

UTILIZAÇÃO DA LEVEDURA *Pichia pastoris* COMO SISTEMA DE EXPRESSÃO DA GLICOPROTEÍNA S1 DO VIRUS DA BRONQUITE INFECCIOSA AVIÁRIA

**FINGER, Paula Fonseca¹; CERQUEIRA, Michele Pepe¹; DUMMER, Luana¹;
CONCEIÇÃO, Fabricio Rochedo¹; ESTEVES, Paulo Augusto²; HÜBNER,
Silvia de Oliveira³**

¹Universidade Federal de Pelotas - paulaafinger@hotmail.com

²Embrapa Suínos e Aves, Concórdia - SC

³Universidade Federal de Pelotas - sohubner@yahoo.com.br

1. INTRODUÇÃO

O vírus da bronquite infecciosa (VBI) é um coronavírus de aves domésticas (*Gallus gallus*), e se notabiliza por ser o agente etiológico da bronquite infecciosa (BI), mais comumente conhecida como bronquite infecciosa das aves. O VBI é altamente contagioso e um dos principais agentes de perdas econômicas na avicultura, afetando o desempenho de aves de postura e corte. O vírus além de causar problemas no trato respiratório, pode replicar em diversos tecidos do trato digestivo, além de rins, testículos e ovidutos (PENA et al., 2005).

O VBI é um membro da família *Coronaviridae*, constituído por um genoma composto por um RNA de fita simples e sentido positivo com 27,6 kb que codifica a produção de quatro proteínas estruturais, identificadas como a glicoproteína de espícula (S) que se subdivide em S1 e S2, a glicoproteína integral de membrana (M), a proteína pequena de membrana (E) e proteína fosforilada de nucleocapsídeo (N) (CAVANAGH, 2007). A S1 é responsável pela infectividade viral e possui determinantes antigênicos que induzem a formação de anticorpos neutralizantes. Essa proteína possui um papel crucial para a indústria avícola, uma vez que é a principal indutora da resposta imune protetora contra a infecção pelo VBI, sendo por isto de fundamental importância na imunoprofilaxia (CAVANAGH et al., 1992). Por essas características e por sofrer muitas variações ela é a base dos testes de diagnósticos que têm sido utilizados para identificar e caracterizar diferenças entre cepas virais (KEELER et al., 1998; COOK et al., 1999).

A levedura haplóide e metilotrófica *Pichia pastoris*, utilizada como sistema de expressão de proteínas heterólogas, têm recebido destaque nas últimas décadas (TORRES; MORAES, 2000). A utilização desta levedura proporciona vantagens com relação aos sistemas de expressão procariotos, mantendo a fácil manipulação genética associada ao crescimento rápido em meios de cultivo relativamente simples, permitindo a sua expansão para a produção de proteínas em escalas industriais, além de possuir um forte promotor induzível por metanol (CEREGHINO; CREGG, 2000). O presente estudo descreve a clonagem e expressão da glicoproteína S1 do VBI em *Pichia pastoris*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Propagação viral e preparação do RNA

A estirpe vacinal de referência Massachusetts 41 (M 41- CNPSA – EMBRAPA – Concórdia, SC) do VBI foi propagada em ovos embrionados SPF com 9 dias de incubação, na cavidade córion-alantoide (CA), sendo o líquido colhido e estocado a -70°C, até o momento do uso. O ácido nucléico das amostras obtido de suspensões oriundas do LCA foi extraído com a utilização de Trizol® LS Reagent (Invitrogen™), de acordo com as recomendações do fabricante.

Amplificação do gene S1 por RT-PCR

A partir do RNA viral extraído da suspensão de LCA infectado com a estirpe M41 do VBI, foi obtido o cDNA por transcrição reversa (RT), usando oligonucleotídeo randômico para, em seguida, ser amplificada pela reação em cadeia da polimerase (PCR) toda a *orf* do gene da glicoproteína S1. Com base na sequência do gene da proteína S1 da estirpe M41 do VBI (“GenBank” nº de acesso- M21883) foram desenhados os primers forward (5'-cgggaattcctgctttgtatgacagt-3') e reverse (5'-ccggtacctaataatgtaaaactgg-3') para a completa amplificação do gene que codifica para a proteína desejada e o DNA foi submetido a PCR conforme descrito por FINGER (2010).

Clonagem do gene da glicoproteína S1

O produto amplificado contendo o inserto na posição correta de leitura (“in frame”) – 1.580 pb, a ser subclonado no vetor de expressão em leveduras pPICZ B, foi purificado através da utilização do “kit” comercial GFX PCR DNA e Gel Band Purification Kit (GE Healthcare, USA), de acordo com as especificações do fabricante. O produto do PCR e o vetor de expressão pPICZ B foram digeridos com enzimas de restrição *KpnI* e *EcoRI*, e então ligados com T4 DNA ligase. O plasmídeo resultante pPICZB/S1 foi transformado em cepa TOP10F de *E. coli* por choque térmico. Os transformantes foram selecionados em placas com meio Luria Bertani. Aproximadamente 60 colônias resistentes à zeocina foram obtidas. Dessas, metade foi escolhida para o *screening* e posterior extração de plasmídeo, resultando em sete recombinantes contendo o vetor com o gene S1 inserido corretamente.

Transformação em Pichia pastoris

O plasmídeo recombinante pPICZB/S1 foi propagado em *E. coli*, purificado e posteriormente linearizado com a enzima de restrição *PmeI* (New England Biolabs). A precipitação do DNA foi realizada de acordo com o manual *Invitrogen EasySelect Pichia Expression Kit*. A cepa KM71H de *P. pastoris* com fenótipo Mut^S foi cultivada em meio YPD (extrato de levedura 1% , peptona 2% e D-glucose 2%) por 18 horas em agitador orbital a 28°C até a densidade óptica de aproximadamente 1,3 a 600 nm. As células competentes foram preparadas e então transformadas por eletroporação (25 F, 200,2 kV) com 10 µg de pPICZB/S1 linearizado. Após 1 hora da transformação, 100 e 200 µl do volume de 1 mL da célula transformada contendo sorbitol a 1M, foi espalhado em placa para o crescimento em meio YPDS contendo 500 µg/mL de zeocina e por fim incubados a 28°C durante 4 dias. Cento e sessenta colônias foram selecionadas e repicadas em placas contendo YPD.

Colony blotting

Para o teste Colony blotting, as colônias foram repicadas em meio BMMY e incubadas a 28°C por 6 dias, sendo adicionado 0,5% de Metanol absoluto a cada 24 horas no topo das placas para a indução da expressão. No final da indução, as colônias foram transferidas para a membrana de nitrocelulose por 3 horas a 28°C e as mesmas foram bloqueadas com 0,5% de leite em pó diluído em PBS-T e incubadas com agitação leve. Após, foram feitas lavagens e adicionou-se o anticorpo Anti-6xHIS, deixando as membranas em agitação leve por 1 hora. Passado o período, novas lavagens foram feitas e adicionado o conjugado Anti-camundongo, que foi deixado também em agitação por 1 hora. As colônias recombinantes foram detectadas por revelação com SIGMA FAST™ DAB.

Dot blotting

Os recombinantes selecionados no colony blotting foram cultivados em meio líquido BMMY. Primeiramente os clones foram crescidos em meio BMGY e após foi realizada a troca de meio com redução de 5X do volume para BMMY, as quais foram induzidas com 0,5% de metanol absoluto durante 6 dias, com coleta de sobrenadante a cada 24 horas. Ao final da indução os cultivos foram centrifugados e 6 µl do sobrenadante foi testado em membrana de nitrocelulose como descrito no *colony blotting*.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

A amplificação do gene da glicoproteína S1 correspondeu á esperada, de 1.580 pb. A construção do vetor pPICZB/S1 foi utilizada para transformar em cepa TOP10F de *E. coli*, resultando em muitas colônias, sendo que sete foram confirmadas por *screening* como recombinantes resistentes à zeocina. Após a transformação em *Pichia pastoris*, foi realizado PCR de colônia com os mesmos primers utilizados na amplificação do gene, confirmando os recombinantes, os quais foram induzidos para expressão da proteína em meio líquido.

O Dot blotting confirmou a expressão da proteína S1 por dois recombinantes que secretaram a proteína e foram equivalentes aos controles positivos utilizados no teste.

Esses resultados serão futuramente utilizados a fim de testar a proteína oriunda do sistema eucarioto de expressão como diagnóstico imunológico da Bronquite Infecciosa, bem como a possível elaboração de uma vacina de subunidade contendo a principal indutora de imunidade, a glicoproteína S1, uma vez que uma das grandes problemáticas está relacionada com o aparecimento de novas cepas antigenicamente diferentes do sorotipo vacinal (Massachusetts), o que pode resultar em falha da vacina em indução de proteção total.

4. CONCLUSÕES

O trabalho demonstrou o sucesso na utilização da levedura *Pichia pastoris* como sistema de expressão de glicoproteínas recombinantes, uma vez que foi constatada a secreção da S1 no sobrenadante dos cultivos. A continuidade do estudo pretende otimizar essa expressão com a aplicação da produção em larga

escala, fazendo a caracterização da proteína e posterior utilização da mesma em diagnóstico e vacina.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CAVANAGH, D.; D AVIS, P.J.; COOK, J.K.A. Infectious bronchitis vírus: evidence for recombination within the Massachusetts serotype. **Avian Pathology**, v.21, p.401- 408, 1992.

CAVANAGH, D. Coronavirus avian infectious bronchitis vírus. **Veterinary Research**, v.38, n.22, p.281- 297, 2007.

CEREGHINO, J.L.; CREGG, J. M. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 24, p. 45-66, 2000.

COOK, J.K.A. Bronquite infecciosa aviária. In: **SIMPÓSIO SOBRE SANIDADE AVÍCOLA**, São Paulo, 1997. Anais. São Paulo: FACTA, p.13-27.

FINGER, P.F., et al. Construction of expression vector pPICZalfaB for cloning of S1 glycoprotein gene of the infectious bronchitis virus (IBV) in *Pichia pastoris*. In: **XXI ENCONTRO NACIONAL DE VIROLOGIA**, Gramado, 2010. Virus Reviews and Research. SBV, 2010. p. 305.

KEELER, C.L.; REED, K.L.; NIX, W.A.; GELB, J. Serotype identification of avian infectious bronchitis by RTPCR of the peplomer (S1) gene. **Avian Diseases**, v.42, p.275-284, 1998.

PENA, L.J.; SANTOS, B.M.; ROBERTI, R.P.; MARIN, S.Y. Bronquite infecciosa das galinhas. Artigo de revisão. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v.72, n.3, p.397-404, 2005.

TORRES, F.A.G.; MORAES, L.M.P. de. Proteínas recombinantes produzidas em 24 leveduras. **Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**, v. 12, p. 20-22, 2000.