pool 1 of fractions of *Lonomia obliqua* hemolymph (Souza et al. 2005). We are currently investigating the possibility that this protein may be a multifunctional protein playing an essential role in the enhancement of GPV production observed. On the other hand, while the protein isolated in our study is a high molecular mass protein (about 51 kDa, Kanaya and Kobayashi characterized a 15 kDa protein).

Another relevant observation is that there is a relationship between cellular growth and the production of the protein in the cultures studied. As it can be observed in Fig. 8, the productivity per cell increased as cells grew and decreased as cells entered the stationary phase, indicating that the production of GPV may be directly related to cellular activity.

In conclusion, we have isolated a high molecular mass protein (pool 1 of chromatographic fractions) from *Lonomia obliqua* hemolymph, capable of increasing recombinant protein production by about 59%.

Acknowledgements This work was supported by grants from FAPESP (02/09482-3 and 03/08728-1). We gratefully acknowledge the technical assistance provided by of Alexsander Seixas de Souza (Confocal) and the financial support of Fapesp: 02/09482-3; 03/08728-1

References

- Chang KH, Kim KS, Kim JH (1999) N-acetylcysteine increases the biosynthesis of recombinant EPO in apoptotic Chinese hamster ovary cells. *Free Rad Res* 30:85–91
- Choi SS, Rhee WJ, Park TH (2005) Beneficial effect of silkworm hemolymph on a CHO cell system: Inhibition of apoptosis and increase of EPO production. *Biotechnol Bioeng* 91(7):793–800
- Derksen AC, Granados RR (1988) Alteration of a lepidopteran peritrophic membrane by baculovirus and enhancement of viral infection. *Virology* 167:242–250
- Dorner AJ, Wasley LC, Kaufman RJ (1989) Increased synthesis of secreted proteins induces expression of glucose-regulated proteins in butyrate-treated chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem* 264(34):20602–20607
- Gallo LG, Corsaro BG, Hughes PR, Granados RR (1991) In vitro enhancement of baculovirus infection by the viral enhancing factors of a granulosis of the cabbage looper *Trichoplusia ni* (Lepidoptera: Noctuidae). *J Invert Pathol* 58:203–210
- Gross J, Muller C, Vilcinskas A, Hilker M (1998) Antimicrobial activity of exocrine glandular secretions, hemolymph, and larval regurgitate of the mustard leaf beetle phaedon cochleariae. *J Invertebr Pathol* 72(3):296–303
- Guerrero B, Perales J, Gil A, Arocha-Pinango CL (1999) Effect on platelet FXIII and partial characterization of Lonomin V, a proteolytic enzyme from *Lonomia achelous* caterpillars. *Thromb Res* 93(5):243–252
- Hamdaoui A, Wataleb S, Devreese B, Chiou SJ, Vanden Broeck J, Beeumen J, Van De Loof A, Schoofs L (1998) Purification and characterization of a group of five novel peptide serine protease inhibitors from ovaries of the desert locust, *Schistocerca gregaria*. *FEBS Lett* 422: 74–78
- Huberman A, Arechiga H, Cimet A, De La Rosa J, Aramburo C (1979) Isolation and purification of a neurodepressing hormone from the eyestalk of *Procambarus bouvieri* (Ortmann). *Eur J Biochem* 99(1):203–208
- Hukuhara T, Tamura K, Zhu Y, Abe H, Tanada Y (1987) Synergistic factors show specificity in enhancing nuclear polyhedrosis virus infections. *Appl Entomol Zool* 22:235–236
- Jiang H, Wang Y, Kanost MR (1999) Four serine proteinases expressed in *Manduca sexta* haemocytes. *Insect Mol Biol* 8:39–53
- Johns R, Sonenshine DE, Hynes WL (1998) Control of bacterial infections in the hard tick *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae): evidence for the existence of antimicrobial proteins in tick hemolymph. *J Med Entomol* 35(4):458–464
- Jones G, Manczak M, Horn M (1993) Hormonal regulation and properties of a new group of basic hemolymph proteins expressed during insect metamorphosis. *J Biol Chem* 268(2):1284–1291
- Kanaya T, Kobayashi J (2000) Purification and characterization of an insect cell hemolymph protein promoting in vitro replication of the *Bombyx Mori* nucleopolyhedrovirus. *J Gen Virol* 81:1135–1141
- Kurata K, Nakamura M, Okuda T, Hirano H, Shinbo H (1994) Purification and characterization of a juvenile hormone binding protein from hemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 109(1):105–114
- Lamberty M, Ades S, Uttenweiler-Joseph S, Brookhart G, Bushey D, Hoffmann JA, Bulet P (1999) Insect immunity. Isolation from the lepidopteran *Heliothis virescens* of a novel insect defensin with potent antifungal activity. *J Biol Chem* 274(14):9320–9326
- Lanz-Mendoza H, Bettencourt R, Fabbri M, Faye I (1996) Regulation of the insect immune response: the effect of hemolin on cellular immune mechanisms. *Cell Immunol* 169(1):47–54
- Lin CY, Chen SH, Kou GH, Kuo CM (1998) Identification and characterization of a hyperglycemic hormone from freshwater giant prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 121(4):315–321
- Lowenberger C, Charlet M, Vizioli J, Kamal S, Richman A, Christensen BM, Bulet P (1999) Antimicrobial activity spectrum, cDNA cloning, and mRNA expression of a newly isolated member of the cecropin family from the mosquito vector *Aedes aegypti*. *J Biol Chem* 274(29):20092–20097
- Maranga L, Mendonça RZ, Bengala A, Peixoto CC, Moraes RHP, Pereira CA, Carrondo MJT (2003) Enhancement of Sf-9 cell growth and longevity through supplementation of culture medium with hemolymph. *Biotechnol Progress* 19:58–63
- Moon HJ, Kurata S, Natori S, Lee BL (1995) Purification and cDNA cloning of an antifungal protein from the hemolymph of *Holotrichia diomphalia* larvae. *Biol Pharm Bull* 18(8):1049–1052
- Nussbaumer C, Hinton AC, Schopf A, Stradner A, Hammock BD (2000) Isolation characterization of juvenile hormone esterase from hemolymph of *Lymantria dispar* by affinity- and by anion-exchange chromatography. *Insect Biochem Mol Biol* 30(4):307–314
- Ochanda JO, Osir EO, Nguu EK, Olembo NK (1992) Isolation and properties of 600-kDa and 23-kDa hemolymph

- proteins from the tsetse fly, *Glossina morsitans*: their possible role as biological insecticides. *Scand J Immunol Suppl* 11:41–47
- Palermo DP, De Graaf ME, Maroti KR, Rehberg E, Post LE (1991) Production of analytical quantities of recombinant proteins in Chinese hamster ovary cells using sodium butyrate to elevate gene expression. *J Biotechnol* 19: 35–48
- Perrin P, Lafon M, Sureau P (1996) Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for the determination of glycoprotein content of rabies vaccines. In: Meslin FX, Kaplan M, Koprowski H (eds) *Laboratory techniques in rabies*. WHO, Geneva, pp 383–388
- Peters ID, Rancourt DE, Davies PL, Walker VK (1993) Isolation and characterization of an antifreeze protein precursor from transgenic *Drosophila*: evidence for partial processing. *Biochim Biophys Acta* 1171(3):247–254
- Rhee WJ, Park TH (2000) Silkworm hemolymph inhibits baculovirus-induced insect cell apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 271:186–190
- Rosenfeld A, Vanderberg JP (1998) Identification of electrophoretically separated proteases from midgut and hemolymph of adult *Anopheles stephensi* mosquitoes. *J Parasitol* 84(2):361–365
- Shiotsuki T, Bonning BC, Hirai M, Kikuchi K, Hammock BD (2000) Characterization and affinity purification of juvenile hormone esterase from *Bombyx mori*. *Biosci Biotechnol Biochem* 64(8):1681–1687
- Shishikura F, Abe T, Ohtake S, Tanaka K (1996) Purification and characterization of a 58,000-Da proteinase inhibitor from the hemolymph of a solitary ascidian, *Halocynthia roretzi*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 114(1):1–9
- Shishikura F, Abe T, Ohtake S, Tanaka K (1997) Purification and characterization of a 39,000-Da serine proteinase from the hemolymph of a solitary ascidian, *Halocynthia roretzi*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 118(1):131–141
- Souza APB, Peixoto CC, Maranga L, Carvalho AV, Moraes RHP, Mendonça RMZ, Pereira CA, Carrondo MJT, Mendonça RZ (2005) Purification and characterization of an anti-apoptotic protein isolated from *Lonomia obliqua* hemolymph. *Biotechnol Progr* 21:99–105
- Tanada Y, Himeno M, Omi EM (1973) Isolation of a factor from the capsule of a granulosis virus synergistic factor a nuclear polyhedrosis virus of the armyworm. *J Invertebr Pathol* 21:31–40
- Woo SD, Kim WJ, Kim HS, Choi JY, Jin BR, Kang SK (1997) Effect of silkworm hemolymph on the expression of *E. coli* beta-galactosidase in insect cell lines infected with recombinant baculoviruses. *Mol Cells* 7(4):572–574
- Xu J, Hukuhara T (1994) Biochemical properties of an enhancing factor of an entomopoxvirus. *J Invertebr Pathol* 63:14–18
- Yamamoto Y, Watabe S, Kageyama T, Takahashi SY (1999) Purification and characterization of *Bombyx* cysteine proteinase specific inhibitors from the hemolymph of *Bombyx mori*. *Arch Insect Biochem Physiol* 42(2): 119–129
- Yokomizo AY, Jorge ACS, Astray RM, Fernandes I, Ribeiro OG, Horton DSPQ, Tonso A, Tordo N, Pereira CA (2007) Rabies virus glycoprotein expression in *Drosophila* S2 cells. I. Functional recombinant protein in stable co-transfected cell line. *Biotechnol J* 2(1):102–109
- Zhu S, Li W, Jiang D, Zeng X (2000) Evidence for the existence of insect defensin-like peptide in scorpion venom. *IUBMB Life* 50(1):57–61

Growth of recombinant *Drosophila melanogaster* Schneider 2 cells producing rabies virus glycoprotein in bioreactor employing serum-free medium

Adriana L. L. Galesi · Marcelo A. Aguiar ·
Renato M. Astray · Elisabeth F. P. Augusto ·
Ângela M. Moraes

Received: 29 November 2007 / Accepted: 14 February 2008 / Published online: 2 March 2008
© Springer Science+Business Media B.V. 2008

Abstract *Drosophila melanogaster* Schneider 2 (S2) cells have been increasingly used as a suitable expression system for the production of different recombinant proteins, and the employment of bioreactors for large-scale culture is an important tool for this purpose. In this work, *Drosophila* S2 cells producing the rabies virus glycoprotein RVGP were cultivated in bioreactor, employing a serum-free medium, aiming an improvement in cell growth and in glycoprotein production. To overcome cell growth limitation commonly observed in stirred flasks, different experiments in bioreactor were performed, in which some system modifications were carried out to attain the desired goal. The study showed that this cell line is considerably sensitive to hydrodynamic

forces, and a high cell density (about 16.0×10^6 cells mL^{-1}) was only obtained when Pluronic F68® percentage was increased to 0.6% (w/v). Despite ammonium concentration affected RVGP production, and also cell growth, an elevated amount of the target protein was obtained, attaining $563 \text{ ng } 10^{-7}$ cells.

Keywords Rabies virus glycoprotein · S2 cells · Hydrodynamic forces · Bioreactor · Serum-free medium · Pluronic F68®

Introduction

Animal cell culture to obtain bioproducts has started in the 1950s with the production of vaccines for animals and humans, but its employment in large scale has become more usual since the 1980s due to recombinant DNA and hybridoma technologies (Augusto and Oliveira 2001). Herewith, improvement in the employed methodologies was necessary and the particular features of animal cells were so considered.

In this sense, the bioreactors used for culture of animal cells should be gently aerated and agitated, as high rates can cause shear injuries for cells. Environmental conditions should be homogeneous and well-controlled. Agitated tank bioreactors are the most frequently used since they provide adequate process control and are easy to scale up. Therefore, bioreactors

Ângela M. Moraes is recipient of a CNPq fellowship.

A. L. L. Galesi · Â. M. Moraes (✉)
Department of Biotechnological Processes, School
of Chemical Engineering, State University of Campinas,
P.O. Box 6066, 13083-852 Campinas, SP, Brazil
e-mail: ammoraes@feq.unicamp.br

M. A. Aguiar · E. F. P. Augusto
Laboratory of Industrial Biotechnology, Institute
of Technological Research of the State of São Paulo,
Av. Prof. Almeida Prado, 532, 05508-901 São Paulo,
SP, Brazil

R. M. Astray
Laboratory of Viral Immunology, Butantan Institute,
Av. Vital Brasil, 1500, 05503-900 São Paulo, SP, Brazil

design for animal cells include round-bottom geometry, suitable impellers and the prevention of vortex areas, which could cause shear damages (van der Pol and Tramper 1998).

In large-scale culture, protecting agents against hydrodynamic forces are commonly added to culture medium formulations, mainly to serum-free media, to avoid cell injuries. Commonly used additives include some polymers, such as Pluronic F68[®], methylcellulose and polyethylene glycol, and fetal bovine serum. Among polymers, Pluronic F68[®], a non-ionic surfactant, is the most employed for insect and mammalian cells (Palomares et al. 2000). Its utilization is related to higher cell survival and concentration, mainly in cultures performed in serum-free media. Nevertheless, the action mechanism of this additive is still debated (Palomares et al. 2000).

Some authors suggest that, in aerated cultures, Pluronic F68[®] presence minimizes cell-bubble adherence, decreasing the damages that occur when cells are carried to the liquid surface. Other proposed mechanisms include foam layer stabilization in the top of bioreactor and liquid film slower draining during bubble rupture, as well as reduction in membrane fluidity after association to cell membrane (Chisti 2000). This surfactant also presents effects in non-aerated cultures, in which cell damage occur due to vortex presence, reducing the tendency of cells adherence to the new surface (van der Pol and Tramper 1998; Palomares et al. 2000).

Dipteran's embryonic cells such as *Drosophila melanogaster* Schneider 2 (S2) cells are being successfully employed in recombinant protein expression (Deml et al. 1999a, b), since they present some advantages as fast growth, non-requirement of pH control, and use of culture media that do not require expensive additives. Besides that, the *Drosophila* expression system is a non-lytic insect expression system that uses simple plasmid vectors. Biological products already expressed by these cells include antibodies (Kirkpatrick et al. 1995), receptors (Millar et al. 1995; Tota et al. 1995; Van den Broeck et al. 1995; Torfs et al. 2000; Perret et al. 2003), enzymes (Gibson et al. 1993; Banks et al. 2003), tumor inhibitors (Valle et al. 2001; Jeon et al. 2003), growth factors (Lee et al. 2000) and viral antigens (Deml et al. 1999a; Bachmann et al. 2004). Nevertheless, literature is still scarce with regard to metabolism and culture of these cells, with few

previous works dealing specifically with recombinant rabies virus glycoprotein production through these cells (Yokomizo et al. 2007; Galesi et al. 2007).

In this study, *Drosophila melanogaster* Schneider 2 cells producing the rabies virus glycoprotein (RVGP) were cultured in bioreactor employing a serum-free culture medium. Some modifications in system were performed to bring cell behavior in bioreactor close to that observed in agitated flasks. Besides that, glycoprotein expression was evaluated considering the influence of cell growth, pH, lactate and ammonium production.

Materials and methods

Cell line and culture media

The transfected insect cell line S2AcRVGP2 producing the G glycoprotein from rabies virus was employed (Yokomizo et al. 2007). Cells were maintained in a serum-free TC100-based medium (Galesi et al. 2007), formulated with TC100 medium (Cultilab, Campinas, Brazil) containing 3 g L⁻¹ of yeastolate and 1% (v/v) of a lipid emulsion (Gibco, Grand Island, USA), 10 g L⁻¹ of glucose, 3.5 g L⁻¹ of glutamine and 0.1% (m/v) of Pluronic F68[®] (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA).

Inoculum preparation

For each bioreactor run, a vial of cells were thawed and cultivated in the previously described culture medium in 100 mL shake flasks (working volume of 20 mL) and incubated in a rotary shaker, at 100 rpm, and 28 °C, with subcultures occurring every 3–4 days. Cells with 25–30 passages in the culture medium, and at exponential growth phase, were used as inoculum in all experiments. Before inoculation in bioreactors, cells were centrifuged at 320 g for 5 min and the metabolized medium was discharged.

Bioreactor runs

Bioreactor runs were performed at a 2 L Biostat MD system (B. Braun, Germany), (1.5 L of working volume). Aeration was realized through a silicone tube (Si-Schlauch, Germany), with a diameter of 3.00 ± 0.20 mm and a wall thickness of

0.35 ± 0.15 mm. Total tube length was 5 m, but only 3.5 m was submersed. Temperature was controlled at 28 °C. Five runs were performed in distinct conditions aiming at adequate cell growth, as described in Table 1.

In the first two runs, oxygen from atmospheric air was supplied through an odontological compressor (Barionkar, EL 20750 model, Brazil), and its concentration was controlled feeding the system with ultra-pure nitrogen and ultra-pure oxygen (White Martins, Brazil). Two Rushton turbines were employed for stirring, providing radial flow in bioreactor. In the third run, medicinal synthetic air (Air Liquid, Brazil) substituted the odontological compressor, and mixing was performed with two pitched blade turbines with two paddles each (45° angle), providing axial flow. The forth and fifth runs were carried out with the same system, but increasing the Pluronic F68® percentage to 0.3 and 0.6% (w/v), respectively.

All experiments were performed with an inoculum concentration of 7.5×10^5 viable cells mL^{-1} .

Analytical methods

Cell concentration was determined by optical microscopy through a Neubauer hemocytometer and viability by the trypan blue dye exclusion method (Freshney 1994). Glucose and lactate were determined by High Performance Liquid Chromatography—HPLC (Waters, EUA), utilizing the columns SC1011 and SH1011 (Shodex, EUA), respectively. Ammonium

was determined by a specific electrode (Orion 9512, EUA). Glutamine concentration was determined enzymatically with a 2700 YSI Biochemical Analyser (Yellow Spring Instruments, USA).

The target protein (RVGP), a transmembrane protein, was recovered from the cells through centrifugation of sample aliquots containing 10^6 cells at 580 g for 5 min; the supernatant was discarded and the cell pellet was disrupted by using a lysis buffer (25 mM Tris, 25 mM NaCl, 5 mM MgCl_2) at pH 7.4 (Astray et al. 2008). After homogenization, the samples were kept at 4 °C for 1 h, with periodical mixing. Following the lysis process, samples were centrifuged for 5 min at 10,000 g for cell debris removal and the supernatants were analyzed. The target product concentration was measured employing a rabies glycoprotein ELISA kit (Pasteur Institute, France), with monoclonal antibodies specific to the bioactive trimeric form of the glycoprotein, and the RVGP cell content was estimated according to Eq. 1:

$$\text{RVGP} = (\text{RVGP}_X)_t * (X_T)_t$$

where RVGP is glycoprotein concentration, RVGP_X is the glycoprotein cell content, X_T is total cell concentration and t refers to time.

Results and discussion

With the purpose of evaluating S2AcRVGP2 cells growth in bioreactor, runs were performed employing

Table 1 Distinct conditions employed for runs performed in bioreactor

Run	Impeller	Stirring rate (rpm)	Dissolved oxygen (%)	Pluronic F68® concentration (% w/v)	Air source
1	Rushton turbine with six paddles	150	40	0.1	Odontological compressor
2	Rushton turbine with six paddles	100	40	0.1	Odontological compressor
3	Pitched blade turbine with two paddles	50 (up to 6.5 h) 75 (up to 69.5 h) 90 (remainder)	30	0.1	Commercial medicinal synthetic air
4	Pitched blade turbine with two paddles	90	30	0.3	Commercial medicinal synthetic air
5	Pitched blade turbine with two paddles	90	30	0.6	Odontological compressor

a serum-free medium. Glucose consumption, lactate and ammonium productions were also evaluated. Results are presented in Figs. 1 and 2, and Table 2.

In the first run (Fig. 1a, Table 2), cells presented a lag phase of about 20 h and, after that, culture entered an exponential growth phase, with a maximum specific cell growth of 0.018 h^{-1} , attaining a maximum cell concentration of 4.6×10^6 viable cells per mL. Nevertheless, this growth rate and cell concentration were inferior to that commonly obtained in agitated flasks (around 0.04 h^{-1} and 10×10^6 cells mL^{-1}), and could be attributed to hydrodynamic forces caused by the high stirring rate employed (150 rpm), since cell debris were observed in the supernatant during the whole experiment. The reduction of the stirring rate to 100 rpm was performed in the second run, and it was observed that maximum cell concentration and growth rate were similar to those obtained in the previous run (5.0×10^6 cells mL^{-1} and 0.021 h^{-1} , respectively) and cell viability decreased after 72–96 h (Fig. 1b), indicating that cells were under stress in such conditions.

Fig. 1 Cell growth (a) and viability (b) for runs 1 (●), 2 (■), 3 (△), 4 (◇) and 5 (□)

Apparently, the stirring rate decrease did not result on hydrodynamic forces reduction and, consequently, did not induce significant differences in cell behavior. However, these runs have allowed verifying that experimental errors are very low, since the curves obtained are quite similar.

In an attempt to minimize the differences observed between agitated flasks and bioreactor results, other modifications were made in the system (run 3). The radial flow impeller was substituted for an axial flow impeller, which is more adequate for cell culture since it provides less hydrodynamic forces. The stirring rate was also reduced and dissolved oxygen concentration was controlled at a lower value, closer to the values achieved in agitated flasks. In that system, O_2 concentration is maintained at low levels because flasks are opened only once a day for sampling. Medicinal synthetic air was also employed to eliminate the possibility of toxicity due to the potential presence of toxic compounds, since atmospheric air was being used.

Despite all these modifications, cell growth was not superior to that obtained in the other two runs. Cells presented a lag phase duration of about 15 h, maximum cell concentration was 5.5×10^6 cells mL^{-1} (Fig. 1a), and maximum cell growth rate was 0.024 h^{-1} (Table 2). The stirring rate was increased during the culture period because pellet formation was observed at the bioreactor bottom potentially due to insufficient mixing.

The next attempt to overcome the lower growth of S2AcRVGP2 cells in the bioreactor consisted of increasing Pluronic F68[®] percentage, aiming to avoid limitations related to hydrodynamic forces. For this purpose, a previous experiment was performed in stirred flasks to assess the Pluronic F68[®] concentration upper limit that did not cause toxic effects to the cells. Despite the recommended concentration range of this surfactant to animal cells is from 0.05 to 0.3% (w/v), the range tested in this work was expanded, going from 0.1 to 0.6% (w/v), and no significant differences in cell growth rates were observed between the different cultures (data not shown). However, supplementation with values above 0.4% caused cell aggregation, which could interfere in nutrient transport, metabolite elimination and RVGP expression. Therefore, 0.3% of Pluronic F68[®] was added to the culture medium and another run was performed in bioreactor. In this situation, cell growth

Fig. 2 Glucose (a), glutamine (b), lactate (c) and NH_4^+ (d) profiles for runs 1 (●), 2 (■), 3 (△), 4 (◇) and 5 (□)

Table 2 Growth parameters for bioreactor runs

Run	Lag phase duration (h)	Maximum cell concentration (cells mL ⁻¹)	Maximum specific cell growth rate (h ⁻¹)	t _{EXP} * (h)
1	20	4.6×10^6	0.018	139
2	10	5.0×10^6	0.021	92
3	15	5.5×10^6	0.024	122
4	–	9.0×10^6	0.033	99
5	30	16.0×10^6	0.027	165

* t_{EXP} refers to exponential phase duration

was higher than in the previous runs (Fig. 1a), achieving a final cell concentration closer to that observed in agitated flasks. No lag phase was observed, cell concentration attained 9.0×10^6 cells mL⁻¹ and maximum specific cell growth rate was 0.033 h^{-1} .

Despite restrictions about the use of Pluronic F68® percentages over 0.3%, a last effort was made to improve S2AcRVGP2 cell growth in bioreactor, increasing Pluronic F68® percentage to 0.6%.

Figure 1a shows that the maximum cell concentration was around 16.1×10^6 cells mL⁻¹, a value considerably higher than those observed in the previous runs and than that verified in the control experiment performed in an agitated flask (data not shown).

The lower growth in shaken flasks could be attributed to oxygen limitation, since in this culture system, air exchange occurs only with flask opening, while in bioreactor this condition was controlled. Swiech et al. (2008) showed that recombinant *Drosophila melanogaster* Schneider 2 cells present growth limitation, but not immediate death, due to oxygen deprivation in Schott-flask assays, with cells entering in stationary growth phase and remaining in it for long periods with high viabilities even at very low oxygen concentrations. The cells cultivated in bioreactor presented a lag phase of approximately 30 h, what could be credited to the low inoculum concentration (particularly in this run, an initial cell concentration of 4.8×10^5 cells mL⁻¹ was practiced, a value 28% lower than the one employed in the remaining experiments). The higher Pluronic F68®

Fig. 3 RVGP ($\square$) and RVGP cell content ($\blacksquare$) (bar graphs), and viable cell concentration ($\blacktriangle$), NH_4^+ concentration ($\diamond$), lactate concentration ($*$) and pH ($\circ$) for runs 1 (**a**), 2 (**b**) and 3 (**c**)

concentration could also explain this behavior, since the cells were not previously adapted to this condition. Maximum specific cell growth rate was slightly lower than that observed in run 4, maybe due to the high Pluronic F68[®] concentration, although no differences were verified in small scale. These results show that probably the cells were not growing in large scale due to the higher hydrodynamic forces in bioreactor when compared to the agitated flasks, condition that was overcome with the addition of a higher concentration of Pluronic F68[®].

Cell viability was up to 90% in all experiments (Fig. 1b), with exception of runs number 1 and 2, due to the higher agitation rate and type of impeller used.

Glucose consumption was similar in all runs (Fig. 2a). It was not the limiting substrate, since it was not totally consumed (except in run 5) and when cells reduced the growth rate, a significant amount of this substrate was still present in culture media.

Glutamine analysis in experiments 2, 4 and 5 (Fig. 2b) shows that this amino acid was also not limiting, since at least 0.5 g L⁻¹ of glutamine were present in culture medium when cells had their growth rate reduced. According to Bovo et al. (2008), *Drosophila melanogaster* Schneider 2 cell growth is indeed limited by the absence of glutamine in culture medium, which determines the end of exponential growth phase.

Lactate was produced in runs 1, 2, 4 and 5 in low quantities, 0.13–0.31 g L⁻¹, and it was not produced in run 3. Ammonium production attained values up to 80 mg L⁻¹ in runs 1, 2, 4 and 5, and around 67 mg L⁻¹ in run 3. According to Ikononou et al. (2003), insect cells are not as sensible as mammalian cells to ammonium presence, since the addition of 10 mM of ammonium salts to culture medium did not affect Sf-9 and BTI-EAA cell lines. On the other hand, the presence of 30 mM of NH₄Cl had a great

impact on recombinant protein production by High-FiveTM, despite affecting cell growth only discreetly. Studies also show that alanine is generally produced when glucose and amino acids are in excess in culture medium as well as ammonium is formed when there is glucose limitation (Ikonomou et al. 2003). This was probably not the case in the present work, since ammonium was produced in the presence of high glucose concentrations. Consistent values of 50–60 mg L⁻¹ of ammonium were detected at the end of exponential phase (time indicated in Table 2), what can be an indication of cell growth inhibition by ammonium.

RVGP production was also measured, and the influence of cell growth, pH, lactate and ammonium production over glycoprotein expression were evaluated. As RVGP is a transmembrane protein, and S2AcRVGP2 cells have not a secretion signal, only cell lysates were analyzed. Figures 3 and 4 show that RVGP concentration increases with cell growth, diminishing after that. The highest concentration was

obtained in run 2, in which 189 ng mL⁻¹ of RVGP were produced in 116 h, while in run 3, the lowest levels of glycoprotein were observed. Regarding RVGP cell content, it is high or it increases in early culture, generally decreasing in the course of it. Increases in cell number did not result in correspondent augmentation in RVGP concentration, what maybe an evidence that glycoprotein production is more efficient in the early culture stage. RVGP cell content commonly presented high values in the runs, in a range of 300–400 ng 10⁻⁷ cells, attaining 563 ng 10⁻⁷ cells in run 5.

RVGP cell content decreases whenever ammonium concentration reaches values around 45–55 mg L⁻¹, suggesting that this by-product inhibits product synthesis, consistent to the previous observation that cell growth could also be inhibited by ammonium. For baculovirus expression system based on *Trichoplusia ni* cells, the literature reports that high ammonium concentrations reduces or even inhibits protein production (Yang et al. 1996; Ikonomou et al. 2003).

Fig. 4 RVGP (□) and RVGP cell content (■) (bar graphs), and viable cell concentration (▲), NH₄⁺ concentration (◇), lactate concentration (*) and pH (○) for runs 4 (a) and 5 (b)

Since the RVGP undergoes structural changes in acidic pH, loosing its native shape (Gaudin et al. 1993; Gaudin 1997; Maillard and Gaudin 2002), pH and lactate concentration were monitored. In the five runs, only slight pH variations were observed, but the acidic culture medium pH could indeed have interfered with glycoprotein shape and also in its dosage, causing an underestimation of the actual produced RVGP concentration. An attempt of growing this cell line at a higher pH (6.8) was not successful, since the cells could not grow (data not shown). Although no significant changes were noted in pH during the runs, lactate production could have changed the internal cell pH, contributing to the loss of RVGP native structure and affecting protein quantification. Nevertheless, observing the results, it is not clear if lactate concentration played this role, since the quantity of this metabolite in the culture medium varies among runs when RVGP concentration decreased.

Concluding remarks

Despite being considerably sensitive to hydrodynamic forces, it is possible to cultivate S2AcRVGP2 cells in stirred bioreactors in serum-free medium if relatively high amounts of Pluronic F68® are added, achieving high levels of RVGP. Indications that ammonium interferes with glycoprotein production, as well as with cell growth were noted, however, the use of a fedbatch system, in which the gradual nutrient provision allows effective metabolite formation control, could overcome this limitation, turning the S2AcRVGP2 cells a potential platform for the production of a rabies virus vaccine.

Acknowledgements This work was supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Brasília, Brazil), Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP Grant Nos. 02/09482-3 and 03/00675-6, São Paulo, Brazil), Instituto Butantan (São Paulo, Brazil) and Instituto de Pesquisas Tecnológicas (São Paulo, Brazil).

References

- Astray RM, Augusto EFP, Yokomizo AY, Pereira CA (2008) Analytical approach for extraction of recombinant membrane viral glycoprotein from stably transfected *Drosophila melanogaster* cells. *Biotechnol J* 3(1):98–103
- Augusto EFP, Oliveira MS (2001) Processos com Células Animais. In: *Biotecnologia Industrial*, 1st edn, vol 3. Edgar Blücher, São Paulo
- Bachmann AS, Corpuz G, Hareld WP, Wang G, Collier BA (2004) A simple method for the rapid purification of copia virus-like particles from *Drosophila* Schneider 2 cells. *J Virol Methods* 115:159–165
- Banks DJ, Hua G, Adang M (2003) Cloning of a *Heliothis virescens* 110 kDa aminopeptidase N and expression in *Drosophila* S2 cells. *Insect Biochem Mol* 33:499–508
- Bovo R, Galesi ALL, Jorge SAC, Piccoli RAM, Moraes AM, Pereira CA, Augusto EFP (2008) Kinetic response of a *Drosophila melanogaster* cell line to different medium formulations and culture conditions. Submitted to *Cytotechnology*
- Chisti Y (2000) Animal-cell damage in sparged bioreactors. *Trends Biotechnol* 18:420–432
- Deml L, Wolf H, Wagner R (1999a) High level expression of hepatitis B virus surface antigen in stably transfected *Drosophila* Schneider-2 cells. *J Virol Methods* 79:191–203
- Deml L, Schirmbeck R, Reimann J, Wolf H, Wagner R (1999b) Purification and characterization of hepatitis B virus surface antigen particles produced in *Drosophila* Schneider-2 cells. *J Virol Methods* 79:205–217
- Freshney RI (1994) Culture of animal cells: a manual of basic technique, 3rd edn. Wiley-Liss, New York
- Galesi ALL, Pereira CA, Moraes AM (2007) Culture of transgenic *Drosophila melanogaster* Schneider 2 cells in serum-free media based on TC100 basal medium. *Biotechnol J* 2(11):1399–1407
- Gaudin Y (1997) Folding of rabies virus glycoprotein: epitope acquisition and interaction with endoplasmic reticulum chaperones. *J Virol* 71(5):3742–3750
- Gaudin Y, Ruigrok RWH, Knossow M, Flamand A (1993) Low-pH conformational changes of rabies virus glycoprotein and their role in membrane fusion. *J Virol* 67(3):1365–1372
- Gibson KR, Vanek PG, Kaloss WD, Collier GB, Connaughton JF, Angelichio M, Livi GP, Fleming PJ (1993) Expression of dopamine- β -hydroxylase in *Drosophila* Schneider 2 cells – evidence for a mechanism of membrane-binding other than uncleaved signal peptide. *J Biol Chem* 268:9490–9495
- Ikonomou L, Schneider YJ, Agathos SN (2003) Insect cell culture for industrial production of recombinant proteins. *Appl Microbiol Biotechnol* 62:1–20
- Jeon HK, Chang KH, Kim KI, Chung IK (2003) Functional expression of recombinant tumstatin in stably transformed *Drosophila melanogaster* S2 cells. *Biotechnol Lett* 25: 185–189
- Kirkpatrick RB, Ganguly S, Angelichio M, Griego S, Shatzman A, Silverman C, Rosenberg M (1995) Heavy chain dimers as well as complete antibodies are efficiently formed and secreted from *Drosophila* via a BiP-mediated pathway. *J Biol Chem* 270(34):19800–19805
- Lee JM, Park JH, Park JO, Chang KH, Chung IS (2000) Expression of recombinant erythropoietin in stably transformed *Drosophila melanogaster* S2 cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 36:348–350
- Maillard AP, Gaudin Y (2002) Rabies virus glycoprotein can fold in two alternative, antigenically distinct conformations

- depending on membrane-anchor type. *J Gen Virol* 83:1465–1476
- Millar NS, Baylis HA, Reaper C, Bunting R, Mason WT, Sattelle DB (1995) Functional expression of a cloned *Drosophila* muscarinic acetylcholine receptor in a stable *Drosophila* cell line. *J Exp Biol* 198:1843–1850
- Palomares LA, González M, Ramírez OT (2000) Evidence of Pluronic F68® direct interaction with insect cells: impact on shear protection, recombinant protein, and baculovirus production. *Enzyme Microb Technol* 26:324–331
- Perret BG, Wagner R, Lecat S, Brillet K, Rabut G, Bucher B, Pattus F (2003) Expression of EGFP-amino-tagged human mu opioid receptor in *Drosophila* Schneider 2 cells: a potential expression system for large-scale production of g-protein coupled receptors. *Protein Expr Purif* 31:123–132
- Swiech K, da Silva CS, Arantes MK, dos Santos AS, Astray RM, Pereira CA, Suazo CAT (2008) Characterization of growth and metabolism of *Drosophila melanogaster* cells transfected with the rabies-virus glycoprotein gene. *Biotechnol Appl Biochem* 49:41–49
- Torfs H, Shariatmadari R, Guerrero F, Parmentier M, Poels J, Van Poyer W, Swinnen E, De Loof A, Akerman K, Van den Broeck J (2000) Characterization of a receptor for insect tachykinin-like peptide agonists by functional expression in a stable *Drosophila* Schneider 2 cell line. *J Neurochem* 74:2182–2189
- Tota MR, Xu L, Sirotina A, Strader CD, Graziano MP (1995) Interaction of [fluorescein-Trp²⁵]glucagon with the human glucagon receptor expressed in *Drosophila* Schneider-2 cells. *J Biol Chem* 270:26466–26472
- Valle MA, Kester MB, Burns AL, Marx SJ, Spiegel AM, Shiloach J (2001) Production and purification of human menin from *Drosophila melanogaster* S2 cells using stirred tank reactor. *Cytotechnology* 35:127–135
- van der Pol L, Tramper J (1998) Shear sensitivity of animal cells from a culture-medium perspective. *Trends Biotechnol* 16:323–328
- Van den Broeck J, Vulsteke V, Huybrechts R, De Loof A (1995) Characterization of a cloned locust tyramine receptor cDNA by functional expression in permanently transformed *Drosophila* S2 cells. *J Neurochem* 64:2387–2395
- Yang JD, Gecik P, Collins A, Czarnecki S, Hsu HH, Lasdun A, Sundaram R, Muthukumar G, Silberklang M (1996) Rational scale-up of a baculovirus-insect cell batch process based on medium nutritional depth. *Biotechnol Bioeng* 52:696–706
- Yokomizo AY, Jorge SAC, Astray RM, Fernandes I, Filho ORG, Horton DSPQ, Tonso A, Pereira CA (2007) Rabies virus glycoprotein expression in *Drosophila* S2 cells. I. Functional recombinant protein in stable co-transfected cell line. *Biotechnol J* 2(1):102–109