

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**CLONAGEM E EXPRESSÃO DE FRAGMENTOS DE  
ANTICORPOS (scFv) CONTRA O VÍRUS DA LEUCEMIA  
FELINA (FeLV) POR *PHAGE DISPLAY***

**Andreza Soriano Figueiredo**

**Botucatu – São Paulo – Brasil**

**2010**

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**CLONAGEM E EXPRESSÃO DE FRAGMENTOS DE  
ANTICORPOS (scFv) CONTRA O VÍRUS DA LEUCEMIA  
FELINA (FeLV) POR *PHAGE DISPLAY***

**Andreza Soriano Figueiredo**

Tese apresentada junto ao Programa de  
Pós-Graduação em Medicina Veterinária  
para obtenção do título de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. João Pessoa Araújo  
Júnior

**Botucatu – São Paulo – Brasil**

**2010**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: *ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE*

Figueiredo, Andreza Soriano.

Clonagem e expressão de fragmentos de anticorpos (scFv) contra o vírus da leucemia felina (FeLV) por phage display / Andreza Soriano Figueiredo. - Botucatu, 2011

Tese (doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, 2011

Orientador: João Pessoa Araújo Júnior

Capes: 50502034

1. Doenças transmissíveis em animais. 2. Leucemia - Diagnóstico. 3. Gato.

Palavras-chave: Anticorpos recombinantes; Diagnóstico; p27; Phage display; ScFv; Vírus da leucemia felina.

**ANDREZA SORIANO FIGUEIREDO**  
**CLONAGEM E EXPRESSÃO DE FRAGMENTOS DE ANTICORPOS (SCFV)**  
**CONTRA O VÍRUS DA LEUCEMIA FELINA (FELV) POR *PHAGE DISPLAY***

**Comissão examinadora**

Prof. Dr. João Pessoa Araújo Júnior  
Presidente e Orientador  
Departamento de Microbiologia e Imunologia  
Instituto de Biociências - UNESP-Botucatu

Prof. Dr. Camilo Bulla  
Membro  
Department of Pathobiology and Population Medicine  
College of Veterinary Medicine, Mississippi State University, MS, United States

Prof. Dr. Paulo Eduardo Martins Ribolla  
Membro  
Departamento de Parasitologia  
Instituto de Biociências - UNESP, Botucatu

Prof. Dr. Julio Lopes Sequeira  
Membro  
Departamento de Patologia Veterinária  
FMVZ – UNESP, Botucatu

Prof. Dr. Alexandre Secorum Borges  
Membro  
Departamento de Clínica Veterinária  
FMVZ – UNESP, Botucatu

Data da defesa: 13 de dezembro de 2010.

## **Agradecimentos**

Agradecer foi um ato constante ao longo dos quatro anos de construção dessa tese.

Aos meus pais, Jeannete e Eriberto, e ao meu irmão Lorenzo pelo amor, confiança e apoio incondicionais.

Ao meu orientador João Pessoa. Uma frase não descreve o quanto você é importante para mim, mas obrigada pela oportunidade e pela confiança.

Aos professores do Departamento de Microbiologia e Imunologia – IB: Prof. João Candeias, Profa. Vera L. Mores Rall, Profa. Maria Teresa Peraçoli, Profa. Terue Sadatsume, Prof. Ramon Kaneno, Prof. Silvio de Oliveira, Prof. José Maurício Sforcin que construíram imensamente para meu crescimento.

Ao Prof. Camilo Bulla pela experiência vertiginosa na Mississippi State University e à Sandra Curotto (Titiiii!) pela amizade gostosa e inesperada!

Aos funcionários do Departamento de Microbiologia e Imunologia, especialmente, Sônia, Nice, Luiz e Lula pela ajuda diária.

Especialmente à Sueli Taniwaki (Suelen!) e Taís Fukuta (Pink!) pela contribuição neste trabalho e por compartilharmos as mesmas aflições e glórias do doutorado.

Às amigas sem fim Fernanda Saules, Daiane Garrido, Luciana Facco, Juliana Chagas e Carolina Nascimento.

À Michelle Búfalo, amiga, vou sentir muito a sua falta!

À Ana Paula Masseno, por dividirmos as idéias mais malucas.

À Aline Augusti, a sua Iniciação Científica foi muito importante pra mim.

Aos companheiros de laboratório Flávio Paz (Flívio!), Ricardo Yama (Cuuura!), Marlous Vinícius (Cérebro!), Elaine Uehara, Lidiany Araújo (Titis!), Cristiane Alvez, Marina Mitie, pelo nosso convívio quase familiar.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão de bolsa de doutorado (processo número 07/58262-0).

**Resumo** - FIGUEIREDO, A. S. **Clonagem e expressão de fragmentos de anticorpos (scFv) contra o vírus da leucemia felina (FeLV) por Phage display.** Botucatu, 2010. 98p Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

O vírus da leucemia felina (FeLV) é um retrovírus que infecta principalmente gatos jovens. Em aglomerados de animais, a infecção pelo FeLV é a que mais contribui para a mortalidade. O emprego de técnicas moleculares de detecção viral permitiu avanços no que diz respeito à caracterização da patogenia e resposta à vacinação. Baseando-se nesses novos resultados, o diagnóstico da infecção deve ser realizado, primeiramente, com um teste de triagem de detecção da proteína de capsídeo p27, e, posteriormente, a confirmação com teste de detecção de DNA proviral. O diagnóstico e separação de animais positivos constituem o mecanismo primordial para conter a disseminação do FeLV. Diante disso, é de grande importância facilitar o acesso e baratear o diagnóstico. A construção de um teste de detecção da p27 baseia-se na produção de anticorpos monoclonais. A técnica de hibridomas é menos prática e demanda mais tempo para a obtenção de resultados satisfatórios quando comparada à técnica de *Phage Display*. Esta está em franco desenvolvimento e tem ganhado grande aplicabilidade na medicina veterinária. Empregamos o sistema de *Phage Display* desenvolvido por Krebber e colaboradores (1997). Primeiramente, foi construída uma biblioteca imune em camundongos, em seguida, foram amplificadas as regiões gênicas variáveis das cadeias leve ( $V_L$ ) e pesada ( $V_H$ ) e ligadas com um *Linker* de  $(Gli_4Ser)_4$ . Esses fragmentos geneticamente construídos derivados de anticorpos são denominados de *single chain variable fragment* ou scFv. Os scFvs foram fusionados à pIII e apresentados na superfície de fagos filamentosos. Após três ciclos de seleção e enriquecimento contra a p27 recombinante produzida no laboratório, onze scFvs foram selecionados e caracterizados com relação à constituição nucleotídica e de aminoácidos. Dentre eles, o scFv 9 e scFv 70 foram escolhidos para a subclonagem e expressão em sistema procarioto de produção de proteínas heterólogas. Os scFvs na forma solúvel foram avaliados com relação a capacidade de se ligar à p27. Os scFvs serão empregados para o desenvolvimento de ensaio imunoenzimático para a detecção do FeLV no soro ou plasma de gatos.

**Palavras-chave:** Anticorpos recombinantes; Diagnóstico; p27; Phage display; ScFv; Vírus da leucemia felina

**Abstract** – FIGUEIREDO, A. S. **Cloning and expression of single chain variable fragments (scFv) against feline leukemia virus (FeLV) by Phage display.** Botucatu, 2010. 98p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

The feline leukemia virus (FeLV) is a retrovirus that infects primarily young cats. In animal clusters, FeLV infection is the largest contributor to mortality. The use of molecular techniques for viral detection has allowed advances with regard to the pathogenicity and response to vaccination. Based on these new findings, the diagnosis of infection should be performed first, with a screening test for detection of p27 capsid protein, and subsequently confirmed with testing for proviral DNA. The diagnosis and segregation of positive animals is the primary mechanism to contain the FeLV spread. Therefore, it is of great importance to facilitate access and lower the diagnosis. The construction of a test for p27 detection relies on monoclonal antibody development. The hybridoma technique is less practical and more time consuming to obtain satisfactory results when compared to Phage Display technology. The latter has been improved rapidly and has gained wide application in veterinary medicine. We employed the Phage Display system developed by Krebber et al. (1997). First, an immune library was built in mice and the variable region of the light and the heavy genes were amplified and connected by a linker of (Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>4</sub>. This genetically engineered antibody fragments are called single chain variable fragments or scFv. The scFvs were fused to the pIII protein and displayed on the surface of filamentous phages. After three rounds of selection and enrichment against recombinant p27 (produced in the laboratory), eleven scFvs were selected and characterized with respect to nucleotide and aminoacid composition. Among them, scFv 9 and scFv 70 were chosen for subcloning and expression in prokaryotic system for production of heterologous proteins. The scFvs in soluble forms were evaluated for their binding capacity to p27. The scFvs will be employed to the development of an immunoassay for FeLV detection in serum or plasma cat samples.

**Keywords:** Diagnosis; Feline leukemia virus; p27; Phage display; Recombinant antibody; ScFv

## Lista de figuras

- Figura 1. Esquema da estrutura de um monômero de anticorpo e os fragmentos derivados. (A) IgG, 160 kDa. (B) Fragmento Fab, 50 kDa. (C) Fragmento Fv, 30 kDa. (D) scFv com *linker*, ~28 kDa. .... 15
- Figura 2. Esquema da morfologia de um fago filamentosso apresentando as proteínas estruturais pIII, pVIII, pVII e pIX. .... 16
- Figura 3. Mapa dos sítios de restrição e componentes do fagomídeo pAK100. Este fagomídeo foi desenhado para que o fragmento scFv seja inserido *upstream* ao gene da proteína III do fago M13, possibilitando assim, a expressão da proteína III fusionada. Além disso, possui a origem de replicação para DNA fita dupla Col E1 e de DNA fita simples fl ori. .... 27
- Figura 4. Mapa dos sítios de restrição e componentes do plasmídeo pGS-21a (GenScript Corporation). .... 30
- Figura 5. Mapa dos componentes do vetor de destino pDEST 17 (Life Technologies). 32
- Figura 6. Visualização de gel de agarose 1,5%. (1) Banda de 402 pb para V<sub>L</sub>. (2) Banda de 420 pb para V<sub>H</sub>. (3) Low Mass Ladder (Invitrogen). .... 48
- Figura 7. Visualização de gel de agarose 1,5%. (1) Produto de 820 pb das reação de SOE-PCR. (2) Marcador de tamanho molecular de 100 pb (Norgen). .... 49
- Figura 8. Placa com meio LB sólido contendo Cloranfenicol (25 µl/ml) as colônias de XL-1 Blue transformadas os scFvs ligados aos fagomídeos. .... 50
- Figura 9. Visualização do SDS-PAGE em *Precast Polyacrylamide Gel (12.5%)*. Linha 1: marcador *Prestained SDS-PAGE Standards/ Broad Range* (BIO RAD). Linha 2: amostra colhida após passagem do lisado na *Ni-NTA Agarose* (Qiagen). Linha 3 e 4: amostras colhidas durante as lavagens do sistema. Linha 5: primeira amostra colhida durante eluição. Linhas 6 e 7: segunda e terceira amostras colhidas durante eluição. Seta: indica a banda da p27 recombinante (31,2 kDa). Linhas 8, 9 e 10: quarta, quinta e sexta amostras colhidas durante eluição. .... 51
- Figura 10. Visualização dos sedimentos de (A) Bactéria XL-1 Blue após indução da produção de fagos recombinantes e (B) Sedimento após precipitação dos bacteriófagos recombinantes. .... 52
- Figura 11. Densidade ótica dos 120 fagos recombinantes analisados pelo *Phage-ELISA*. Foram selecionados para posteriores análises aqueles com DO<sub>450nm</sub> acima de 0,3. .... 53
- Figura 12. Alinhamento das sequência de nucleotídeos dos fragmentos de anticorpos compostos pela região variável da cadeia leve (V<sub>L</sub>) e pesada (V<sub>H</sub>) dos scFv 9 e scFv 70. A figura apresenta apenas a comparação entre esses scFvs. Os pontos indicam

nucleotídeos iguais e traços indicam deleções. Além disso, estão destacadas as sequências dos *primers* scFv Foward (caixa vermelha) e scFv Back (caixa rosa); sequência dos scFvs (marca texto cinza); de parte do peptídeo FLAG (caixa azul); primer sítio da SfiI (marca texto amarelo); sítio da NcoI (negrito/sublinhado, início); sítio da EcoRI (negrito/sublinhado, final); e a sequência *Linker* (setas pretas)..... 55

Figura 13.(A) Sequência de aminoácidos deduzidas da sequência de nucleotídeos do scFv 9. (B) Sequência de aminoácidos deduzidas da sequência de nucleotídeos do scFv 70. Em sombra amarela os aminoácidos comuns. Delimitado por setas as *Framework* (FR) e em caixa azul as *Complementarity Determining Regions* da cadeia leve CDR<sub>L</sub> e em caixa lilás as CDR da cadeia pesada (CDR<sub>H</sub>). ..... 56

Figura 14. Visualização de gel SDS-PAGE. Linha 1: *SDS-PAGE Standards/ Broad Range* (BIO RAD<sup>®</sup>). Linha 2: momento 0 h. Linha 2: momento 2 h. Linha 3: momento 3 h. Linha 4: fração solúvel. Linha 5: fração insolúvel. Seta: indicação da banda de 58,69 kDa..... 58

Figura 15. Visualização de gel SDS-PAGE. Linha 1: *SDS-PAGE Standards/ Broad Range* (BIO RAD<sup>®</sup>). Linha 2: momento 0 h. Linha 3: momento 2 h. Linha 4: momento 4 h 30 min. Linha 5: momento 6 h. Linha 6: momento *overnight*. Linha 7: fração solúvel. Linha 8: fração insolúvel. Seta: indicação da banda de 58,2 kDa..... 59

Figura 16. Resultado da análise da p27 recombinante. Seta em branco: local de reatividade para a presença da p27 indica reação positiva. Seta preenchida: local de reatividade para o controle interno do teste. .... 60

Figura 17. Resultado do ensaio de imunoblot. (A) e (B): precipitação positiva para reação antígeno/anticorpo. Antígeno: scFv 9 e 70, respectivamente. Conjugado: anti-FLAG monoclonal. (C) e (D): precipitação positiva para reação antígeno/anticorpo. Antígeno: p27 recombinante. Anticorpo: scFv 9 e 70, respectivamente, solúveis. Conjugado: anti-FLAG monoclonal. (E): controle negativo. .... 61

Figura 18. Resultado do teste de bloqueio da p27 recombinante. Seta: região azulada que demonstra reatividade do controle interno do teste. Não se observou formação de cor na porção esperada de reatividade para a presença da p27..... 62

## Glossário

- ATP – Adenosina trifosfato
- BCA – Ácido bicinconínico
- BSA – Soro albumina bovina
- CDR – *Complementary Determining Regions* (regiões determinantes de complementaridade)
- cDNA – DNA complementar
- C<sub>H</sub> – *Heavy Chain* (cadeia pesada)
- C<sub>L</sub> – *Light Chain* (cadeia leve)
- DNA – Ácido Desoxirribonucléico
- DTT - Ditioneitol
- E. coli* – *Escherichia coli*
- ELISA – enzyme-linked immunosorbent assay (ensaio de imunoabsorvência por ligação enzimática)
- Fab – *antigen binding fragment* (fragmento de ligação com o antígeno)
- FeLV – *Feline leukemia virus* (vírus da leucemia felina)
- FIV – *Feline immunodeficiency virus* (vírus da imunodeficiência felina)
- Fc – *crystallizable fragment* (fragmento cristalizável)
- FR – *Framework* (arcabouço, estrutura da molécula)
- Fv – *variable fragment* (fragmento variável)
- HIV – *Human immunodeficiency virus* (vírus da imunodeficiência humana)
- Ig – Imunoglobulina
- IgG – Imunoglobulina G
- kDa – kilo Dalton
- NE – *Non expression médium* (meio não indutor)
- p27 – proteína de capsídeo viral de 27 kDa
- pb – pares de bases
- PCR – *Polymerase Chain Reaction* (reação da polimerase em cadeia)
- pH – Potencial de Hidrogênio
- RNA – Ácido ribonucléico
- SDS-PAGE - *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*
- SOE-PCR – *splicing by overlap extension*

ssDNA – *single stranded DNA* (DNA fita simples)

scFv – *single chain variable fragment* (fragmento variável de cadeia única)

UFP – Unidades formadoras de placa

$V_H$  – Região variável da cadeia pesada

$V_L$  – Região variável da cadeia leve

### **Símbolos**

$\alpha$  - Alfa

$\kappa$  - Capa

$\lambda$  - Lâmbda

$\mu$  - Mi

## Sumário

I. Introdução e Revisão de literatura .....	1
1. A infecção pelo vírus da leucemia felina (FeLV) .....	1
1.1. Origem do FeLV .....	1
1.2. O vírus da leucemia felina.....	1
1.3. Epidemiologia .....	4
1.4. Patogenia e sinais clínicos.....	6
1.5. Diagnóstico .....	10
2. Produção de anticorpos monoclonais .....	12
2.1. Estrutura e função dos anticorpos .....	12
2.2. Técnica de hibridomas e anticorpos recombinantes.....	14
2.3. Biologia do fago M13 .....	16
2.4. Apresentação de anticorpos monoclonais na superfície de fagos .....	18
II. Objetivos .....	22
III. Materiais e Métodos.....	23
3. Produção dos fragmentos de anticorpo (scFv) .....	23
3.1. Inoculação de antígeno viral em camundongos ( <i>Mus musculus</i> ).....	23
3.3. Reação de transcrição reversa .....	24
3.4. Reação em cadeia pela polimerase (PCR) para obtenção das cadeias variáveis leve (V <sub>L</sub> ) e pesada (V <sub>H</sub> ) de imunoglobulinas de camundongo.....	24
3.5. Reação de junção dos fragmentos da cadeia leve e pesada – “SOE ( <i>splicing by overlap extension</i> ) – PCR.....	25
3.6. Preparação e clonagem dos fragmentos scFv.....	26
3.6.1. Digestão dos fragmentos scFv e do fagomídeo pAK100.....	26
3.6.2. Ligação do scFv ao pAK 100.....	27
3.6.3. Preparação de bactérias competentes .....	27
3.6.3. Transformação química de XL-1 Blue.....	28
3.7. Expressão e seleção ( <i>biopanning</i> ) dos fagos recombinantes .....	29

3.7.1.	Obtenção da proteína de capsídeo p27 .....	29
3.7.2.	Produção da p27 recombinante .....	30
3.7.3.	Propagação do plasmídeo pGS-21a/p27 .....	30
3.7.5.	Reação de clonagem pCR8/GW/TOPO TA.....	31
3.7.6.	Reação de recombinação LR ( <i>LR Recombination</i> ) .....	32
3.7.7.	PCR para verificar presença da sequência da p27 no vetor pDEST 17 .....	33
3.7.8.	Expressão da proteína p27.....	33
3.7.9.	Purificação da p27 .....	34
3.7.10.	Propagação e titulação de fagos .....	36
3.7.10.1.	Propagação do fago auxiliar .....	36
3.7.10.2.	Titulação de fagos.....	37
3.7.11.	Recuperação da biblioteca de fragmentos de anticorpos com a utilização do fago auxiliar M13K07 .....	37
3.7.12.	Seleção dos fagos recombinantes.....	38
3.7.13.	Infecção de <i>E. coli</i> XL-1 Blue com fagos obtidos após <i>biopanning</i> .....	39
3.8.	Propagação de fagos individuais após terceiro <i>biopanning</i> .....	40
3.9.	Seleção de fagos recombinantes de maior afinidade pela p27 (Phage-ELISA)	40
3.9.1	Primeiro teste .....	40
3.9.2.	ELISA de seleção.....	41
3.10.	Obtenção de fragmentos de anticorpos (scFv) solúveis.....	41
3.10.1.	Sequenciamento de nucleotídeos dos scFv selecionados.....	41
3.10.2.	Subclonagem dos scFv em vetor de expressão .....	42
3.10.3.	Indução da expressão do scFv solúvel .....	42
3.10.4.	Purificação dos scFvs solúveis.....	44
3.11.	Avaliação dos fragmentos de anticorpos (scFv) .....	44
3.11.1	Segunda produção e purificação da p27 recombinante.....	45

3.11.2. Análise da p27 recombinante .....	45
3.11.3. Ensaio de Imunoblot .....	46
3.11.4. Teste de bloqueio da p27 pelo scFv .....	46
IV. Resultados.....	48
4. Produção dos fragmentos de anticorpo (scFv) .....	48
4.1. Amplificação das cadeias $V_L$ e $V_H$ e reação de SOE-PCR .....	48
4.2. Preparação e clonagem dos fragmentos scFv.....	49
4.3. Expressão e seleção ( <i>biopanning</i> ) dos fagos recombinantes .....	50
4.3.1. Expressão e purificação da p27 recombinante .....	50
4.3.2. Titulação dos fagos .....	51
4.3.3. Recuperação da biblioteca de fragmentos de anticorpos (scFv) com a utilização do fago auxiliar M13K07 .....	51
4.3.4. ELISA de seleção .....	52
4.4. Sequenciamento de nucleotídeos dos scFv selecionados.....	53
4.5. Indução da expressão do scFv solúvel .....	57
4.6. Segunda produção da p27 recombinante.....	59
4.7. Análise da p27 recombinante .....	60
4.8. Ensaio de Imunoblot.....	61
4.9. Teste de bloqueio da p27 pelos scFvs .....	62
V. Discussão .....	63
VI. Conclusões.....	72
VII. Referências Bibliográficas .....	73
VIII. Trabalho Científico .....	82

## **I. Introdução e Revisão de literatura**

### **1. A infecção pelo vírus da leucemia felina (FeLV)**

#### **1.1. Origem do FeLV**

Em 1964, uma residência na Escócia contendo vários gatos apresentou um aumento na incidência de linfossarcomas sugerindo que algum agente contagioso estivesse causando a doença. Quatro filhotes foram inoculados com células de uma amostra de linfossarcoma e todos desenvolveram sinais da doença, confirmando a presença de um agente infeccioso. Partículas semelhantes a vírus foram identificadas no interior de vesículas após análise dos tecidos afetados. Essas partículas eram muito semelhantes a aquelas observadas em camundongos e galinhas infectados com um agente viral causador de leucemia e então, foram denominadas de vírus da leucemia felina (FeLV) (JARRET et al. 1968).

#### **1.2. O vírus da leucemia felina**

O FeLV pertence à família *Retroviridae*, subfamília *Orthoretrovirinae* e gênero *Gammaretrovirus*. Nesta família também são classificados o vírus da imunodeficiência felina (FIV) e o vírus da imunodeficiência humana (HIV) (ICTVdB Management, 2006). O vírus possui duas cópias idênticas de RNA fita simples, polaridade positiva, de aproximadamente 8 kilobases (Kb) cada. Cada fita de RNA possui a região *cap* na extremidade 5' e a região poli-A na extremidade 3' (Neil, 2008). As fitas de RNA encontram-se altamente condensadas e associadas com múltiplas cópias da Nucleoproteína (p10, NC), formando o núcleo ou *core*. No núcleo também estão presentes algumas proteínas que desempenham funções catalíticas durante a replicação: a Protease (PR), a Transcriptase Reversa (RT) e a Integrase (IN). Esse complexo está

contido em um capsídeo de forma esférica ou cônica, formado pela associação de múltiplas cópias da proteína de Capsídeo (p27, CA). O nucleocapsídeo (*core* + capsídeo) é revestido externamente por uma camada formada por centenas ou milhares de cópias da proteína de Matriz (p15, MA). Essa camada é recoberta por um envelope lipoprotéico, no qual se encontra as duas glicoproteínas virais, a Transmembrana (p15E, TM) e a de Superfície (gp70, SU). A TM é uma proteína integral de membrana e a SU está localizada externamente ao vírion, associada à região externa da TM. As partículas víricas são liberadas das células infectadas ainda imaturas. A maturação ocorre no meio extracelular pela clivagem dos precursores protéicos e rearranjos nas estruturas víricas internas (RAVAZOLLO e COSTA, 2007).

A replicação viral ocorre após a ligação do vírion ao receptor celular específico, internalização e desnudamento. O RNA viral é convertido em DNA fita dupla pela RT que utiliza o RNA transportador da prolina (tRNA<sup>Pro</sup>) como *primer* (MARQUET et al., 1995) e possui atividade ribonuclease H para degradar o RNA viral. Após a translocação nuclear, o DNA é integrado ao genoma hospedeiro pela IN e, então é denominado de provírus (NEIL, 2008).

O RNA genômico é produzido pela transcrição do DNA viral integrado no cromossomo da célula hospedeira, reação que é catalisada pela maquinaria celular de transcrição. O provírus possui sequências envolvidas na expressão gênica e na replicação, localizadas próximas às extremidades: as regiões R (de repetida) e U5 (única na extremidade 5') estão próximas à extremidade 5'; e as sequências R e U3 se localizam próximas à extremidade 3'. O processo de transcrição reversa resulta na duplicação das regiões únicas (U5 e U3), o que faz com que a molécula de DNA resultante, contenha sequências idênticas nas duas extremidades, denominadas de regiões longas terminais (*Long Terminal Repeat*, LTR). Cada LTR apresenta as

seguintes sequências, nesta ordem: U3-R-U5. Na região U3, estão localizadas as principais sequências de ligação para fatores de transcrição, enquanto que o início da região R corresponde ao início da transcrição. A transcrição do provírus só acontece após a integração ao genoma hospedeiro (RAVAZOLLO e COSTA, 2007).

O FeLV é denominado de retrovírus simples por possuir apenas os genes *gag*, *pol* e *env*, diferentemente dos retrovírus complexos que possuem genes adicionais. O RNA genômico funciona como RNA mensageiro (mRNA) para os produtos dos genes *gag* e *pol*. Enquanto que um mRNA subgenômico de, aproximadamente, 3 kb codifica os produtos do gene *env*. A maior parte dos produtos da tradução são terminados na porção 3' da região do gene *gag* para produzir o precursor Pr65gag, que quando clivados pela PR no processo de maturação darão origem às proteínas MA, NC e CA. Outra parcela do mRNA será lido até a porção do gene *pol* através de um códon UAG terminador suprimido para produzir o precursor Pr180gag-pol, que quando clivados pela PR darão origem às proteínas IN, PR e RT. Os produtos do gene *env* são produzidos a partir do precursor Pr80env que será processado por proteases celulares para dar origem às proteínas SU e TM (NEIL, 2008).

O gene *gag* também é expresso de forma abundante por uma via alternativa que utiliza a via de glicosilação da célula hospedeira. A modificação pós-traducional de proteínas pela adição de carboidratos, denominada glicosolação, é um evento importante para diversificação estrutural e funcional de proteínas (Vigerust e Shepherd, 2007). Segundo Viregust e Shepherd, as proteínas virais modificadas são menos reconhecidas por anticorpos. Uma vez que, aproximadamente, metade das proteínas p27 sintetizadas pelas células infectadas é liberada sob a forma glicosilada, este é, provavelmente, um mecanismo de evasão à resposta imune (JARRET, 1999).

A infecção de gatos domésticos pelo FeLV e FIV são denominadas retrovíruses exógenas (externa, “patogênica”), mas a presença de sequências de DNA proviral no genoma do gato, transmitidas pela linhagem germinativa, são denominadas retrovíruses endógenas (herdada, “não patogênica”). São exemplos de retrovíruses endógenas o vírus RD-114, enFeLV e vírus MAC-1 (HARTMANN, 2006).

### 1.3. Epidemiologia

O FeLV ocorre na natureza não como uma espécie viral de um único genoma, mas como um conjunto de variantes intimamente relacionados. A variação genética do FeLV é gerada durante a replicação devido à propensão ao erro da Transcriptase Reversa e por recombinações com sequências virais endógenas. Como consequência dessa variabilidade ocorre uma população viral geneticamente diversa que sofre continuamente pressão seletiva *in vivo* da qual surgem variantes que predominam (OVERBAUGH e BANGHAM, 2001).

Um dos sítios de variabilidade mais importante no genoma do FeLV está na sequência do gene que codifica a glicoproteína de superfície (SU). Foi demonstrado que o acúmulo de mutações durante a infecção determina a alteração de propriedades biológicas virais como reconhecimento e afinidade a receptores, cinética da replicação e/ou o potencial patogênico do variante. Assim, o FeLV é classificado em quatro subgrupos, FeLV-A, B, C e T identificados geneticamente de acordo com diferenças na SU e, funcionalmente, pela utilização de diferentes receptores para entrada na célula hospedeira (OVERBAUGH e BANGHAM, 2001).

Somente o subgrupo A é transmissível entre gatos (JARRET et al., 1984). A proteína de membrana hospedeira utilizada como receptor é a *Feline high-affinity thiamine transporter 1* (feTHTR1) (MENDOZA et al., 2006). Encontrada em tecidos de

absorção como intestino delgado, fígado e rins, e também em células do sistema linfóide. Esta ampla distribuição é consistente com o fato de que o FeLV-A é encontrado nesses diversos tecidos e células (HOOVER ET AL., 1976) e pode explicar a vantagem sobre os outros subgrupos no que diz respeito a transmissibilidade. Esse subgrupo pode causar linfomas, mas geralmente promove alterações patológicas moderadas na ausência de outros subgrupos (MOSER et al.,1998).

O FeLV-B é comumente associado a linfomas (JARRET et al., 1973). Esse variante surge da recombinação entre FeLV-A e sequências retrovirais endógenas e, portanto, compartilha a menor identidade entre sequências (STEWART et al., 1986).

O FeLV-T foi originalmente isolado de um gato com *FeLV induced immunodeficiency (FAIDS)*. Este subgrupo apresenta aproximadamente 96% de similaridade com o subgrupo A e surge a partir de mutações na sequência da SU do FeLV-A (DONAHUE et al., 1991).

O subgrupo C é o mais patogênico, causa anemia aplástica e também surge a partir de mutações na sequência da SU do FeLV-A (HARDY et al., 1976).

De acordo com Hardy e colaboradores (1976), em 100% dos animais infectados foi detectado o FeLV-A. Em 49% detectou-se a coinfeção com o FeLV-B e em 1% com o FeLV-C. Rey (2009) sugere que os eventos de recombinação genética com sequências endógenas no hospedeiro podem produzir um novo subgrupo com maior frequência que o acúmulo de mutações.

Dados de prevalência dos Estados Unidos e Europa demonstraram infecção pelo FeLV variando de 1 a 38% (BRALEY, 1994). No Brasil, a presença do FeLV foi demonstrada por kits comerciais em Minas Gerais variando de 12,6 % (BARBOSA et al., 2001) e 32,5 % (TEIXEIRA et al.,2007) e no Rio de Janeiro, apresentando 17,4% (SOUZA et al., 2002). Um estudo abrangendo maior número de estados, São Paulo,

Minas Gerais, Paraná, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul, Pernambuco, Bahia e Ceará, empregando-se a imunofluorescência, a frequência da infecção foi de 6,2 % (HAGIWARA et al., 2007). Outro estudo abrangente empregando-se a PCR demonstrou 5,3 % de infecção (FIGUEIREDO et al., 2009). Estes dados não permitem uma comparação direta por apresentarem diferentes formas de detecção e avaliação de diferentes grupos de animais.

#### **1.4. Patogenia e sinais clínicos**

O FeLV infecta, primeiramente, linfócitos da orofaringe e é transportado para a medula óssea. Uma vez que as células de rápida divisão da medula óssea são infectadas, os vírions são produzidos em altas concentrações e a viremia é instalada (LUTZ et al., 1983b). As glândulas salivares e o intestino são infectados e o vírus é eliminado pela saliva, urina e fezes (ROJKO et al., 1979). A concentração de vírus na saliva de animais infectados saudáveis é comparável a aquela em animais com sinais da infecção (HARTMANN, 2006).

A disseminação do vírus ocorre de forma vertical e horizontal, sendo esta, principalmente, via saliva pelo contato próximo prolongado durante comportamentos sociais de compartilhamento de vasilhas de água/comida, por lambeduras e durante as brigas (HOOVER et al., 1976; HOOVER e MULLINS, 1991). A susceptibilidade dos animais ao FeLV parece ser dependente da idade, mas o grau de resistência natural permanece desconhecido (HOOVER et al., 1976).

Historicamente, o estudo dos diferentes cursos da infecção desencadeados pelo FeLV eram estudados com base em: (1) viremia por isolamento em cultivo celular (FISCHINGER et al., 1974), (2) antigenemia com detecção de antígeno intracelular por imunofluorescência direta (HARDY et al., 1973) e (3) antigenemia com detecção de

antígeno extracelular por ELISA de captura (proteína de capsídeo p27) (LUTZ et al., 1983). As informações obtidas a partir desses ensaios permitiram estimar que, aproximadamente, 60% de animais adultos jovens expostos ao FeLV não apresentavam antígeno p27 nem vírus infectivo (animais regressores). Em contraste, aproximadamente, 30% dos animais expostos apresentavam antigenemia e viremia persistentes (animais em infecção progressiva) (HARDY et al., 1976; ROJKO et al., 1979, HOOVER e MULLINS, 1991). Entretanto, a ampla utilização desses ensaios permitiu a identificação de resultados conflitantes. Uma proporção de animais que apresentavam sinais clinicopatológicos consistentes com a infecção eram FeLV-negativos (TORRES et al., 2010). Antígeno viral (p27) circulante estava presente em 70% de animais com anemias não regenerativas, 88% em doenças mieloproliferativas (excluindo linfossarcoma), 70% com linfossarcoma e 80% com doenças mielodegenerativas (HARDY, 1981). Adicionando-se relatos de que foi possível reativar a infecção em animais considerados regressores (MADEWELL e JARRETT, 1983), no final da década de 90, tanto a classificação das diferentes patogenias do FeLV e a sensibilidade dos testes empregados foram questionados (TORRES et al., 2010).

Estudos recentes sugeriram que a maioria dos animais permanece infectada ao longo da vida. Os animais reverterem para um status avirêmico em que não são detectados antígeno p27 nem vírus infectivo no sangue, mas o DNA proviral pode ser detectado no sangue por PCR (HOFMANN-LEHMANN et al 2001; TORRES et al 2005). A relevância clínica de animais PCR-positivos p27-negativos não está bem definida. Uma vez que o provírus está integrado ao genoma do gato, não é esperado o *clearence* ao longo do tempo (CATTORI, 2006). Apesar de ser improvável que esses animais disseminem o vírus pela saliva, o DNA proviral pode ser infeccioso via transfusão de sangue (CHEN et al., 1998).

Em conjunto, os dados obtidos a partir das análises de quantificação de DNA proviral, RNA viral, antigenemia (p27) e isolamento viral permitiram a Hofmann-Lehmann e colaboradores (2008) sugerirem a seguinte classificação:

- *Infecção Abortiva*: ausência de DNA proviral, RNA viral, antígeno p27 nem isolamento após exposição.

- *Infecção Regressiva*: níveis moderados de DNA proviral e RNA viral com antigenemia indetectável ou transiente. O DNA proviral é detectável ao longo da infecção, mas o RNA viral pode ou não ser detectado.

- *Infecção Progressiva*: níveis elevados de DNA proviral e RNA viral, antigenemia e isolamento viral constantes.

A *Infecção Latente* apresentou resultados conflitantes: enquanto um grupo encontrou níveis distinguíveis dos outros grupos de DNA proviral (TORRES et al., 2005), outro grupo encontrou níveis equivalentes à categoria de animais com infecção regressiva (HOFMANN-LEHAMNN et al., 2007). Assim, recomenda-se manter a definição anterior de infecção latente sendo a ausência de antigenemia/viremia e persistência de vírus cultivável na medula óssea com potencial de reativação (HOFMANN-LEHMANN et al., 2008).

Recentemente, Helfer-Hungerbuehler e colaboradores (2010) demonstraram a detecção de DNA proviral em todas as amostras colhidas durante 8,5 anos de acompanhamento de um animal experimentalmente infectado com FeLV e FIV. Concomitantemente com o estabelecimento da imunossupressão causada pelo FIV ocorreu a reativação da infecção pelo FeLV e só então foi possível detectar antígeno p27 e os níveis de DNA proviral se elevaram.

As consequências mais comuns da doença em animais com viremia persistente são imunodeficiência, anemia e linfoma. O prognóstico de gatos com viremia

persistente é ruim e a maioria apresenta os sinais clínicos. Destes, 70-90% terão morrido dentro de 18 meses a 3 anos (HARDY et al. 1976). Alguns deles permanecerão saudáveis por anos antes do desenvolvimento das doenças relacionadas ao FeLV e em casos raros permanecerão saudáveis (HOFMANN-LEHMANN et al., 1997). A idade em que os animais são expostos ao FeLV é o fator mais determinante para a evolução da infecção: quanto mais jovens mais susceptíveis são os animais (HOOVER et al., 1976).

Em gatis com coronavírus felino (FCoV) endêmico, FeLV, vírus da imunodeficiência felina (FIV), a infecção por FeLV tem maior contribuição na mortalidade. De 8.642 gatos FeLV-positivos, 15% apresentaram co-infecções (PIF, infecções respiratórias, FIV), 11% apresentaram anemia, 6% linfoma, 5% leucopenia ou trombocitopenia e 4% com leucemia ou doença mieloproliferativa (HARTMANN, 2006).

#### 1.4.1. Imunodeficiência

A imunodeficiência das infecções pelo FeLV são mais complexas e severas do que aquela causada pelo FIV. Atrofia tímica, linfopenia, neutropenia, anormalidades funcionais de neutrófilos, perda de células CD4+ e, mais importante, perda de células CD8+ tem sido relatado (HOOVER et al., 1976). Apresentando ou não sinais clínicos, todo animal positivo com viremia persistente está imunossuprimido, com a resposta imune humoral primária e secundária comprometidas (PERRYMAN et al., 1972). A imunodeficiência pode permitir infecções de agentes em que os gatos seriam naturalmente resistentes como espécies de *Salmonella*, ou mesmo doenças exacerbadas de poxvírus, *Mycoplasma haemofelis* e *Cryptococcus neoformans*. Infecções imperceptíveis em gatos como por *Toxoplasma gondii* podem emergir. Além disso, os animais estão mais predispostos a desenvolver estomatite e rinite crônicas (TENORIO

et al., 1991) e outros achados clínicos como abscessos subcutâneos podem demorar mais tempo para serem resolvidos (LUTZ et al., 2009).

#### 1.4.2. Anemia

Podem ocorrer diferentes tipos de anemia em animais FeLV-positivos, dentre elas ocorre, principalmente, as não regenerativas. O FeLV-C pode interferir com a proteína de transporte do grupo heme de hemácias o que diretamente resulta em anemia não regenerativa (QUIGLEY et al., 2000). Outras citopenias podem ocorrer como trombocitopenia e neutropenia, provavelmente devido a mecanismos imunomediados ou mielossupressão (LUTZ et al., 2009).

#### 1.4.3. Neoplasias

São encontrados normalmente linfomas e leucemia, mas outras neoplasias malignas de origem não hematopoiética também são encontradas. Os linfomas são classificados de acordo com a localização anatômica em tímico ou mediastínico; forma alimentar; multicêntrico ou periférico e atípico ou extranodal (REINACHER et al., 1987). Diferentes tipos de leucemias agudas têm sido descritas e classificadas de acordo com o tipo celular afetado (LUTZ et al., 2009).

### **1.5. Diagnóstico**

Produzida em abundância pelas células infectadas, a p27 constitui uma importante ferramenta para o diagnóstico do FeLV. O ELISA para p27 demonstra a infecção, mas nem sempre a viremia, pois o teste pode detectar a p27 solúvel, separada do vírion. Este procedimento tem a vantagem da alta sensibilidade e especificidade (LUTZ et al., 2009), mas, aproximadamente 10% dos animais positivos por PCR são negativos por ELISA, devido ao fato de não serem antigenêmicos (HOFMANN-LEHMANN et al., 2007). Por outro lado, a especificidade relativa do teste chega a 100% já que nenhuma

amostra ELISA-positiva é PCR negativa (HARTMANN et al., 2001). Em animais experimentalmente infectados o teste demonstrou positividade 28 dias após exposição (JARRETT et al., 1982).

A imunocromatografia, que também detecta p27 circulante, tem especificidade e sensibilidade semelhantes ao ELISA (HARTMANN et al., 2007).

Também é possível detectar a infecção pela imunofluorescência (IFA). Ela é baseada na observação de que em animais virêmicos os granulócitos, linfócitos e plaquetas contêm componentes do gene *gag* que podem ser detectados por anticorpos específicos em esfregaço sanguíneo. Não é recomendado como teste de triagem por não detectar animais nas primeiras semanas após infecção, além disso, não é prático para rotina de diagnóstico por exigir microscopia especial e pessoal de alta qualificação (HARTMANN, 2006).

O isolamento viral foi o teste originalmente desenvolvido para identificação de gatos infectados. Uma vez que ele detecta vírus infectivos, o isolamento em cultivo celular é considerado teste definitivo. Não é praticável na rotina de diagnóstico pela complexidade de sua realização (LUTZ et al., 2009).

De acordo com a *American Association of Feline Practitioners* (LEVY et al., 2008) e o *European Advisor Board on Cat Diseases* (ABCD) (LUTZ et al., 2009), o diagnóstico de FeLV na prática veterinária deve ser realizado com teste de triagem pela detecção de antígeno por ELISA ou imunocromatografia. Como as consequências de um resultado positivo são significativas, testes confirmatórios são recomendados, preferencialmente por PCR (detecção DNA proviral).

No Brasil, o teste realizado nas clínicas é o SNAP Feline Triple Test (IDEXX Laboratories) que detecta p27 circulante. O material é importado, custando em torno de R\$80,00 por amostra. O Laboratório de Diagnóstico Molecular (LDM) sob supervisão

do Prof. Dr. João Pessoa Araújo Júnior (Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biociências de Botucatu, UNESP-Botucatu, São Paulo) presta serviço de diagnóstico para a infecção do FeLV pela técnica de PCR. Em estudo recente, foi demonstrada uma frequência de 5,3% da infecção em um total de 319 amostras de sangue provenientes de clínicas de diversos estados do país, de 2003 a 2009 (FIGUEIREDO et al., 2009). Apesar do crescimento e barateamento ocorridos nos últimos anos, faz-se necessária uma maior conscientização e adesão ao diagnóstico laboratorial da infecção. A maior dificuldade parece ser o preço dos testes.

## **2. Produção de anticorpos monoclonais**

### **2.1. Estrutura e função dos anticorpos**

Os anticorpos são moléculas glicoprotéicas com tamanho aproximado de 160 quilodaltons (kDa), originárias das células B, que circulam através do sangue e da linfa. Também chamadas de imunoglobulinas (Ig), estas são responsáveis pela notável capacidade de detectar, localizar, reconhecer, ligar-se e inativar ou dar início ao processo de eliminação de um antígeno. Cada clone de anticorpo possui uma estrutura única que lhe permite ligar-se especificamente ao seu antígeno correspondente (SILVERTON et al., 1977).

Todas as imunoglobulinas têm uma estrutura similar que consiste em dois pares de subunidades polipeptídicas. Há duas cadeias pesadas idênticas e duas cadeias leves idênticas. Cada cadeia leve é ligada covalentemente a uma cadeia pesada por uma ponte dissulfeto e, as duas cadeias pesadas, ligadas às cadeias leves, são unidas covalentemente também por pontes dissulfeto. Na porção amino-terminal (N-terminal) das cadeias leve e pesada localizam-se as regiões variáveis denominadas de variável leve ( $V_L$ ) e variável pesada ( $V_H$ ), respectivamente, e na carboxi-terminal (C-terminal),

localizam-se as regiões constantes (C). A especificidade da imunoglobulina é determinada pela sequência de aminoácidos das regiões variáveis das cadeias leve e pesada. A cadeia leve possui uma única região constante ( $C_L$ ) e a cadeia pesada possui 3 ou 4 regiões constantes, dependendo da classe da imunoglobulina, denominados CH1, CH2, CH3 e CH4. As regiões  $V_H$  e  $V_L$  formam o fragmento variável (Fv) e as regiões constantes CH2 e CH3 (e CH4 quando houver) constituem o fragmento cristalizável (Fc), capaz de interagir e recrutar outras moléculas efetoras e células do sistema imune. As regiões  $V_H/CH1$  e  $V_L/C_L$  são denominadas de fragmento de ligação ao antígeno (Fab) (TIZARD, 1998).

As regiões mais importantes para a ligação ao antígeno são denominadas de região determinantes de complementariedade (*Complementarity Determining Region* – CDR). Essas regiões são caracterizadas por serem ilhas hipervariáveis em um arcabouço relativamente conservado (*Framework* – FR). Existem três CDRs em cada cadeia (CDR1, CDR2 e CDR3), sendo a terceira a que possui maior variabilidade e é considerada a mais importante para a determinação da especificidade ao antígeno (ABBAS et al., 2003).

Os genes que codificam as cadeias leve e pesada são organizadas em segmentos gênicos, que sofrem rearranjo durante a fase antígeno-independente do desenvolvimento das células B. Cerca de  $10^3$  cadeias leves diferentes e por volta de  $10^4$  cadeias pesadas diferentes podem ser formadas. Tendo em vista que cada uma é formada independentemente da outra, por volta  $10^7$  tipos de imunoglobulinas podem ser criados. Cada célula B produz apenas um dos  $10^7$  tipos de anticorpos possíveis (GILBERT, 2006).

## 2.2. Técnica de hibridomas e anticorpos recombinantes

Em 1975, os médicos imunologistas Georges Jean Franz Köhler e César Milstein provaram que da fusão de células tumorais adaptadas para sobreviver e se multiplicar *in vitro* com linfócitos provenientes de animais imunizados, originavam-se os hibridomas produtores de anticorpos monoclonais. Esta descoberta lhes valeu o prêmio Nobel de medicina de 1984, pelo desenvolvimento da tecnologia de hibridomas e dos princípios da produção de anticorpos monoclonais (VELIZ, 2002).

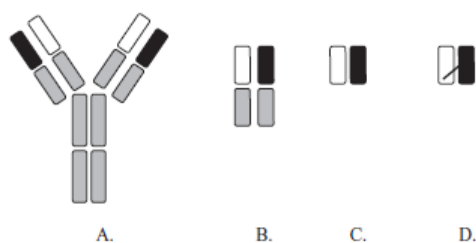
A gama de especificidade, aliada à versatilidade de construção e configuração do sítio ligante ao antígeno, faz dos anticorpos um excelente modelo de estudos de interação molecular e uma matéria-prima para gerar imunoderivados com ação farmacológica, diagnóstico e como marcadores moleculares (FILPULA, 2007; MARASCO e SUI, 2007). Os primeiros testes de ELISA para o diagnóstico da infecção do FeLV envolveram a construção de anticorpos monoclonais pela técnica de hibridomas para detecção de p27 circulante (LUTZ et al., 1983).

As aplicações de anticorpos com especificidade conhecida e disponibilidade ilimitada foram imensas. Entretanto, a aplicação de anticorpos como agente terapêutico em humanos foi impossibilitada. Derivados de camundongos, o uso em seres humanos gerava uma resposta de anticorpos contra os anticorpos monoclonais, denominada resposta HAMA (*Human Anti-mouse Antibody*). O desenvolvimento de anticorpos pelo hospedeiro, gerando resposta imune contra as imunoglobulinas administradas, culminava na neutralização destas ou forte reação imune (SCHROFF et al., 1985).

Assim, as metodologias e estratégias para produção de anticorpos passaram por processos de evolução, incorporando a manipulação genética. As flexibilidades na manipulação genética de sua base peptídica e o acúmulo de informações sobre estrutura

e função fizeram das imunoglobulinas um produto de alto valor econômico (FILPULA, 2007; MARASCO e SUI, 2007).

Os avanços em biologia molecular permitiram o uso de bactérias *Escherichia coli* para a produção de anticorpos recombinantes. Restringindo-se o tamanho para um fragmento Fab, um Fv ou um fragmento único de cadeias variáveis (*single chain variable fragment* - scFv) (Figura 1), estes puderam não somente serem expressos em *E. coli*, mas serem apresentados na superfície de vírus que infectam bactérias (bacteriófagos) pela fusão com proteínas virais. O conceito da apresentação em fagos (*Phage Display*) foi introduzido inicialmente por Smith em 1985, quando fragmentos da sequência da endonuclease EcoRI, apresentados como peptídeos fusionados (fenótipo) ao gene da proteína 3 (pIII) do bacteriófago, foram codificados pela molécula de DNA (genótipo) encapsulada pela partícula viral. A ligação entre genótipo e o fenótipo é o aspecto fundamental da apresentação em fagos (CARMEN & JERMUTUS, 2002).



(Carmen & Jermutus, 2002)

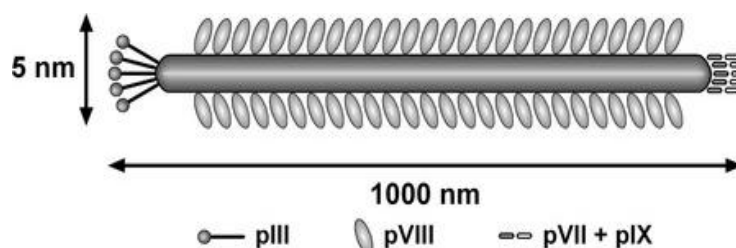
Figura 1. Esquema da estrutura de um monômero de anticorpo e os fragmentos derivados. (A) IgG, 160 kDa. (B) Fragmento Fab, 50 kDa. (C) Fragmento Fv, 30 kDa. (D) scFv com *linker*, ~28 kDa.

Um das maiores vantagens do *Phage Display* em comparação com a técnica de hibridomas é a geração de fragmentos (scFv/Fab) específicos para um determinado antígeno em algumas semanas. O ponto inicial é, geralmente, a obtenção de uma biblioteca de anticorpos, que pode ser de animais *naive* (não imunizados) ou imunizados. Com alguns ciclos de seleção a população é enriquecida para uma alta

porcentagem de fragmentos específicos para o antígeno alvo (CARMEN e JERMUTUS, 2002).

### 2.3. Biologia do fago M13

Os fagos filamentosos (M13, f1, fd, entre outros) pertencem à família *Inoviridae*, gênero *Inovirus* de bacteriófagos e possuem como material genético um DNA fita simples (ssDNA). As partículas virais são compostas por 5 proteínas estruturais (Figura 2). O tubo oco que envolve o material genético é composto por centenas de cópias da proteína pVIII, formando um corpo cilíndrico e flexível (OVERMAN e THOMAS Jr., 2008). Em uma das extremidades encontram-se cinco cópias de cada pIII e pIV, envolvidas na ligação ao hospedeiro e no acabamento da montagem viral. Na outra extremidade encontram-se cinco cópias de cada pVII e pIX, envolvidas na iniciação da montagem e na manutenção da estabilidade da partícula (RODI & MAKOWSKI, 1999).



(Krumpe & Mori, Toshiyuki, 2006)

Figura 2. Esquema da morfologia de um fago filamentoso apresentando as proteínas estruturais pIII, pVIII, pVII e pIX.

A infecção viral ocorre via pilus sexual de células bacterianas gram-negativas que apresentam o gene desta fímbria especial codificado pelo plasmídeo F. Os fagos podem infectar bactérias sem o pilus, mas o processo é extremamente ineficiente (RUSSEL et al., 2004).

As proteínas mais empregadas para o *Phage Display* são as pVIII e pIII. Na pVIII costuma-se inserir a sequência externa na porção N-terminal. Infelizmente, somente peptídeos curtos (6 a 8 resíduos) podem ser apresentados em cada unidade da pVIII, pois peptídeos longos impedem a montagem das partículas, provavelmente, pela limitação de tamanho (RUSSEL et al., 2004). Proteínas de fusão longas são bem toleradas pela pIII, no entanto, em um formato multivalente em que todas as 5 unidades da pIII são fusionadas, isso pode causar uma perda de infectividade por impedimento estérico. Este problema pode ser resolvido pelo uso de fagomídeos. Fagomídeos são plasmídeos que codificam, entre outras, a proteína de capsídeo viral (pIII) e uma sequência de resistência a antibiótico. O fragmento de anticorpo é clonado *upstream* à sequência da pIII e a expressão é controlada com o uso de um promotor (como o lacZ). O fagomídeo não é capaz de produzir partículas virais completas, sendo necessário um fago auxiliar (*Helper Phage*) como o M13K07 ou VCSM13. O fago auxiliar disponibiliza os genes para a codificação de proteínas essenciais para a replicação e montagem virais, incluindo a cópia nativa da pIII (CARMEN & JERMUTUS, 2002). Dessa forma, as partículas virais formadas possuem tanto proteínas pIII nativas quanto recombinantes (formato monovalente), garantindo a infectividade e apresentação das proteínas recombinantes. A expressão das proteínas segue uma distribuição de Poisson em que 10% ou menos das partículas virais vão apresentar uma cópia da proteína recombinante, uma porcentagem bem menor das partículas vão apresentar duas cópias e a maioria das partículas não apresentarão a proteína recombinante (RUSSEL et al., 2004).

#### 2.4. Apresentação de anticorpos monoclonais na superfície de fagos

Para a geração de uma biblioteca imunológica de anticorpos ampla e altamente específica, animais “doadores” podem ser imunizados com um determinado antígeno. Os genes responsáveis pela codificação de anticorpos podem ser amplificados e clonados, sendo mais expressos após exposição inicial ao agente inoculado. Os fragmentos funcionais que são produzidos por este método são numerosos, podem ser especificamente selecionados e tem uma grande vantagem, pois foram sujeitos a uma maturação *in vivo* no sistema imune do hospedeiro. Além disso, a partir de uma biblioteca imunológica pode-se isolar vários anticorpos específicos para um mesmo imunógeno (BENHAR, 2001). Bibliotecas imunológica já foram obtidas de camundongos (KREBBER et al.,1997), homem (BARBAS et al., 1993), coelho (LANG et al., 1996), carneiro (LI et al., 2000) e aves (CAETANO, 2009). A imunização, entretanto, não é sempre possível devido a considerações éticas, possíveis efeitos tóxicos ou falta de imunogenicidade do antígeno. Conseqüentemente, bibliotecas não imunes foram desenvolvidas (BENHAR, 2001).

A construção dessas bibliotecas envolve técnicas de biologia molecular simples como transcrição reversa de RNA mensageiros (mRNA), reação em cadeia pela polimerase (PCR) com *primers* específicos para amplificar segmentos dos genes das cadeias leve ( $V_L$ ) e pesada ( $V_H$ ) a partir de DNA complementar (cDNA), seguido de clonagem com enzimas de restrição para incorporar os segmentos rearranjados de anticorpos em um vetor de apresentação apropriado. Finalmente, os vetores são inseridos em *E. coli* para gerar o repertório de anticorpos (CARMEN e JERMUTUS, 1999).

Nas bibliotecas construídas em fagos filamentosos, a seleção de formas com maior ou menor afinidade, por um ligante alvo é feita misturando-se fagos de fusão,

produzidos e liberados para o sobrenadante de cultura de células infectadas, com a molécula reconhecida pelo peptídeo fixo em um suporte. Durante os procedimentos de lavagem, os fagos capazes de reconhecer o ligante com o qual a placa foi sensibilizada, são retidos. Os fagos selecionados podem ser obtidos através de condições de eluição que desfavoreçam a ligação desses com a molécula presa ao suporte, e após a sua amplificação por meio de infecção em *E. coli*, os fagos selecionados podem ser utilizados em novos ciclos de seleção. A cada procedimento de seleção, formas mais afins do peptídeo exógeno são obtidas, ocorrendo o processo de maturação da afinidade (LOWMAN e WELLS, 1993).

Algumas dificuldades e limitações já foram encontradas nessa técnica. Podem ocorrer fagos expressando cadeias polipeptídicas alteradas não tóxicas às bactérias (KREBBER et al., 1997). Outros relatam problemas de crescimento celular nas culturas que expressam a proteína de fusão, o que poderia ocasionar uma relativa tendenciosidade da biblioteca, que passaria a expressar, preferencialmente, as formas mais toleradas pela bactéria (KREBBER et al., 1997; KENAN et al., 1994). Destaca-se também a ocorrência de mutações que podem dificultar a replicação viral e outras alterações no ciclo biológico do fago (RODI & MAKOWSKI, 1999) e problemas para a produção de proteína na forma solúvel (CAETANO, 2009).

Apesar das dificuldades, a técnica de apresentação de anticorpos ou outros polipeptídeos na superfície de fagos é utilizada tanto na área médica humana, por exemplo, para a produção de anticorpos com aplicação terapêutica (MARQUES, 2005) quanto na área médica veterinária, por exemplo, na produção de anticorpos com fins de diagnóstico como na infecção por *Babesia gibsoni* por esfregaços de sangue (HIROSE et al., 2009) e do vírus da imunodeficiência bovina (BIV) por ELISA (BATHIA et al.,

2010) como também para neutralização da infecção do vírus de Newcastle independente do sistema imune (OSAWA et al., 2005), entre outras.

O sucesso desses trabalhos envolveu não somente a utilização de diferentes sistemas que se adequassem mais a cada caso, mas também o aperfeiçoamento de sistemas já existentes. Em 1997, Krebber e colaboradores apresentaram um sistema de apresentação de fragmentos de anticorpos do tipo scFv, em fagos filamentosos, com características que permitiam a clonagem fidedigna dos genes de interesse em um sistema de expressão de alta qualidade. Entre as vantagens do sistema, destacam-se a construção de um conjunto de *primers* para abranger todos os tipos de cadeias de genes de camundongos, os da variável leve lambda ( $\lambda$ ) e kappa ( $\kappa$ ) e da variável pesada. A utilização de uma única enzima para clonagem direcional (SfiI), cujo sítio de restrição é raramente encontrado nas sequências que codificam anticorpos. O uso do Cloranfenicol como antibiótico de seleção, já que este demonstrou maior exstringência em relação à Ampicilina, e não promove redução do crescimento bacteriano quando comparado à Canamicina ou Tetraciclina. A utilização de diferentes vetores para as etapas de clonagem (pAK 100) e expressão (pAK 400) permitiram o uso de diferentes características em cada um para obter vantagens em cada momento do experimento. Além disso, o sistema pode ser aplicado para a obtenção de bibliotecas a partir da imunização de camundongos e também a partir de hibridomas.

Em 2003, Deng e colaboradores confirmaram as características vantajosas do sistema descrito acima para a produção de scFvs direcionados à toxina B de *Clostridium difficile* e seu emprego na detecção rápida da presença da toxina.

A infecção pelo vírus da leucemia felina (FeLV) constitui uma das mais importantes e estudadas doenças virais dos gatos domésticos. A mortalidade de animais persistentemente virêmicos em aglomerados de gatos é aproximadamente 50% em 2

anos e 80% em 3 anos (LEVY, 2000). O teste para infecção do FeLV e, conseqüente separação de gatos positivos, é a principal forma de prevenir a disseminação da infecção. De todos os testes comercialmente disponíveis para a detecção da proteína de capsídeo p27, SNAP Feline Triple Test (IDEXX, USA), Duo Speed (Bio Veto Test, França), Fastest (MegaCor, Alemanha), Witness (Synbiotic, USA), Virachek FeLV (Synbiotics, USA), Mapic FeLV (Biotech, USA) e One-Step (EVL, Holanda), somente o primeiro pode ser encontrado no país atualmente. Além deste teste, existe o acesso apenas ao diagnóstico molecular, que, além de ter custo considerado elevado existe um número reduzido de laboratórios que o disponibilizam.

Em contrapartida, ficou claro com as novas descobertas a respeito da patogenia da infecção que o diagnóstico deve ser realizado por um exame de triagem pela detecção da p27 seguido da confirmação pelo PCR dirigido para o DNA proviral (LEVY et al., 2008; LUTZ et al., 2009). Mais do que um teste diagnóstico, a detecção da p27 pode indicar a fase da infecção e o prognóstico.

O teste de *Enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) possui características desejáveis para a detecção de antígenos como a p27. Podemos citar a alta sensibilidade em detectar o analito, a relativa facilidade e possível automação do procedimento, além de não ser necessário o contato com materiais radioativos ou tóxicos (LUTZ et al., 1980). O desenvolvimento de um ELISA envolve a produção de anticorpos monoclonais, para isso a construção de uma biblioteca imune aliada à técnica de *Phage Display* é uma das melhores opções, de acordo com as vantagens descritas anteriormente.

## **II. Objetivos**

**2.1.** Produzir e selecionar fagos recombinantes expressando fragmentos de anticorpos (scFv) contra a proteína de capsídeo p27 do vírus da leucemia felina

**2.2.** Clonar, expressar e verificar a especificidade dos scFvs sob a forma solúvel em sistema procarioto

### III. Materiais e Métodos

Este projeto está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal e foi aprovado pela Câmara de Ética em Experimentação Animal, protocolo nº174/2007 – CEEA.

#### 3. Produção dos fragmentos de anticorpo (scFv)

##### 3.1. Inoculação de antígeno viral em camundongos (*Mus musculus*)

Para a obtenção de resposta imune contra o antígeno viral (FeLV), um camundongo *High Responder* de Biozzi, linhagem IV-A, foi inoculado conforme o esquema de imunização descrito por Barret (1994) com a vacina Fel-O-Vax LvK Feline Leukemia Vaccine (Fort Dodge).

Três dias após a última inoculação, o animal foi anestesiado com Quetamina 44mg/kg por via intramuscular e submetido à eutanásia por realização de sangria total por punção cardíaca. O baço foi dividido em três partes e imediatamente processado para extração de RNA total. Preservação do RNA, os fragmentos de baço não utilizados para a extração foram armazenados em *RNA Safe Reagent – RNA Stabilizater* (Omega BIO-tek) a -80°C de acordo com as recomendações do fabricante.

##### 3.2. Extração de RNA

Um terço do fragmento de baço foi utilizado para extração com *Kit Illustra RNAspin Mini* (GE Healthcare) de acordo com as recomendações do fabricante. Em seguida foi realizada a quantificação de RNA por espectrofotometria com o aparelho NanoDrop 1000 (Thermo Scientific).

### 3.3. Reação de transcrição reversa

As amostras de RNA foram submetidas ao tratamento com a *RQ1 RNase-Free DNase* (Promega), segundo recomendações do fabricante. O cDNA foi obtido com o emprego do *kit High Capacity cDNA Archive* (Life Technologies), em que se aplicou 1,0 µg de RNA por 20 µl de reação. Como iniciador da reação de transcrição reversa foi utilizado o *Random Primer* (Life Technologies) (hexâmeros ao acaso) na concentração de 250 ng/20 µl.

### 3.4. Reação em cadeia pela polimerase (PCR) para obtenção das cadeias variáveis leve ( $V_L$ ) e pesada ( $V_H$ ) de imunoglobulinas de camundongo

A partir do cDNA produzido foram preparadas duas reações de PCR para amplificação das  $V_L$  e  $V_H$ , separadamente, utilizando os mesmos *primers* descritos por Krebber e colaboradores (1997). Estes foram diluídos para uma concentração de 100 pmol/µl (solução mãe), e em seguida feita a mistura dos *primers*, segundo a descrição do autor, para uma concentração final de 10 pmol/µl (solução de uso). Para facilitar a compreensão, consideramos o pool de *primers*  $V_H$  *reverse* como sendo o  $V_H$  *reverse*, o pool de *primers*  $V_H$  *foward* como o *primer*  $V_H$  *forward*, a mesma consideração deve ser feita com os *primers* da cadeia leve ( $V_L$ ).

As reações foram preparadas para um volume total de 50 µL, os quais continham 25 µL de *GoTaq Green Master Mix* (Promega), 5 µL de *primer*  $V_L$ , 5 µL de *primer*  $V_H$ , 5 µL de água livre de nucleases (Promega) e 10 µL do cDNA. As condições das reações empregadas seguiram protocolo utilizado por Deng e colaboradores (2003) com modificações: desnaturação a 92 °C / 5 minutos, seguidos de 7 ciclos de 92 °C / 60 segundos, 63 °C / 30 segundos e 58 °C / 50 segundos e 72°C / 60 segundos. Uma segunda etapa foi realizada da seguinte forma: 23 ciclos de 92 °C / 30 segundos e 63 °C

/ 30 segundos e 72 °C / 60 segundos. Um ciclo de 72 °C / 5 minutos para extensão final. Os produtos obtidos na amplificação foram analisados em gel de agarose 1,5 %, corado com *SYBR Safe* (Life Technologies).

Após visualização dos produtos de amplificação estes foram purificados com o *kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega) em gel de agarose 0,8 % e então quantificados de forma comparativa de intensidade de bandas com o padrão *Low DNA Mass Ladder* (Life Technologies), também por eletroforese.

### **3.5. Reação de junção dos fragmentos da cadeia leve e pesada – “SOE (*splicing by overlap extension*) – PCR**

As reações de SOE-PCR foram realizadas da seguinte forma: a 30 ng de cada fragmento de V<sub>L</sub> e V<sub>H</sub> foram adicionados 2,5 unidades de Platinum Taq DNA polimerase (Life Technologies), 5 µl de tampão de PCR 10X contendo 200mM de Tris-HCl (pH8,4) 500 mM de KCl, 1,5 µl de MgCl<sub>2</sub> (50 mM) e água livre de nucleases (Promega) q.s.p. 50 µl.

As condições do termociclador foram seguidas de acordo com Deng e colaboradores (2003), com modificações: 94 °C/ 5 minutos, seguida de 5 ciclos com 94°C/ 30 segundos, 63 °C/ 30 segundos e 72 °C/ 3 minutos. Foi realizada então uma pausa na reação para a adição de 0,5 µl de *primer Sc forward* (GGA ATT CGG CCC CCG AG) (20 pmol/ µl) e *Sc back* (TTA CTC GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCG GAC TAC AAA G) (20 pmol/ µl). Após a adição dos *primers*, foram realizados os seguintes ciclos: 94 °C/ 30 segundos, 63 °C/ 1 minuto e 72 °C/ 3 minutos, com extensão final de 72 °C/ 7 minutos.

Após visualização dos produtos por eletroforese, nas mesmas condições descritas no item 3.1.4 e purificados utilizando o *kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega).

### **3.6. Preparação e clonagem dos fragmentos scFv**

#### **3.6.1. Digestão dos fragmentos scFv e do fagomídeo pAK100**

Os produtos da reação de SOE-PCR purificados foram submetidos à reação de digestão com a enzima de restrição *Sfi* I (Fermentas): para cada 1 µg de DNA uma unidade da enzima foi adicionada em tampão 10X Buffer G com BSA e água livre de nucleases (Promega) para um volume final ajustado de acordo com a necessidade. Seguiu-se a uma incubação em termociclador por 4 h a uma temperatura de 50°C.

O fagomídeo pAK100<sup>1</sup> (Figura 3), purificado, foi obtido após propagação em bactérias competentes descrita por Batista (2008). A digestão do fagomídeo seguiu mesmo protocolo descrito acima.

Os fragmentos digeridos foram visualizados por eletroforese nas mesmas condições descritas no item 3.1.4 e purificados utilizando o *kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega).

---

<sup>1</sup> Gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Andreas Plückthun, Universidade de Zurique

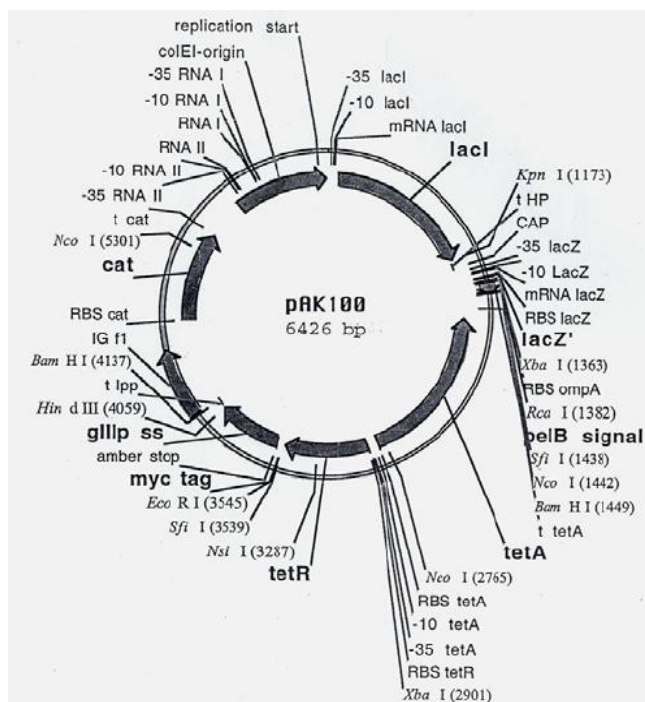


Figura 3. Mapa dos sítios de restrição e componentes do fagomídeo pAK100. Este fagomídeo foi desenhado para que o fragmento scFv seja inserido *upstream* ao gene da proteína III do fago M13, possibilitando assim, a expressão da proteína III fusionada. Além disso, possui a origem de replicação para DNA fita dupla Col E1 e de DNA fita simples fl ori.

### 3.6.2. Ligação do scFv ao pAK 100

Foi escolhida uma proporção 1:3 da relação vetor/inserto. A quantidade de fagomídeo adicionada foi 300 ng. Além disso, a reação continha tampão 10X contendo 300 mM de Tris-HCl pH7,8, 100 mM de MgCl<sub>2</sub>, 100 mM de DTT, e 10 mM de ATP; *T4 DNA Ligase* (Promega) e água livre de nucleases q.s.p. 15 µl. As reações foram submetidas à incubação *overnight* a 16 °C.

### 3.6.3. Preparação de bactérias competentes

Bactérias *E. coli* XL-1 Blue (Stratagene) foram utilizadas por serem supressoras, ou seja, não reconhecem o códon âmbar presente no fagomídeo pAK100. Desta forma, a expressão do scFv ocorre somente como proteína de fusão na extremidade da proteína III do fago.

Após semeadura em placa foi selecionada uma colônia isolada da bactéria XL-1 Blue com alça de platina estéril e transferida para um tubo de vidro estéril contendo 1 ml de meio SOB (2% Triptona, 0,5% Extrato de Levedura, 0,05% Cloreto de sódio, 1,86% Cloreto de cálcio, sem Magnésio) e então cultivada a 37°C, sob agitação de 150 rpm por 16 horas. Uma alíquota de 2,5 ml foi transferida para 50 ml de meio SOB e incubada a 37°C / 220 rpm até atingir absorvância entre 0,5- 0,6, num comprimento de onda de 600 nm ( $A_{600}$ ). Atingida a absorvância desejada, o frasco foi colocado no gelo e adicionou-se 1 ml de  $MgCl_2$  (1M) gelado, seguido de incubação de 30 minutos. A cultura foi dividida em dois frascos e centrifugada a 4.000 rpm por 15 minutos a 4°C. O sedimento foi ressuspensionado delicadamente em 10 ml de solução RF1 (KCl 0,1 M;  $MnCl_2$  50 mM,  $KC_2H_3O_2$  30mM,  $CaCl_2$  10 mM e 15% Glicerol) filtrada e gelada. Após incubação de 15 minutos em gelo, centrifugou-se a 4.000 rpm/15 minutos a 4°C e novamente, ressuspendeu-se o sedimento delicadamente em soluçãoRF2 (NaMOPS 10 mM, KCl 10 mM,  $CaCl_2$  74 mM, glicerol 15%). As bactérias foram divididas em alíquotas de 100  $\mu$ l, imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C até o momento do uso.

### **3.6.3. Transformação química de XL-1 Blue**

As alíquotas de bactérias competentes armazenadas a -80°C foram deixadas em gelo por 30 min para descongelamento. A cada 100  $\mu$ l de bactérias adicionou-se todo o volume da reação de ligação (descrita no item 3.6.2). Procedeu-se à homogeneização delicada e incubou-se a mistura em gelo por 30 min. Fez-se um choque térmico em banho-maria a, exatos, 42°C por 2,0 min seguidos de 2,0 min no gelo. Adicionou-se 900  $\mu$ l de meio SOC a TA e incubou-se a 37°C sob agitação de 150 rpm por 2 horas. Terminada a incubação, transferiu-se todo o volume de bactérias transformadas para

placas de 530 cm<sup>2</sup> com meio sólido não indutor ou NE (Non-expression medium) que contém o meio 2YT (Tryptona 1,6%, Extrato de Levedura 1,0%, NaCl 0,5%, Ágar bacteriológico 1,0%), glucose 1,0% e cloranfenicol (25 µg/ml) e incubadas a 37°C por 48 horas.

Observado o crescimento, as colônias foram contadas e removidas da superfície das placas utilizando-se 5 ml de meio NE e alça de Drigalski. O *pool* de todas as colônias foi acrescido de glicerol 10% para armazenagem em freezer -80°C.

### **3.6.5. Verificação da presença fagomídeo/scFv**

Após o crescimento das colônias, 10 delas foram selecionadas para a realização de PCR para verificar a presença do fagomídeo/scFv. Os *primers* foram desenhados com base na sequência do pAK100 e direcionados para a amplificação do fragmento scFv (pAK 100 forward: 5'- AGA TAA CGA GGG CAA ATC AT-3' e pAK 100 reverse: 5'- CAT CAG GTC TTC TCA GA- 3'), gerando um produto de, aproximadamente, 820 pb.

## **3.7. Expressão e seleção (*biopanning*) dos fagos recombinantes**

### **3.7.1. Obtenção da proteína de capsídeo p27**

Para a etapa de *biopanning* foi necessário produzir a proteína de capsídeo p27 recombinante. Como o *biopanning* foi realizado no laboratório *Hematopoietic Disorders* chefiado pelo Prof. Dr. Camilo Bulla (*College of Veterinary Medicine, Mississippi State University, United States*) a p27 foi produzida e purificada primeiramente nesse local. Após retorno ao Brasil, fez-se necessária nova produção e purificação, mas empregando outros sistemas e procedimentos, descrito no item 3.11.1. Foram empregados dois tipos de sistemas de expressão. Seguem abaixo as metodologias de cada sistema.

### 3.7.2. Produção da p27 recombinante

O primeiro passo para obtenção da p27 foi inserir a sequência de nucleotídeos que a codifica em plasmídeo de expressão pGS-21a, entre os sítios de clonagem *Bam* HI e *Xho* I, serviço prestado pela empresa GenScript (Piscataway, NJ, USA, [www.genscript.com](http://www.genscript.com)) (Figura 4).

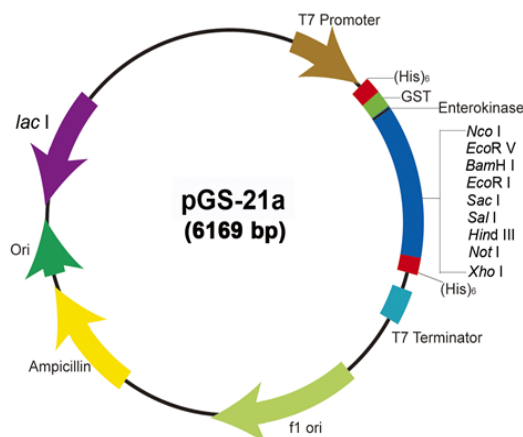


Figura 4. Mapa dos sítios de restrição e componentes do plasmídeo pGS-21a (GenScript Corporation).

### 3.7.3. Propagação do plasmídeo pGS-21a/p27

O plasmídeo de expressão contendo a sequência da p27 foi inserido em bactérias *Subcloning Efficiency DH5α Chemically Competent E. coli* (Life Technologies) seguindo recomendações do fabricante. Após crescimento, uma colônia isolada foi submetida à multiplicação em meio LB contendo 100 µg/ml de Ampicilina, submetido à agitação de 220 rpm a 37°C *overnight*. A extração plasmidial foi realizada com o kit *QIAprep Spin Miniprep Kit* (Qiagen).

### 3.7.4. Amplificação da p27 para inserção em sistema de expressão

O sistema de expressão de proteínas recombinantes utilizado pelo Laboratório *Hematopoietic Disorders (College of Veterinary Medicine, Mississippi State University, United States)* é o *E. coli Expression System with Gateway Technology* com *BL-21 AI*

*One Shot Cells*. Esse sistema emprega o L-arabinose operon como regulador da expressão de proteínas recombinantes. A expressão é ativada pela adição de L-arabinose, diferentemente do sistema do plasmídeo pGS-21a, cuja expressão é regulada pelo Lac-operon, ativado pela adição de IPTG.

Assim, foi necessário transferir a sequência de nucleotídeos da p27 para o sistema *Gateway*. Foram construídos *primers* (Eurofins MWG Operon) para amplificar a p27 imediatamente no início e no final da sequência, adicionando-se à porção final do *primer* antisense um códon de sinalização de terminação da tradução (TAA), exigido pelo sistema (p27FORmsu: 5' - CCC TTG AGG GAA GGC CCC AAC AAC CGG -3' e p27REVSTOPmsu: 5' -TTA CAG AAC TTT AGT CAT CTC CTT GTG GCG -3'). O produto de amplificação de, aproximadamente, 740 pb foi visualizado em gel de agarose 1,5%.

### **3.7.5. Reação de clonagem pCR8/GW/TOPO TA**

O produto de PCR foi utilizado para a construção de um clone de entrada ou *entry clone* com o *pCR8/GW/TOPO TA Cloning Kit* (Life Technologies). Um microlitro do produto de PCR foi adicionado a 1 µl de Solução salina (1,2 M NaCl e 0,06 M MgCl<sub>2</sub>), 1 µl de vetor linear pCR8/GW/TOPO e água livre de nucleases q.s.p. 6 µl. A reação foi incubada em temperatura ambiente por 30 min, e em seguida realizada a transformação em *One Shot TOP10 Chemically Competent E. coli* (Life Technologies) seguindo recomendações do fabricante.

Após crescimento das colônias, cinco delas foram escolhidas para extração plasmidial, amplificação por PCR e sequenciamento para verificar a presença do clone de entrada e o direcionamento em fase do produto inserido. A extração foi realizada com o *QIAprep Spin Miniprep Kit* (Qiagen), a PCR realizada com os primers GW1 e

GW2 do *pCR8/GW/TOPO TA Cloning Kit* (Life Technologies) e o sequenciamento realizado pela empresa *Eurofins MWG Operon*.

### 3.7.6. Reação de recombinação LR (*LR Recombination*)

A reação de recombinação é realizada entre o vetor de entrada (item 3.2.1.3) e o vetor de destino pDEST 17, demonstrado no Figura 5 abaixo:

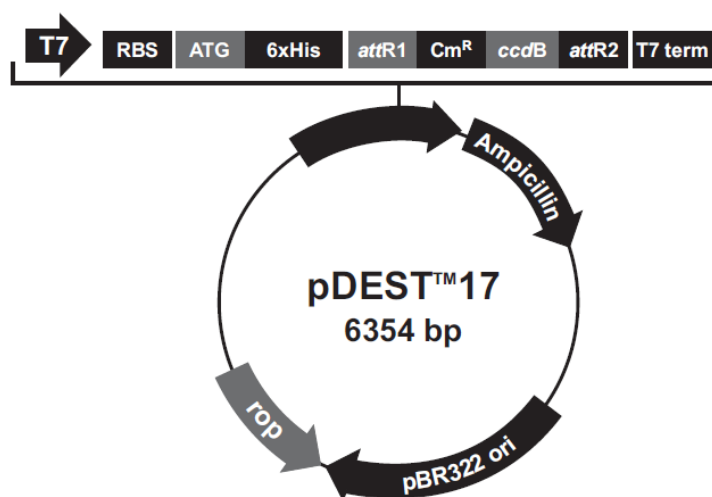


Figura 5. Mapa dos componentes do vetor de destino pDEST 17 (Life Technologies).

Para um volume final de 8  $\mu\text{l}$ , foram adicionados 0,7  $\mu\text{l}$  (150 ng) do vetor de entrada, 1,0  $\mu\text{l}$  (150 ng) do vetor de destino pDEST 17 e 6,3  $\mu\text{l}$  de Tampão TE (10 mM Tris-HCl, pH 8,0, 1 mM EDTA). Após descongelamento em gelo, a enzima *LR Clonase II* foi levada ao vortex por duas vezes de 2 min cada. À mistura descrita, foram adicionados 2  $\mu\text{l}$  da enzima *LR Clonase II*. A mistura foi incubada a 25°C por 1 h e, então, adicionado 1,0  $\mu\text{l}$  de Proteinase K, seguido de incubação a 37°C por 10 min. Esta reação foi submetida à transformação em *Subcloning Efficiency DH5 $\alpha$  Chemically Competent E. coli* (Life Technologies) seguindo recomendações do fabricante.

### 3.7.7. PCR para verificar presença da sequência da p27 no vetor pDEST 17

Após crescimento, 10 colônias foram selecionadas para verificar a presença do vetor pela realização da PCR. A reação de PCR foi realizada com 0,2 µl (5u/µl) de Platinum Taq DNA polimerase (Life Technologies), 5 µl de tampão de PCR 10X (200mM de Tris-HCl pH8,4; 500 mM de KCl), 1,5 µl de MgCl<sub>2</sub> (50 mM), 1 µl (10 µM) de cada *primer* direcionado para p27 (item 3.7.4.) e água livre de nucleases (Promega) q.s.p. 25 µl. O produto de amplificação de 747 pb foi visualizado em gel de agarose 1,5%.

Um colônia contendo o vetor de destino foi selecionada para propagação e posterior isolamento do plasmídeo utilizando o kit *QIAprep Spin Miniprep Kit* (Qiagen). O DNA plasmidial foi submetido à quantificação em aparelho NanoDrop 1000 (Thermo Scientific).

### 3.7.8. Expressão da proteína p27

O vetor de destino pDEST 17 contendo a sequência da p27 foi inserido em bactéria *BL21-AI One Shot*, seguindo protocolo descrito no item 3.1.6.4. Após transformação, uma colônia isolada foi escolhida para indução da expressão da p27 seguindo protocolo adiante: a colônia isolada foi inoculada em 10 ml de meio LB contendo 100 µg/ml de Ampicilina, seguido de incubação *overnight* a 37°C/220 rpm. Uma alíquota (6,25 ml) dessa cultura foi transferida para 50 ml de meio LB contendo 100 µg/ml de Ampicilina e deixada sob agitação de 220 rpm até atingir densidade ótica entre 0,5- 0,6, num comprimento de onda de 600 nm (DO<sub>600nm</sub>). A indução da expressão foi realizada com 0,2% de L-arabinose com uma incubação de 6 h a 37°C/220 rpm.

Para a análise em SDS-PAGE, foram colhidas alíquotas de 1ml das amostras e centrifugadas a 5000 g por 2 min, e os sedimentos ressuspendidos em 100 µl de tampão

de amostra 1X (12 mM Tris-HCl pH 6,8. 5% Glicerol, 0,4% Sódio Dodecil-sulfato, 2,88 mM  $\beta$ -mercaptoetanol e 0,02% Azul de Bromofenol), aquecidos a 100 °C por 3 min e mantidos a 4°C até a realização da SDS-PAGE. Para a análise da fração solúvel eram colhidas alíquotas de 100  $\mu$ l do lisado bacteriano após centrifugação de 5000 g por 2 min. Para a fração insolúvel, eram colhidas alíquotas de 100  $\mu$ l do lisado bacteriano, submetia-se à centrifugação por 5000 g por 2 min e ressuspensava-se o sedimento em 100  $\mu$ l da solução desnaturante (20 mM de Fosfato de sódio pH 7,4, 0,5 mM Cloreto de sódio e 8 M Uréia). Adicionava-se ainda tampão de amostra 5X para aplicação no gel.

A cultura foi centrifugada a 3000 g por 10 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi congelado em freezer -20°C até o momento do uso.

### **3.7.9. Purificação da p27**

A proteína p27 produzida foi purificada com o uso da resina *Ni-NTA Agarose* (25 ml) (Qiagen) por cromatografia em fluxo gravitacional. Ao sedimento previamente descongelado foram adicionados 8 ml de *Native Binding Buffer* 1X (250 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 8,0; 2,5 M NaCl), 8 mg de Lisozima (USB Corporation) (1 mg/ml). A mistura foi incubada em gelo por 30 min. A lise das bactérias foi realizada por sonicação em aparelho Sonic-Dismembrator (Fisher Scientific) em amplitude de 50%, cada etapa compreendendo 30 segundos seguidos de 30 segundos em gelo por 5 vezes. O lisado foi centrifugado a 3000 g por 5 min e o sedimento descartado posteriormente. Uma alíquota de 100  $\mu$ l foi separada para visualização em gel de poliacrilamida. A resina foi preparada para a purificação de acordo com as indicações do fabricante e, em seguida, todo o volume do lisado foi adicionado a um tubo Falcon (15 ml) contendo a resina preparada e a mistura foi submetida à agitação suave por 1 h em temperatura ambiente.

Após incubação, a mistura foi transferida para um suporte de cromatografia apropriado. O filtrado foi colhido em tubo Falcon (15 ml) e armazenado para análise em gel de poliacrilamida. Em seguida, 3 lavagens foram realizadas com 8 ml de *Native Wash Buffer* (*Native Binding Buffer* 1X e 20 mM Imidazole - Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) cada. Todo o filtrado também foi colhido para análise. Para eluição da proteína p27, foram adicionados 5 ml de *Native Elution Buffer* (*Native Binding Buffer* 1X e 250 mM Imidazole-Sigma) e colhidos em microtubos de 1,5 ml, 1 ml/tubo. A resina foi submetida à lavagem com NaOH 0,5 M por 30 min e armazenada em *Native Binding Buffer* 1X para reutilização posterior.

A análise das frações foi realizada em Tris-HCl 10% *Precast Polyacrylamide gel* (BIO RAD) em cuba de eletroforese *Mini-PROTEAN Tetra Cells* (BIO RAD), contendo Tampão de Corrida (12 mM Tris-HCl pH 6,8, 5% Glicerol, 0,4% Sódio Dodecil-sulfato, 2,88 mM  $\beta$ -mercaptoetanol e 0,02% Azul de Bromofenol) a 200 V por 30 min. As amostras foram adicionadas de tampão de corrida (0,5 M Tris-HCl, pH 6,8, 25% Glicerol, 10% peso/volume Dodecil sulfato de sódio-SDS, 5%  $\beta$ -mercaptoetanol e 1% Azul de Bromofenol, 2X) na proporção de 1:2 e aquecidas a 99°C por 5 min. O marcador de peso molecular utilizado foi o *Prestained SDS-PAGE Standards, broad range* (BIO RAD). Após migração, o gel foi corado em Solução Corante (40% Metanol, 10% Ácido acético, 0,1% Coomassie Blue R-250, água destilada q.s.p. 1 L) por 30 min sob agitação suave. Para visualização das bandas o gel foi incubado em Solução Descorante (40% Metanol, 10% Ácido acético, água destilada q.s.p. 1 L).

O peso molecular da proteína foi estimado utilizando-se o programa *ProtParam Tool* disponível no *ExpASY Proteomics Server* (<http://expasy.org/>).

A concentração da proteína purificada foi estimada pelo método de BCA (SMITH et al. 1985) em comparação à curva padrão de concentração de albumina sérica bovina (BSA).

### **3.7.10. Propagação e titulação de fagos**

A metodologia empregada foi uma modificação do protocolo sugerido por Sambrook e colaboradores (1989).

#### **3.7.10.1. Propagação do fago auxiliar**

O fago auxiliar M13K07 ( $5 \times 10^{10}$  UFP/ml, GE Healthcare, United Kingdom) foi estriado em uma placa com meio LB sólido (1% Triptona, 0,5% Extrato de levedura, 1% NaCl e 1,5% Ágar). A esta placa foi adicionada uma mistura de cultura de bactéria *E.coli* XL-1 Blue (0,5 ml em uma  $DO_{600nm}$  0,6) e 3,5 ml de *Soft agar* (meio LB 0,5% Ágar) a 45°C, da região menos concentrada para a mais concentrada de fagos M13K07. A placa foi incubada a 37°C por 12-14 h. No dia seguinte, a região de placas isoladas de menor crescimento de bactérias foi raspada e transferida para 50 ml de meio 2YT contendo 70 µg/ml de Canamicina, sendo incubado a 37°C em 250 rpm por 14 h, com bastante aeração. Após incubação a cultura foi centrifugada a 3500 g por 10 min a 4°C. O sobrenadante contendo os fagos foi armazenado a 4°C em alíquotas de 1 ml e submetido à titulação.

### 3.7.10.2. Titulação de fagos

Essa metodologia de titulação de fagos foi empregada tanto para fago auxiliar M13K07 quanto para os fagos recombinantes expressando os scFvs.

Uma colônia isolada de bactéria *E. coli* XL-1 Blue foi inoculada em 10 ml de meio 2YT contendo 15 µg/ml de Tetraciclina e incubada a 37°C em 220 rpm até atingir  $DO_{600nm}$  0,6-0,8. Foram feitas diluições seriadas do vírus (item 3.2.3.1.) na base 100 (990µl de meio LB mais 10 µl de fago) de  $10^{-2}$  a  $10^{-10}$  em duplicata. Procedimento: em um microtubo de 1,5 ml, mantido em banho-maria a 45°C, adicionou-se 250 µl de XL-1 Blue, 100 µl da diluição do fago e 1 ml de *Top Agar* (meio 2YT, 0,75% de Ágar). Imediatamente após homogeneização as misturas foram transferidas para placas de meio LB sólido e incubadas a 37°C *overnight*.

O cálculo da concentração de fagos na solução estoque foi realizado pela contagem do número de placas da menor diluição em que foi possível visualizá-las individualmente, multiplicando pelo respectivo fator de diluição e por 10 (porque 0,1 ml da diluição do fago foi adicionado por placa).

### 3.7.11. Recuperação da biblioteca de fragmentos de anticorpos com a utilização do fago auxiliar M13K07

A expressão dos fagomídeos em bacteriófagos carreando a porção scFv compreendeu uma indução com Isopropil -  $\beta$  - D - Thiogalactopiranosídeo (IPTG, Sigma), associando-se a uma “co-infecção” com o fago auxiliar M13K07 (GE Health Care), segundo protocolo descrito por Deng e colaboradores (2003), com modificações: 200 µl do *pool* de colônias foram transferidos para 25 ml de meio NE e incubados sob rotação de 200 rpm a 37°C até atingir  $DO_{600nm}$  0,5-1,0. Foram adicionados  $10^{11}$  UFP (unidades formadoras de placa) de fago auxiliar, 37,5 µl de IPTG 1M (concentração

final de 0,5 mM) e mais 50 ml de meio NE, sendo novamente incubados a 200 rpm/26°C *overnight*. Duas horas após indução com IPTG, adicionou-se Canamicina (concentração final de 30 µg/ml).

Após incubação *overnight*, a cultura foi centrifugada a 4000 g por 10 min a 4°C. Os fagos contidos no sobrenadante (70 ml) foram precipitados com 20 ml de uma solução de PEG-NaCl 5X (20% Polietilenoglicol 8000 p/v, NaCl 2,5 M). A mistura foi então deixada por 30 min em gelo e posteriormente centrifugada a 10000 g por 40 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspendido em 30 ml de tampão PBS (Tampão Fosfatos 0,1 M, NaCl 0,14 M, pH 7,4), onde também se adicionou 5,5 ml da solução de PEG-NaCl. Após 20 min em gelo, a solução foi centrifugada a 10000 g por 25 min a 4°C. O sedimento foi ressuspendido em 2 ml de PBS contendo 10% de Glicerol e armazenado a 4-8°C.

### **3.7.12. Seleção dos fagos recombinantes**

A seleção dos fagos recombinantes foi realizada em placa de fundo plano do tipo MaxiSorp (Nunc, Rochester, New York, USA). Uma linha (12 poços) foi sensibilizada com 200 µl de proteína p27 purificada (5 µg/ml) em Tampão Carbonato/Bicarbonato (TCB, 0,05 M, pH9,6) e incubada *overnight* em câmara úmida a 4°C. A lavagem foi realizada com PBS contendo 0,05% de Tween (PBS-T) por 3 vezes e o bloqueio com leite em pó desnatado (LPD) 10% em TCB, 300 µl/poço e incubação a 37°C por 2 h. Cinco procedimentos de lavagem foram realizados com PBS-T, seguidos de outras 5 lavagens com PBS sem Tween para remover o excesso de detergente. Em seguida os fagos expressos foram diluídos em PBS com LPD 2% em uma concentração de 10<sup>11</sup> UFP/ml, incubados em câmara úmida a 37°C por 1h 30 min. Mais 5 lavagens com PBS-T e outras 5 com PBS foram realizadas. Os fagos foram eluídos com solução ácida de

Glicina-HCl (0,1 M, pH 2,2) deixada para agir por 2 min. Com o objetivo de obter fagos com maior afinidade, 200 µl da solução ácida foram adicionados ao primeiro poço, homogeneizados e, imediatamente, 195 µl foram transferidos para o segundo poço, deste, 190 µl foram transferidos para o terceiro poço e assim sucessivamente até o décimo segundo poço. Novamente, 200 µl de solução ácida foram adicionados ao primeiro poço e após 2 min de incubação, todo o volume foi transferido para o segundo. Assim, os 200 µl iniciais e o volume restante de cada poço foram recolhidos após incubação de 2 min até o décimo primeiro poço. A solução no décimo segundo poço contém fagos de menor especificidade por terem sido eluídos rapidamente. A solução do décimo primeiro poço contém fagos de maior afinidade por ter sido necessário mais tempo de incubação para eluição. Logo após as soluções obtidas, foi adicionado metade do volume de Tris (2 M) para neutralizar o pH, sendo metade do volume de bacteriófagos utilizado para re-infectar bactérias *E. coli* XL-1 Blue e a outra metade armazenada a 4°C. O procedimento de *biopanning* foi realizado 3 vezes.

### **3.7.13. Infecção de *E. coli* XL-1 Blue com fagos obtidos após *biopanning***

Uma colônia isolada de XL-1 Blue foi inoculada em 5 ml de meio 2YT e incubada a 37°C sob 220 rpm até atingir DO<sub>600nm</sub> entre 0,5 e 0,8. A cultura foi inoculada com metade do volume da solução de bacteriófagos do décimo primeiro poço do *biopanning* e incubada a 37°C sob 220 rpm por 1 h e em seguida centrifugada a 3000 g por 5 min. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi ressuscitado em 500 µl de meio 2YT. Cinco placas de meio NE sólido foram semeadas com 100 µl/placa com a suspensão de bactéria e incubadas a 25°C por 72 h. Após crescimento, as colônias foram removidas da superfície das placas utilizando-se 5 ml de meio 2YT e alça de Drigalski. Parte do *pool* de colônias foi utilizada para expressão dos bacteriófagos

recombinantes e parte foi acrescida de Glicerol 10% para armazenagem em freezer - 80°C.

Os procedimentos de re-infecção de *E.coli* XL-1 Blue, produção de fagos recombinantes e titulação realizados sempre que necessário.

### **3.8. Propagação de fagos individuais após terceiro biopanning**

As colônias isoladas obtidas após terceiro *biopanning* foram imediatamente utilizadas para propagação dos fagos individualmente. Cada colônia foi individualmente inoculada em 2 ml de meio NE e incubados a 37°C sob agitação de 220 rpm até uma DO<sub>600nm</sub> entre 0,5-0,7. Atingida a DO foram adicionados 2 ml de meio NE, IPTG (concentração final de 1 mM) e 10<sup>9</sup> UFP de fago auxiliar e a mistura foi incubada *overnight* a 26°C sob agitação de 220 rpm. No dia seguinte, as culturas foram centrifugadas a 3000 g por 10 min a 4°C.

### **3.9. Seleção de fagos recombinantes de maior afinidade pela p27 (Phage-ELISA)**

#### **3.9.1 Primeiro teste**

O primeiro ELISA para seleção de fagos de maior afinidade pela p27 foi realizado como se segue: uma microplaca de fundo chato MaxiSorp (Nunc) foi sensibilizada com a p27 purificada nas concentrações de 5,0, 2,5, 1,25 e 0,625 µg/ml em TCB, adicionando-se 100 µl em cada poço em duplicata. A placa foi incubada a 4°C *overnight* em câmara úmida. O bloqueio foi realizado com albumina sérica bovina (BSA) 1% em TCB, 200 µl/poço, com incubação a 37°C por 2 h. Os fagos individualizados foram testados em duas diluições: ½ e ¼ em PBS contendo 0,5% BSA (PBS/BSA 0,5%). Após 2 h de incubação a 37°C foi adicionado o anticorpo monoclonal

de camundongo anti-M13 conjugado com Peroxidase (*HRP/Anti-M13 Monoclonal Conjugate*, GE Healthcare) diluído 1:5000 em PBS/BSA 0,5%, 100 µl/poço e a placa incubada a 37°C por 1 h. A solução de substrato e cromógeno foi constituída de 1% de 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB, 10 mg/ml em Dimetilsulfóxido-DMSO), 25 µl de Peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) a 3% e 20 ml de Tampão Citrato/Acetato (TCA) pH 6,0, 100 µl/poço, em agitação em temperatura ambiente por 15 min. A reação enzimática foi bloqueada com HCl 2 M, 50 µl/poço e em seguida foi realizada a leitura das densidades óticas em aparelho espectrofotométrico a 450 nm. Após cada etapa de incubação os poços foram submetidos a 5 lavagens com 300 µl/poço de PBS-Tween 0,05%.

### **3.9.2. ELISA de seleção**

Os melhores resultados do primeiro ELISA foram obtidos com a sensibilização da placa com 1,25 µg/ml de p27 purificada e diluição dos fagos em 1/2. Assim, todos os ensaios de ELISA para seleção dos fagos de maior afinidade foram realizados com essas características, sendo testado um total de 120 fagos recombinantes individuais.

### **3.10. Obtenção de fragmentos de anticorpos (scFv) solúveis**

#### **3.10.1. Sequenciamento de nucleotídeos dos scFv selecionados**

Dos 120 fagos recombinantes analisados, 11 apresentaram DO acima de 0,3 e foram escolhidos para re-infecção em *E.coli* XL-1 Blue. Posteriormente, os 11 fagomídeos foram isolados utilizando o kit *QIAprep Spin Miniprep Kit* (Qiagen) e quantificados em aparelho NanoDrop 1000 (Thermo Scientific).

A reação de sequenciamento foi realizada com os *primers* direcionados ao fagomídeo pAK 100 descrito no item 3.6.5.. A análise das sequências com relação à

determinação do arcabouço e das CDRs foi de acordo com a numeração Kabat disponível em <http://www.bioinf.org.uk/abs/>.

### **3.10.2. Subclonagem dos scFv em vetor de expressão**

Após análise dos nucleotídeos dos scFv de maior afinidade, dois foram escolhidos para produção da proteína solúvel, o scFv 9 e o scFv 70. Os scFvs foram clonados entre os sítios de restrição *Nco I* e *Xho I* do vetor de expressão pGS-21a (GenScript Corporation). Foi escolhida uma proporção 1:3 da relação vetor/inserto. A quantidade de DNA adicionada foi 50 ng de vetor e 20 ng de scFv. A reação de ligação continha 1,5 µl de tampão 10X (300 mM de Tris-HCl pH 7,8, 100 mM de MgCl<sub>2</sub>, 100 mM de DTT e 10 mM de ATP), uma unidade de *T4 DNA Ligase* (Promega) e água livre de nucleases q.s.p. 15 µl. As reações foram submetidas à incubação a 16 °C/ *overnight*. No dia seguinte, esta reação foi utilizada para transformação da *E. coli* BL21 (DE) segundo protocolo descrito no item 3.6.4..

### **3.10.3. Indução da expressão do scFv solúvel**

Uma colônia isolada de *E. coli* cepa BL21 (DE) contendo pGS-21a/scFv 9 ou 70 foi usada para inocular 3 ml de meio LB líquido contendo 100 µg/ml de Ampicilina e incubada *overnight* a 37 °C sob agitação de 250 rpm.

No dia seguinte, a cultura de BL21/scFv 9 (ou 70) foi inoculado em 50 ml de LB contendo 100 µg/ml de Ampicilina e incubado a 37°C sob agitação de 220 rpm até atingir DO<sub>600nm</sub> de 0,6. Atingida a DO, foi adicionado à cultura 0,1 mM de IPTG e submetida à incubação a 28°C sob agitação de 180 rpm por 5 h 30 min. Foram colhidas alíquotas de 0,5 ml para leitura em espectrofotômetro e 1,0 ml para ser analisada em gel de SDS-PAGE nos momentos 0 h, 2 h, 3 h.

Para a análise em SDS-PAGE, as amostras foram centrifugadas a 5000 g por 2 min, imediatamente após a colheita, e os sedimentos ressuspensos em 100 µl de tampão de amostra 1X (Tris-HCl 12 mM pH 6,8, Glicerol 5%, Sódio Dodecil-sulfato 0,4%, β-mercaptoetanol 2,88 mM e Azul de Bromofenol 0,02%), aquecidos a 100 °C por 3 min e mantidos a 4°C até a realização da SDS-PAGE.

Além da análise da presença dos fragmentos de anticorpos nas amostras, também foi analisada a localização da proteína, fração solúvel ou insolúvel. Para isso, os 50 ml da cultura induzida (scFv 9 ou 70) foi centrifugado a 3500 g por 15 min a 4°C e o sedimento ressuspensionado em 5 ml de Tampão de ligação (Fosfato de sódio 20 mM, NaCl 500 mM e Imidazole 20 mM) 1 ml de tampão para cada 10 de cultura. A lise das bactérias foi realizada com adição de 10 mg de Lisozima (USB Corporation) (1 mg/ml) e sonicação (Sonics & Materials Inc., Vibra Cell) com amplitude de 20%, cada etapa compreendendo 1 min de sonicação seguidos de 1 min em gelo por 5 vezes. O lisado foi centrifugado a 3000 g por 5 min, sendo o sobrenadante (fração solúvel) e o sedimento (fração insolúvel) separados. O sedimento foi ressuspensionado em solução desnaturante (Fosfato de sódio 20 mM pH 7,4, Cloreto de sódio 0,5 mM e Uréia 8 M).

Após análise por SDS, verificou-se a produção da proteína correspondente ao fragmento de anticorpo scFv de forma solúvel. A indução da produção dos scFv em larga escala foi realizada com 150 ml de cultura induzida com 0,1 mM de IPTG, a 28°C sob agitação de 180 rpm por 6 h. Imediatamente após a ressuspensão do sedimento de cultura induzida foram adicionados 15 µl de Protease Inhibitor Mix HP Plus (Serva Electrophoresis).

#### **3.10.4. Purificação dos scFvs solúveis**

A purificação dos scFvs solúveis foi realizada por cromatografia de afinidade com resina HisTrap HP 5 ml (GE Healthcare) e bomba de propulsão, como descrito a seguir: a cultura induzida de BL21 (DE) contendo pGS-21a/scFv 9 (ou 70) foi submetida à lise como descrito no item 3.3.3. e o sobrenadante foi filtrado em membrana de 0,22 µm. A resina foi preparada para a passagem do filtrado e as lavagens subsequentes foram realizadas de acordo com as recomendações do fabricante. A eluição da proteína foi realizada em um gradiente de concentração de Imidazole. As soluções foram feitas com Fosfato de sódio 20 mM, NaCl 500 mM e as diferentes concentrações de Imidazole (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA): 100 mM, 200 mM, 300 mM, 400 mM e 500 mM. Ao final da eluição, a resina foi lavada e preparada para reutilização seguindo recomendações do fabricante.

Após análise em SDS-PAGE, as frações de eluição contendo a maior proporção de scFvs em relação a proteínas contaminantes foram selecionadas para adição de Protease Inhibitor Mix HP Plus (Serva Electrophoresis).

#### **3.11. Avaliação dos fragmentos de anticorpos (scFv)**

Após a produção e purificação dos scFvs, estes foram analisados segundo sua especificidade com a proteína p27. Para isso, foi necessária nova produção e purificação desta, já que o plasmídeo de expressão contendo a sequência codificante da p27 utilizado no Laboratório *Hematopoietic Disorders (College of Veterinary Medicine, Mississippi State University, United States)* durante o estágio, precisaria de uma cepa diferente das *E. coli* disponíveis em nosso laboratório.

### 3.11.1 Segunda produção e purificação da p27 recombinante

Desta vez, a produção da proteína viral foi realizada com o vetor de expressão pGS-21a contendo a sequência codificante da p27 pedido à empresa GenScript Corporation. O vetor foi inserido na *E. coli* BL-21 (DE) seguindo mesmo protocolo de transformação descrito no item 3.1.6.4.. Após cultivo *overnight* de uma colônia isolada de BL21 (DE) em 10 ml de meio LB contendo 100 µg/ml de Ampicilina, 100 ml de meio LB foram inoculados e a expressão da proteína foi induzida com IPTG (concentração final de 0,1 mM), incubados a 28 °C sob agitação de 180 rpm por 5 h.

A purificação da proteína seguiu mesmo protocolo descrito no item 3.7.9. A concentração da proteína purificada foi estimada pelo método de BCA (SMITH et al. 1985) em comparação à curva padrão de concentração de albumina sérica bovina (BSA).

### 3.11.2. Análise da p27 recombinante

Uma vez que animais infectados pelo FeLV não desenvolvem anticorpos neutralizantes contra a proteína de capsídeo p27 (JARRET, 1999), não foi possível verificar a especificidade da proteína p27 recombinante pela técnica de Western Blot. Por isso, a proteína produzida e purificada foi submetida ao teste SNAP Feline Triple Test (IDEXX Laboratories). Este teste foi desenvolvido para realização do diagnóstico rápido das infecções por FIV, FeLV e *Dirofilaria immitis*. Para a infecção do FeLV, o teste detecta a proteína viral p27 circulante com a aplicação de soro ou plasma.

O procedimento para a aplicação da p27 recombinante seguiu as recomendações do fabricante, sendo adicionados 50 ng de proteína.

### 3.11.3. Ensaio de Imunoblot

Para a análise da especificidade dos scFv, estes foram submetidos ao ensaio de imunoblot como descrito a seguir: a membrana de nitrocelulose foi sensibilizada com 200 ng do scFv 9 e 70, 200 ng de p27 e 200 ng de proteína bacteriana em porções diferentes. Em seguida a membrana foi incubada a 37°C para secagem por 30 min. A membrana foi bloqueada por submersão em uma solução de TBS (*Tris-Buffered Saline* – Tris-HCl 10 mM pH 7,5 e NaCl 150 mM) contendo 3% de BSA submetida à agitação suave em temperatura ambiente por 40 min. A membrana foi lavada com TBS por 3 vezes e então, a porção sensibilizada apenas com p27 foi incubada em solução de TBS contendo 0,5% de BSA e 200 ng de scFv 9 e 70 (separadamente), sob agitação suave por 40 min. Após 3 lavagens com TBS, todas as porções de membrana foram incubadas em solução de TBS 0,5% BSA contendo o conjugado anti-FLAG (Monoclonal ANTI-FLAG M2-Peroxidase (HRP) (Sigma-Aldrich) na proporção de 1:2000, sob agitação suave por 40 min. Seguiu-se à lavagem por 2 vezes em TBS por 10 min cada. As porções foram incubadas em uma solução de substrato e cromógeno contendo 100 µl de Cloronaftol (30 mg/ml em Metanol), 1 ml de Metanol, 3 µl de Peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30%) e TBS para um volume final de 5 ml. As bandas foram visualizadas dentro de 20 min de incubação e então a reação enzimática foi bloqueada com 3 lavagens de 10 min com água ultra pura.

### 3.11.4. Teste de bloqueio da p27 pelo scFv

Outra avaliação dos scFv foi realizada com o teste de bloqueio da p27. Para isso, 2 µg de scFv 9 solúvel foram adicionados a 100 ng de p27 recombinante e incubados em temperatura ambiente por 1 h. Após incubação, a mistura foi posta para reagir no

teste SNAP Triple Test (IDEXX Laboratories) seguindo recomendações do fabricante.

O mesmo procedimento foi realizado para o scFv 70 solúvel.

## IV. Resultados

### 4. Produção dos fragmentos de anticorpo (scFv)

#### 4.1. Amplificação das cadeias $V_L$ e $V_H$ e reação de SOE-PCR

A partir do fragmento de baço do camundongo imunizado com a vacina Fel-O-Vax LvK Feline Leukemia Vaccine (Fort Dodge), foi produzido o DNA complementar, seguido de amplificação com o conjunto de *primers* degenerados direcionados para as sequência da cadeia leve e pesada de anticorpos. Na Figura 6 é possível visualizar as bandas de 402 pb ( $V_L$ ) e 420 pb ( $V_H$ ).

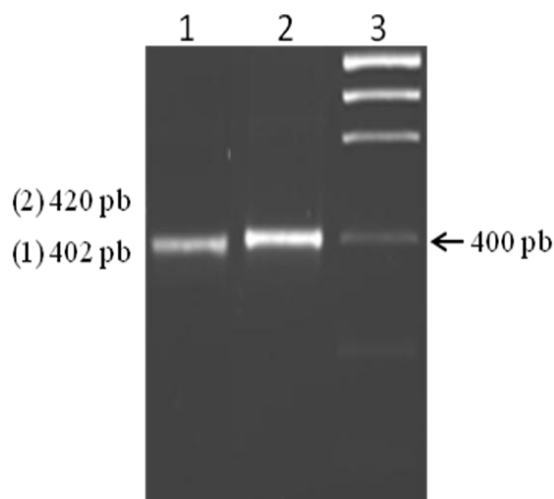


Figura 6. Visualização de gel de agarose 1,5%. (1) Banda de 402 pb para  $V_L$ . (2) Banda de 420 pb para  $V_H$ . (3) Low Mass Ladder (Invitrogen).

O conjunto de bandas de  $V_L$  e  $V_H$  foi purificado do gel de agarose e empregado para a produção do gene artificial composto pela  $V_L$  e  $V_H$  unidas por um *Linker*. A Figura 7 apresenta a banda de, aproximadamente, 820 pb resultante da reação de SOE-PCR.

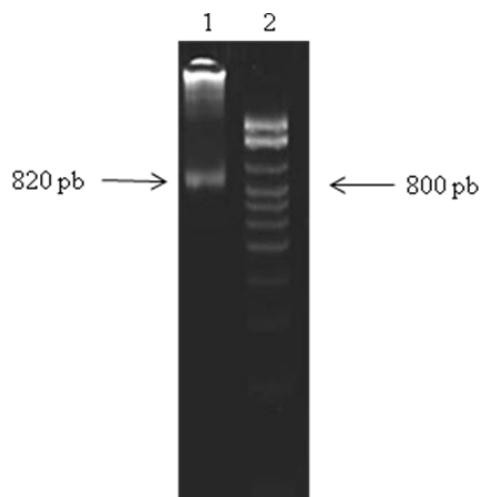


Figura 7. Visualização de gel de agarose 1,5%. (1) Produto de 820 pb das reação de SOE-PCR. (2) Marcador de tamanho molecular de 100 pb (Norgen).

Com o objetivo de se obter a maior variabilidade possível de fragmentos scFv, 8 reações de SOE-PCR foram realizadas com as  $V_L$  e  $V_H$  purificadas. O volume total de reações foi submetido à precipitação por etanol (SAMBROOK et al., 1989).

#### 4.2. Preparação e clonagem dos fragmentos scFv

Os fragmentos scFv e o fagomídeo pAK100 foram digeridos com a enzima *Sfi* I e então submetidos à reação de ligação. Sempre almejando a obtenção de maior variabilidade possível, todo o volume de bactérias transformadas foi plaqueado. A Figura 8 apresenta as colônias de *E. coli* XL-1 Blue após incubação de 72 h. Um total de  $2,8 \times 10^3$  colônias foram contadas e raspadas.

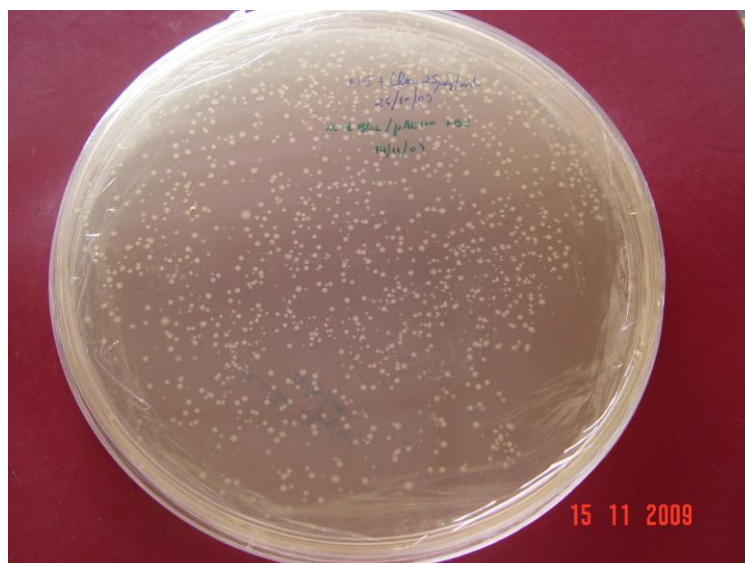


Figura 8. Placa com meio LB sólido contendo Cloranfenicol (25 µl/ml) as colônias de XL-1 Blue transformadas os scFvs ligados aos fagomídeos.

### 4.3. Expressão e seleção (*biopanning*) dos fagos recombinantes

#### 4.3.1. Expressão e purificação da p27 recombinante

Como alvo dos testes diagnósticos da infecção pelo FeLV, a proteína de capsídeo p27 foi produzida em sistema procarioto para utilização nas etapas de *biopanning* e determinação da especificidade dos scFvs. A Figura 9 demonstra o gel de poliacrilamida do SDS-PAGE com as frações colhidas durante a purificação da p27 recombinante. No poço 6 e 7 é possível visualizar a banda de, aproximadamente, 31,2 kDa, resultante da p27 inserida no vetor de expressão pDEST 17, que adiciona 2,4 kDa do códon iniciador à cauda de histidina e outras sequências do sistema.

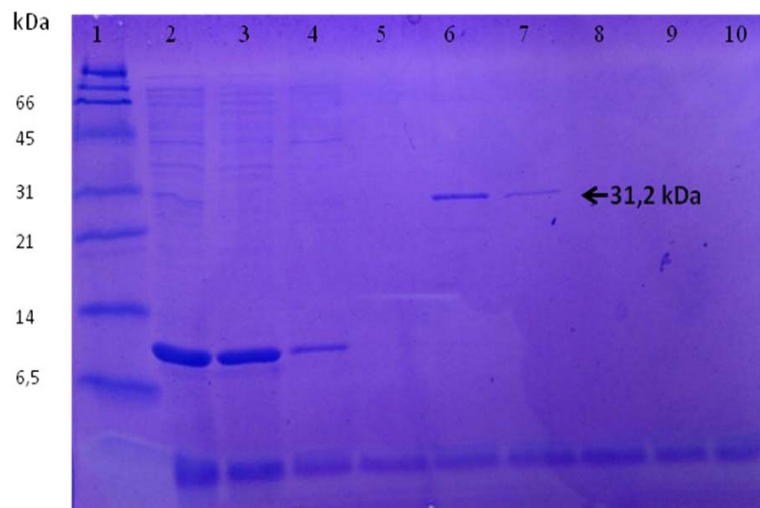


Figura 9. Visualização do SDS-PAGE em *Precast Polyacrylamide Gel (12.5%)*. Linha 1: marcador *Prestained SDS-PAGE Standards/ Broad Range (BIO RAD)*. Linha 2: amostra colhida após passagem do lisado na *Ni-NTA Agarose (Qiagen)*. Linha 3 e 4: amostras colhidas durante as lavagens do sistema. Linha 5: primeira amostra colhida durante eluição. Linhas 6 e 7: segunda e terceira amostras colhidas durante eluição. Seta: indica a banda da p27 recombinante (31,2 kDa). Linhas 8, 9 e 10: quarta, quinta e sexta amostras colhidas durante eluição.

A análise detalhada da p27 pelo programa *ProtParam Tool* revelou que ela é constituída de 248 aminoácidos (744 nucleotídeos), sendo 36 negativamente carregados (Asp + Glu) e 36 positivamente carregados (Arg + Lys).

#### 4.3.2. Titulação dos fagos

Com o objetivo de se obter fago auxiliar em concentração suficiente para o experimento, este foi propagado e titulado, resultando em  $3 \times 10^{11}$  UFP/ml.

#### 4.3.3. Recuperação da biblioteca de fragmentos de anticorpos (scFv) com a utilização do fago auxiliar M13K07

Uma vez obtida a biblioteca nucleotídica resultante da junção das cadeias leve e pesada ao fagomídeo, o próximo passo foi obter a biblioteca peptídica correspondente. Para isso procedeu-se à indução da expressão dos scFv unidos à proteína pIII de bacteriófagos com a presença de fago auxiliar. Na Figura 10 é possível visualizar o

sedimento formado após centrifugação da cultura de *E.coli* XL-1 Blue contendo fagomídeos ligados aos scFvs: A- sedimento de XL-1 Blue, B- sedimento de bacteriófago recombinante precipitado.

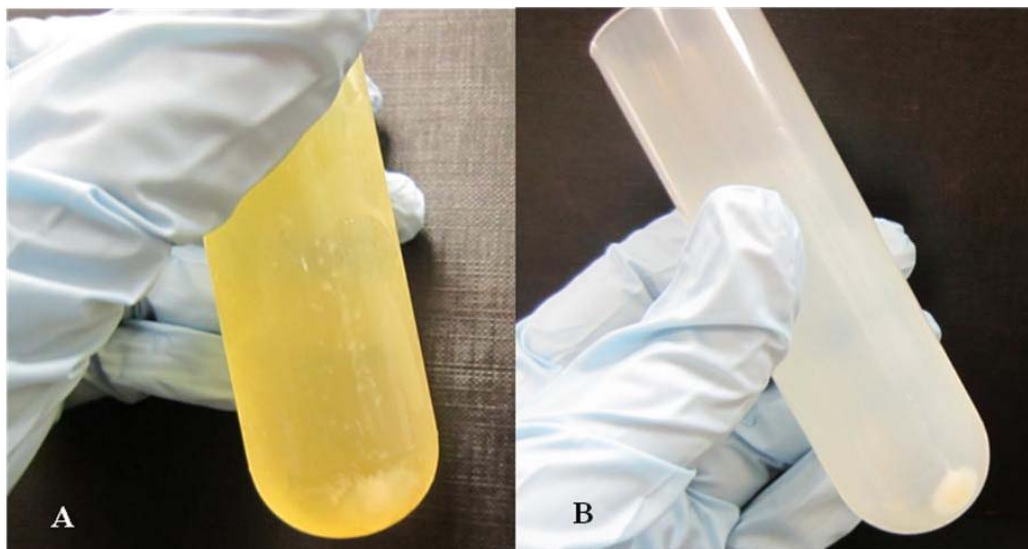


Figura 10. Visualização dos sedimentos de (A) Bactéria XL-1 Blue após indução da produção de fagos recombinantes e (B) Sedimento após precipitação dos bacteriófagos recombinantes.

#### 4.3.4. ELISA de seleção

Após análise de 120 fagos recombinantes pelo *Phage-ELISA*, 11 deles foram selecionados por apresentarem as densidades óticas a 450 nm mais elevadas ( $DO_{450nm} > 0,3$ ), indicando maior reatividade com a proteína recombinante p27.

Na figura a seguir estão apresentados os fagos selecionados e as respectivas  $DO_{450nm}$ .

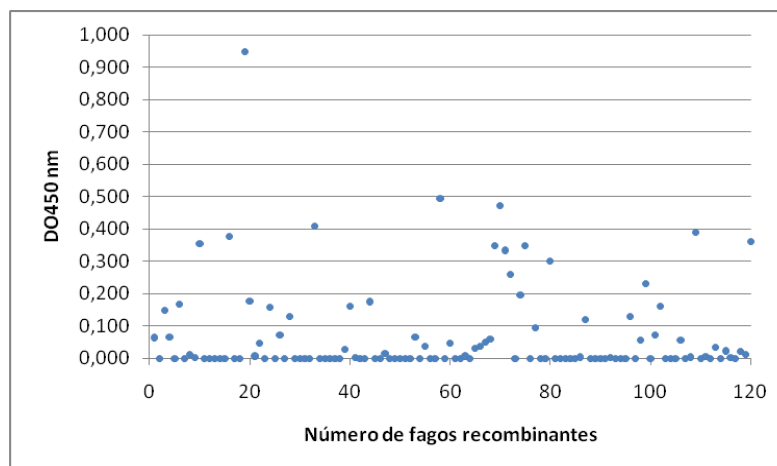


Figura 11. Densidade ótica dos 120 fagos recombinantes analisados pelo *Phage*-ELISA. Foram selecionados para posteriores análises aqueles com  $DO_{450nm}$  acima de 0,3.

#### 4.4. Sequenciamento de nucleotídeos dos scFv selecionados

De acordo com a análise das sequências dos 11 scFvs selecionados pudemos observar que os fagos 23 e 32 são idênticos, mas não poderiam ser utilizados, pois apresentaram sítios internos de digestão para a enzima de restrição *Nco* I ([www.watcut.uwaterloo.ca](http://www.watcut.uwaterloo.ca)), sendo a única possível para subclonagem em vetor de expressão. Os scFvs 7, 8 e 51 também foram excluídos das etapas posteriores, pois apresentaram alteração da sequência de aminoácidos da região *Linker*, o que poderia alterar a conformação final do fragmento expresso e comprometer a afinidade com a p27. Dentre os que restaram, optamos pela continuidade dos trabalhos apenas com o scFv 9 e 70 por apresentarem as maiores  $DO_{450nm}$ .

Esta apresentado na Figura 12 a sequência de nucleotídeos obtida dos scFvs 9-1 e 70-1. Pontos são nucleotídeos iguais, traços são deleções. É possível observar a presença da sequência encurtada que codifica o peptídeo FLAG (5'-GAC TAC AAA GAC-3') na extremidade N-terminal do scFv. A sequência *Linker* (5'-GGT AGT GGT GGT TCT GGT GGT GGT TCT GGC GGC GGC GGC TCC GGT GGT GGT GGA TCC-3'). O sítio de clivagem da *Sfi*I (5'-GGCCNNNNNGGCC-3'); o

sítio de clivagem da NcoI (5'-CCATGG-3'); e o sítio de clivagem da EcoRI (5'-GAATTC-3'). Nota-se que, no scFv 9, a sequência *Linker* está alterada com uma substituição de Guanina (G) por Adenina (A), no entanto, sendo o scFv com maior reatividade com a p27, esse não poderia ser descartado.



A partir da sequência de nucleotídeos foi possível deduzir as sequências de aminoácidos dos scFv 9 e scFv 70. Na Figura 13 (A e B) estão demonstrados os aminoácidos com destaque à delimitação das regiões de *Framework* (FR), com setas pretas, e *Complementarity Determining Region* (CDR), com caixas azuis. Com sombra amarela estão destacados os aminoácidos em comum. O scFv 9 apresentou um aminoácido a mais que o scFv 70 e a na região *Linker* apresentou uma substituição de Glicina (G) por Serina (S).

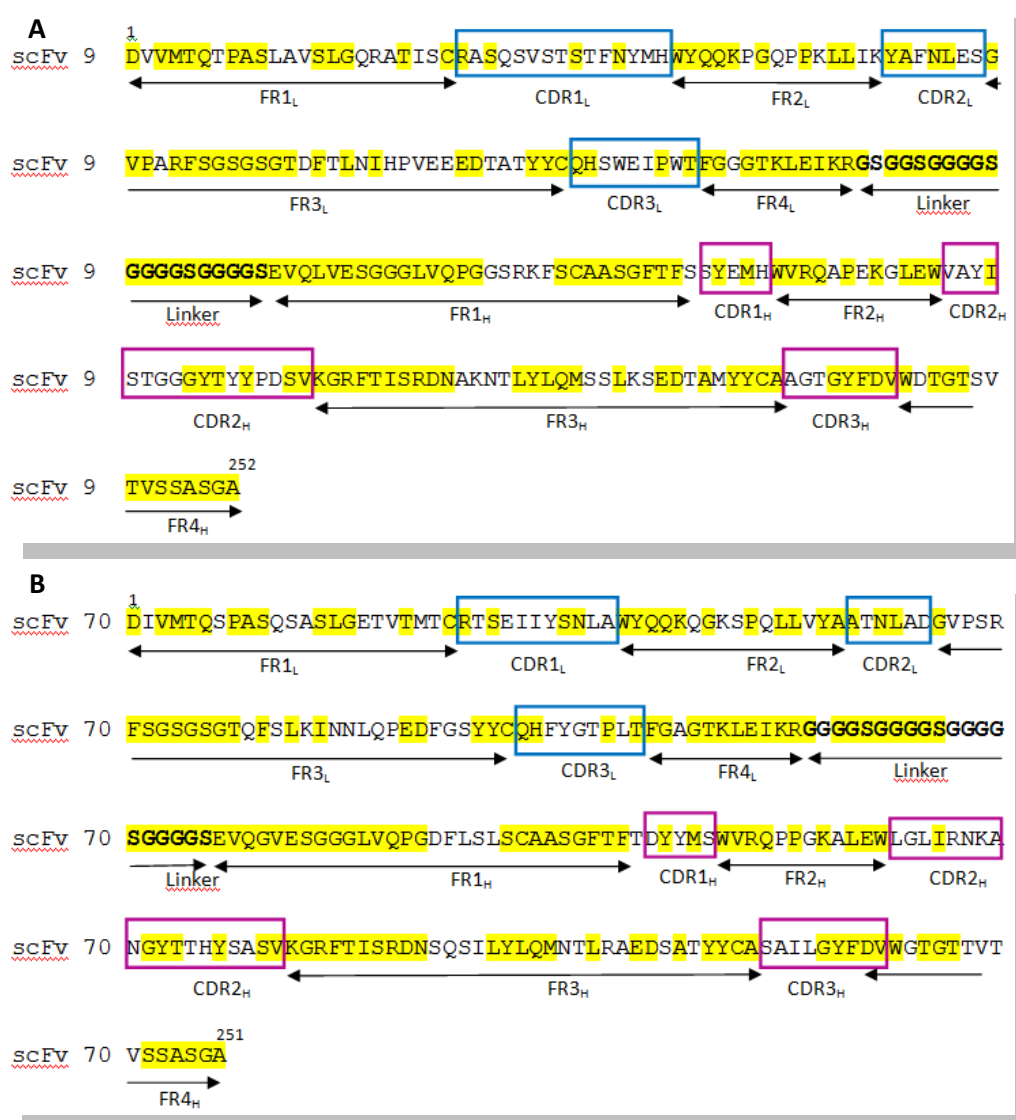


Figura 13.(A) Sequência de aminoácidos deduzidas da sequência de nucleotídeos do scFv 9. (B) Sequência de aminoácidos deduzidas da sequência de nucleotídeos do scFv 70. Em sombra amarela os aminoácidos comuns. Delimitado por setas as *Framework* (FR) e em caixa azul as

*Complementarity Determining Regions* da cadeia leve CDR<sub>L</sub> e em caixa lilás as CDR da cadeia pesada (CDR<sub>H</sub>).

#### **4.5. Indução da expressão do scFv solúvel**

O sistema de expressão desenvolvido e aperfeiçoado pelo Prof. Andreas Plünckthun, Anke Krebber e colaboradores (1997) resulta em scFvs inseridos em fagomídeos pAK 100 para a expressão do fragmento de anticorpo fusionado com a proteína pIII do fago M13. Para a expressão do fragmento solúvel os autores subclonaram os scFvs em um vetor (pAK 400) cuja sequência Shine-Dalgarno é mais eficiente que aquela do pAK 100. Por não possuímos o pAK 400, foi escolhido outro vetor de expressão. Inicialmente, foi empregado o sistema de expressão de proteínas heterólogas pET 28a (Novagen). Entretanto, não foi possível a produção dos scFv 9 e 70 na forma solúvel (dados não apresentados). Posteriormente, foi realizada a subclonagem dos scFvs no vetor de expressão pGS-21a.

Uma vez inserido no vetor de expressão pGS-21a, os fragmentos de anticorpo scFv 9 de 27,25 kDa e scFv 70 de 26,88 kDa, foram acrescidos de 26 kDa da cauda GST e 0,84 kDa da cauda de histidina (N-terminal), resultando em, aproximadamente, 58,69 kDa e 58,32 kDa, respectivamente. Na Figura 14 é possível visualizar a banda de tamanho esperado correspondente ao scFv 9-1 (indicação da seta) na fração solúvel do lisado. No poço 2, amostra 0 h. Nos poços 3 e 4 é possível verificar o aumento de intensidade de banda de acordo com o tempo após indução.

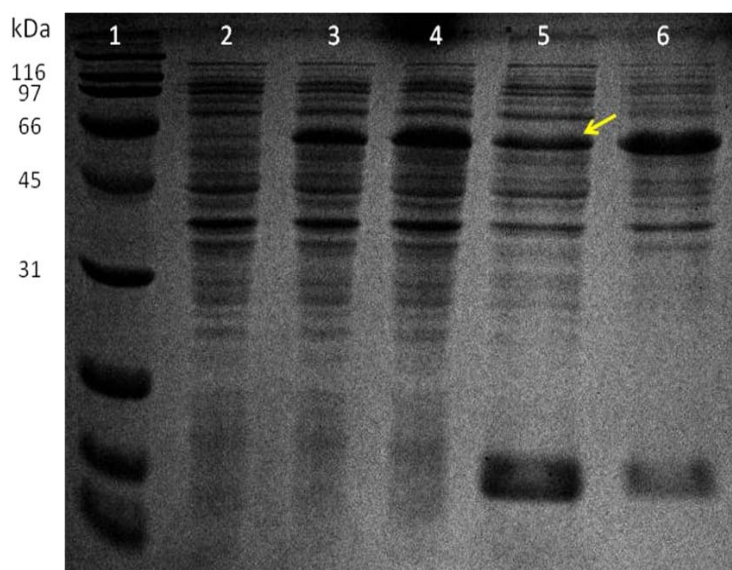


Figura 14. Visualização de gel SDS-PAGE. Linha 1: *SDS-PAGE Standards/ Broad Range* (BIO RAD<sup>®</sup>). Linha 2: momento 0 h. Linha 2: momento 2 h. Linha 3: momento 3 h. Linha 4: fração solúvel. Linha 5: fração insolúvel. Seta: indicação da banda de 58,69 kDa.

Mesmo com a mudança de sistema, é possível visualizar na Figura 14 que comparativamente, há mais proteína na porção insolúvel do que na solúvel em um mesmo volume de amostra por poço.

#### 4.6. Segunda produção da p27 recombinante

Inserida no vetor de expressão pGS-21a, a proteína p27, de 28,8 kDa, foi acrescida de 26 kDa da cauda GST e 3,22 kDa da cauda de histidina (N-terminal e C-terminal) e de pequenas sequências inerentes ao plasmídeo, resultando em, aproximadamente, 58,2 kDa. Na Figura 17 é possível visualizar a banda de tamanho esperado correspondente à p27 (seta amarela). No poço 2, amostra 0 h. Nos poços 3 (2 h), 4 (4 h 30 min), 5 (6 h) e 6 (*overnight*) verifica-se o aumento da intensidade da banda de acordo com o tempo. Visualiza-se a presença da banda na fração solúvel (poço 7) e na insolúvel (poço 8).

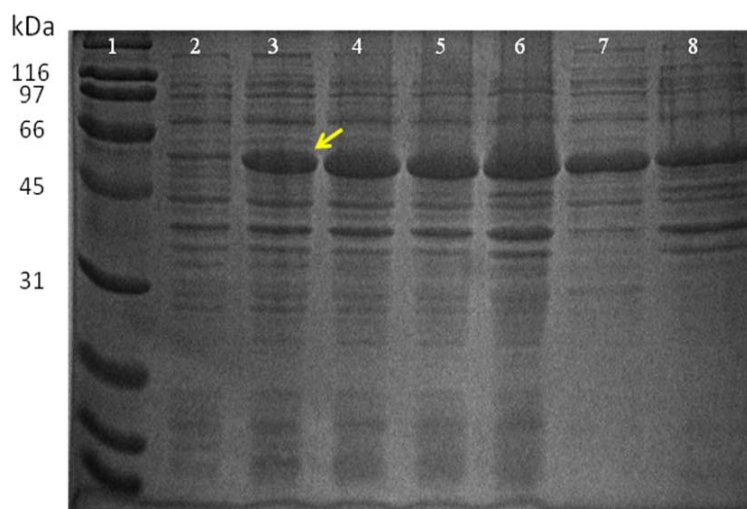


Figura 15. Visualização de gel SDS-PAGE. Linha 1: *SDS-PAGE Standards/ Broad Range* (BIO RAD®). Linha 2: momento 0 h. Linha 3: momento 2 h. Linha 4: momento 4 h 30 min. Linha 5: momento 6 h. Linha 6: momento *overnight*. Linha 7: fração solúvel. Linha 8: fração insolúvel. Seta: indicação da banda de 58,2 kDa.

#### 4.7. Análise da p27 recombinante

A análise da p27 recombinante foi realizado para a proteína produzida em nosso laboratório. Após purificação, a proteína foi submetida à reação do SNAP Triple Test (IDEXX) e o resultado pode ser visualizado na Figura 18. Observa-se na porção superior uma região azulada indicativa de reatividade do controle interno no teste. Na porção superior direita, observa-se região mais fracamente azulada de reatividade para a presença da p27. De acordo com esses parâmetros, a p27 recombinante foi reconhecida pelos anticorpos contidos no teste.

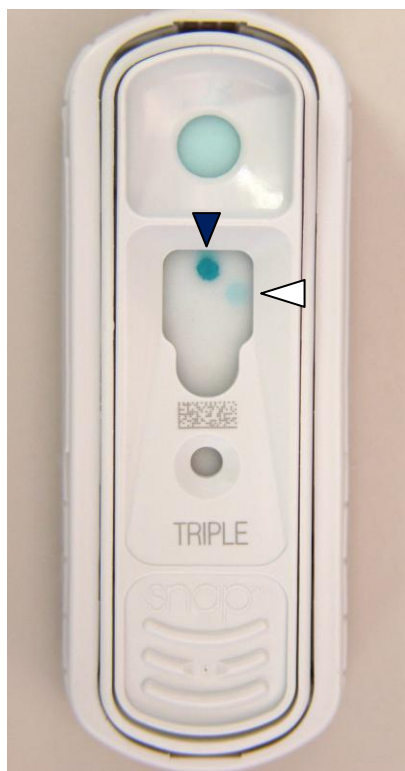


Figura 16. Resultado da análise da p27 recombinante. Seta em branco: local de reatividade para a presença da p27 indica reação positiva. Seta preenchida: local de reatividade para o controle interno do teste.

#### 4.8. Ensaio de Imunoblot

Com especificidade da p27 verificada, procedeu-se ao ensaio imunoenzimático em membrana de nitrocelulose para se avaliar a especificidade dos scFv solúveis em relação à p27 recombinante. O resultado deste teste está demonstrado na Figura 19. Observa-se em (A) a precipitação do cromógeno indicando a reação antígeno/anticorpo entre o scFv 9 solúvel aplicado à membrana e o anticorpo monoclonal específico para o peptídeo FLAG (conjugado anti-FLAG) presente no início da sequência do scFv. O mesmo pode ser observado para o scFv 70 (B). Em (C) e (D), pode-se observar reação de precipitação de intensidade menor entre p27 recombinante adicionada à membrana, scFv 9 e 70, respectivamente, e anti-FLAG. Em (D), não se observa reação de precipitação por se tratar de controle negativo.

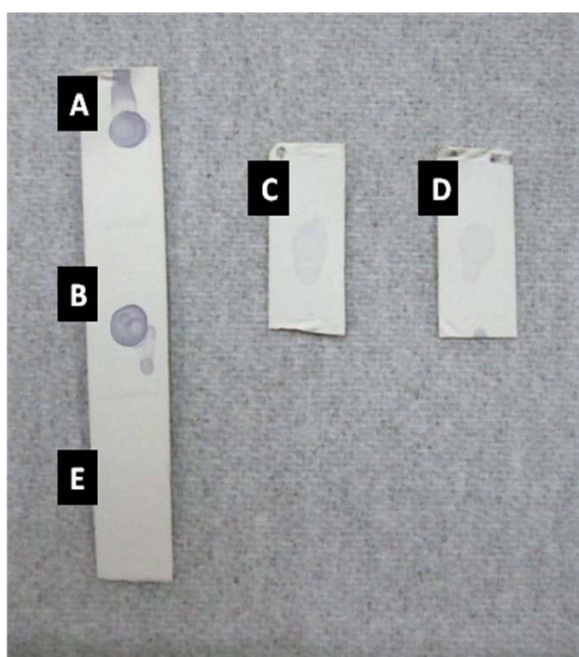


Figura 17. Resultado do ensaio de imunoblot. (A) e (B): precipitação positiva para reação antígeno/anticorpo. Antígeno: scFv 9 e 70, respectivamente. Conjugado: anti-FLAG monoclonal. (C) e (D): precipitação positiva para reação antígeno/anticorpo. Antígeno: p27 recombinante. Anticorpo: scFv 9 e 70, respectivamente, solúveis. Conjugado: anti-FLAG monoclonal. (E): controle negativo.

#### 4.9. Teste de bloqueio da p27 pelos scFvs

O resultado do teste de bloqueio da p27 recombinante pelos scFv 9 e 70 solúveis pode ser visto na Figura 20. Na porção superior observa-se região azulada indicativa de reatividade do controle interno do teste. Na porção onde se esperava reatividade pela presença da p27, não foi observada reação pelo bloqueio do scFv.



Figura 18. Resultado do teste de bloqueio da p27 recombinante. Seta: região azulada que demonstra reatividade do controle interno do teste. Não se observou formação de cor na porção esperada de reatividade para a presença da p27.

## V. Discussão

A detecção de antígeno p27 envolve a produção de anticorpos monoclonais e, para isso, contamos com a construção de bibliotecas de anticorpos pela técnica de hibridomas (VELIZ, 2002) ou pela apresentação de polipeptídeos na superfície de fagos filamentosos - *Phage Display* (SMITH, 1985), sendo as mais amplamente utilizadas.

A técnica de hibridomas, apesar de revolucionária, demanda mais tempo, é mais cara, necessita de manipulação intensa e requer vários ciclos até que se consigam resultados satisfatórios, quando comparada à técnica de *Phage Display*. Esta última é uma metodologia em franco desenvolvimento e aplicação, inclusive no Brasil. O *Phage Display* aliado à clonagem de genes codificadores de anticorpos é a promessa para os entraves da produção de biomoléculas (DENG et al., 2003). Amplamente empregada na área da medicina humana, principalmente para a produção de anticorpos monoclonais para fins terapêuticos (OLIVEIRA, 2009), esta técnica também tem ganhado grande utilização na medicina veterinária: anticorpos para detecção e diferenciação do vírus da bronquite infecciosa das galinhas (CAETANO, 2009), detecção de *Babesia gibsoni* (HIROSE et al., 2009), detecção do vírus da imunodeficiência bovina (BIV) (BATHIA et al., 2010), entre outros. Não existem relatos da produção de anticorpos monoclonais contra a p27 pela técnica de *Phage Display*.

O primeiro passo para a produção de anticorpos monoclonais é a construção de bibliotecas de fragmentos de anticorpos, seja uma biblioteca *naive* ou uma biblioteca imune. Optamos por desenvolver a biblioteca a partir da inoculação de antígeno em camundongos *High Responder* de Biozzi, linhagem IV-A, considerados bons produtores de anticorpos (IBANEZ et al., 1988). A proposta inicial era inocular no camundongo antígeno viral o mais purificado possível. O vírus seria cultivado *in vitro* para posterior

purificação por ultracentrifugação. Para isso, foi obtido o sangue de um animal com resultado de imunofluorescência direta positivo, assistido pela equipe da Prof. Dr. Mitika Kuribayashi Hagiwara (FMVZ-USP) em São Paulo-SP. Foi feita uma co-cultura de linfócitos com células felinas adaptadas ao cultivo *in vitro*, a *Crendell Feline Kidney* (CrFK). Devido a dificuldades no isolamento, optamos por purificar o FeLV a partir da vacina Fel-O-Vax Lv-K<sup>®</sup> Feline Leukemia Virus (Fort Dodge) composta por vírus inativado. Esta vacina não é encontrada no Brasil, sendo as 50 doses do experimento gentilmente cedidas pela Fort Dodge. Mathes e colaboradores (1977), purificaram o FeLV a partir de cultivo celular obtendo uma banda correspondente ao vírus entre 32 e 36 % de sacarose em uma densidade de 1,14 a 1,16 g/cm<sup>3</sup>. Com base nesses dados, após os procedimentos de clarificação, ultracentrifugação em gradiente de Sacarose e em Cloreto de céσιο, não foi possível purificar o vírus. Por não termos acesso às informações no que diz respeito aos componentes da vacina, podemos supor que o insucesso na obtenção de vírus purificado a partir da vacina foi devido a um conjunto de fatores. A purificação viral a partir de cultivo, normalmente, exige uma alta concentração de vírus e a concentração da vacina pode não ter sido suficiente para conseguirmos determinar a presença viral nas alíquotas analisadas. Outro fator a ser considerado é o processo de inativação viral empregado. Algumas metodologias de inativação, por exemplo, adição de detergentes ou formalina, podem resultar na perda da forma da partícula viral e isso comprometeria o coeficiente de sedimentação durante a ultracentrifugação impossibilitando a concentração das partículas dentro de uma variação de densidade esperada. Ainda assim, outros componentes da vacina como o adjuvante também pode ter contribuído por impedir o processo de clarificação adequado ou mesmo alterar o coeficiente de sedimentação viral.

Como a inoculação de camundongos para a obtenção de uma biblioteca imune não exige a presença de somente o antígeno de interesse, optamos por induzir a resposta imune pela inoculação da vacina acima citada já que contém todas as proteínas virais, incluindo o antígeno de interesse do nosso experimento (p27).

Vários cuidados devem ser tomados durante a construção de uma biblioteca imune ampla e fidedigna, que represente todo o repertório imune animal. Das etapas iniciais de isolamento de RNA até a obtenção dos clones (scFv ligados ao fagomídeo inseridos em *E. coli*), todas são pontos críticos. De acordo com Brígido e Maranhão (2002), dentre as estratégias para garantir esse repertório, destacam-se uma alta eficiência de amplificação e de transformação. Com relação às reações de amplificação, os resultados foram sempre satisfatórios. Apenas algumas modificações dos ciclos de amplificação sugeridos por Deng e colaboradores (2003) (descritos em Materiais e Métodos) foram necessárias para ajustar aos diferentes equipamentos e reagentes utilizados. Uma característica interessante do sistema desenvolvido por Krebber e colaboradores (1997) é a utilização de um conjunto de *primers* dirigidos à amplificação de todas as possíveis cadeias variáveis de camundongos descritas no banco de dados Kabat (KABAT et al., 1991), as variáveis da cadeia leve  $\lambda$  e  $\kappa$  e as variáveis da cadeia pesada, que, anteriormente, eram amplificadas com conjuntos de *primers* diferentes. Além disso, agrega *primers* já descritos por outros autores (KREBBER et al., 1997).

Um dos fatores mais limitadores que encontramos durante o experimento foi a perda de material (DNA) durante as etapas de purificação a partir de gel de agarose, mesmo empregando-se kits comercialmente disponíveis amplamente utilizados. De acordo com o comprimento dos nossos produtos, o fabricante garante 90 % de recuperação, mas houve discordância com nossos resultados. Deng e colaboradores (2003) e Batista (2008) relataram o mesmo problema, e então empregamos os

procedimentos recomendados pelos autores: realizamos um número grande de reações de SOE-PCR (oito reações, 50 µl/reação) seguidas da precipitação com etanol, para reduzir o volume, e então purificação em gel de agarose.

A transformação elétrica (eletroporação) foi inicialmente empregada para a inserção dos fagomídeos/scFv por ser considerada de maior rendimento em relação à transformação química (SAMBROOK et al., 1989). No entanto, a necessidade de se purificar a reação de ligação antes da eletroporação contribuiu para a perda de material, resultando em uma baixa eficiência de transformação. Com a transformação química obtivemos melhores resultados, uma biblioteca de  $2,8 \times 10^3$  clones. Enquanto Krebber e colaboradores encontraram  $6 \times 10^6$  clones, Batista (2008), utilizando a eletroporação, encontrou apenas  $3,5 \times 10^2$ . Como produzimos nossa própria bactéria competente, a eficiência de transformação era monitorada em cada procedimento, empregando-se plasmídeos controle. Estes eram DNA plasmidial purificado e a eficiência de transformação foi sempre satisfatória. A utilização de uma única enzima de restrição, a SfiI, traz vantagens ao sistema, como a inserção direcional do fragmento e a baixa probabilidade de digestão do interior das sequências codificadoras de anticorpos, já que o sítio de restrição é raramente encontrado nelas. Entretanto, podemos sugerir que a eficiência de ligação desses sítios pode ser baixa, ao encontrarmos baixo número de clones.

Após a indução da expressão dos fagos individuais obtidos no terceiro *biopanning*, procedemos à titulação destes para verificar a homogeneidade da produção dos fagos e garantir a adição de quantidades iguais durante o *Phage-ELISA*. Realizamos a análise de um total de 120 fagos recombinantes e selecionamos onze deles, por apresentarem as maiores densidades óticas,  $DO_{450nm}$  maior que 0.3. Um deles ficou em destaque, apresentando  $DO_{450nm}$  de 0,949 e o restante entre 0,334 e 0,495.

A análise das sequência de nucleotídeos dos onze scFv selecionados permitiu verificar a presença de algumas características do sistema criado por Krebber e colaboradores (1997) (Figura 12). Por exemplo, a sequência encurtada que codifica o FLAG (5'-**GAC TAC AAA GAC**-3') na extremidade N-terminal do scFv, que pode ser usada tanto para a detecção por anticorpo conjugado, quanto para purificação com cromatografia de afinidade. A sequência *Linker* (5'-**GGT AGT GGT GGT TCT GGT GGT GGT GGT TCT GGC GGC GGC GGC TCC GGT GGT GGT GGA TCC**-3') composta por códons diferentes em cada cadeia para evitar sobreposições incorretas durante a reação de SOE-PCR. O sítio de clivagem da SfiI (5'-**GGCCNNNNNGGCC**-3'); o sítio de clivagem da NcoI (5'-**CCATGG**-3'); e o sítio de clivagem da EcoRI (5'-**GAATTC**-3').

O alinhamento da sequência de nucleotídeos dos scFvs com o banco de dados GenBank permitiu classificar foi possível classificar os fragmentos como derivados da classe IgG as sequências da cadeia variável pesada e como kappa ( $\kappa$ ) as sequências cadeia variável leve. Este achado está de acordo com Tizard (1998) que relata que 95 % das imunoglobulinas de camundongos pertencem à classe  $\kappa$ .

Mesmo após a realização de três ciclos de seleção (*biopanning*) dos fagos contra a p27, verificamos uma grande diversidade entre as sequências dos onze scFvs, exceto pela presença de dois scFv idênticos, o 23 e o 32 (densidades óticas parecidas,  $DO_{450nm}$  0,495 e 0,408, respectivamente). Essa diversidade pode indicar a afinidade dos scFvs para diferentes epítomos da p27, o que pode ser útil para a implementação futura de um teste imunoenzimático de alta sensibilidade. Esses resultados demonstram que apesar de pequeno, o número de clones do nosso experimento apresentou uma variabilidade considerável e que de fato ocorreu um processo de seleção de fagos específicos para a p27.

A partir da sequência de nucleotídeos pudemos deduzir a sequência de aminoácidos dos fragmentos de anticorpos. Com esta, delimitamos as regiões determinantes de complementariedade (CDRs) e os arcabouços (*Framework* - FR). Verificou-se a presença de todos os elementos que determinam as posições das CDRs e FRs (Figura 13) de acordo com a numeração Kabat.

No sistema desenvolvido por Krebber e colaboradores (1997) os scFv foram subclonados em vetor de expressão pAK 400, por este possuir uma sequência de Shine-Dalgarno mais eficiente do que a sequência sintética do pAK 100. De acordo com os autores, após a indução da expressão dos scFv fusionados à pIII pode ocorrer a seleção de formas mais toleradas pelas bactérias, causando a perda de variabilidade, por exemplo. Esta possível seleção é evitada pela estratégia de utilização de um vetor de baixa eficiência de tradução nas primeiras etapas do processo.

A enzima de restrição empregada para a subclonagem no vetor pAK 400 foi a SfiI, no nosso caso, nem o vetor inicialmente escolhido (plasmídeo pET28a) nem o posteriormente empregado (plasmídeo pGS-21a), possuem sítios dessa enzima, assim, contamos com outra característica importante do sistema que é a presença do sítio da NcoI e da EcoRI, no início e no final dos fragmentos, respectivamente, incorporados às sequências pelo primers utilizados.

Infelizmente os dois fagos idênticos foram descartados por apresentarem um sítio de clivagem a mais da NcoI na posição 519, impossibilitando a subclonagem no vetor de expressão. Os scFvs 7, 8 e 51 também foram descartados das etapas posteriores por apresentarem substituições na sequência *Linker*. Já o scFv 9 foi escolhido para ser expresso na forma solúvel por ter apresentado a maior  $DO_{450nm}$  e o scFv 70 foi escolhido por apresentar a maior  $DO_{450nm}$  dentre os que restaram.

A primeira tentativa de expressão dos scFvs foi com o vetor pET28a (Novagen) por ser amplamente utilizado e por apresentar altos níveis de transcrição do fragmento clonado (GUO et al., 2003). Entretanto, não foi possível a produção dos scFv 9 e 70 na forma solúvel (dados não apresentados). As alterações das condições de indução como baixas temperaturas, manutenção do pH e baixas concentrações de indutor (STRANDBERG e ENFORS, 1991) não foram suficientes para produzir scFv na forma solúvel em nosso experimento.

Waugh (2005) revisou as considerações a respeito da utilização de caudas N-terminais para aumentar a solubilidade de proteínas heterólogas. O mecanismo exato para facilitar a solubilização das proteínas ainda não é conhecido, já que nem toda cauda polipeptídica N-terminal aumenta a solubilidade e nem sempre as mais utilizadas funcionam em todos os experimentos. Apesar de Waugh (2005) não apresentar a cauda GST (Glutathione S-transferase) como facilitadora da solubilização, em nosso experimento, ficou evidente que a subclonagem dos scFvs no plasmídeo pGS-21a que contém essa cauda, foi determinante para a obtenção dos scFvs na forma solúvel (Figura 14). Provavelmente, a presença da cauda N-terminal proporcionou um contexto seguro para a iniciação da tradução, o que favorece todo o processo (WAUGH, 2005).

Uma estratégia interessante é a utilização de caudas combinadas, como a adição de uma cauda para aumentar a solubilização e outra para a purificação (WAUGH, 2005). O vetor de expressão pGS-21a possibilita essa estratégia com a adição da GST N-terminal e a 6xHis N e C-terminal e possibilita ainda a obtenção dos scFvs mais puros, pelo emprego de dois procedimentos de purificação, por cromatografia de afinidade pela GST e pela 6xHis. Segundo Waugh (2005) a desvantagem desse sistema é que as caudas (curtas ou longas) podem alterar as propriedades da proteína e que os procedimentos de clivagem das caudas podem diminuir o rendimento do processo.

A produção da p27 recombinante pelo sistema Gateway e pelo vetor de expressão pGS-21a não apresentou problemas. O desafio, no entanto, foi determinar sua especificidade. Jarret (1991) sugere que o FeLV utiliza um mecanismo de evasão ao sistema imune ao induzir a produção de grande parte das proteínas codificadas pelo gene *gag* através da via de glicosilação. Dessa forma, seria mais difícil detectarmos anticorpos direcionados à p27, por exemplo. Esta pode ser uma das explicações para a não detecção da p27 por Western Blotting com o uso de soro de animal positivo disponível no laboratório. A saída encontrada foi testar a p27 com o SNAP Feline Triple Test (IDEXX Laboratories) que detecta a proteína circulante em soro ou plasma de gatos. A adição de 50 ng de p27 purificada foi suficiente para desencadear reação positiva no teste (Figura 16).

A caracterização dos scFvs com relação a especificidade à p27 foi realizada de duas formas: pelo ensaio imunoenzimático (imunoblot) e pelo bloqueio da p27. O primeiro envolveu a utilização de anticorpo monoclonal anti-FLAG marcado com Peroxidase (Figura 17). No teste realizado com três camadas, p27/scFv/anti-FLAG, nessa ordem, observamos que a afinidade do anti-FLAG foi menor quando comparada ao teste realizado em duas camadas, scFv/anti-FLAG, também nessa ordem. Sugerimos que a presença da cauda GST tanto na p27 (produzida no Brasil, item 4.6) quanto nos scFv 9 e 70 podem causar algum grau de impedimento estérico ao peptídeo FLAG. Além disso, os *primers* adicionaram aos scFv somente parte da sequência do peptídeo FLAG (quatro aminoácidos, Asp-Tir-Lis-Asp) ao invés dos oito aminoácidos que o compõem, o que pode ter dificultado ainda mais o acesso do conjugado anti-FLAG, desenvolvido para reconhecer todo o peptídeo. O Prof. Dr. Deilson Elgui de Oliveira (Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu-UNESP-Botucatu) também já relatou dificuldades com o conjugado anti-FLAG (comunicação pessoal).

O segundo teste revelou a capacidade dos scFvs de se ligarem a p27 pelo bloqueio desta (Figura 18). Após incubação com os fragmentos de anticorpo, separadamente, a p27 não foi detectada pelo SNAP Feline Triple Test (IDEXX Laboratories).

Empregada na medicina humana, a técnica de produção de bibliotecas imunes aliada à expressão de proteínas em bactérias e seleção pela apresentação em fagos constitui uma das principais promessas da área médica. O estudo das interações intermoleculares, a criação de biomoléculas com atividade terapêutica, produção de anticorpos com fins de diagnóstico, entre outros, serão facilitados com o aprimoramento contínuo que a técnica vem apresentando.

Da imunização de camundongos com uma vacina composta por FeLV inativado foi possível a seleção de fragmentos de anticorpos voltados para uma das proteínas da vacina. É evidente a amplitude de aplicações da técnica na área médica veterinária.

As perspectivas são, padronizar a aplicação prática dos scFv para a detecção da p27 em amostras de soro ou plasma felinas, além de determinar se os scFvs são direcionados para epítomos espécie-específicos, visto que a p27 apresenta regiões comuns a outros vírus pertencentes ao gênero *Gammaretrovirus*.

## **VI. Conclusões**

A metodologia de clonagem e expressão empregada neste trabalho revelou ser eficiente para a construção de uma biblioteca imune a partir de camundongos.

Foi possível produzir e selecionar fagos recombinantes expressando fragmentos de anticorpos (scFv) contra a proteína de capsídeo do FeLV, p27.

Os scFvs foram produzidos na forma solúvel em sistema procarioto e foi demonstrada a capacidade de se ligarem à p27.

## VII. Referências Bibliográficas

ABBAS, A., LICHTMAN, A. *Cellular and Molecular Immunology*. 5<sup>th</sup> ed. W.B. Saunders Company, 2003.

ALMEIDA, F.M., FARIA, M.C.F., BRANCO, A.S. et al. Sanitary conditions of colony of urban feral cats (*Felis catus* Linnaeus, 1758) in a Zoological Garden of Rio de Janeiro, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v.46, p.269-274, 2004.

BARBAS, C.F. 3rd, COLLET, T.A., AMBERG, W., ROBEN, P., BINLEY, J.M., HOEKSTRA, D., CABABA, D., JONES, T.M., WILLIAMSON, R.A., PILKINGTON, G.R., HAIGWOOD, N.L., CABEZAS, E., SATTERTHWAIT, A.C., SANZ, I., BURTON, D.R. Molecular profile of an antibody response to HIV-1 as probed by combinatorial libraries. *Journal of Molecular Biology*, v.230, p.812-23, 1993.

BARBOSA, F.C.; CHRISTIANINE, M.P.T.; WALDEMARIN, K.C.A. Prevalência de leucemia felina em gatos domésticos de Uberlândia – MG. *Arq. Ciên. Vet. Zool. UNIPAR*, v. 5, n. 2, p. 207-211, 2001.

BARRETT, C.H. Hybridomas and Monoclonal Antibodies. In: Malik, V.S., Lillehoj, E.P. *Antibody Techniques*. Academic Press, Inc., 1994.

BATISTA, T.N. *Clonagem e expressão de fragmentos funcionais (scFv) de anticorpos contra o parvovírus canino-2 com a técnica de phage display*. Tese (Doutorado). 2007. 60f. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

BENHAR, I. Biotechnological applications of phage and cell display. *Biotechnology Advances*, v. 19, p. 1-33, 2001.

BHATIA, S. , GANGIL, R., GUPTA, D.S., SOOD, R., PRADHAN, H.K., DUBEY, S.C. Single-chain fragment variable antibody against the capsid protein of bovine immunodeficiency virus and its use in ELISA. *Journal of Virological Methods*, v. 167, n. 1, p. 68-73, 2010.

BRALEY, J. FeLV and FIV: survey shows prevalence in the United States and Europe. *Feline Practice*, v.22, p.25-28, 1994.

BRÍGIDO, M.M., MARANHÃO, A.Q. Bibliotecas apresentadas em fagos. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, n. 26, p. 44-51, 2002.

CAETANO, A.G. *Produção de fragmentos de anticorpos recombinantes scFV-N e scFv-SI e suas aplicações da detecção e diferenciação do vírus da bronquite infecciosa*. Tese (Doutorado). 2009.78f. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

CALDAS, A.P.F.; LEAL, E.S.; SILVA, E.F.A. et al. Detecção do provírus da Imunodeficiência Felina em gatos domésticos pela técnica de reação em cadeia da polimerase. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.20, p.20-25, 2000.

CARMEN, S., JERMUTUS, L. Concepts in antibody phage display. *Briefings in Functional Genomics and Proteomics*, v. 1, n. 2, p. 189–203, 2002.

CATTORI, V., TANDON, R., PEPIN, A., LUTZ, H., HOFMANN-LEHMAN, R. Rapid detection of feline leukemia virus provirus integration into feline genomic DNA. *Mol. Cell Probes*, v. 20, p.172–181, 2006.

CAXITO, F.A. *Detecção e subtipagem do vírus da imunodeficiência felina em Minas Gerais*. 2003. 90f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

CHEN, H., BECHTEL, M. K., SHI, Y., PHIPPS, A., MATHES, L.E., HAYES, K.A., ROY-BURMAN, P. Pathogenicity Induced by Feline Leukemia Virus, Rickard Strain, Subgroup A Plasmid DNA (pFRA). *Journal of Virology*, v. 72, p. 7048-7056, 1998.

DENG, X.K., NESBIT, L.A., JOHN MORROW Jr. K., Recombinant single-chain variable fragment antibodies directed against *Clostridium difficile* toxin B produced by use of an optimized phage display system. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, v. 10, n. 4, p. 587–595, 2003.

DONAHUE, P.R., QUACKENBUSH, S.L., GALLO, M.V. Viral genetic determinants of T-cell killing and immunodeficiency disease induction by the feline leukemia virus FeLV-FAIDS. *Journal of Virology*, v. 65, p. 4461-9, 1991.

FIGUEIREDO, A.S., TANIWAKI, S.A., AUGUSTI, A., ARAÚJO Jr., J.P. Feline retrovirus (FIV and FeLV) infection and the susceptibility of secondary infection with Haemoplasmas. In: XX Encontro Nacional de virologia, 2009, Brasília. *Virus Reviews and Research, Journal of Brazilian Society for Virology*, São Paulo: Imprinta Express Ltda, 2009, v. 14, suplemento 1, p. 88-89.

FILPULA, D. Antibody engineering and modification technologies. *Biomolecular Engineering*, v. 24, p. 201-215, 2007.

FISCHINGER, P.J., BLEVINS, C.S., NOMURA, S. Simple, Quantitative Assay for Both Xenotropic Murine Leukemia and Ecotropic Feline Leukemia Viruses. *Journal of Virology*, v. 14, n. 1, p. 177-179, 1974.

GILBERT, S.F. *Developmental Biology*. 8<sup>th</sup> ed. 2006.

GUO, J.Q., YOU, S.Y., LI, L., ZHANG, C.Y. Construction and high-level expression of a single-chain variable fragment specific for acidic isoferitin in *Escherichia coli*. *Journal Biotechnology*, v.102, p. 177-186, 2003.

HAGIWARA, M. K.; JUNQUEIRA-JORGE, J.; STRICAGNOLO, C. Infecção pelo vírus da leucemia felina em gatos de diversas cidades do Brasil. *Clínica Veterinária*, n. 66, p. 44-50, 2007.

HARDY Jr., W.D., OLD, L.J., HESS, P.W., ESSEX, M., COTTER, S. Horizontal transmission of feline leukaemia virus. *Nature*, v. 244, p. 266–269, 1973.

HARDY, W. D., Jr., HESS, P. W., MACEWEN, E. G., MCCLELLAND, A. J., ZUCKERMAN, E. E., ESSEX, M., COTTER, S. M., and JARRETT, O. Biology of feline leukemia virus in the natural environment. *Cancer Research*, v. 36, p. 582–588, 1976.

HARDY, W.D. Jr. Feline leukemia virus non-neoplastic diseases. *Journal of the American Animal Hospital Association*, v. 17, p. 941-949, 1981.

HARTMANN, K. Feline Leukemia Virus Infection. In: Greene, C.E. *Infectious disease of the dog and cat*. 3<sup>rd</sup> ed. Georgia, 2006. Cap. 13, p.105-131.

HARTMANN, K., GRIESSMAYR, P., SCHULZ, B., et al. Quality of different in-clinic test systems for feline immunodeficiency virus and feline leukaemia virus infection. *J. Feline Med. Surg.*, v. 9, p. 439–45, 2007.

HARTMANN, K., WERNER, R.M., EGBERINK, H., JARRETT, O. Comparison of six in-house tests for the rapid diagnosis of feline immunodeficiency and feline leukaemia virus infections. *Veterinary Records*, v. 149, p. 317–20, 2001.

HAWKS, D.M., LEGENDRE, A.M., ROHRBACH, B.W. Comparison of four test kits for feline leukemia virus antigen. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v. 199, p. 1371-77, 1991.

HELPER-HUNGERBUEHLER, K., CATTORI, V., BORETTI, F. S., OSSENT, P., GREY, P., REINACHER, M., HENRICH, M., BAUER, E., BAUER-PHAM, K., NIEDERER, E., HOLZNAGE, E., LUTZ, H., HOFMANN-LEHMANN, R. Dominance

of highly divergent feline leukemia virus A progeny variants in a cat with recurrent viremia and fatal lymphoma. *Retrovirology*, v. 7, p. 1-14, 2010.

HIROSE, Y., MATSUHIRA, S., BATANOVA, T.A., GOO, Y., TERKAW, M.A., NISHIKAWA, Y., KITO, K., XUAN, X., TAKASHIMA, Y. Detection of *Babesia gibsoni* by Reaction of Phage Display Single Chain Antibodies with P50 Proteins *Journal of Veterinary Medicine Science*, v. 71, n.8, p. 1133-1136, 2009.

HOFMAN-LEHMANN, R. et al. Parameters of disease progression in long-term experimental feline retrovirus (feline immunodeficiency virus and feline leukemia virus) infection: hematology, clinical chemistry and lymphocyte subsets, *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, v.4, n.1, p.33-42, 1997.

HOFMANN-LEHMANN, R., CATTORI, V., TANDON, R., BORETTI, F.S., MELI, M.L., RIOND, B., LUTZ, H. How molecular methods change our views of FeLV infection and vaccination. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 123, p. 119–123, 2008.

HOFMANN-LEHMANN, R., CATTORI, V., TANDON, R., BORETTI, F.S., MELI, M.L., RIOND, B., PEPIN, A.C., WILLI, B., OSSENT, P., LUTZ, H. Vaccination against the feline leukaemia virus: outcome and response categories and long-term follow-up. *Vaccine*, v. 25, p. 5531–5539, 2007.

HOFMANN-LEHMANN, R., HUDER, J.B., GRUBER, S., BORETTI, F., SIGRIST, B., LUTZ, H. Feline leukaemia provirus load during the course of experimental infection and in naturally infected cats. *Journal of General Virology*, v. 82, p. 1589–1596, 2001.

HOOVER, E. A., OLSEN, R. G., MATHES, L. E., and SCHALLER, J. P. Relationship between feline leukemia virus antigen expression and viral infectivity in blood, bone marrow, and saliva of cats. *Cancer Research*, v. 37, p. 3707–3710, 1976.

HOOVER, E.A., MULLINS, J.I. Feline leukemia virus infection and diseases. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 199, p. 1287–1297, 1991.

ICTVdB Management (2006). 00.061.1.02. Gammaretrovirus. In: *ICTVdB - The Universal Virus Database*, version 4. Büchen-Osmond, C. (Ed), Columbia University, New York, USA.

IBANEZ, O.M., MOUTON, D., OLIVEIRA, S.L., RIBEIRO FILHO, O.G., PIATTI, R.M., SANT'ANNA, A.O. et al. Polygenic controlo f quantitative antibody

responsiveness: restrictions of the multispecific effect related to the selection antigen. *Immunogenetics*, v. 28, p. 6-12, 1988.

JARRETT O, GOLDBER MC, WEIJER K. A comparison of three methods of feline leukaemia virus diagnosis. *Veterinary Records*, v. 110, p. 325–28, 1982.

JARRETT, O. Strategies of retrovirus survival in the cat. *Veterinary Microbiology*, v. 69, p. 99-107, 1999.

JARRETT, O., GOLDBER, M.C., TOTH, S., ONIONS, D.E., STEWART, M.F. Interaction between feline leukaemia virus subgroups in the pathogenesis of erythroid hypoplasia. *International Journal Cancer*, v. 34 p. 283-8, 1984.

JARRETT, O., LAIRD, H.M., HAY, D. Determinants of the host range of feline leukaemia viruses. *Journal of General Virology*, v. 20, p. 169-75, 1973.

JARRETT, W.F., CRAWFORD, E.M., MARTIN, W.M., DAVIE, F. A virus like particle associated with leukaemia (lymphosarcoma). *Nature*, v. 202, p. 567–568, 1964.

KABAT, E.A., WU, T.T., REID-MILLER, M., PERRY, H.M., GOTTESMAN, K.S., FOELLER, C. 1991. *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5<sup>th</sup> ed. US Department of Health and Human Services, Public Service, NIH, Washington.

KENAN, D. J., TSAI, D. E. & KEENE, J. D. Exploring molecular diversity with combinatorial shape libraries. *Trends Biochem. Sci.*, v. 19, p. 57 – 63, 1994.

KREBBER, A. et al. Reliable cloning of functional antibody variable domains from hybridomas and spleen cell repertoires employing a reengineered phage display system. *Journal of Immunological Methods*, v. 201, p. 35 – 55, 1997.

KRUMPE, L.R.H., MORI, T. The Use of Phage-Displayed Peptide Libraries to Develop Tumor-Targeting Drugs. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, v. 12, n. 1, 2006.

LANG, I.M., BARBAS, C.F., SCHLEEF, R.R. Recombinant rabbit Fab with binding activity to type-1 plasminogen activator inhibitor derived from a phage-display library against human alpha-granules. *Gene*, v. 172, p. 295-8, 1996.

LEVY, J., CRAWFORD, C., HARTMANN, K., HOFMANN-LEHMANN, R., LITTLE, S., SUNDAHL, E., THAYER, V. American Association of Feline Practitioners' feline retrovirus management guidelines. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, v. 10, p. 300-316, 2008.

LEVY, J.K. Feline immunodeficiency virus update. In: Bonagura J (ed), *Current Veterinary Therapy XIII*. 2000. Philadelphia: WB Saunders, pp. 284e288.

LI, Y., KILPATRICK, J., WHITELAM, G.C. Sheep monoclonal antibody fragments generated using a phage display system. *Journal of Immunological Methods*, v. 236, p. 133-46, 2000.

LOWMAN, H. B., WELLS, J. A. Affinity maturation of human growth hormone by monovalent phage display. *Journal of Molecular Biology*, v. 234, p. 564-578, 1993.

LUTZ, H., PEDERSEN, N.C., HARRIS, C.W., HIGGINS, J., THEILEN, G.H. Detection of Feline Leukemia Virus infection. *Feline Practice*, v. 10, n. 4, p. 13-23, 1980.

LUTZ, H., PEDERSEN, N.C., DURBIN, R., THEILEN, G. H. Monoclonal antibodies to three epitopic regions of feline leukemia virus p27 and their use in Enzyme-linked immunosorbent assay of p27. *Journal of Immunological Methods*, v. 56, p. 209-220, 1983a.

LUTZ, H., PEDERSEN, N.C., THEILEN, G.H. Course of feline leukemia virus infection and its detection by enzyme-linked immunosorbent assay and monoclonal antibodies. *American Journal of Veterinary Research*, v. 44, p. 2054–59, 1983b.

LUTZ, H., ADDIE, D., BELÁK, S., BOUCRAUT-BARALON, C., EGBERINK, H., TADEUSZ, F., GRUFFYDD-JONES, T., HARTMANN, K., HOSIE, M. J., LLORET, A., MARSILIO, F., PENNISI, M. G., RADFORD, A. D., Thiry, E., Truyen, U. and Horzinek, M. C. Feline Leukaemia ABCD guidelines on prevention and management. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, v. 11, p. 565-574, 2009.

MADEWELL, B.R., JARRETT, O. Recovery of feline leukaemia virus from nonviraemic cats. *Vet Rec*, v. 112, p. 339–42, 1983.

MARASCO, W. A., SUI, J. The growth and potential of human antiviral monoclonal antibody therapeutics. *Nature*, v. 25, p. 1421-1433, 2007.

MARQUES, C.H. *Aspectos fundamentais à implantação da tecnologia de produção de anticorpos monoclonais humanizados com potencial aplicação terapêutica*. 2005. 109f. Dissertação (Mestrado) - Biologia Celular e Molecular, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.

MARQUET, R. C., ISEL, C., EHRESMANN, B. tRNAs as primer of reverse transcriptases. *Biochimie*, v.77, p.113-124, 1995.

MATHES, L.E., YOHN, D.S., OLSEN, R.G. Purification of infectious feline leukemia virus from large volumes of tissue culture fluids. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 5, n. 3, p. 372-374, 1977.

MENDOZA, R, ANDERSON, M.M., OVERBAUGH, J. A putative thiamine transport protein is a receptor for feline leukemia virus subgroup A. *Journal of Virology*, v. 80, p. 3378-85, 2006.

MOSER, M., BURNS, C.C., BOOMER, S., OVERBAUGH, J. The host range and interference properties of two closely related feline leukemia variants suggest that they use distinct receptors. *Virology*, v. 242, p. 366-77, 1998.

NEIL, J.C. Feline Leukemia and Sarcoma Viruses In: Mahy, B.W.J. van Regenmortel M. H.V. *Encyclopedia of Virology*. Academic Press, 2008. Cap. F, p.185-191.

OLIVEIRA, Y. S. *Evolução in vitro de anticorpos anti-CD3 pela seleção de cadeias leve (VL) humanas por phage display*, 2009. 64f. Tese (Doutorado) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília.

OSAWA, M., OHASHI, K., ONUMA, M. Identification and characterization of peptides binding to New Castle Disease virus by phage display. *Journal of Veterinary Medicine Science*, v. 67, n. 12, p. 1237-1241, 2005.

OVERBAUGH, J. and BANGHAM, C.R.M. Selection forces and constraints on retroviral sequence variation. *Science*, v. 292, p. 1106, 2001.

OVERMAN, S. A., THOMAS, Jr., G. J. Filamentous ssDNA Bacterial Viruses. In: Mahy, B.W.J. van Regenmortel M. H.V. *Encyclopedia of Virology*. Academic Press, 2008. Cap.191-198.

PERRYMAN, L.E., HOOVER, E.A., YOHN, D.S. Immunologic reactivity of the cat: immunosuppression in experimental feline leukemia. *Journal of National Cancer Institute*, v. 49, p. 1357-65, 1972.

QUIGLEY, J.G., BURNS, C.C., ANDERSON, M.M., et al. Cloning of the cellular receptor for feline leukemia virus subgroup C (FeLVC), a retrovirus that induces red cell aplasia. *Blood*, v.95, p. 1093-99, 2000.

RAVAZOLLO, A.P., COSTA, U.M. Retroviridae. In: Flores, E.F. *Virologia Veterinária*. Santa Maria, Editora da UFSM, 2007. Cap. 31, p. 811-836.

REINACHER M, THEILEN G. Frequency and significance of feline leukemia virus infection in necropsied cats. *American Journal of Veterinary Research*, v. 48, p. 939–45, 1987.

REY, M. A. *Investigation into subgroup C FeLV interaction with its host receptor FLVCR1 and the role of FLVCR1 in Diamond Blackfan Anemia*. 2009. 155f. Tese (Doutorado). Universidade de Toronto.

RODI, D.J., MAKOWSKI, L. Phage-display technology — finding a needle in a vast molecular haystack. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 10, p. 87–93, 1999.

ROJKO, J.L., HOOVER, E.A., MATHES, L.E., OLSEN, R.G., SCHALLER, J.P. Pathogenesis of experimental feline leukemia virus infection. *Journal of National Cancer Institute*, v. 63, p. 759–68, 1979.

RUSSEL, M., LOWMAN, H.B., CLARCKSON, T. Introduction to phage display biology and phage display. In: Clarkson, T., Lowman, H.B. *Phage Display: a practical approach*. Oxford: Oxford University Press, 2004, cap. 1, p. 1-26.

SAMBROOK, J; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. In: *Molecular Cloning: a laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SCHORF, R.W., FOON, K. A., BEATTY, S.M., OLDMAN, R. K., MORGAN, A. C.Jr. Human anti-murine immunoglobulin responses in patients receiving monoclonal antibodies therapy. *Cancer Research*, v. 45, p. 879-885, 1985.

SILVERTON, E.W., NAVIA, M.A., DAVIES, D.R. Three-dimensional structure of an intact human immunoglobulin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, v.74, n. 11, p. 5140-5144, 1977.

SMITH, G.P. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science*, v. 228, p. 1315-1317, 1985.

SMITH, P.K., KRHON, R.I., HERMANSON, G.T., MALLIA, A.K., GARTNER, F.H., PROVENZANO, M.D. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem.*, v. 150, p. 76-85, 1985.

SOUZA, H.J.M.; TEIXEIRA, C.H.R.; GRAÇA, R.F.S. Estudo epidemiológico de infecções pelo vírus da leucemia e/ou imunodeficiência felina, em gatos domésticos do município do Rio de Janeiro. *Clini. Vet.*, v.36, p.14-21, 2002.

STEWART, M.A., WARNOCK, M., WHEELER, A. Nucleotide sequences of a feline leukemia virus subgroup A envelope gene and long terminal repeat and evidence

for the recombinational origin of subgroup B viruses. *Journal of Virology*, v. 58, p. 825-34, 1986.

STRANDBERG, L., ENFORS, S. Factors Influencing Inclusion Body Formation in the Production of a Fused Protein in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 57, n. 6, p. 1669-74, 1991.

TEIXEIRA B.M.; RAJÃO, D.S.; HADDAD, J.P.A; LEITE, R.C; REIS, J.K.P. Ocorrência do vírus da imunodeficiência felina e do vírus da leucemia felina em gatos domésticos mantidos em abrigos no município de Belo Horizonte. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 59, n.4, p. 939-947, 2007.

TENORIO AP, FRANTI CE, MADEWELL BR, PERDERSEN NC. Chronic oral infections of cats and their relationship to persistent oral carriage of feline calici-, immunodeficiency, or leukaemia viruses. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 29, p. 1–14, 1991.

TIZARD, I.R. *Imunologia Veterinária: uma introdução*. 5.ed. São Paulo: Editora Roca, 1998. 545p.

TORRES, A.N., MATHIASON, C.K., HOOVER, E.A. Re-examination of feline leukemia virus:host relationships using real-time PCR. *Virology*, v. 332, p. 272–283, 2005.

TORRES, A.N., O'HALLORAN, K.P., LARSON, L.J., SCHULTZ, R.D., HOOVER, E.A. Feline leukemia virus immunity induced by whole inactivated virus vaccination. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 134, p. 122-31, 2010.

VELIZ, R. V. Alternative techniques to obtain monoclonal antibodies at a small scale. Current state and future goals. *Biotechnologia Aplicada*, v.19 (3/4), p. 119-131, 2002.

WAUGH, D.S. Making the most of affinity tags. *Trends in Biotechnology*, v. 23, p. 317-320, 2005.

## VIII. Trabalho Científico

### Trabalho a ser enviado para publicação

#### Journal of Virological Methods

### Cloning and expression of single chain antibody fragments directed against the FeLV major capsid p27 protein

Andreza S. Figueiredo<sup>a</sup>, Sueli A. Taniwaki<sup>a</sup>, Taís F. Cruz<sup>a</sup>, Camilo Bulla<sup>b</sup>, João P. Araújo Jr. <sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Microbiology and Immunology, Biosciences Institute, UNESP, PO Box 510, Botucatu, SP, 18618-000, Brazil.

<sup>b</sup> Department of Patobiology and Population Medicine, College of Veterinary Medicine, Mississippi State University, Starkville, MS 39762, United States.

\*Corresponding author. Tel.: +55 14 3811 6240 fax.: +55 14 3811 6058

E-mail address: [jpessoa@ibb.unesp.br](mailto:jpessoa@ibb.unesp.br) (J.P. Araújo Jr.)

#### Summary

Feline leukemia virus (FeLV) is a retrovirus that infects mainly young domestic cats. In animal clusters, FeLV infection is the largest contributor to mortality. The use of molecular techniques for viral detection has allowed advances with regard to the pathogenicity and response to vaccination. Based on new findings, the diagnosis of infection should be performed first with a screening test for detection of p27 capsid protein, and subsequently confirmed with testing for proviral DNA. For the construction of monoclonal antibody fragments to detect p27 we employed an improved Phage Display system. First, an immune library was built in mouse and the variable region of the light and the heavy genes were amplified and connected by a flexible linker DNA. This single chain variable fragments (scFv) were fused to the pIII protein and displayed on the surface of filamentous phages. After rounds of selection and enrichment against recombinant p27, the scFvs in soluble forms were evaluated for their binding capacity to p27. The scFvs will be employed to the development of an immunoassay for FeLV detection in serum or plasma cat samples.

Keywords: phage display; feline leukemia virus; single chain variable fragment; p27; antibody engineering

Feline leukemia virus (FeLV) is a member of the *Gammaretrovirus* genus that infects domestic cats and wild cats like *Felis silvestris*, and European and Iberian lynxes. The

single-stranded RNA genome is reverse transcribed by reverse transcriptase enzyme into DNA, which is integrated into the host cell genome. Feline leukemia virus exists in the subtypes A, B, C and T, which are defined by their host cell spectrum; antigenically they are closely related (Lutz et al., 2009).

Routine diagnostic screening for FeLV relies on detection of the core viral antigen p27 by ELISA (Lutz et al., 1983), which is produced abundantly in most infected cats. The *gag* gene components present inside granulocytes, lymphocytes and platelets can be detected by Immunofluorescent assay (IFA) (Hardy et al., 1973). Virus isolation test is the test that was originally developed to identify FeLV-infected cats (Fischinger et al., 1974). It is not used in routine due to its complex logistics (Lutz et al., 2009). The PCR reaction can be performed on anticoagulated whole blood to detect provirus (Hofmann-Lehmann et al., 2001). Recent studies using real-time PCR have shown that 5-10% of cats negative on soluble antigen tests were positive for FeLV provirus (Gomes-Keller et al 2006; Hofmann-Lehmann et al 2001). According to the European Advisory Board on Cat Disease (Lutz et al., 2009), cats should be initially tested for p27. If the result is inconclusive for any reason, the test should be repeated by a reliable laboratory, using an alternative method, preferably DNA PCR for provirus.

The FeLV presence in Brazil was detected by immunofluorescent assay in São Paulo, Minas Gerais, Paraná, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul, Pernambuco, Bahia and Ceará States with results ranging from 0 to 34.9% (Hagiwara et al., 2007). Employing a commercial ELISA kit (SNAP combo, IDEXX, Westbrook, USA) that detects p27, 32,5% were positive in Minas Gerais (Teixeira et al., 2007). In the same State, 47,5% were positive by Nested-PCR (Coelho et al., 2008). This data demonstrate how heterogeneous are the information of FeLV frequency in Brazil. Moreover, determining the true prevalence of FeLV infection is difficult because testing is voluntary and results are not collected into a central database. The lack of reliable data and inaccessibility to cheap tests make even more difficult to monitor and segregate positive animals to contain the infection spread.

During the past few years, advances in antibody cloning technology have greatly facilitated the genetic manipulation of antibody fragments. These innovations have permitted the development of a large variety of engineered antibody molecules for research, diagnosis, and therapy (Carmen and Jermutus, 2002). The phage display technique was first described by Smith in 1985. This method relies on a phage display system in which fragments of antibodies are expressed as fusion proteins displayed on the phage surface. The recombinant antibodies obtained from bacteria are cheaper than the hybridoma derived monoclonal antibodies (MAbs). It is also easier to maintain the prokaryotic clones of recombinant antibodies than the hybridoma clones (Bathia et al., 2010).

The aim of this study was to employ the phage display system to generate recombinant antibody fragments against the FeLV major capsid p27 antigen.

The antibody cloning and phage display system employed was developed by Krebber et al. (1997) with the following modifications.

For mouse immune library construction, one mouse from Biozzi high antibody responder line (IV-A) was immunized, according to Barret (1994) protocol, with the Fel-O-Vax LvK Feline Leukemia Vaccine (Fort Dodge, Iowa, USA). The RNA extraction from the mouse spleen was performed with Illustra RNAspin Mini (GE Healthcare, United Kingdom). One microgram of total RNA was reverse transcribed with High Capacity cDNA Archive (Life Technologies, Carlsbad, California, USA)

using separate reactions for the light and the heavy chains with the primers specified by Krebber et al. (1997).

The cDNA was amplified in a mixture containing the PCR primers and GoTaq Green Master Mix (Promega, Madison, Wisconsin, USA). A total of 50 pmol of LB and LF primer mixes were added for amplification of the light chain variable domain gene (VL) or 50 pmol of HB and HF primer mixes were added for amplification of the heavy chain variable domain gene (VH). The PCR program was as follows: denaturation at 92°C for 5 min followed by 7 cycles of 1 min at 92°C, 30 s at 63°C, 50 s at 58°C, and 1 min at 72°C and 23 cycles of 1 min at 92°C, 30 s at 63°C, and 1 min at 72°C. Subsequently, the reaction products were analyzed by electrophoresis running a 7 µl sample on a 1.5% agarose gel.

The purified PCR products of the VL and VH were prepared with the Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Madison, Wisconsin, USA). Approximately 30 ng of each VL and VH DNA was combined by SOE-PCR (splicing by overlap extension). Platinum *Taq* DNA polymerase (Life Technologies, Carlsbad, California, USA) (2.5 U) was added and the solution was kept on ice. The following program was used: denaturation at 94°C for 5 min followed by 5 cycles of 1 min at 94°C, 30 s at 63°C, 50 s at 58°C, and 3 min at 72°C without primers. After adding 10 µmol of the outer primers scback and scfor, we repeated the denaturation at 94°C for 5 min followed by 5 cycles of 30s at 94°C, 1 min at 63°C and 3 min at 72°C. The reaction products were analyzed by electrophoresis as above.

Eight assembly SOE-PCR reactions (50µl each) were performed as above. The PCR products were pooled and precipitated with ethanol as described by Sambrook et al. (1989). The DNA was purified from a 0.8% gel with Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Madison, Wisconsin, USA), and for each 1 µg of gel-purified scFv fragment, 1 U of *Sfi*I was added and incubated at 50°C for 4 h. The concentration of the digested PCR product was determined by comparison with the known amounts of DNA on the ladder (Low DNA Mass Ladder, Life Technologies, Carlsbad, California, USA) in a 1% gel electrophoresis. Eight micrograms of pAK100 was digested with 8 U of *Sfi*I and incubated at 50°C for 4 h. DNA was purified on a 0.8% gel as described above. Three hundred nanograms of the vector was ligated with scFv in a molar ratio of 1:3 (vector to insert) and transformed into *Escherichia coli* strain XL1-Blue (Stratagene, La Jolla, California, USA). The total volume of transformed bacteria was spread on nonexpression medium (NE; 1.6% tryptone, 1.0% yeast extract containing 1% glucose and 25µg of chloramphenicol/ml) plated in dishes (530 cm<sup>2</sup>) and incubated at 37°C for 48h. All colonies were scraped off into 5 ml of NE and stored at -80°C after adding 10% glycerol.

Fifty microliters of the phage culture was inoculated into 25 ml of NE medium and grown at 37°C with shaking. When an optical density at 600 nm (OD<sub>600</sub>) between 0.5 and 1.0 was reached, 10<sup>11</sup> pfu of M13K07 (GE Healthcare, United Kingdom) helper phage (previously propagated and titrated according to manufacturer's instructions), 37.5 µl of 1 M isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) (final IPTG concentration, 0.5 mM), and 50 ml of NE were added and then the culture was shaken at 225 rpm at 26°C overnight for phage production. Two hours after IPTG induction, Kanamycin was added to the culture to reach a final concentration of 30 µg/ml. The next day the culture medium was centrifuged at 4,000 x g at 4°C for 10 min to eliminate bacterial cells. To precipitate the phage particles, 20 ml of 5x polyethylene glycol (PEG)-NaCl (20% PEG 8000, 2.5M NaCl) were added to the supernatant (about 70 ml) and kept on ice for 30 min. Subsequently, another centrifugation step at 10,000 x g at 4°C for 15 min was

performed. The supernatant was poured off and the pellet resuspended in 30 ml of phosphate-buffered saline (PBS). The phage solution was once again mixed with 5.5 ml of 5x PEG–NaCl on ice for 20 min and centrifuged again at 10,000 x g at 4°C for 25 min. The supernatant was discarded and the phage pellet was resuspended in 2 ml of PBS (containing 10% glycerol) for storage at 4–8°C. The phage was either subjected to further panning after titers were determined or used in a phage ELISA to determine phage antibody activity. Only freshly prepared phages were employed for panning in order to optimize binding ability.

The expression vector pGS-21a containing the sequence of the FeLV major core protein p27 was purchased from GenScript Corporation (GenScript, Piscataway, New Jersey, USA). The expressed 6×-His tagged p27 protein was purified by the HisTrap HP 5 ml (GE Healthcare, United Kingdom) according to the manufacturer's instructions.

Twelve wells of MaxiSorp (Nunc, Rochester, New York, USA) plate were coated overnight with 100 µl of a solution containing 5 µg of recombinant p27/ml in carbonate buffer (0.05 M carbonate, pH 9.6) at 4 °C. The next day the wells were washed 3 times with PBS by pouring buffer in and immediately discarding it. For blocking, the plate was filled with PBS containing 10% dry milk and incubated at 37°C for 2 h. The plate was washed 5 times with PBS-T (0.05% Tween 20) followed by 5 times with PBS, then 10<sup>11</sup> pfu of the rescued phages in PBS 2% dry milk was added. The plate was incubated at 37°C for 1 h 30 min, and the unbound phage in the supernatant was discarded. The plate was washed as described above. Two hundred microliters of an acid solution of 0.1 M glycine/HCl (pH 2.2) was used to rescue the bound phages. At first, the solution was added into a well and immediately transferred to another from the first to the twelfth. Subsequently, another 200 µl of the acid solution was added from the first to the twelfth well with an incubation step of 2 min. Both solutions were neutralized by the addition of half of the volume with 1 M Tris (pH 7.4) and kept at 4 °C.

Half of this volume was added to 5 ml of mid-log phase (OD<sub>600nm</sub> of 0.6–0.8) cultures of *E. coli* XL1-Blue. The cells were shaken at 250 rpm at 37°C for 1 h and centrifuged at 3,000 xg for 5 min. The supernatant was carefully discarded, and the cells were resuspended in 500 µl of 2YT. The entire contents were spread onto 5 NE plates (100 µl per plate) and incubated overnight at 25°C. After overnight growth, 1.5 ml of 2YT medium per plate was added and all colonies were scraped off and pooled into microtubes for storage at -80 °C. If a further round of selection was required, 25 ml of NE medium were inoculated with 200 µl of these cells, grew them to an OD<sub>600nm</sub> of 1.0 and proceeded with the phagemid rescue as above.

ELISA plates were coated with 5 µg of recombinant p27 (100 µl/well) in PBS at 4°C, and after coating overnight, the wells were rinsed three times with PBS and blocked with 200 µl of 10% nonfat dry milk in carbonate buffer per well for 2 h at 37°C. For the preparation of phage antibody supernatant to be used as the first antibody in the ELISA, colonies of XL-1 Blue were grown separately in 2 ml of NE at 37°C. After an OD<sub>600nm</sub> of 0.5 was reached, 2 ml of NE, 1 mM IPTG, and 10<sup>9</sup> PFU of M13K07 helper phage were added and the culture was incubated overnight at 26°C with shaking at 225 rpm. Cultures were centrifuged at 3,000 x g at 4°C for 10 min and the supernatant was collected. An equal volume of 0.5% bovine serum albumin (BSA) in PBS (MPBS) was added to the phage supernatants and used directly in the assay. After blocking with 0.5% BSA/PBS, wells were rinsed five times with PBS-T, loaded with 100 µl of phage supernatant prepared as above and incubated for 1.5 h at 37°C. The wells were washed three times for 2 min each with PBS–0.1% Tween 20. We diluted the horseradish peroxidase (HRP)-conjugated anti-M13 antibody (GE healthcare, United Kingdom) in

100  $\mu$ l of 0.5% BSA/PBS (1:5,000) per well and incubated the mixture for 1 h at 37°C. The plates were washed as described above. The substrate was prepared by mixing 1% of 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB, 10 mg/ml), 25  $\mu$ l of 3% hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) and 20 ml of citrate buffer (0.1 M citrate, pH 6.0). One hundred microliters of the substrate was added in into each well and incubated for 15 min at room temperature. The reaction was stopped by adding 50  $\mu$ l of 1 M HCl per well. The plates were read at 450 nm. The clones giving the highest signals against recombinant p27 were chosen for further analysis. The scFv in pAK100 was subcloned into the expression vector pGS-21a (GenScript, Piscataway, New Jersey, USA). The *E. coli* strain BL21 was transformed with pGS-21a harboring the appropriate scFv candidate. The transformant was plated out on an LB plate, incubated overnight at 26°C, and then stored at 4°C. A single colony was inoculated 100 ml of LB (preculture) and incubated at 37°C overnight with shaking at 250 rpm. Three milliliters of the preculture was inoculated in 150 ml of LB medium and the mixture was shook at 180 rpm at 28°C until an  $OD_{600nm}$  of 0.5. For expression induction, 1M IPTG was added to a final concentration of 0.5 mM, and continued shaking for 5 h 30 min. The cells were harvested by centrifugation at 3,500 x g, 4°C for 15 min. To prepare the whole-cell extract, the cell pellet was resuspended in 15 ml of Ligation Buffer (20 mM sodium phosphate, 500 mM NaCl, 20 mM imidazole, pH 7.4), disrupted the cells by sonication (Sonics & Materials Inc., Vibra Cell Newtown, Connecticut, USA) with lysozyme at 10 mg/ml, centrifuged the suspension at 3,500 x g, 4°C for 15 min, and the supernatant containing the single-chain antibody fragment was carefully collected. The solution was filtered through a 0.22- $\mu$ m-pore-size filter and immediately purified over a HisTrap HP 5 ml (GE Healthcare, United Kingdom) following the manufacturer's instructions. The Dot-blot assay was performed by coating the nitrocellulose membrane with 200 ng of purified scFv and incubated at 37 °C for 30 min. The membrane was blocked with tris buffered saline (TBS, 10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl) containing 3% of BSA and incubated with monoclonal anti-FLAG M2-Peroxidase (HRP) (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) antibody diluted 1:2,000 in TBS 0.5% BSA for 1 h. A second assay was performed by coating 200 ng of purified recombinant p27 and incubated with 200 ng of each scFv in TBS 0.5% BSA for 1 h and incubated with monoclonal antibody as above. The membranes were washed with TBS. The blots were developed with a solution containing 100  $\mu$ l of chloronaftol (30 mg/ml), 1 ml methanol, 3  $\mu$ l  $H_2O_2$ , 30% and TBS to a final volume of 5 ml.

After expression in prokaryotic system, the recombinant p27 was purified by its 6x-His tag in affinity chromatography. Fifty nanograms of the purified p27 were submitted to the SNAP Triple Test (IDEXX, Westbrook, Maine, USA) that detects circulating p27 in serum or plasma cat samples. The recombinant p27 demonstrated positive reaction (data not shown) which confirms its similarity with the field p27.

The heavy chain ( $V_H$ ) and the light chain ( $V_L$ ) genes were amplified from the cDNA obtained from the total RNA extracted from the mouse spleen resulting in approximately, 420 bp e 400 bp bands, respectively. An 820 bp scFv DNA was produced by joining  $V_H$  and  $V_L$  DNA fragments and was cloned subsequently to express recombinant phage pIII-ScFv. The critical factor influencing the antibody library yield was the loss of DNA during purification procedures from agarose gels. To overcome this problem, eight times more SOE-PCR reactions were produced, and the recovery of DNA was enough for subsequent manipulations. A scFv antibody library of  $2 \times 10^3$  clones was obtained to select for scFv specific for p27. After three rounds of panning, out of 120 recombinants screened for the expression of anti-p27 ScFv, eleven

were selected by their high signals ( $OD_{600} > 0.3$ ) (Figure 1). The DNA sequence obtained from the eleven fragments revealed two of them to be identical, that indicates a successful enrichment of specific p27 scFv by panning. Their heavy chains were classified as the IgG isotype and the light chain classified as the kappa ( $\kappa$ ) type, which was expected as 95% of the mice immunoglobulins are classified in the  $\kappa$  type (Tizard, 1998).

Two scFv (scFv 9 and scFv 70) with the higher signals were subcloned in an expression system for the production of their soluble form. It was not possible to demonstrate the presence of the scFv with Western blotting experiments (data not shown). However, in dot-blot assay both scFv reacted with the anti-FLAG antibody which recognizes the N-terminal FLAG tag fused to the antibody sequence (Figure 2, A and B). When the recombinant p27 was added to the membrane, both scFv demonstrated a weak reactivity (Figure 3, C and D). We suggest that the presence of a C-terminal GST tag (26 kDa) in both scFv and recombinant p27, added by the expression plasmid, may have sterically compromised the ligation of the anti-FLAG antibody to its epitope. The cleavage and removal of the GST are the next steps to be performed.

The cloning and phage display system employed has several advantages over some previous systems. The extended primer set can incorporate all of the mouse VH and VL sequences collected in the Kabat database (Kabat et al., 1991). The system included a FLAG peptide introduced at the N terminus of the VL chain for purification and detection and SOE-PCR assembly from two rather than three pieces. Incorrect overlaps during assembly PCR were prevented by four (Gly<sub>4</sub>Ser) repeats, encoded by different codons, and *Sfi*I restriction sites that produce two different sticky ends at the same time. This is the only enzyme necessary for directional cloning of the scFv fragments into the phage display vector pAK100, preventing self-dimerization by either insert or vector (Krebber et al., 1997).

In our hands, it was possible to efficiently generate an immune library in mouse and genetically engineer single chain variable antibody fragments (scFv). After rounds of selection in a filamentous phage display system against a recombinant p27 protein, two scFv were chosen for the production in a soluble form. Both of them recognized the p27 as demonstrated in the dot-blot assay. Further improvements are necessary to obtain scFv suitable for the detection of p27 from serum or plasma samples by immunoassay.

This work was supported by Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), protocol number 07/58262-0. We would like to thank Dr. Plückthun for kindly provide the pAK 100 plasmid.

Barrett, C.H. 1994. Hybridomas and Monoclonal Antibodies, in: Malik, V.S., Lillehoj, E.P. Antibody Techniques. Academic Press, Inc, California, p.71-102.

Bhatia, S., Gangil, R., Gupta, D.S., Sood, R., Pradhan, H.K., Dubey, S.C., 2010. Single-chain fragment variable antibody against the capsid protein of bovine immunodeficiency virus and its use in ELISA. *Journal of Virological Methods*, 167 (1), 68-73.

Carmen, S., Jermutus, L., 2002. Concepts in antibody phage display. *Briefings in Functional Genomics and Proteomics*, 1(2), 189–203.

Coelho, F.M., Bomfim, M.R.Q., Caxito, F.A., Ribeiro, N.A., Luppi, M.M., Costa, E.A., Oliveira, M.E., Fonseca, F.G., Resende, M., 2008. Naturally occurring feline leukemia virus subgroup A and B infections in urban domestic cats. *Journal of General Virology*, 89, 2799–2805.

- Fischinger, P.J., Blevins, C.S., Nomura, S., 1974.** Simple Quantitative Assay for Both Xenotropic Murine Leukemia and Ecotropic Feline Leukemia Viruses. *Journal of Virology*, 14 (1), 177-179.
- Gomes-Keller, M.A., Gonczi, E., Tandon, R., Riondato, F., Hofmann-Lehmann, R., Meli, M.L., Lutz, H., 2006. Detection of feline leukemia virus RNA in saliva from naturally infected cats and correlation of PCR results with those of current diagnostic methods. *Journal of Clinical Microbiology*, 44, 916–22.
- Hagiwara, M.K., Junqueira-Jorge, J., Stricagnolo, C., 2007.** Infecção pelo vírus da leucemia felina em gatos de diversas cidades do Brasil. *Clínica Veterinária*, 66, 44-50.
- Hardy Jr., W.D., Old, L.J., Hess, P.W., Essex, M., Cotter, S., 1973. Horizontal transmission of feline leukaemia virus. *Nature*, 244, 266–269.
- Hofmann-Lehmann, R., Huder, J.B., Gruber, S., Boretti, F., Sigrist, B., Lutz, H., 2001. Feline leukaemia provirus load during the course of experimental infection and in naturally infected cats. *Journal of General Virology*, 82, 1589–1596.
- Kabat, E.A., Wu, T.T., Reid-Miller, M., Perry, H.M., Gottesman, K.S., Foeller, C. 1991. Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5<sup>th</sup> ed. US Department of Health and Human Services, Public Service, NIH, Washington.
- Krebber, A., Bornhauser, S., Burmester, J., Honegger, A., Willuda, J., Bosshard, H.R., Plückthun, 1997. Reliable cloning of functional antibody variable domains from hybridomas and spleen cell repertoires employing a reengineered phage display system. *Journal of Immunological Methods*, 201, 35 – 55.
- Lutz, H., Addie, D., Belák, S., Boucraut-Baralon, C., Egberink, H., Tadeusz, F., Gruffydd-Jones, T., Hartmann, K., Hosie, M. J., Lloret, A., Marsilio, F., Pennisi, M. G., Radford, A. D., Thiry, E., Truyen, U. and Horzinek, M. C., 2009. Feline Leukaemia ABCD guidelines on prevention and management. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 11, 565-574.
- Lutz, H., Pedersen, N.C., Durbin, R., Theilen, G. H., 1983. Monoclonal antibodies to three epitopic regions of feline leukemia virus p27 and their use in Enzyme-linked immunosorbent assay of p27. *Journal of Immunological Methods*, 56, 209-220.
- Sambrook, J, Fritsch, E.F., Maniatis, T., 1989. *Molecular Cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Smith, G.P., 1985. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science*, 228, 1315-1317.
- Teixeira, B.M., Rajão, D.S., Haddad, J.P.A., Leite, R.C., Reis, J.K.P., 2007. Ocorrência do vírus da imunodeficiência felina e do vírus da leucemia felina em gatos domésticos mantidos em abrigos no município de Belo Horizonte. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 59(4), 939-947.
- Tizard, I.R., 1998. *Imunologia Veterinária: uma introdução*, fifth ed. Editora Roca, São Paulo.

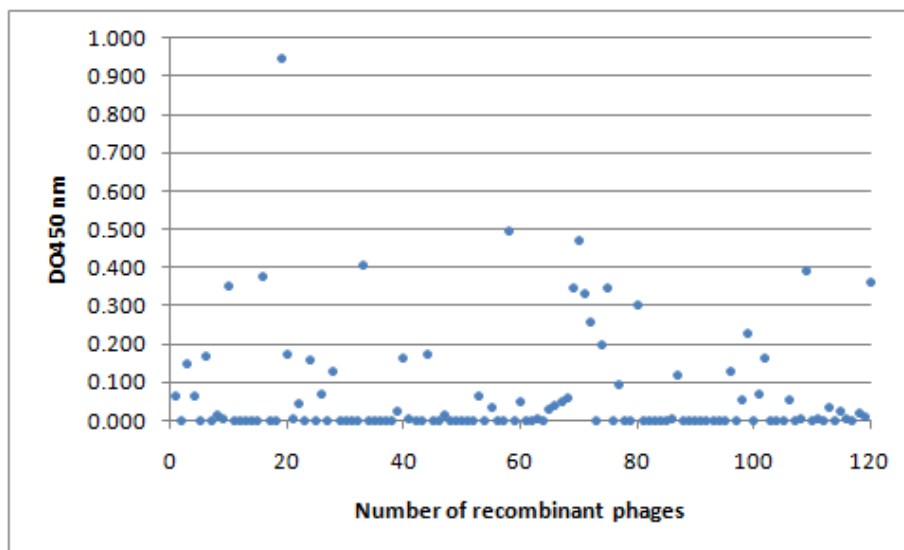


Figure 1. Performance of the 120 recombinant phages screened for binding with recombinant p27 by phage ELISA. Each point represents the ELISA signal from an individual clone isolated after the third round of panning. The bound phages were detected with horseradish peroxidase (HRP)-conjugated anti-M13 antibody (GE healthcare, United Kingdom). Plates were read at 450 nm.

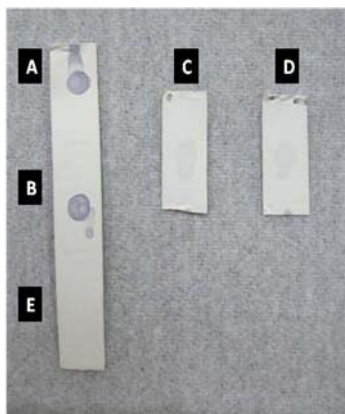


Figure 2. Dot-blot of scFv antibody detected with an anti-FLAG antibody (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA). A and B: nitrocellulose membrane was sensitized with scFv 9 and 70 purified by affinity chromatography, respectively. C and D: nitrocellulose membrane was sensitized with recombinant p27 and incubated with scFv 9 and scFv 70, respectively. E: nitrocellulose membrane was sensitized with extract of induced bacteria containing the expression vector without insert.

## Journal of Virological Methods

### Guide for authors

#### **Introduction**

*The Journal of Virological Methods* publishes original papers and invited reviews covering techniques on all aspects of virology. These include methods for studying the morphology, assembly, replication, composition, function and physicochemical properties of viruses and their components; the purification of viruses and their components; cultivation; properties of viral antigens, production of antibody, and techniques for studying the immune response to virions, viral subunits, and components; the detection and identification of viruses and viral infections; assay of viruses and viral infectivity and the investigation of transmission and pathogenicity; and methods for investigating the suppression or inhibition of viral growth.

#### **Types of paper**

**Research articles** should generally not exceed 25 typewritten pages and should be divided into Summary (on a separate sheet and not exceeding 200 words, followed by 3-6 keywords). Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, Acknowledgements and References.

**Short communications**, approx. 12 typewritten pages, with a Summary and keywords but without section headings.

**Book reviews or meeting reports** will be published following invitation from, or by authors first contacting, the Editor-in-Chief, Arie J. Zuckerman:

Arie J. Zuckerman

Email: [j.v.meth@medsch.ucl.ac.uk](mailto:j.v.meth@medsch.ucl.ac.uk)

Tel: +44 (0) 20 7830 2579

Fax: +44 (0) 20 7830 2070

Please note there are different Instructions to Authors for VIROLOGY PROTOCOLS. These are included at the end of the "Preparation" section.

#### **Page charges**

This journal has no page charges.

#### **Ethics in Publishing**

For information on Ethics in Publishing and Ethical guidelines for journal publication

see <http://www.elsevier.com/publishingethics> and <http://www.elsevier.com/ethicalguidelines>.

#### **Ethical Policy: human subjects and animals**

The research described in papers submitted to the *Journal of Virological Methods* that involve the use of human beings, including healthy volunteers, must adhere to the principles of the Declaration of Helsinki as well as to Title 45, U.S. Code of Federal Regulations, Part 46, Protection of Human Subjects, Revised November 13, 2001, effective December 13, 2001. Research involving animals must adhere to the American Physiological Society's Guiding Principles in the Care and Use of Animals. All investigations involving humans or animals that are reported in the journal must be conducted in conformity with these principles, and that a statement of protocol approval from an \* IRB or \* \* IACUC or equivalent is included in the methods section of the paper. Manuscripts reporting the results of experiments on human subjects, including healthy volunteers, must include a statement that informed consent was obtained.

\* IRB = Institutional Review Board

\* \* IACUC = Institutional Animal Care and Use Committee

#### **Conflict of interest**

All authors are requested to disclose any actual or potential conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations within three years of beginning the submitted work that could inappropriately influence, or be perceived to influence, their work. See

also <http://www.elsevier.com/conflictsofinterest>.

#### **Submission declaration and verification**

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection software iThenticate. See

also <http://www.elsevier.com/editors/plagdetect>.

#### **Changes to authorship**

This policy concerns the addition, deletion, or rearrangement of author names in the authorship of accepted manuscripts:

*Before the accepted manuscript is published in an online issue:* Requests to add or remove an author, or to rearrange the author names, must be sent to the Journal Manager from the corresponding author of the accepted manuscript and must include: (a) the reason the name should be added or removed, or the author names rearranged and (b) written confirmation (e-mail, fax, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed. Requests that are not sent by the corresponding author will be forwarded by the Journal Manager to the corresponding author, who must follow the procedure as described above. Note that: (1) Journal Managers will inform the Journal Editors of any such requests and (2) publication of the accepted manuscript in an online issue is suspended until authorship has been agreed.

*After the accepted manuscript is published in an online issue:* Any requests to add, delete, or rearrange author names in an article published in an online issue will follow the same policies as noted above and result in a corrigendum.

### **Copyright**

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (for more information on this and copyright see <http://www.elsevier.com/copyright>). Acceptance of the agreement will ensure the widest possible dissemination of information. An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations (please consult <http://www.elsevier.com/permissions>). If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: please consult <http://www.elsevier.com/permissions>.

### **Retained author rights**

As an author you (or your employer or institution) retain certain rights; for details you are referred to: <http://www.elsevier.com/authorsrights>.

### **Role of the funding source**

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the paper for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated. Please see <http://www.elsevier.com/funding>.

### **Funding body agreements and policies**

Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors whose articles appear in journals published by Elsevier, to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>.

### **Open access**

This journal offers you the option of making your article freely available to all via the ScienceDirect platform. To prevent any conflict of interest, you can only make this choice after receiving notification that your article has been accepted for publication. The fee of \$3,000 excludes taxes and other potential author fees such as color charges. In some cases, institutions and funding bodies have entered into agreement with Elsevier to meet these fees on behalf of their authors. Details of these agreements are available at <http://www.elsevier.com/fundingbodies>. Authors of accepted articles, who wish to take advantage of this option, should complete and submit the order form (available at <http://www.elsevier.com/locate/openaccessform.pdf>). Whatever access option you choose, you retain many rights as an author, including the right to post a revised personal version of your article on your own website. More information can be found here: <http://www.elsevier.com/authorsrights>.

### **Language and language services**

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these) avoid the use of split infinitives, and do not use the first person pronoun. Authors who require information about language editing and copyediting services pre- and post-submission please visit <http://www.elsevier.com/languageediting> or our customer support site at <http://epsupport.elsevier.com> for more information.

## Submission

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts source files to a single PDF file of the article, which is used in the peer-review process. Please note that even though manuscript source files are converted to PDF files at submission for the review process, these source files are needed for further processing after acceptance. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, takes place by e-mail removing the need for a paper trail.

## Referees

Please submit, with the manuscript, the names, addresses and e-mail addresses of 3 potential referees. Note that the editor retains the sole right to decide whether or not the suggested reviewers are used.

## Use of wordprocessing software

It is important that the file be saved in the native format of the wordprocessor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the wordprocessor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with

Elsevier: <http://www.elsevier.com/guidepublication>). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic illustrations.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the "spell-check" and "grammar-check" functions of your wordprocessor.

## Article structure

### **Subdivision - numbered sections**

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to "the text". Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

### **Introduction**

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

### **Material and methods**

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

### **Results**

Results should be clear and concise.

### **Discussion**

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. The Results and Discussion section must be written separately. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

### **Conclusions**

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

### **Appendices**

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

## Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name, and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that telephone and fax numbers (with country and area code)**

**are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address. Contact details must be kept up to date by the corresponding author.**

- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a "Present address" (or "Permanent address") may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

### **Abstract**

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

### **Graphical abstract**

A Graphical abstract is optional and should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership online. Authors must provide images that clearly represent the work described in the article. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files.

See <http://www.elsevier.com/graphicalabstracts> for examples.

### **Highlights**

Highlights are a short collection of bullet points that convey the core findings of the article. Highlights are optional and should be submitted in a separate file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters per bullet point including spaces).

See <http://www.elsevier.com/highlights> for examples.

### **Keywords**

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, "and", "of"). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

### **Abbreviations**

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article. Avoid the excessive use of abbreviations in the text and do not use unconventional acronyms.

### **Acknowledgements**

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

#### *Nomenclature and units.*

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other quantities are mentioned, give their equivalent in SI.

#### *Virus nomenclature.*

Each virus should be identified at least once, preferably in the 'Introduction' or 'Materials and Methods' section, using formal family, genus, and species terms and where possible by using a precise strain designation term as developed by an internationally recognized specialty group or culture collection. Please note that the word type is not used before species designations that include a number. Formal terms used for virus families, genera, and species should be those approved by the International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV): Fauquet, C.M., Mayo, M.A., Maniloff, J., Desselberger, U., and Ball, L.A. (2005) *Virus Taxonomy, Classification and Nomenclature of Viruses*. Eighth ICTV Report, Academic Press, an imprint of Elsevier. This volume also includes standard abbreviations for species. Once formal taxonomic names have been given in a paper, vernacular terms may be used.

#### *Formal taxonomic nomenclature*

In formal taxonomic usage, the first letters of virus order, family, subfamily, genus and species names are capitalized and the terms are printed in italics. Other words in the species names are not capitalized unless they are proper nouns or parts of nouns, for example *West Nile virus*. In formal usage, the name of the taxon should precede the term for the taxonomic unit; for example; "the family *Paramyxoviridae*," "the genus *Morbillivirus*."

The following represent examples of full formal taxonomic terminology:

1. Order Mononegavirales, family Rhabdoviridae, genus Lyssavirus, species Rabies virus.
2. Family Poxviridae, subfamily Chordopoxvirinae, genus Orthopoxvirus, species Vaccinia virus.
3. Family Picornaviridae, genus Enterovirus, species Poliovirus.
4. Family Bunyaviridae, genus Tospovirus, species Tomato spotted wilt virus.

#### *Vernacular Taxonomic Nomenclature*

In formal vernacular usage, virus order, family, subfamily, genus and species names are written in lower case Roman script: they are not capitalized, nor are they printed in italics or underlined. In informal usage, the name of the taxon should not include the formal suffix, and the name of the taxon should follow the term for the taxonomic unit; for example "the picornavirus family, the enterovirus genus." One particular source of ambiguity in vernacular nomenclature lies in the common use of the same root terms in formal family, genus or species names. Imprecision stems from not being able to easily identify in vernacular usage which hierarchical level is being cited. For example, the vernacular name "*paramyxovirus*" might refer to the family *Paramyxoviridae*, or one species in the genus *Respirovirus*, such as *Human parainfluenza virus 1*. The solution in vernacular usage is to avoid "jumping" hierarchical levels and to add taxon identification wherever needed. For example, when citing the taxonomic placement of *Human parainfluenza virus 1*, taxon identification should always be added: *Human Parainfluenza virus 1* is a species in the genus *Respirovirus*, family *Paramyxoviridae*. In this example, as is usually the case, adding the information that this virus is also a member of the subfamily *Paramyxovirinae* and the order *Mononegavirales* is unnecessary.

It should be stressed that italics and capital initial letters need be used only if the species name refers to the taxonomic category. When the name refers to viral objects such as virions present in a preparation or seen in an electron micro

#### **Database linking and Accession numbers**

Elsevier aims at connecting online articles with external databases which are useful in their respective research communities. If your article contains relevant unique identifiers or accession numbers (bioinformatics) linking to information on entities (genes, proteins, diseases, etc.) or structures deposited in public databases, then please indicate those entities according to the standard explained below.

Authors should explicitly mention the *database abbreviation (as mentioned below) together with the actual database number*, bearing in mind that an error in a letter or number can result in a dead link in the online version of the article.

Please use the following format: **Database ID: xxxx**

Links can be provided in your online article to the following databases (examples of citations are given in parentheses):

- [GenBank](#): Genetic sequence database at the National Center for Biotechnical Information (NCBI) (GenBank ID: BA123456)
- [PDB](#): Worldwide Protein Data Bank (PDB ID: 1TUP)
- [CCDC](#): Cambridge Crystallographic Data Centre (CCDC ID: AI631510)
- [TAIR](#): The Arabidopsis Information Resource database (TAIR ID: AT1G01020)
- [NCT](#): ClinicalTrials.gov (NCT ID: NCT00222573)
- [OMIM](#): Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM ID: 601240)
- [MINT](#): Molecular INTeractions database (MINT ID: 6166710)
- [MI](#): EMBL-EBI IntAct database for Molecular Interactions (MI ID: 0218)
- [UniProt](#): Universal Protein Resource Knowledgebase (UniProt ID: Q9H0H5)

#### **Footnotes**

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article, using superscript Arabic numbers. Many wordprocessors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

##### *Table footnotes*

Indicate each footnote in a table with a superscript lowercase letter.

#### **Artwork**

##### ***Electronic artwork***

##### *General points*

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Save text in illustrations as "graphics" or enclose the font.
- Only use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times, Symbol.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Produce images near to the desired size of the printed version.
- Submit each figure as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website:

☞ <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

**You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.**

#### *Formats*

Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalised, please "save as" or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS: Vector drawings. Embed the font or save the text as "graphics".

TIFF: color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi.

TIFF: Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.

TIFF: Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required.

DOC, XLS or PPT: If your electronic artwork is created in any of these Microsoft Office applications please supply "as is".

#### **Please do not:**

- Supply files that are optimised for screen use (like GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

#### **Color artwork**

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF, EPS or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color on the Web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color in print or on the Web only. For further information on the preparation of electronic artwork, please

see ☞ <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Please note: Because of technical complications which can arise by converting color figures to "gray scale" (for the printed version should you not opt for color in print) please submit in addition usable black and white versions of all the color illustrations.

#### **Figure captions**

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

#### **Tables**

Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text. Place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript lowercase letters. Avoid vertical rules. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article.

#### **References**

##### **Citation in text**

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either "Unpublished results" or "Personal communication" Citation of a reference as "in press" implies that the item has been accepted for publication.

##### **Web references**

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

##### **References in a special issue**

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

##### **Reference style**

*Text:* All citations in the text should refer to:

1. *Single author:* the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
2. *Two authors:* both authors' names and the year of publication;
3. *Three or more authors:* first author's name followed by "et al." and the year of publication.

Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references should be listed first alphabetically, then chronologically.

Examples: "as demonstrated (Allan, 1996a, 1996b, 1999; Allan and Jones, 1995). Kramer et al. (2000) have recently shown ..."

*List:* References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary.

More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters "a", "b", "c", etc., placed after the year of publication.

*Examples:*

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2000. The art of writing a scientific article. *J. Sci. Commun.* 163, 51–59.

Reference to a book:

Strunk Jr., W., White, E.B., 1979. *The Elements of Style*, third ed. Macmillan, New York.

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G.R., Adams, L.B., 1999. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*. E-Publishing Inc., New York, pp. 281–304.

### **Journal abbreviations source**

Journal names should be abbreviated according to

Index Medicus journal abbreviations: <http://www.nlm.nih.gov/tsd/serials/lji.html>;

List of serial title word abbreviations: <http://www.issn.org/2-22661-LTWA-online.php>;

CAS (Chemical Abstracts Service): <http://www.cas.org/sent.html>.

### **Video data**

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research.

Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 50 MB. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including

ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

### **Supplementary data**

Elsevier accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research.

Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including

ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please provide the data in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

### **Submission checklist**

The following list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

**Ensure that the following items are present:**

One Author designated as corresponding Author:

- E-mail address
- Full postal address
- Telephone and fax numbers

All necessary files have been uploaded

- Keywords
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes)

Further considerations

- Manuscript has been "spellchecked" and "grammar-checked"
- References are in the correct format for this journal
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Web)
- Color figures are clearly marked as being intended for color reproduction on the Web (free of charge) and in print or to be reproduced in color on the Web (free of charge) and in black-and-white in print
- If only color on the Web is required, black and white versions of the figures are also supplied for printing purposes

For any further information please visit our customer support site at <http://support.elsevier.com>.

### **Virology Protocols**

Protocols are to be submitted in the same way as regular articles

## Organization of a Protocol

### *Title page:*

The title page should contain the following items: (i) complete title (preferably no chemical formulas or arbitrary abbreviations); (ii) full names of all authors; (iii) complete affiliations of all authors; (iv) the number of text pages of the whole manuscript (including figures and tables) and the number of figures and tables; (v) the name and complete address of the corresponding author (including telephone number, facsimile number and electronic mail address); (vi) acknowledgements.

### **Abstract:**

This should provide a concise description of the purpose of the Protocol and should not exceed 200 words.

### *Keywords:*

Please provide 3 - 6 keywords.

### *Type of research:*

In this section, relevant published studies should be described concisely in list form preceded by Roman lower case numeral characters. The published studies should be appropriately cited.

### *Time required.*

An estimation of the time required to run the protocol should be given per separate step and for the whole protocol.

### *Materials*

The materials used should be described in sufficient detail for the protocol to be replicated. Animals used should include information on breed, breeder, sex, age, weight and the maintenance conditions. Furthermore, this section should be divided into two subsections: (i) Special equipment and (ii) Chemicals and reagents. Any special equipment required should be mentioned, including details of model type/number and (international) supplier. The source or supplier of any special equipment should also be stated, in parentheses, after mentioning the equipment for the first time. A listing (preceded by dashes) of chemicals and reagents used in the protocol, should be provided, if applicable. Special chemicals and drugs with their sources or suppliers should be grouped under a separate subheading ("Chemicals" or "Drugs"). For drugs, generic names should be used; trade names may be given in brackets where the drug is first mentioned. In case of new drugs or chemicals, a full chemical description (formula) should be given. The form of the drug used should be indicated.

### *Detailed procedure.*

This section should include an extensive, detailed and stepwise description of the procedures used. The individual steps should be described in list form preceded by Roman lower case numeral characters and correspond with the steps described under Quick procedure. All companies from which chemicals or materials were obtained should be listed with their full address.

### *Results.*

In this section the expected results should be described clearly and concisely, and in logical order without extended discussion of their significance. Results should usually be presented descriptively and be supplemented by photographs or diagrams.

### *Discussion.*

This section should present an assessment of the protocol, problems which may be encountered, and alternative or support protocols. This section should be divided into two parts: (i) Trouble-shooting and (ii) Alternative and Support Protocols. Troubleshooting: Problems that may have been encountered during any of the procedures should be discussed clearly and concisely, and suitable solutions suggested. Alternative methods for replacing certain steps in the protocol should be mentioned in sufficient detail, and clearly indicating at which point in the protocol they should be applied. Alternative and Support Protocols: If applicable, alternative or support protocols should be mentioned, clearly stating the advantages and disadvantages of such protocols and be accompanied by appropriate citation of the literature.

### *Essential literature references.*

This should mention certain essential reading divided into original papers, book chapters and review papers. Do not cite the full reference, but just list the reference number. All references cited in the text should be listed at the end of the manuscript, arranged in alphabetical order of the author's surname.

### *Quick procedure.*

This section should describe the protocol in a concise, stepwise manner. The individual steps should be described in list form preceded by roman lower case numeral characters and correspond with the steps described under Detailed procedure. This section should contain basic, essential information for the protocol to be replicated successfully.

#### *Illustrations.*

Follow the standard article guidelines for instructions on illustrations.

### **After Acceptance**

#### **Use of the Digital Object Identifier**

The Digital Object Identifier (DOI) may be used to cite and link to electronic documents. The DOI consists of a unique alpha-numeric character string which is assigned to a document by the publisher upon the initial electronic publication. The assigned DOI never changes. Therefore, it is an ideal medium for citing a document, particularly 'Articles in press' because they have not yet received their full bibliographic information. The correct format for citing a DOI is shown as follows (example taken from a document in the journal *Physics Letters B*): doi:10.1016/j.physletb.2010.09.059

When you use the DOI to create URL hyperlinks to documents on the web, they are guaranteed never to change.

#### **Proofs**

One set of page proofs (as PDF files) will be sent by e-mail to the corresponding author (if we do not have an e-mail address then paper proofs will be sent by post) or, a link will be provided in the e-mail so that authors can download the files themselves. Elsevier now provides authors with PDF proofs which can be annotated; for this you will need to download Adobe Reader version 7 (or higher) available free from <http://get.adobe.com/reader>. Instructions on how to annotate PDF files will accompany the proofs (also given online). The exact system requirements are given at the Adobe site: <http://www.adobe.com/products/reader/systemregs>.

If you do not wish to use the PDF annotations function, you may list the corrections (including replies to the Query Form) and return them to Elsevier in an e-mail. Please list your corrections quoting line number. If, for any reason, this is not possible, then mark the corrections and any other comments (including replies to the Query Form) on a printout of your proof and return by fax, or scan the pages and e-mail, or by post. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Therefore, it is important to ensure that all of your corrections are sent back to us in one communication: please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility. Note that Elsevier may proceed with the publication of your article if no response is received.

#### **Offprints**

The corresponding author, at no cost, will be provided with a PDF file of the article via e-mail. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. The PDF file is a watermarked version of the published article and includes a cover sheet with the journal cover image and a disclaimer outlining the terms and conditions of use.

#### **Author Inquiries**

For inquiries relating to the submission of articles (including electronic submission where available) please visit this journal's homepage. You can track accepted articles at <http://www.elsevier.com/trackarticle> and set up e-mail alerts to inform you of when an article's status has changed. Also accessible from here is information on copyright, frequently asked questions and more. Contact details for questions arising after acceptance of an article, especially those relating to proofs, will be provided by the publisher.