

Replicação de um baculovírus recombinante contendo o gene *rolA* de *Agrobacterium rhizogenes* em cultura de células de inseto

República Federativa do Brasil

Luiz Inácio Lula da Silva
Presidente

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Roberto Rodrigues
Ministro

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária Conselho de Administração

Luis Carlos Guedes Pinto
Presidente

Silvio Crestana
Vice-Presidente

Alexandre Kalil Pires
Ernesto Paterniani
Helio Tollini
Marcelo Barbosa Saintive
Membros

Diretoria-Executiva da Embrapa

Silvio Crestana
Diretor Presidente

José Geraldo Eugênio de França
Kepler Euclides Filho
Tatiana Deane de Abreu Sá
Diretores Executivos

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

José Manuel Cabral de Sousa Dias
Chefe-Geral

Maurício Antônio Lopes
Chefe-Adjunto de Pesquisa e Desenvolvimento

Maria Isabel de Oliveira Penteado
Chefe-Adjunto de Comunicação e Negócios

Maria do Rosário de Moraes
Chefe-Adjunto de Administração

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 111

**Replicação de um baculovírus recombinante contendo o
gene *rolA* de *Agrobacterium rhizogenes* em cultura de
células de inseto**

Briana Cardoso Ferreira
William Sihler
Mauro Carneiro
Marlinda Lobo de Souza

Brasília, DF
2005

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Serviço de Atendimento ao Cidadão

Parque Estação Biológica, Av. W/5 Norte (Final) –

Brasília, DF CEP 70770-900 – Caixa Postal 02372 PABX: (61) 3348-4739 Fax:

(61) 3340-3666 <http://www.cenargen.embrapa.br>

e.mail:sac@cenargen.embrapa.br

Comitê de Publicações

Presidente: *Maria Isabel de Oliveira Penteado*

Secretário-Executivo: *Maria da Graça Simões Pires Negrão*

Membros: *Arthur da Silva Mariante*

Maria Alice Bianchi

Maria de Fátima Batista

Maurício Machain Franco

Regina Maria Dechechi Carneiro

Sueli Correa Marques de Mello

Vera Tavares de Campos Carneiro

Supervisor editorial: *Maria da Graça S. P. Negrão*

Normalização Bibliográfica: *Maria Iara Pereira Machado*

Editoração eletrônica: *Maria da Graça S. P. Negrão*

1ª edição

1ª impressão (2005):

R 425 Replicação de um baculovírus recombinante contendo o gene rolA de *Agrobacterium rhizogenes* em cultura de células de inseto / Briana Cardoso Ferreira ... [et. al.]. – Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2005.
19p.: il. - (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, ISSN 1676-1340 ; 111)

1. Baculovírus recombinante – replocação. 2. *Agrobacterium rhizogenes* – gene rolA. 3. Inseto - cultura. I. Ferreira, Briana Cardoso. II. Sihler, William. III. Carneiro, Mauro. IV. Souza, Marlinda Lobo de. V. Série.

579.2436 – CDD 21

SUMÁRIO

| | |
|----------------------------------|----|
| RESUMO..... | 6 |
| INTRODUÇÃO | 6 |
| MATERIAL E MÉTODOS | 9 |
| Material:..... | 9 |
| Métodos: | 9 |
| RESULTADOS..... | 12 |
| DISCUSSÃO E CONCLUSÃO..... | 17 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 18 |

Replicação de um baculovírus recombinante contendo o gene *rolA* de *Agrobacterium rhizogenes* em cultura de células de inseto

Briana Cardoso Ferreira
William Sihler
Mauro Carneiro
Marlinda Lobo de Souza

RESUMO

As características morfológicas conferidas a plantas infectadas por *Agrobacterium rhizogenes* têm como principal responsável o gene *rolA*. Entre as anomalias causadas por esse gene estão a redução do tamanho da planta, inibição do crescimento da raiz e retardo na floração. Em trabalhos anteriores foi construído um baculovírus recombinante com o gene *rolA* no locus do gene da poliedrina. O gene *rolA* foi clonado no vetor pFastBac HTb usado para transformação em células DH10Bac cells (Invitrogen), que contêm o genoma viral de *Autographa californica Nucleopolyhedrovirus* (AcMNPV). Este DNA viral recombinante foi cotransfectado em células de inseto Sf9 resultando em um vírus deficiente na produção da poliedrina, o qual foi chamado de v-*rolA* (Sihler *et al*, 2002). No presente trabalho foi investigada a infecção do vírus v-*rolA* nas diferentes linhagens celulares de *Trichoplusia ni* (Tn5B1-4) e de *Spodoptera frugiperda*, IPLB-SF-21AE e Sf9. O inóculo viral foi removido depois de uma hora de adsorção e as células foram incubadas em meio TNMFH a 27°C por 48h. O progresso de infecção foi monitorado por microscopia óptica. Alterações morfológicas como hipertrofia nuclear e formação de corpo denso foram observados nas células Tn5B1-4, SF21 e Sf9 após 24h. O DNA do vírus recombinante foi extraído de células infectadas, digeridas com enzima *Pst* I e amplificado através da técnica de PCR. As amostras de DNA foram analisadas por eletroforese em gel de agarose mostrando que o vírus se replicou em todas as linhagens celulares.

INTRODUÇÃO

A bactéria de solo *Agrobacterium rhizogenes* é a principal causadora de neoplasias em plantas. Segundo Petit *et al* (1983), o mecanismo de interação com o hospedeiro se dá através da transferência de parte de seu material genético para o genoma da planta. Os genes transferidos são replicados, transcritos e traduzidos como se fossem da própria célula vegetal, resultando no desenvolvimento de tumores ou raízes no sítio de infecção, conhecidos como raízes em “cabeleira”.

De acordo com Chilton *et al* (1977), essa bactéria possui um plasmídeo denominado Ti ou Ri que varia de 200 a 800kb. Esse plasmídeo transfere um segmento de DNA (T-DNA) para o genoma vegetal que uma vez no núcleo, é integrado ao genoma por recombinação nos locais ativos, sendo expresso pela planta. Dentre os vários tipos de T-DNA estão inclusos os T_R e os T_L , responsáveis pela síntese de opinas e proliferação de células tumorais. Existem quatro genes responsáveis pelo fenótipo de raízes em “cabeleira” como proposto por Spena *et al* (1987) que são os *rolA*, *rolB*, *rolC* e *rolD* correspondentes às ORFs do plasmídeo Ri. Estes genes quando agem em pares causam efeitos mais acentuados do que quando agem isoladamente.

As neoplasias nas raízes provêm de uma única célula transformada diferindo dos demais tumores. As plantas segundo Tepfer (1984) apresentam um fenótipo alterado como: diminuição do porte, enrugamento foliar, formação de raízes adventícias, redução da dominância apical, alteração na morfologia floral, número de sementes reduzido, dentre outros.

Dentre os genes *rol*, o gene *rolA* é o que causa maiores alterações morfológicas em plantas. Foi conferido a esse gene a capacidade de redução do porte da planta, enrugamento e arredondamento foliar, coloração verde escura das folhas, atraso no período de floração, empobrecimento do sistema radicular, redução do número de flores e retardo na senescência. De acordo com Spena *et*

al (1987) foi especulado que esse fenótipo seja resultado de um aumento da relação entre os hormônios citocinina/auxina.

Segundo Slightom *et al* (1986), a proteína RolA possui 100 aminoácidos com massa molecular em torno de 11,4 kDa e ponto isoelétrico de 11,2. Experimentos indicam que essa proteína estaria associada à uma fração da membrana plasmática, porém as informações quanto a sua localização na célula vegetal e sua função são contraditórias fazendo-se necessário um aprofundamento das investigações para se chegar a sua verdadeira função biológica.

O avanço nos estudos sobre a proteína RolA, principalmente com relação a caracterização bioquímica e estrutural, tem sido dificultado pelas baixas concentrações nos tecidos onde ela é funcional. Há também a dificuldade no processo de purificação devido ao ataque de proteases que tendem a acontecer. O entendimento dos mecanismos pelos quais as agrobactérias alteram a morfologia da planta pode ser útil nos estudos de biologia do desenvolvimento e fisiologia vegetal, bem como na manipulação de características agronômicas de interesse.

Os sistemas de expressão visam a produção de grandes quantidades de proteínas. Porém um dos sistemas que se tornou importante como ferramenta em biotecnologia é a utilização de baculovírus como vetor de expressão. As vantagens desse sistema incluem: altos níveis de expressão da proteína; existência de promotores fortemente ativos durante a fase tardia de infecção onde não interfere no ciclo viral; fases diferentes na regulação gênica do ciclo viral que oferecem oportunidades de expressão de genes heterólogos sob diferentes condições celulares; capacidade para clonagem de grandes inserções; e eficiência na expressão de genes contínuos e cDNAs (O'Reilly *et al*, 1992).

Com base nas vantagens proporcionadas por este sistema, em trabalhos anteriores um baculovírus recombinante foi construído através da subclonagem do gene *rolA* de *A. rhizogenes* no locus do gene da poliedrina do *Autographa*

californica nucleopolyedrovirus (AcMNPV) utilizando o kit bac to bac (Life Technologies). O recombinante ocluso negativo obtido foi então denominado v-rolA (Sihler *et al*, 2002).

No presente trabalho foram realizadas a investigação da replicação deste recombinante em diferentes linhagens celulares (Tn5B1-4, IPLB SF- 21AE e Sf9) e a averiguação do melhor sistema para uma maior produção da proteína RolA.

MATERIAL E MÉTODOS

Material:

1. **Vírus:** Foi utilizado o vírus recombinante, ocluso negativo denominado v-rolA, contendo o gene *rolA* de *A. rhizogenes* no locus do gene do vírus AcMNPV.
2. **Células de inseto:** Foram utilizadas as linhagens *Trichoplusia ni* Tn5B1-4 (Granado *et al*, 1994) e *Spodoptera frugiperda* IPLB SF21-AE (Vaughn *et al*, 1977) e Sf9 para os experimentos de infecção com o recombinante v-rolA, bem como para a visualização por microscopia ótica. Para manutenção das linhagens celulares foi utilizado o meio de cultura TNMFH (GIBCO), seguindo-se as instruções do fabricante para o seu preparo. Além da adição do antibiótico (sulfato de gentamicina, 100µg/ml), o meio “Grace’s insect medium” (GIBCO) contendo hidrolisado de lactoalbumina e extrato de levedura foi complementado com 10% de soro bovino fetal estéril.

Métodos:

1. **Amplificação viral (segundo O'Reilly *et al*, 1992):** O vírus recombinante v-rolA foi amplificado em cultura de células de *Trichoplusia ni* (Tn5B1-4) e *Spodoptera frugiperda* (IPLB SF21-AE e Sf 9). As células foram semeadas em frascos T-25 na concentração de 3×10^6 . Antes da infecção, as células foram lavadas com meio TNMFH sem soro e incubadas por uma hora com 1 ml do inóculo viral. Após nova lavagem com meio sem soro, as células eram mantidas em meio TNMFH completo a 27°C por 48 horas. O sobrenadante foi coletado, centrifugado a 4.000 g e mantido a 4°C.
2. **Extração de DNA viral (de acordo com J. E. Maruniak, 1989):** Após centrifugação a 4000 g, os pellets celulares foram recolhidos em uma concentração inicial de 3×10^6 da infecção com baculovírus recombinante. Estas amostras foram submetidas ao tratamento com 200µl de EDTA 0,01M pH 7,6 e 6,2µl de SDS 20% e então mantidas por 30 minutos a temperatura ambiente. Após esse primeiro procedimento, foram adicionados 51,6 µl de NaCl 5 M e incubadas no gelo por 10 minutos, e em seguida, 10µl da enzima Proteinase K e incubadas *overnight* a 37° C. Após tratamento com a enzima, os DNAs foram extraídos com 3 ciclos de fenol saturado (270µl) e submetidos a centrifugação de 12000 g a cada ciclo; 2 ciclos de éter saturado em água destilada (570µl) e submetidos a centrifugação de 12000 g. As amostras foram incubadas a 56°C por 10 minutos com as tampas dos tubos abertas. Foram acrescentados etanol 100% (2,5 x o volume inicial da amostra) e 10% do volume total de NaAc e deixado *overnight* a -20°C. Após centrifugação por 30 minutos e retirada do sobrenadante, os pellets foram ressuspensos com 50µl de RNase a 10µg/ml e incubados a 37°C por 15 minutos. Após incubação foram adicionados em cada amostra 50µl de tampãoTE (0,01M de Tris pH 7,8; 0,001M de EDTA completando para 1 litro com água destilada), 50µl de NH₄Ac 7,5M, 300µl de etanol 70% e submetidas a centrifugação de 12000

g. Após descarte do sobrenadante foram acrescentados 500µl de etanol 70%, novamente centrifugado a 12000 g e o pellet foi seco no centrivap. O DNA puro foi ressuspensionado em 17µl de tampão TE e conservado a 4°C.

3. **Eletroforese em gel de agarose:** Os géis de agarose foram preparados em uma concentração de 0,8% em tampão **TAE 1X** (Tris Base, 5,71% de ácido acético glacial, 10% de EDTA 0,5M pH 8.0) contendo brometo de etídeo 0,2 µg/100 ml de acordo com Sambrook *et al*, 1989. As amostras, ressuspensas em tampão de aplicação 5X foram colocadas nos poços e uma corrente elétrica constante de 80V foi aplicada ao gel.
4. **Clivagem de DNA viral com enzimas de restrição:** O perfil de restrição das amostras de DNAs virais foi obtido através da clivagem dos mesmos com a enzima *Pst* I (Promega). O sistema foi feito em um volume de reação de 20µl contendo: 1µg de DNA molde (*v-rolA*), 1µl da enzima *Pst*I (10 U) e 2µl do tampão React 2 (10x). O sistema de digestão foi submetido à temperatura de 37°C em banho-maria por 4 horas.
5. **Amplificação do gene *rolA* por PCR:** Para multiplicar a região codificadora de *rolA*, utilizou-se a técnica “Polymerase Chain Reaction” (PCR). As reações foram realizadas em termociclador MiniCycler-PT-150 da MJ Research. Foram utilizados os *primers* externos à *rolA*, *pic1* e *pic2* para amplificação do gene. Os sistemas foram feitos com água destilada estéril, contendo as concentrações finais de: 5 - 10 ng de DNA molde (*v-rolA*), 400 ng de cada *primer*, 0,1 mM de cada dNTP, 5 U de enzima Taq polimerase e 1x do tampão correspondente à enzima, cobertos por óleo mineral.
 - passo I (desnaturação): 95°C / 5min;
 - passo II (desnaturação): 95°C / 1 min e 30 s;
 - passo III (anelamento): 47°C / 1 min e 10 s;

- passo IV (elongação): 72°C / 1 min e 30 s;
- repetição dos passos de II-IV por 35 ciclos;
- elongação: 72°C / 10 min
- manutenção à 4°C.

RESULTADOS

Inicialmente foi feita a multiplicação do vírus recombinante v-rolA nas diferentes linhagens celulares e os efeitos induzidos foram monitorados por microscopia óptica. Os dados indicam a formação de vírus ocluso negativo nas linhagens *Trichoplusia ni* Tn5B1-4 (Figura 1), *Spodoptera frugiperda* IPLB SF21-AE (Figura 2) e *Spodoptera frugiperda* Sf9 (Figura 3). Após infecção as células apresentaram alterações morfológicas significantes como aumento de tamanho, hipertrofia nuclear e formação de corpo denso (estroma virogênico) a partir de 24 h p.i. A presença de vacúolos foi também observada em algumas células, em especial na linhagem SF21. A linhagem Tn5B1-4, conhecida como *High Five*, apresentou um maior número de células infectadas, sendo portanto mais susceptível a infecção pelo vírus, seguido pelas linhagens celulares SF21 e Sf9.

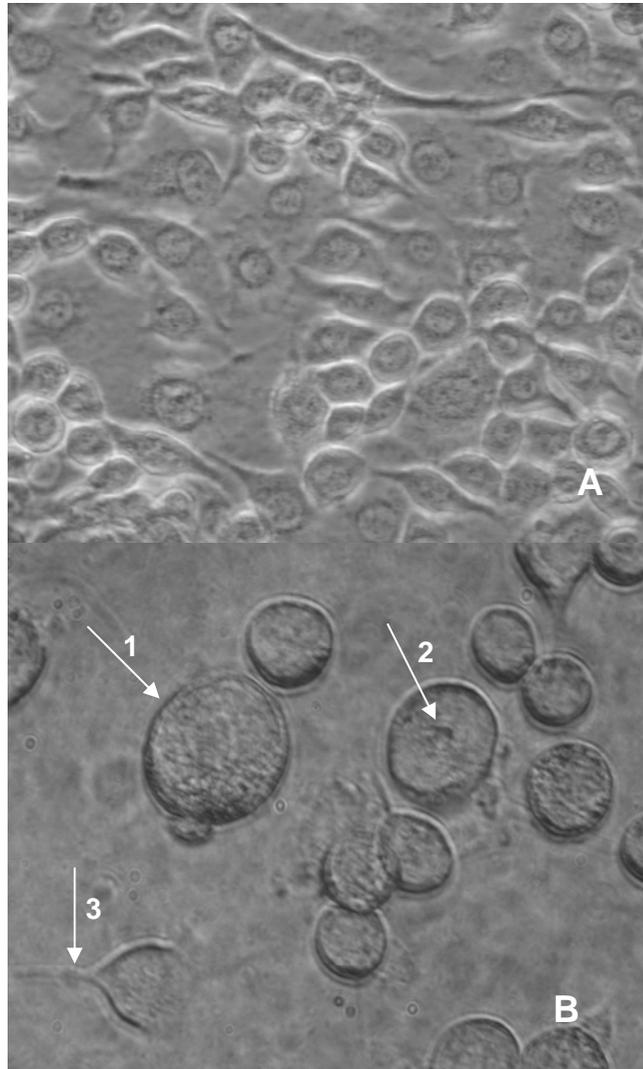


FIGURA 1: Microscopia óptica de células *Trichoplusia ni* (Tn5B1-4) não infectadas (A) e após 48 h de infecção com baculovírus recombinante v-rolA (B)

1. Hipertrofia celular – aumento do tamanho normal da célula
2. Estroma virogênico - corpo denso no interior do núcleo
3. Protusão da membrana celular

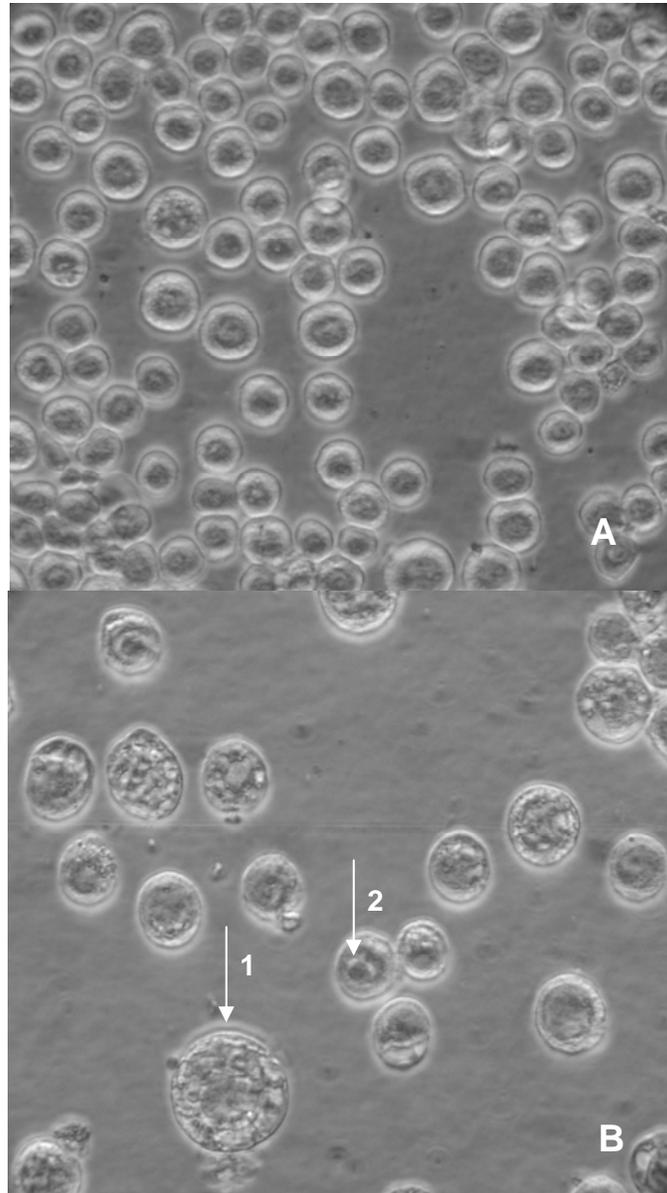


FIGURA 2: Microscopia óptica de células *Spodoptera frugiperda* (IPLB SF21-AE) não infectadas (A) e após 48 h de infecção com baculovírus recombinante v-rolA (B)

1. Hipertrofia celular – aumento do tamanho normal da célula; presença de vacúolos.
2. Estroma virogênico - corpo denso no interior do núcleo

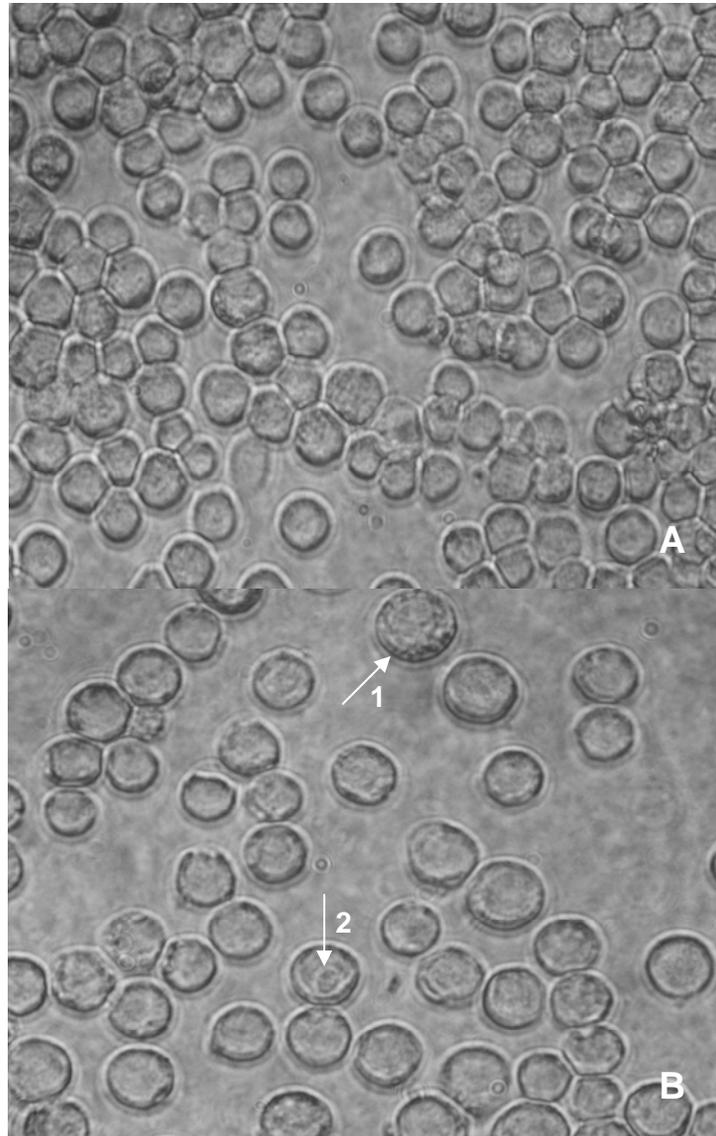


FIGURA 3: Microscopia óptica de células *Spodoptera frugiperda* (Sf9) não infectadas (A) e após 48 h de infecção com baculovírus recombinante v-rolA (B)

1. Hipertrofia celular – aumento do tamanho normal da célula
2. Estroma virogênico - corpo denso no interior do núcleo.

Após a coleta dos *pellets* celulares, foi possível a extração do DNA viral a partir de ciclos de fenol:éter, tendo sua comprovação através da análise do perfil de restrição obtido após clivagem com a enzima *Pst* I. Os perfis apresentados

foram os mesmos (Fig. 4), podendo inferir que houve infecção do vírus recombinante nas diferentes linhagens celulares utilizadas.

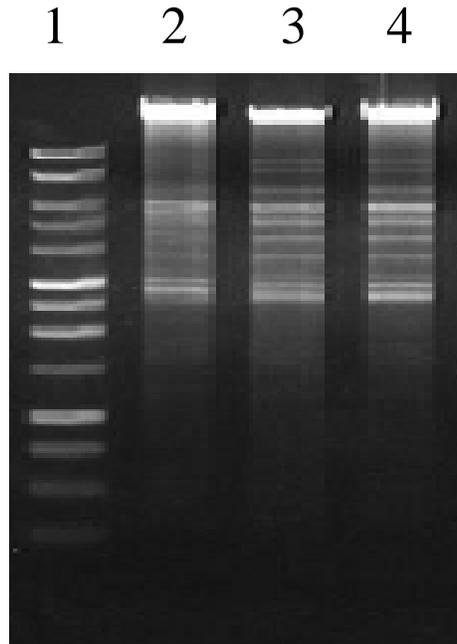


FIGURA 4: Perfil de restrição do DNA do vírus recombinante v-rolA, extraído das células Tn5B1-4, Sf9 e IPLB-SF-21. Análise em gel de agarose 0,8% após digestão com *Pst*I.

1. Marcador 1Kb DNA Ladder
2. DNA v-rolA obtido de células Tn5B1-4.
3. DNA v-rolA obtido de células Sf9.
4. DNA v-rolA obtido de células IPLB-SF-21.

Em seguida foi utilizada a técnica de PCR que permitiu também confirmar a presença do gene *rolA* no DNA viral, multiplicado nas diferentes linhagens. Como observado na Figura 5, houve a amplificação de uma única banda com peso molecular de aproximadamente 300 pb como esperado para o gene *rolA*.

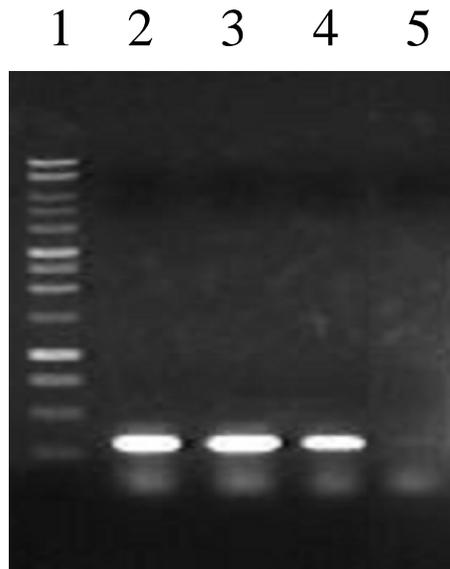


FIGURA 5: Replicação do gene *roIA* em linhagens celulares de inseto. Eletroforese em gel de agarose 1% dos produtos de PCR.

1. Marcador 1Kb DNA Ladder.
2. Células *Trichoplusia ni* (Tn5B1-4).
3. Células *Spodoptera frugiperda* Sf9.
4. Células *Spodoptera frugiperda* IPLB-SF-21
5. Controle negativo.

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

O vírus recombinante v-*roIA*, produzido para expressão da proteína Rol A *Agrobacterium rhizogenes*, mostrou ser capaz de replicar-se eficientemente nos três cultivos celulares. Sinais típicos de infecção com vírus ocluso negativo foram apresentados. Entretanto um número maior de células infectadas foi observado na linhagem *Trichoplusia ni* (Tn5B1-4), seguido das linhagens *Spodoptera frugiperda* IPLB-SF-21 e *Spodoptera frugiperda* Sf9. A análise de restrição, com a enzima *PstI*, do DNA do vírus replicado nas diferentes linhagens mostrou similaridade entre os perfis obtidos. O emprego técnica de PCR permitiu confirmar a presença do gene *roIA* no DNA viral, tendo resultado na amplificação de uma única banda com tamanho previsto para o gene *roIA* (300 pb). Esses dados indicam que os três

sistemas celulares testados são adequados para a multiplicação do vírus v-rolA, sendo que a linhagem Tn5B1-4 apresenta uma maior susceptibilidade ao vírus e deverá ser usada preferencialmente para continuidade dos trabalhos de produção da proteína heteróloga Rol A

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Chilton MD, Drummond MH, Merlo DJ, Sciaky D, Montoya AL, Gordon MP, Nester EW (1977). Stable Incorporation of Plasmid DNA Into Higher Plant Cells: The Molecular Bases of Crown Gall Tumorigenesis. *Cell*, **11**: 263-271

O'Reilly DR, Miller LK & Luckow VA (1992) baculovirus expression vectors – a laboratory manual. W.H. Freeman and Company, New York.

Petit A, David C, Dahl GA, Ellis JG, Guyon P, CasseDelbart F, Tempé J (1983). Further Extension of the Opine Concept: Plasmids in *Agrobacterium rhizogenes* Cooperate for Opine Degradation. *Mol. Gen. Genet.*, **190**: 204-214.

Sihler W, Oliveira MS, Carneiro M & Souza MLS (2002). Expressão do gene *rolA* em sistema baculovirus. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia **38**, Brasília, DF, 26p.

Slightom JL, Durand-Tardif M, Jouanin L, Tepfer D (1986). Nucleotide sequence analysis of TL-DNA of *Agrobacterium rhizogenes* agropine type plasmid. *J. Biol. Chem.*, **261**: 108-121.

Spena A, Schmulling T, Konez C, Schell JS (1987). Independent and synergistic activity of rol A, B and C loci in stimulating abnormal growth in plants. *EMBO J.*, **6**: 3891-3899

Tepfer D (1984). Transformation of several species of higher plants by *Agrobacterium rhizogenes*: sexual transmission of transformed genotype and phenotype. *Cell*, **37**: 959-967.