

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 42

Análise da atividade anti-apoptótica do gene *iap-3* de *Anticarsia gemmatalis* MNPV

Elisa Figueiras Soares
Bergmann Morais Ribeiro
Maria Elita Batista de Castro

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Serviço de Atendimento ao Cidadão

Parque Estação Biológica, Av. W5 Norte (Final) - Brasília, DF

CEP 70770-900 - Caixa Postal 02372

PABX: (61) 448-4600

Fax: (61) 340-3624

<http://www.cenargen.embrapa.br>

e.mail: sac@cenargen.embrapa.br

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: José Manuel Cabral de Sousa Dias

Secretária-Executiva: Maria José de Oliveira Duarte

Membros: Luciano Lourenço Nass

Regina Maria Dechechi G. Carneiro

Maurício Machaim Franco

Sueli Correa Marques de Mello

Vera Tavares Campos Carneiro

Suplentes: Maria Alice Bianchi

Maria Fátima Batista

Supervisor editorial: Maria José de Oliveira Duarte

Normalização Bibliográfica: Maria Alice Bianchi

Tratamento de ilustrações: Giscard Matos de Queiroz

Editoração eletrônica: Giscard Matos de Queiroz

1ª edição

1ª impressão (2003): tiragem 150 exemplares.

Todos os direitos reservados.

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Soares, Elisa Figueiras.

Análise da atividade anti-apoptótica do gene *iap-3* de *Anticarsia gemmatalis* MNPV / Elisa Figueiras Soares, Bergmann Morais Ribeiro, Maria Elita Batista de Castro. — Brasília : Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2003.

16p. — (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, ISSN 1676 - 1340 ; n. 42)

1. Gene anti-apoptótico - *Anticarsia gemmatalis*. 2. Apoptose - *Anticarsia gemmatalis*. 3. Células UFL-AG-286 - *Anticarsia gemmatalis*. 4. Baculovirus. 5. Biologia Molecular. 6. Controle biológico. I. Soares, Elisa Figueiras. II.

Ribeiro, Bergmann Morais. III. Castro Maria Elita Batista de. IV. Título. V. Série.

572.8 - CDD 21

Sumário

Resumo	5
Abstract	7
Introdução	9
Materiais e Métodos	10
Resultados e Discussão	11
Referências Bibliográficas	15

Análise da atividade anti-apoptótica do gene *iap-3* de *Anticarsia gemmata*is MNPV

Elisa Filgueiras Soares¹

Bergmann Morais Ribeiro²

Maria Elita Batista de Castro³

Resumo

A apoptose é um evento pré-programado geneticamente que leva células a auto-destruição devido a variados estímulos, entre eles, a infecção por vírus. Assim, os vírus desenvolveram estratégias para evitar a apoptose celular e conseguir se replicar. *Anticarsia gemmata*lis multiple nucleopolyhedrovirus (AgMNPV), um baculovirus largamente utilizado como bioinseticida no Brasil, possui um gene inibidor de apoptose, *iap-3*, que permite sua replicação em células hospedeiras gerando uma infecção altamente produtiva sem que as células sejam levadas à morte prematuramente. Este gene já foi localizado, clonado e seqüenciado. Dando continuidade a sua caracterização, experimentos de expressão transiente foram conduzidos com o objetivo de verificar a atividade anti-apoptótica do gene *iap-3* na presença de um vírus indutor de apoptose, denominado vApAg. Este mutante é capaz de lisar células de *Anticarsia gemmata*lis (UFL-AG-286), levando a uma infecção incompleta, e replicar normalmente em células de *Trichoplusia ni* (BTI-Tn-5B1-4). Com esse objetivo, um plasmídeo recombinante (pBSpIE1AgIAP3) foi construído contendo um cassete gênico com o gene *iap3* de AgMNPV sob o controle do promotor *ie-1* de AgMNPV no plasmídeo pBluescript e usado para transfecção em células UFL-AG-286. Diferentes concentrações do plasmídeo foram usadas para transfecção das células e, 24h pós-transfecção (p.t.), o vírus mutante vApAg foi adicionado. As células transfectadas foram observadas por microscopia óptica, em diferentes tempos pós-infecção (p.i.), e exibiram características

¹Bióloga, mestranda em Biologia Molecular (UnB) / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia(CENARGEN)

²Biólogo, PhD, Universidade de Brasília (UnB)

³Bióloga, PhD, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (CENARGEN)

morfológicas nitidamente detectáveis a 48hp.i., pela presença de corpos apoptóticos ou pela presença de poliedros nos núcleos de suas células. A inibição de apoptose foi determinada pelo número de células viáveis quantificadas pela coloração com trypan blue. Nas concentrações de 2, 5 e 7µg de DNA do plasmídeo pBSpIE1AgIAP3, a viabilidade celular foi de 12,1%, 18,9% e 26,7%, respectivamente. O controle negativo células UFL-AG-286, apresentou 100% de células viáveis enquanto o positivo, células infectadas com vApAg, 7,3%. Estes resultados mostram que os níveis de atividade apoptótica nos sistemas celulares testados apresentaram redução progressiva à medida que a concentração de DNA foi aumentada. A inibição de apoptose também foi determinada através da análise da fragmentação do DNA internucleossomal. Células transfectadas com pBSpIE1AgIAP3 e infectadas com vApAg apresentaram um perfil de fragmentação menos acentuado do que o controle positivo (células infectadas com vApAg) que apresentou um padrão típico de fragmentação causada por apoptose em altos níveis, exibindo fragmentos de baixo peso molecular (tamanhos oligonucleossomais que migram no gel em forma de escada). Estes dados demonstram que o gene *iap-3* foi capaz de inibir parcialmente a apoptose em células UFL-AG-286 mesmo na presença do indutor de apoptose vApAg.

Palavras-chave: gene anti-apoptótico, baculovirus, células UFL-AG-286¹

Analysis of the antiapoptotic activity of the *iap-3* gene of *Anticarsia gemmatalis* MNPV

Abstract

Apoptosis is a genetically programmed event where cells undergo self-destruction due to several stimuli, like virus infection. Therefore, virus developed strategies to avoid apoptotic cell death and replicate. *Anticarsia gemmatalis* multiple nucleopolyhedrovirus (AgMNPV), a baculovirus used in large scale as biopesticide in Brazil, has an apoptosis-inhibiting gene, *iap-3*, which allows its replication in host cells causing a highly productive infection without premature cell death. This *iap-3* gene has already been located, cloned and sequenced. Transient expression assays were carried out in order to analyze the antiapoptotic activity of the *iap-3* in the presence of a apoptosis inducing virus, denominated vApAg. This mutant is capable of leading *Anticarsia gemmatalis* cells (UFL-AG-286) to apoptotic death, causing a non-productive infection, and is also capable of replicating normally in *Trichoplusia ni* cells (BTI-Tn-5B1-4). A recombinant plasmid (pBSpIE1AgIAP3) was constructed containing AgMNPV *iap-3* gene under the control of the AgMNPV *ie-1* promoter in the plasmid pBluescript SK+ and used for the transfection of UFL-AG-286 cells. At 24 hours post-transfection (p.t.), the mutant virus was added to the cells and at different times post-infection (p.i.), the cells were observed by light microscopy. At 48h p.i. typical morphological characteristics were clearly detectable, with the presence of apoptotic bodies and/or by the presence of polyhedral inclusion bodies in the cells nuclei. The inhibition of apoptosis was determined by the number of viable cells quantified by trypan blue staining. At 2, 5 and 7 μ g of DNA (pBSpIE1AgIAP3), the cell viability was about 12.1%; 18.9% and 26.7%, respectively. The negative control containing only UFL-AG-286 cells showed 100% of viability, while the positive control containing UFL-AG-286 cells infected with

vApAg showed 7.3%. These results show that the number of apoptotic cells reduced progressively when the DNA concentration of the plasmid pBSpIE1AgIAP3 were increased, indicating that the *iap-3* gene was capable of partially inhibiting the apoptosis in UFL-AG-286 cells even in the presence of the apoptosis inducing virus, vApAg. The inhibition of apoptosis was also determined by the analysis of internucleosomal DNA fragmentation. Cells transfected with pBSpIE1AgIAP3 and infected with vApAg presented a degradation profile less accentuated than the positive control (cells infected with vApAg) which exhibited a typical pattern of fragmentation caused by apoptosis in high levels (DNA-fragmented oligonucleosome ladders). These findings demonstrate that the *iap-3* gene was capable of partially inhibiting the apoptosis in UFL-AG-286 cells even in the presence of the apoptosis inducing virus, vApAg.

Introdução

Células de organismos multicelulares podem sofrer auto-destruição devido a vários estímulos, como por exemplo, uma infecção viral. Esse evento geneticamente programado é chamado de apoptose (Teodoro & Branton, 1997). Os mecanismos pelos quais essa resposta celular ocorre ainda não são bem conhecidos, mas sabe-se que envolve uma proteína chamada caspase, que deve ser ativada para formar um sistema de amplificação que acelera a resposta da morte celular (Li *et al.*, 1997). A indução de morte prematura de células infectadas é prejudicial à replicação dos vírus pois reduz ou até elimina a produção e a disseminação da progênie viral. Assim, os vírus desenvolveram estratégias para evitar ou atrasar a apoptose celular. Em baculovirus, existem dois genes virais que inibem a apoptose em células infectadas: *p35* e *iap*. As proteínas IAP ainda não são totalmente conhecidas, mas sabe-se que elas possuem duas regiões bem conservadas: domínio “zinc finger” na região C-terminal da proteína e uma seqüência conservada de aminoácidos repetida duas vezes na região N-terminal e denominada de BIR (“baculovirus *iap* repeat”) (Clem & Miller, 1994).

Um baculovirus muito importante e bem estudado é o *Nucleopolyhedrovirus* específico da lagarta-de-soja (*Anticarsia gemmatalis* multiple nucleopolyhedrovirus - AgMNPV). Atualmente, a aplicação do biopesticida Baculovirus anticarsia (AgMNPV) para o controle da lagarta-da-soja no Brasil representa o programa de maior sucesso no mundo com emprego de biopesticida viral, foi introduzido no sul do País na década de 80 e vem sendo aplicado em âmbito nacional, anualmente, em mais de um milhão de hectares de soja (Moscardi, 1998). O vírus AgMNPV possui o gene inibidor de apoptose (*iap-3*) que permite que a sua replicação nas células gere uma infecção altamente produtiva, sem que as células sejam levadas à morte prematuramente. O gene *iap-3* do baculovirus AgMNPV já foi localizado, clonado e seqüenciado (Carpes *et al.*, 2000). Recentemente, foi isolado um mutante de AgMNPV durante a construção de um recombinante (Silveira *et al.*, 1999). Esse mutante (vApAg) é capaz de induzir apoptose em células de *A. gemmatalis* (UFL-AG-286) *in vitro*, levando a uma infecção incompleta, e de se replicar normalmente em células de *Trichoplusia ni* (BTI-Tn5B1-4) (Castro & Ribeiro, 2001). O vírus vApAg possui uma alteração no gene *iap-3*, caracterizada pela inserção de um transposon de células de *A. gemmatalis*. Este fragmento possui uma possível ORF apresentando homologia de seqüência com uma ORF de um transposon de células de *Trichoplusia ni* (Carpes *et al.*, 2002).

O vírus vApAg possui uma alteração no gene *iap-3*, caracterizada pela inserção de um transposon de células de *A. gemmatalis* com uma possível ORF, com homologia de sequência com uma ORF de um transposon de células de *Trichoplusia ni* (Carpes *et al*, 2002).

Depois de localizado, clonado e seqüenciado, o gene *iap-3* de AgMNPV foi o objeto desse estudo no sentido de observar a sua atividade anti-apoptótica através de expressões transientes em células de inseto em cultura na presença do vírus vApAg.

Materiais e Métodos

Plasmídeos - Construção do plasmídeo recombinante pBSpIE1AgIAP3: a ORF (“open reading frame”) do gene *iap-3* de AgMNPV foi amplificada por PCR utilizando os primers forward IAPAgFSall (5'-CGT GTC GAC ACA CAC AAT G-3') e reverse IAPAgRNCOI (5'-CCT CCA TGG CTG AAC G-3'). O programa de PCR usado foi: 94°C/5min; [94°C/1min, 60°C/1min e 30seg, 72°C/1min] x 30; 72°C/7min. O fragmento obtido da reação de PCR foi clonado no vetor pGEM-T (Promega), e o promotor *ie-1* de AgMNPV foi clonado no vetor pBluescript SK+. O gene *iap-3* foi então isolado do plasmídeo pGEM-T e clonado sob o comando do promotor *ie-1* no plasmídeo pBluescript SK+.

Células e Vírus - Células UFL-AG-286 semeadas em meio TC-100 e mantidas a 27°C foram utilizadas para transfecção do plasmídeo pBSpIE1AgIAP3. Vírus vApAg com titulação viral de 2×10^7 UI/ml foi utilizado como indutor de apoptose.

Transfecção e infecção- Diferentes concentrações do plasmídeo pBSpIE1AgIAP3 (2mg, 5mg e 7mg) foram utilizadas para transfecção com Cellfectin® (Invitrogen) das células UFL-AG-286 em meio sem soro. A infecção com vírus vApAg foi feita 24 horas pós-transfecção utilizando uma MOI igual a 5. Como controle negativo foram usadas as células UFL-AG-286 apenas em meio com soro e como controle positivo foram usadas as células UFL-AG-286 infectadas com vApAg.

Análise da fragmentação do DNA - Células UFL-AG-286 transfectadas com 2µg do plasmídeo pBSpIE1AgIAP3 e infectadas com vApAg foram ressuspendidas a 48 hp.i., centrifugadas a 2500rpm e o sobrenadante a 14000rpm. O mesmo procedimento foi feito com as células do controle negativo e positivo. Células e/ou corpos apoptóticos foram tratados com tampão de lise (Tris 100mM, pH7,5; EDTA 2,5mM; Triton X-100 0,2%) por uma hora, à temperatura ambiente, e o DNA total foi extraído com fenol, clorofórmio e álcool isoamílico, precipitado com etanol e tratado com

RNase (50µg/ml). As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1,5%.

Análise de apoptose - A observação das células transfectadas e infectadas e das células controle foi feita a 24, 48 e 72hp.i. por microscopia óptica de contraste de fase. A quantificação da inibição de apoptose foi feita por contagem de células viáveis no hemacitômetro. A 48hp.i., as células foram centrifugadas e ressuspendidas em 1ml de PBS pH 6,2 contendo 0,04% de trypan blue para diferenciar as células viáveis de não-viáveis e então contadas no hemacitômetro. A relativa viabilidade das células foi feita pela divisão do número de células viáveis pelo número de células viáveis do controle negativo (100% de viabilidade). A média e o desvio-padrão foram feitos a partir de tratamentos realizados em triplicata.

Resultados e Discussão

O gene *iap-3* de AgMNPV foi amplificado por PCR e ligado “downstream” ao promotor *ie-1* de AgMNPV no plasmídeo pBluescript (dados não mostrados). O plasmídeo recombinante pBSpIE1AgIAP3 obtido foi confirmado por digestão com *Sal*I (Figura1).

As células transfectadas com o plasmídeo pBSpIE1AgIAP3 e infectadas com o vírus vApAg exibiram características morfológicas nitidamente detectáveis a 48hp.i. pela presença tanto de corpos apoptóticos, característicos de lise celular, como de poliedros nos núcleos de suas células, característicos de uma infecção produtiva (Figura 2). A inibição detectada neste ensaio de expressão, mesmo sendo uma inibição parcial, está em conformidade com informações publicadas de que os vírus podem se beneficiar com a expressão de genes anti-apoptóticos para promover sua replicação, de maneira que os genes anti-apoptóticos produzam proteínas que impedem a ativação do mecanismo de apoptose, ou interagem diretamente com ele, impedindo que a célula se auto-destrua (Li *et al.*, 1997).

A inibição parcial de apoptose resultante da expressão do gene *iap-3* nas células transfectadas foi determinada pela porcentagem de viabilidade celular após indução de apoptose pelo vírus vApAg. A contagem obtida de células viáveis do controle negativo (UFL-AG-286) foi considerada como 100%, sendo esta tomada como referência para avaliação da viabilidade celular dos outros sistemas estudados. Assim, os sistemas celulares transfectados com diferentes concentrações de DNA plasmidial 2µg, 5µg e 7µg tiveram respectivamente 12,1%; 18,9% e 26,7% de células viáveis. Verificou-se portanto, diferenças estatisticamente significativas com relação à do controle positivo. Porém, entre os tratamentos essa diferença não foi significativa.

Portanto, o controle positivo, células UFL-AG-286 infectadas com vApAg, resultou em 7,3% de viabilidade e os sistemas celulares transfectados nas diferentes concentrações de DNA plasmidial 2 μ g, 5 μ g e 7 μ g tiveram respectivamente 12,1%; 18,9% e 26,7% de células viáveis (Tabela 1 e Figura 4). Por análise estatística verificou-se que não houve diferenças significativas entre os tratamentos, porém cada tratamento diferiu significativamente com relação ao controle positivo (teste de Tukey, $P < 0,5$).

Para confirmação da inibição parcial detectada, foi feita uma análise de fragmentação do DNA total do sistema de transfecção-infecção (48hp.i.). Os perfis eletroforéticos apresentados na figura 3 mostraram que mesmo com a menor concentração de DNA do plasmídeo pBSpIE1AgIAP3 (2 μ g), a degradação do DNA detectada foi bem menor quando comparada à do controle positivo (células infectadas com vApAg), que apresentou um padrão típico de fragmentação causada por apoptose, exibindo fragmentos bem definidos e de baixo peso molecular (tamanhos oligonucleossomais que migram no gel em forma de escada).

Os resultados mostram que os níveis de apoptose nas células transfectadas reduziram significativamente, indicando que a expressão do gene *iap-3* foi capaz de inibir parcialmente a atividade apoptótica em células UFL-AG-286 na presença do vírus indutor de apoptose vApAg.

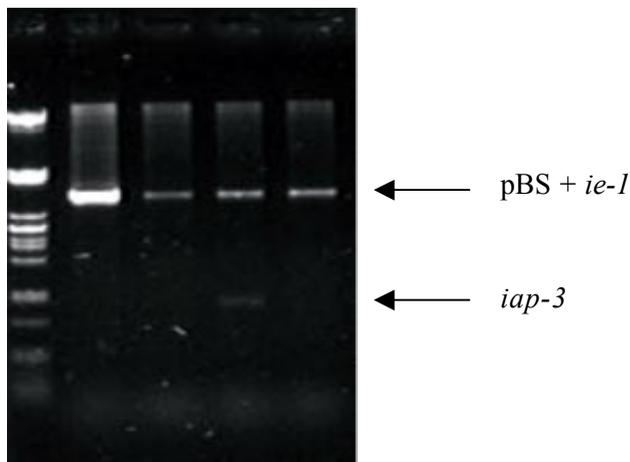


Fig.1. Fragmento correspondente ao gene *iap-3* do AgMNPV no plasmídeo pBluescript contendo o promotor *ie-1* de AgMNPV.

Poço 1: marcador DNA λ /*Pst*I; poços 2, 3, 4 e 5: digestão do plasmídeo recombinante pBSpIE1AgIAP3 com a enzima *Sal*I. As setas indicam o clone com o vetor pBS contendo promotor *ie-1* e o inserto *iap-3*. Eletroforese em gel de agarose 0,8%.

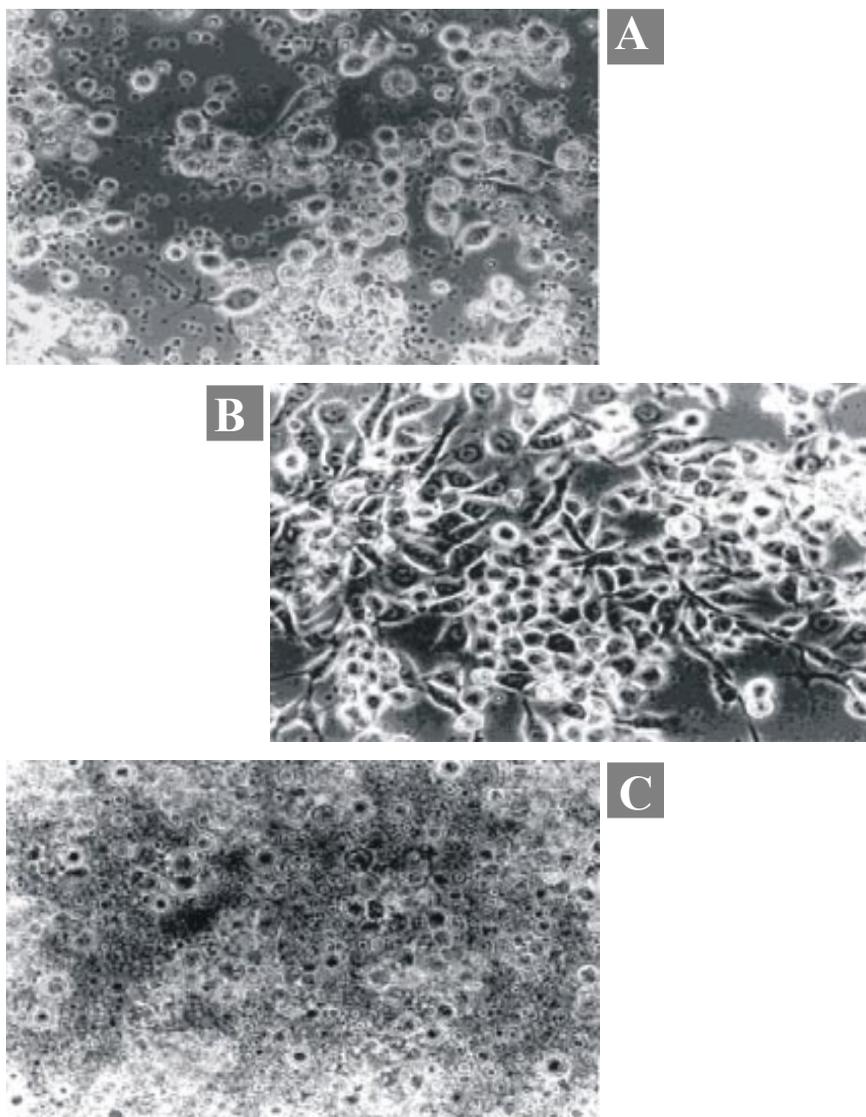


Fig.2. Inibição de apoptose pela expressão do gene *iap3* de AgMNPV na presença de um indutor de apoptose (vApAg) em células UFL-AG-286 a 48hp.i..

(A) células UFL-AG-286 - controle negativo; (B) células infectadas com vApAg - controle positivo; (C) - células transfectadas com o plasmídeo pBSplE1AgIAP3 (2μg) e infectadas com vApAg. Microscopia de contraste de fase. Aumento 320X

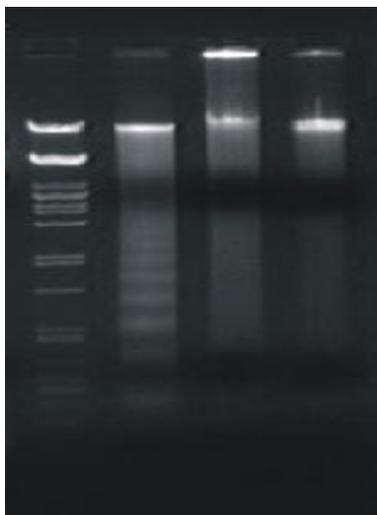


Fig.3. Inibição do padrão de fragmentação de DNA causado por apoptose pela expressão do gene *iap-3* nas células UFL-AG-286 a 48hp.i..

Poço 1: marcador DNA λ /PstI; poço 2: células infectadas com vApAg - controle positivo; poço 3: células transfetadas com o plasmídeo pBSpIE1AglAP3 (2 μ g) e infectadas com vApAg; poço 4: células UFL-AG-286 - controle negativo. Eletroforese em gel de agarose 1,5%.

Tabela 1 . Viabilidade de células de *A. gemmatalis* (UFL-AG-286) transfetadas com diferentes concentrações de DNA (plasmídeo pBSpIE1AglAP3) e infectadas com o vírus mutante vApAg.

	Controle (+) (vApAg)	<i>iap3</i> + vApAg (2 μ g de DNA)	<i>iap3</i> + vApAg (5 μ g de DNA)	<i>iap3</i> + vApAg (7 μ g de DNA)
Média*	0,73	1,21	1,89	2,67
Desvio Padrão	\pm 0,29	\pm 0,81	\pm 0,76	\pm 1,05
Porcentagem	7,3%	12,1%	18,9%	26,7%

A contagem de células viáveis foi feita, a 48hp.i., pela diferenciação com trypan blue.

*Média do número de células viáveis de tratamentos realizados em triplicata.

Os tratamentos com 2, 5 e 7 μ g de DNA do plasmídeo pBSpIE1AglAP3 apresentam diferença estatística significativa do controle positivo (teste de Tukey, $P < 0,5$). Não houve diferença significativa entre os três tratamentos (teste de Tukey).

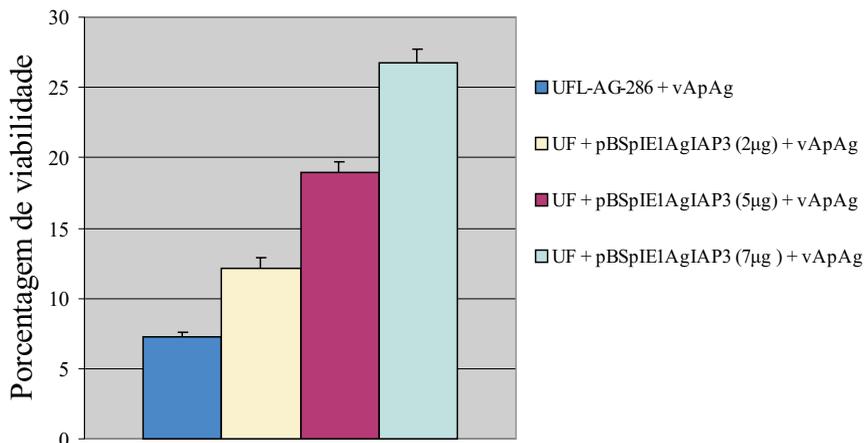


Fig.4. Determinação da porcentagem de inibição de apoptose por contagem de células viáveis com trypan blue.

Células UFL-AG-286 infectadas foram usadas como controle positivo. As células transfectadas receberam o plasmídeo pBSpIE1AgIAP3 em diferentes concentrações e foram infectadas com vApAg 24 horas pós-transfecção. A contagem de células foi feita a 48hp.i.

Referências Bibliográficas

CARPES, M. P.; CASTRO, M. E. B.; RIBEIRO, B. M. Cloning and partial sequencing of a putative *Anticarsia gemmatalis* Nucleopolyhedrovirus (AgMNPV) inhibitor of apoptosis gene (IAP-3). **Virus: reviews and research**, v. 5, n. 2, p. 75, 2000. Supplement 1 (BA 27). Apresentado no 11º Encontro Nacional de Virologia e 3º Encontro de Virologia do Mercosul, 25-29 November, 2000, São Lourenço, MG, Brasil.

CARPES, M. P.; CASTRO, M. E. B.; SOARES, E. F.; VILLELA, A.G.; RIBEIRO, B. M. Characterization of the *Anticarsia gemmatalis* nucleopolyhedrovirus (AgMNPV) inhibitor of apoptosis gene (*iap-3*) and the mutant vApAg. **Virus: reviews and research**, v. 7, n. 1, p.28, 2002. Supplement 1- (IV 1). Apresentado no 12º Encontro Nacional de Virologia, Águas de Lindóia, SP, 30 de setembro a 03 de outubro, 2002.

CASTRO, M. E. B.; RIBEIRO, B. M. Production of viral progenie in insect cells undergoing apoptosis induced by a mutant *Anticarsia gemmatalis* nucleopolyhedrovirus. **Microbiological Research**, Amsterdam, v. 156, n. 4, p. 369-376, 2001.

CLEM, R. J.; MILLER, L. K. Control of programmed cell-death by the baculovirus genes *p35* and *iap*. **Molecular and Cellular Biology**, Washington, DC, v. 14, p. 5212-5222, 1994.

LI, P.; NIJHAWAN, D.; BUDIHardJO, I.; SRINIVASULA, S. M.; AHMAD, M.; ALNEMRI, E. S.; WANG, X. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-I/caspase-9 complex initiates na apoptotic protease cascade. **Cell**, Cambridge, MA, v. 91, p. 479-489, 1997.

MOSCARDI, F. Utilização de vírus entomopatogênicos em campo. In: Alves, S. B. (Ed). **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba: ESALQ, 1998. p. 509-539.

SILVEIRA, E. B.; RIBEIRO, B. M.; BÁO, S. N. Morphological studies of apoptosis in insect cells infected with vApAg, an *Anticarsia gemmatalis* nucleopolyhedrovirus mutant. **Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology**, Bologna, v. 31, p. 543-554, 1999.

TEODORO, J. G; BRANTON, P. E. Minireview: Regulation of apoptosis by viral gene products. **Journal of Virology**, Washington, DC, p.1739-1746, Mar. 1997.