

EXPRESSÃO DE ANTÍGENO DO VÍRUS DA BRONQUITE INFECCIOSA DAS GALINHAS EM SISTEMA EUCARIOTO

PAULA FONSECA FINGER¹; CAROLINA GEORG MAGALHÃES¹; LÍVIA SILVEIRA MUNHOZ²; SILVIA DE OLIVEIRA HÜBNER²; PAULO AUGUSTO ESTEVES³; FABRÍCIO ROCHEDO CONCEIÇÃO⁴

¹UFPEL - Campus Universitário; Laboratório de Imunologia Aplicada, Cenbiot/CDTec – paulaafinger@hotmail.com

²UFPEL - Campus Universitário; Laboratório de Virologia e Imunologia - sohubner@yahoo.com.br

³Embrapa Suínos e Aves, CNPSA - pesteves@cnpsa.embrapa.br

⁴UFPEL - Campus Universitário; Laboratório de Imunologia Aplicada, Cenbiot/CDTec – fabricio.rochedo@ufpel.edu.br

1. INTRODUÇÃO

A bronquite infecciosa das galinhas (IB) é causada por um vírus que pertence à família *Coronaviridae*, gênero *Coronavirus*, podendo ser definida como uma enfermidade viral altamente contagiosa e de curto período de incubação, que acomete as galinhas (CAVANAGH, 2007). Galinhas infectadas com o vírus da bronquite infecciosa (IBV) desenvolvem doenças respiratórias, nefrite e doenças reprodutivas, resultando na redução da produção e qualidade dos ovos (ARIYOSHI et al., 2010). O IBV possui genoma RNA de fita simples, não segmentado, com sentido positivo e de 27,6 Kilobases (Kb), o qual codifica quatro proteínas estruturais importantes. A nucleoproteína (N) está associada ao genoma viral para formar o nucleocapsídeo, já as demais proteínas, de superfície (S), proteína de membrana (M) e a do envelope (E), estão inseridas no envelope que circunda o nucleocapsídeo (MCKINLEY et al., 2008). A proteína de superfície (S) se divide em duas subunidades, S1 e S2. A S1 é responsável pela infectividade viral e possui determinantes antigênicos que induzem a formação de anticorpos neutralizantes. Essa proteína possui um papel crucial em dois processos muito relevantes para a indústria avícola (CAVANAGH et al., 1997). Primeiramente, tal proteína é a principal indutora da resposta imune protetora contra a infecção pelo IBV e, em segundo lugar, ela é a base dos testes de diagnósticos que têm sido utilizados para identificar e caracterizar diferenças entre cepas virais (KEELER et al., 1998).

Os métodos diagnósticos para detecção de IBV do tipo ELISA, embora sejam bastante utilizados, detectam anticorpos que reagem com todos os antígenos proteicos do IBV e, obviamente, não discriminam aqueles anticorpos que interagem com os sítios antigênicos mais específicos e relevantes como os que estão localizados, por exemplo, na subunidade S1. Nesse sentido, é de grande interesse a utilização da glicoproteína S1 como principal antígeno quando se trata de diagnóstico e avaliação de resposta vacinal, uma vez que é a principal indutora de resposta imune nas aves infectadas (IGNJATOVIC et al., 1994).

A produção de proteínas recombinantes é uma alternativa que tem chamado atenção de vários pesquisadores. Sistemas de expressão em eucariotos e procariotos já são conhecidos e têm sido bastante utilizados para a expressão de proteínas. A levedura *Pichia pastoris* é capaz de processar a maioria das modificações pós-traducionais, incluindo processamento proteolítico e glicosilação, conservando características antigênicas das proteínas originais, o que facilita sua aplicação em ensaios diagnósticos e em vacinas de subunidade (CEREGHINO & CREGG, 2000).

O objetivo deste trabalho foi expressar em *Pichia pastoris* o gene que codifica a proteína de superfície S1 da estirpe M41 do IBV e a S1 de um gene sintético elaborado a partir de sequências de amostras de campo nacionais e internacionais, como uma alternativa interessante para a produção de antígeno que possa ser utilizado para monitoramento vacinal das aves e também um antígeno que seja adequado para utilização em diagnóstico sorológico.

2. METODOLOGIA

Propagação viral e preparação do RNA. Uma amostra brasileira cedida pela EMBRAPA - CNPSA com o mesmo perfil da cepa Massachusetts 41 do IBV foi propagada em ovos embrionados SPF com 9 dias de incubação, na cavidade córioalantoide (CA), coletando-se o líquido e estocado-o a -70°C , até o momento do uso. O ácido nucléico das amostras foi extraído com a utilização de Trizol® LS Reagent (Invitrogen™), de acordo com as recomendações do fabricante.

Amplificação do gene S1 nativo por RT-PCR. A partir do RNA viral extraído da suspensão de LCA infectado com a amostra do mesmo perfil da estirpe M41 do IBV, 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 IBV ("GenBank" nº de acesso - M21883) foram desenhados os *primers forward* e *reverse* para a completa amplificação do gene que codifica para a proteína desejada. Sítios de clivagem para *EcoRI* e *KpnI* foram introduzidos no *primer forward* (5'-CGGAATTCCTGCTTTGTATGACAGT – 3') e *reverse* (5' – CCGGTACCTTAATGTAAAAGTGG – 3'), respectivamente.

Obtenção do gene S1 sintético. Foi construído um gene sintético baseado em sequências de amostras de campo nacionais da Embrapa Suínos e Aves e em sequências internacionais depositadas no GenBank. Para tal, utilizou-se o programa Vector NTI (Invitrogen®) para alinhar as sequências e construir o gene. Ao gene consenso foram adicionados sítios de restrição para as enzimas *XhoI* e *KpnI*, visando a clonagem direcional no vetor de expressão em *E. coli* pAE. O gene foi sintetizado pela empresa Epoch Biolabs (USA).

Transformação de *Pichia pastoris*. Os plasmídeos recombinantes pPICZαB/S1 nativo e pPICZαB/S1 sintético foram propagados em *E. coli*, purificados e posteriormente linearizados 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 X33 de *P. pastoris* com fenótipo Mut⁺, 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, transformadas por eletroporação (25 F, 200, 2 kV) com 10 µg dos plasmídeos pPICZαB/S1 linearizados e ressuspensas em Sorbitol 1 M. Após 1 h de incubação em agitador orbital (28°C e 200 rpm), 100 e 200 µl do volume de células foram espalhados em placa de meio YPDS contendo 500 µg/mL de Zeocina (Invitrogen) e, por fim, incubados a 28°C durante 4 dias.

Colony blotting. As colônias foram cultivadas em meio BMMY e incubadas a 28°C por 6 dias, sendo adicionado 1% de metanol absoluto a cada 24 h para a indução da expressão. No final da indução, os cultivos foram transferidos para a membrana de nitrocelulose por 3 h a 28°C e as mesmas foram bloqueadas com leite em pó 0,5% diluído em PBS-T e incubadas sob agitação leve. Após, foram feitas quatro lavagens com PBS-T e adicionou-se o anticorpo anti-histidina (Anti-

6xHIS - Invitrogen), 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 h. As colônias recombinantes foram detectadas por revelação com SIGMA FAST™ DAB (Sigma-Aldrich), seguindo as instruções do fabricante.

Expressão da S1 em *Pichia pastoris*. Um clone recombinante de cada gene que demonstrou uma maior expressão no *colony blot* foi selecionado para indução da expressão em balão aletado com meio BMGY (1% de extrato de levedura, 2% peptona, 1,34% de YNB (Yeast Nitrogen Base), 4×10^{-5} % de biotina, 1% de glicerol e 100 mM Tampão Fosfato de Potássio, pH 6,0) e deixado em agitação orbital de 250 rpm a uma temperatura de 28°C por 24 h. Após atingir uma densidade óptica de 20-30 em 600 nm, o cultivo foi centrifugado e as células ressuspensas no mesmo meio substituindo o glicerol pelo metanol (BMMY), aumentando o volume em cinco vezes. A indução da expressão foi realizada a 28°C com agitação de 250 rpm por 6 dias, objetivando-se observar o melhor dia de expressão da proteína. A cada 24 h, 3% de metanol foi adicionado e o cultivo coletado para detecção da proteína S1 por *Dot blotting*. Como a proteína não foi secretada para o meio de cultivo, a lise dos *pellets* foi realizada com pérolas de vidro e posterior sonicação, a fim de obter a proteína intracelular.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O fragmento esperado de 1.540 pb (Figura 1) do gene nativo foi amplificado na reação de PCR utilizando os *primers* desenhados para obtenção do gene correspondente à região codificadora da S1. O gene nativo foi retirado do vetor PUC19 e a banda do gel de agarose purificada.

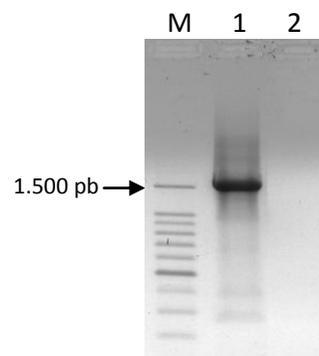


Figura 1. Amplificação do fragmento de 1540 pb correspondente à glicoproteína S1. M: marcador Ladder 100 pb, 1: Gene S1, 2: Controle negativo.

Os vetores pPICZ α B/S1 nativo e sintético foram utilizados para transformar TOP10F de *E. coli*, resultando em muitas colônias, sendo que sete foram confirmadas como recombinantes resistentes. Então, a cepa X33 de *P. pastoris* foi transformada com os plasmídeos pPICZ α B/S1 linearizados, por eletroporação e, após três dias obteve-se muitas colônias em placas de YPDS com 100 μ g e posteriormente com 500 μ g de Zeocina e com adição de sorbitol após 1 hora da transformação.

Após a transformação da *P. pastoris* e confirmação da expressão, os cultivos expressos em meio líquido foram submetidos à lise celular. A proteína expressa foi detectada por *dot blotting*, no qual o melhor resultado foi obtido com 72 h de indução (Figura 2). Um controle negativo, X33 não transformada, também foi cultivada em BMGY e induzida com 3% de metanol em BMMY.

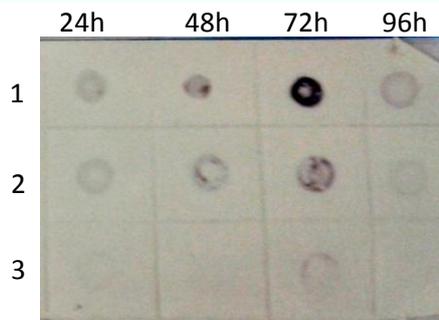


Figura 2. Dot Blotting com MAb anti-6xHis dos cultivos de *P. pastoris* induzidos a cada 24 horas com 3% de metanol e lisados. 1- S1 Sintético, 2- S1 Nativo, 3- Controle negativo.

4. CONCLUSÕES

A glicoproteína S1 pode ser expressa com sucesso em sistema eucarioto. Futuramente as proteínas S1 expressas em *P. pastoris* serão caracterizadas e testadas contra soros de aves imunizadas e não imunizadas com IBV e outros vírus, e avaliadas para uso em testes do tipo ELISA.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARIYOSHI R.; KAWAI T.; HONDA T.; TOKIYOSHI S. Classification of IBV S1 Genotypes by Direct Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) and Relationship between Serotypes and Genotypes of Strains Isolated between 1998 and 2008 in Japan. **Journal of Veterinary Medical Science**, p.687-692, 2010.

CAVANAGH, D.; NAQI, SA. Infectious bronchitis virus. In: Calnek, B.W., Barnes, H., Beard, C.W., McDougald, L.R., Saif, Y.M. (Eds.), **Disease of Poultry**, 9th ed. Iowa State University Press, Ames, IA, p.511–526, 1997.

CAVANAGH, D. Coronavirus avian infectious bronchitis virus. **Veterinary Research**, v.38, p.281–297, 2007.

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

IGNJATOVIC, J.; GALLI, L. The S1 glycoprotein but not the N or M proteins of avian infectious bronchitis virus induces protection in vaccinated chickens, **Arch. Virol**, v.138, p.117–134, 1994.

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

MCKINLEY, E.T. et al. Avian coronavirus infectious bronchitis attenuated live vaccines undergo selection of subpopulations and mutations following vaccination. **Vaccine**, v.26, p.1274- 1284, 2008.

MENDONÇA, J.F.P.; MARTINS, N.R.S.; CARVALHO, L.B.; SÁ, M.E.P.; MELO, C.B. Bronquite infecciosa das galinhas: conhecimentos atuais, cepas e vacinas no Brasil. **Ciência Rural**, v.39, p. 2559-2566, 2009.