

CLONAGEM E EXPRESSÃO DA GLICOPROTEÍNA E DE HERPESVÍRUS BOVINO EM SISTEMA PROCARIOTO

BIANCA SICA SIEDLER¹; GIZELE LIMA DE SÁ²; SIBELE BORSUK²;
FABRÍCIO ROCHEDO CONCEIÇÃO²; PAULO MICHEL ROEHE³; CLÁUDIA
PINHO HARTLEBEN⁴

¹Universidade Federal de Pelotas, Pós Graduação em Biotecnologia – bssiedler@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Núcleo de Biotecnologia

³Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Biociências, Departamento de Microbiologia

⁴Universidade Federal de Pelotas, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Núcleo de Biotecnologia, Laboratório de Imunodiagnóstico – hartlebenclaudia@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

Os herpesvírus bovinos tipo 1 (BoHV-1) e tipo 5 (BoHV-5) são importantes patógenos que afetam os sistemas respiratório e genital de bovinos (GIBBS & RWEYEMAMU, 1977), além de serem responsáveis, principalmente o BoHV-5, por casos de meningoencefalite (ROELS et al., 2000), causando perdas significativas para a pecuária. Estes vírus, pertencentes à família *Herpesviridae* (DAVISON et al., 2009), possuem a capacidade de estabelecer latência no hospedeiro, com períodos de reativação e excreção intermitente, o que faz com que os surtos sejam imprevisíveis, especialmente em áreas endêmicas (VOGEL et al., 2003). O BoHV-1 apresenta distribuição mundial. Já o BoHV-5 é prevalente na América do Sul, principalmente Brasil e Argentina (DEL MEDICO ZAJAC et al., 2010). O controle dos BoHV tem sido realizado através da utilização de vacinas vivas e inativadas (VAN OIRSCHOT et al., 1996a) e, devido a relação antigênica existente entre BoHV-1 e 5, que apresentam homologia de, aproximadamente, 80% (DELHON et al., 2003), acredita-se que ocorra proteção cruzada entre estes vírus (DEL MEDICO ZAJAC et al., 2006).

O genoma dos BoHV-1 e 5 contém aproximadamente 70 genes, cujos produtos gênicos incluem proteínas regulatórias da replicação viral, enzimas, proteínas estruturais e glicoproteínas (DELHON et al., 2003). No envelope viral encontram-se inseridas 10 glicoproteínas (gK, gC, gB, gH, gM, gL, gG, gD, gI e gE), responsáveis pelas interações vírus-célula e alvos para a resposta imunológica do hospedeiro (DELHON et al., 2003). Deleções de genes que codificam glicoproteínas não essenciais na replicação viral *in vitro* ou *in vivo*, geralmente gC e gE (KAASHOEK et al., 1995; KAASHOEK et al., 1998), representam uma estratégia interessante e vem sendo aplicadas no desenvolvimento de vacinas diferenciais (DIVAs), baseadas na capacidade de indução vacinal de uma resposta imune que pode ser sorologicamente diferenciada da resposta induzida pela infecção natural, com cepa viral de campo (VAN OIRSCHOT, 1999).

DIVAs com deleção do gene que codifica a gE foram desenvolvidas (BRUM et al., 2010b; FRANCO et al., 2007) e vem sendo testadas no Brasil (ANZILIERO et al., 2011; BRUM et al., 2010a; CAMPOS et al., 2011; HUBNER et al., 2005; SANTOS et al., 2011), no entanto, o diagnóstico diferencial associado a estas vacinas não foi até o momento desenvolvido. Por este motivo, o presente trabalho objetiva a expressão da proteína gE em sua forma

recombinante, em sistema procarioto, para a posterior produção de anticorpos monoclonais (mAbs) contra este antígeno, visando o desenvolvimento de testes de imunodiagnóstico diferenciais que possam ser associados a DIVAs.

2. METODOLOGIA

O gene codificador para gE (1.682 pb), desenhado com uma sequência consenso obtida através das sequências de gE de BoHV-1 e 5 disponíveis no genbank, foi clonado no vetor pAE de expressão em *Escherichia coli* (pAE/gE), segundo protocolo conhecido (SAMBROOK & RUSSEL, 2001). O produto da ligação foi utilizado para transformar *E. coli* cepa DH5 α por choque térmico. Após triagem dos recombinantes, e confirmação através de digestão enzimática, foram selecionados seis clones para transformação de *E. coli* BL21 Star™ (DE3). A expressão da gE foi avaliada em diferentes períodos e temperaturas, a fim de estabelecer melhores condições a serem aplicadas. Resumidamente, os produtos das seis transformações foram semeados em meio Luria Bertani (LB) sólido contendo ampicilina para a seleção de colônias recombinantes. Após a seleção de colônias, estas foram semeadas em 1 ml de meio LB, incubadas à 37 °C por 16 h; deste cultivo 500 μ L foram transferidos para 10 mL de meio LB e este incubado à 37 °C até atingir a fase exponencial de crescimento bacteriano (DO₆₀₀ 0,6 - 0,8). O cultivo bacteriano foi então induzido com 0,6 mM de IPTG pelos períodos de 4, 6 e 12 horas, nas temperaturas de 25 °C e 37 °C. Amostras correspondentes a cada condição de cultivo foram coletadas e analisadas por SDS-PAGE e *Western Blot* (WB).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O gene sintético codificador para a gE foi clonado com sucesso no vetor de expressão pAE, resultando em seis clones recombinantes, confirmados através de digestão enzimática para liberação do inserto. Após a clonagem, a proteína gE (rgE) foi expressa com sucesso pela cepa BL21 Star™ (DE3) somente após 12 h de indução à 25 °C, o que demonstra a importância da identificação do tempo de indução e temperatura individualizada para a expressão de proteínas recombinantes. Esta proteína será utilizada para a inoculação de camundongos e produção de anticorpos monoclonais (mAbs) que serão empregados no desenvolvimento de um ensaio imunoenzimático (ELISA) de bloqueio. A associação de DIVAs à ELISAs de bloqueio ou competição vem sendo empregada no controle e erradicação do BoHV-1 em países europeus (ACKERMANN & ENGELS, 2006; VAN OIRSCHOT et al., 1996b; VAN OIRSCHOT et al., 1997). Os antígenos utilizados para a produção dos anticorpos monoclonais (mAbs) empregados nestes testes diagnósticos são, geralmente, obtidos de um extrato viral total, onde a gE encontra-se associada a outras glicoproteínas do envelope, comumente gI, com a qual forma-se uma ligação não covalente (complexo gE/gI). No entanto, estes ELISAs apresentam performance limitada, atribuída a sua baixa especificidade. Contudo, esta especificidade reduzida não é atribuída a reações cruzadas com outros vírus, e sim à presença massiva de anticorpos dirigidos a outras glicoproteínas do envelope que não a gE (LEHMANN et al., 2004). Além disso, uma variabilidade entre a gE de diferentes cepas de BoHV-1 já foi relatada, através do desafio destas cepas com um painel de mAbs anti gE (KAASHOEK

et al., 1995). Por essa razão, a expressão da rgE a partir de um gene sintético desenhado com uma sequência consenso obtida através das sequências de gE de BoHV-1 e 5 disponíveis no genbank, pode representar uma alternativa para burlar esta grande variabilidade genética.

4. CONCLUSÕES

O gene sintético codificador para gE de BoHV1/5 foi clonado com sucesso no vetor pAE de expressão em *E. coli*, resultando na expressão da gE em sua forma recombinante. O seguimento deste estudo inclui a obtenção de lotes purificados de rgE, produção de anticorpos monoclonais contra rgE, e desenvolvimento de um ELISA de bloqueio capaz de diferenciar animais naturalmente infectados pelo BoHV1 e/ou 5 ou vacinados contra os mesmos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACKERMANN, M.; ENGELS, M. Pro and contra IBR-eradication. **Veterinary Microbiology**, v.113, n.3-4, p.293-302, 2006.
- ANZILIERO, D.; SANTOS, C. M.; BRUM, M. C.; WEIBLEN, R.; CHOWDHURY, S. I.; FLORES, E. F. A recombinant bovine herpesvirus 5 defective in thymidine kinase and glycoprotein E is immunogenic for calves and confers protection upon homologous challenge and BoHV-1 challenge. **Veterinary Microbiology**, v.154, n.1-2, p.14-22, 2011.
- BRUM, M. C.; CARON, L.; CHOWDHURY, S. I.; WEIBLEN, R.; FLORES, E. F. Immunogenicity of an inactivated bovine herpesvirus type 5 strain defective in thymidine kinase and glycoprotein E. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.30, n.1, p.57-62, 2010a.
- BRUM, M. C.; WEIBLEN, R.; FLORES, E. F.; CHOWDHURY, S. I. Construction and growth properties of bovine herpesvirus type 5 recombinants defective in the glycoprotein E or thymidine kinase gene or both. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.43, n.2, p.217-224, 2010b.
- CAMPOS, F. S.; DEZEN, D.; ANTUNES, D. A.; SANTOS, H. F.; ARANTES, T. S.; CENCI, A.; GOMES, F.; LIMA, F. E.; BRITO, W. M.; FILHO, H. C.; BATISTA, H. B.; SPILKI, F. R.; FRANCO, A. C.; RIJSEWIJK, F. A.; ROEHE, P. M. Efficacy of an inactivated, recombinant bovine herpesvirus type 5 (BoHV-5) vaccine. **Veterinary Microbiology**, v.148, n.1, p.18-26, 2011.
- DAVISON, A. J.; EBERLE, R.; EHLERS, B.; HAYWARD, G. S.; MCGEOCH, D. J.; MINSON, A. C.; PELLETT, P. E.; ROIZMAN, B.; STUDDERT, M. J.; THIRY, E. The order Herpesvirales. **Archives of Virology**, v.154, n.1, p.171-177, 2009.
- DEL MEDICO ZAJAC, M. P.; LADELFA, M. F.; KOTSIAS, F.; MUYLKENS, B.; THIRY, J.; THIRY, E.; ROMERA, S. A. Biology of bovine herpesvirus 5. **The Veterinary Journal**, v.184, n.2, p.138-145, 2010.
- DEL MEDICO ZAJAC, M. P.; PUNTEL, M.; ZAMORANO, P. I.; SADIR, A. M.; ROMERA, S. A. BHV-1 vaccine induces cross-protection against BHV-5 disease in cattle. **Research in Veterinary Science**, v.81, n.3, p.327-334, 2006.
- DELHON, G.; MORAES, M. P.; LU, Z.; AFONSO, C. L.; FLORES, E. F.; WEIBLEN, R.; KUTISH, G. F.; ROCK, D. L. Genome of bovine herpesvirus 5. **Journal of Virology**, v.77, n.19, p.10339-10347, 2003.
- FRANCO, A. C.; HUBNER, S. O.; OLIVEIRA, A. P.; BATISTA, H. B.; ROEHE, P. M.; RIJSEWIJK, F. A. Construction and characterization of a bovine

- herpesvirus 5 mutant with a deletion of the gI, gE and US9 genes. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.38, n.4, p.667-673, 2007.
- GIBBS, E. P. J.; RWEYEMAMU, M. M. Bovine herpesviruses. Part I. **Vet.Bulletin**, v.47, n.5, p.317-343, 1977.
- HUBNER, S. O.; OLIVEIRA, A. P.; FRANCO, A. C.; ESTEVES, P. A.; SILVA, A. D.; SPILKI, F. R.; RIJSEWIJK, F. A.; ROEHE, P. M. Experimental infection of calves with a gI, gE, US9 negative bovine herpesvirus type 5. **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases**, v.28, n.3, p.187-196, 2005.
- KAASHOEK, M. J.; MOERMAN, A.; MADIC, J.; WEERDMEESTER, K.; MARIS-VELDHUIS, M.; RIJSEWIJK, F. A.; VAN OIRSCHOT, J. T. An inactivated vaccine based on a glycoprotein E-negative strain of bovine herpesvirus 1 induces protective immunity and allows serological differentiation. **Vaccine**, v.13, n.4, p.342-346, 1995.
- KAASHOEK, M. J.; RIJSEWIJK, F. A.; RUULS, R. C.; KEIL, G. M.; THIRY, E.; PASTORET, P. P.; VAN OIRSCHOT, J. T. Virulence, immunogenicity and reactivation of bovine herpesvirus 1 mutants with a deletion in the gC, gG, gI, gE, or in both the gI and gE gene. **Vaccine**, v.16, n.8, p.802-809, 1998.
- LEHMANN, D.; SODOYER, R.; LETERME, S. Characterization of BoHV-1 gE envelope glycoprotein mimotopes obtained by phage display. **Veterinary Microbiology**, v.104, n.1-2, p.1-17, 2004.
- ROELS, S.; CHARLIER, G.; LETELLIER, C.; MEYER, G.; SCHYNTS, F.; KERKHOFS, P.; THIRY, E.; VANOPDENBOSCH, E. Natural case of bovine herpesvirus 1 meningoencephalitis in an adult cow. **Veterinary Record**, v.146, n.20, p.586-588, 2000.
- SAMBROOK, J. e RUSSEL, D. W. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 3^a ed. New York: Cold Spring Harbor Lab Press, 2001. 1-2368p.
- SANTOS, C. M. B.; ANZILIERO, D.; BAUERMANN, F. V.; BRUM, M. C.; WEIBLEN, R.; FLORES, E. F. Experimental infection of calves with recombinants of bovine herpesvirus 5 defective in glycoprotein E (gE), thymidine kinase (TK) and both, gE/TK. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.31, n.4, p.319-325, 2011.
- VAN OIRSCHOT, J. T. Diva vaccines that reduce virus transmission. **Journal of Biotechnology**, v.73, n.2-3, p.195-205, 1999.
- VAN OIRSCHOT, J. T.; KAASHOEK, M. J.; MARIS-VELDHUIS, M. A.; WEERDMEESTER, K.; RIJSEWIJK, F. A. An enzyme-linked immunosorbent assay to detect antibodies against glycoprotein gE of bovine herpesvirus 1 allows differentiation between infected and vaccinated cattle. **Journal of Virological Methods**, v.67, n.1, p.23-34, 1997.
- VAN OIRSCHOT, J. T.; KAASHOEK, M. J.; RIJSEWIJK, F. A. Advances in the development and evaluation of bovine herpesvirus 1 vaccines. **Veterinary Microbiology**, v.53, n.1-2, p.43-54, 1996a.
- VAN OIRSCHOT, J. T.; KAASHOEK, M. J.; RIJSEWIJK, F. A.; STEGEMAN, J. A. The use of marker vaccines in eradication of herpesviruses. **Journal of Biotechnology**, v.44, n.1-3, p.75-81, 1996b.
- VOGEL, F. S.; CARON, L.; FLORES, E. F.; WEIBLEN, R.; WINKELMANN, E. R.; MAYER, S. V.; BASTOS, R. G. Distribution of bovine herpesvirus type 5 DNA in the central nervous systems of latently, experimentally infected calves. **Journal of Clinical Microbiology**, v.41, n.10, p.4512-4520, 2003.