

EXPRESSÃO E CARACTERIZAÇÃO DA GLICOPROTEÍNA D RECOMBINANTE DE HERPESVÍRUS BOVINO TIPO 5 EM BIORREATOR

ARAÚJO, Itauá Leston¹; GONÇALVES, Rélber Aguiar¹; RODRIGUES, Fernanda Martins²; OLIVEIRA, Patrícia Diaz³; LEITE, Fábio Pereira Leivas³

¹Graduação em Ciências Biológicas; ²Graduação em Biotecnologia; ^{2,3}Centro de Desenvolvimento Tecnológico - Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas.
itauache@hotmail.com

1 INTRODUÇÃO

A meningoencefalite causada pelo Herpesvírus bovino tipo 5 (BoHV-5) é uma doença infecto contagiosa que afeta principalmente bovinos jovens submetidos a situações de estresse (DIEL et al., 2005). Relatos têm demonstrado que as infecções causadas pelo BoHV-5 estão amplamente disseminadas no rebanho bovino brasileiro, acarretando grandes prejuízos econômicos à exploração pecuária (HOLZ et al., 2009). O BoHV-5 é estruturalmente composto de capsídeo viral, o qual abriga o genoma DNA fita dupla e um tegumento viral envolto por um envelope lipoprotéico contendo espículas ou glicoproteínas virais (MEYER et al., 2001). A glicoproteína D (gD) é uma das principais glicoproteínas do envelope viral e atua na fusão do envelope com a membrana das células permissivas. Respostas imunológicas contra o BoHV-5 apresentam anticorpos neutralizantes contra a gD, tornando-a importante no desenvolvimento de vacinas de subunidade e de testes de imunodiagnóstico. A gD possui 417 aminoácidos, 6 pontes entre resíduos de cisteína conservados e sítios de adição para N- e O- oligossacarídeos (ABDELMAGID et al., 1995). A levedura metilotrófica *Pichia pastoris* tem recebido destaque nas últimas décadas por conciliar vantagens na manipulação e a expressão de proteínas com modificações pós-traducionais, como a glicosilação. A secreção de proteínas solúveis ao meio facilita os processos de purificação da proteína recombinante, uma vez que a levedura secreta poucas ou nenhuma proteína endógena. Por ser caracterizada como um organismo de fermentação pobre, a *Pichia pastoris* pode ser utilizada em cultivos em biorreatores atingindo altas densidades celulares sem que ocorra a produção de metabólitos tóxicos oriundos das rotas fermentativas. (GELISSEN, 2000). Dessa forma, o objetivo deste trabalho é demonstrar que a gD de BoHV-5 expressa por *Pichia pastoris* pode ser obtida em cultivos em biorreator, mantendo suas características após concentração por liofilização.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 CLONAGEM DA gD E EXPRESSÃO EM AGITADOR ORBITAL

A clonagem da glicoproteína D em *Pichia pastoris* foi realizada anteriormente (DUMMER et al., 2009). Brevemente, o gene da gD de BoHV-5 foi inserido no vetor de expressão pPICZalphaB e o vetor resultante (pPICZalphaB/rgD) foi utilizado para transformar *Pichia pastoris* cepa KM71H fenótipo Mut^S. Testes de expressão em pequena escala foram realizados em agitador orbital com agitação de 150 rpm a 28°C. *Pichia pastoris* Km71H não transformada foi utilizada como controle negativo na expressão. Clones recombinantes foram cultivados em 200ml meio BMGY (Extrato de Levedura 1%; Peptona 2%; Tampão Fosfato de Potássio 100mM pH 6.0; YNB 1.34%; Biotina 4 x 10⁻⁵% e glicerol 1%) por 24h, sendo substituído por

20ml de meio de indução BMMY (Extrato de Levedura 1%; Peptona 2%; Tampão Fosfato de Potássio 100mM pH 6.0; YNB 1.34%; Biotina $4 \times 10^{-5}\%$ e metanol 0.5%) , com adição de 1% de metanol a cada 24h por 5 dias. Amostras foram coletadas a cada 24h após o início da indução. A presença de glicoproteína D foi detectada através de Dot blot, conforme descrito abaixo após centrifugação para remoção das células de levedura.

2.2 EXPRESSÃO EM BIOREATOR

A expressão da rgD em larga escala foi realizada em Biorreator BioFlo 110 Benchtop (New Brunswick) em um volume de trabalho de 7 litros. O inóculo foi incubado por 24h a 30°C em frascos com agitação de 250 rpm em MGY (1.34% YNB; $4 \times 10^{-5}\%$ biotina e 1% glicerol) totalizando 5-10% do volume de fermentação inicial. O volume total do pré-inóculo foi adicionado ao meio BMGY. A temperatura de 30°C foi mantida constante durante o experimento e a agitação (200-1000 rpm) controlada pelo oxigênio dissolvido, mantido constante a 30% após o início da indução. O consumo de glicerol total foi observado por picos de elevação nas taxas de oxigênio dissolvido e a suplementação com 50% (v/v) de glicerol foi mantida por 4h. A suplementação com metanol foi realizada por aproximadamente 68 h, inicialmente com de $1 \text{ ml.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$ com aumento gradual até $2 \text{ ml.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$. Amostras foram coletadas aproximadamente a cada 2h até o início da indução e após a cada 12h. A densidade celular foi estipulada através de peso de célula úmida (wcv, g.l^{-1}) em e da leitura da DO_{600} em cada coleta, ambas as análises realizadas em triplicata.

2.3 CONCENTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DA rgD

O meio de cultivo obtido da fermentação foi centrifugado a $10.000 \times g$ para remover as células de *Pichia pastoris* e o sobrenadante foi clarificado com membrana 1.2 μm . Parte do produto clarificado (aproximadamente 2.5 litros) foi então liofilizado (Liotop L101). O material resultante totalizou 103g. A quantificação de proteínas totais do produto liofilizado foi realizada pelo método de Bradford.

2.4 CARACTERIZAÇÃO DA rgD

A técnica de Dot blot foi realizada para detectar a presença de gD em cultivos realizados em agitador orbital, onde 5 μl de sobrenadante do cultivo coletado a cada 24h foram adsorvidos em membrana de nitrocelulose. A membrana foi bloqueada com 5% de leite desnatado e após lavagens com PBS-T, incubada por 1h com anticorpo monoclonal Anti-6xHis conjugado com HRP. Após, a membrana foi colocada em solução de DAB até a coloração ser evidente. Para caracterizar a rgD presente no meio de cultivo foi realizado SDS-PAGE 10% para separar as bandas protéicas presentes no meio. Após foi realizado um Western blot onde as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose. As etapas subseqüentes de bloqueio e reação com anticorpo foram realizadas conforme descrito acima. Após lavagens, a membrana foi incubada com SIGMAFast DAB potencializado com metal.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O cultivo de *P. pastoris* transformadas com o vetor de expressão pPICZalphaB/rgD demonstrou a presença de rgD no sobrenadante do cultivo após 24h, sendo o máximo de expressão obtido com 48h de indução (Fig.1). O cultivo em biorreator permitiu a obtenção de 92g de células úmidas (wcv) l^{-1} após 20h de

cultivo, sendo observada uma redução após o início da indução, como demonstrado na Fig. 2. As análises da DO_{600nm} demonstraram a mesma tendência (Fig. 3). A expressão da rgD em biorreator foi detectada por Western blot, sendo possível observar a presença de uma banda com massa molecular aparente de 55 kDa, conforme esperado (Fig. 4). A reação do anticorpo monoclonal Anti-6xHis é possível devido a presença de 6 histidinas utilizadas como marcador na porção C-terminal da proteína. O processo de concentração da proteína presente no sobrenadante do cultivo em Biorreator foi possível devido ao emprego da liofilização, e, de acordo com os resultados obtidos, pode-se sugerir que este método pode ser empregado para a concentração da rgD com mínimas perdas protéicas durante o processo. A concentração da rgD em Biorreator totalizou 1.4 g/l, após a liofilização.

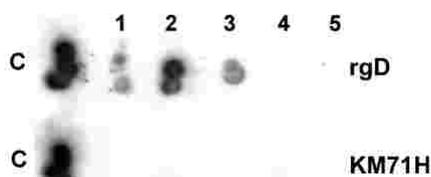


Figura 1. Indução da expressão com Metanol. Análise realizada através de Dot blot, demonstrando a presença de rgD no sobrenadante do cultivo. C = controle positivo.



Figura 2. Densidade celular obtida através da análise do peso úmido das células. A seta demonstra o início da indução com metanol.



Figura 3. Densidade celular obtida através da análise da densidade óptica a 600nm. A seta demonstra o início da indução com metanol.

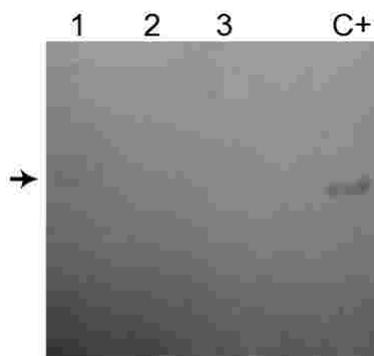


Figura 4. Western Blot demonstrando a detecção de banda de aproximadamente 55 kDa compatível com o tamanho esperado da rgD, 1 e 2: gD liofilizada indicada pela seta; 3: KM71H; 4: Controle positivo para o anticorpo monoclonal Anti-6xHis conjugado com HRP.

4 CONCLUSÃO

Os resultados sugerem que a rgD pode ser expressa em biorreator e a sua concentração pode ser obtida através de liofilização. Desta forma, novos experimentos devem ser realizados visando melhorar as condições de cultivo, obtendo maiores concentrações de rgD. A rgD poderá então ser utilizada em testes de imunodiagnóstico para detecção de anticorpos anti-BoHV-5 em rebanhos ou vacinas de subunidade contra o agente viral.

5 REFERÊNCIAS

ABDELMAGID, O. Y.; et al. Fine mapping of Bovine Herpesvirus-1 (BHV-1) glycoprotein D (gD) neutralizing epitopes by type-specific monoclonal antibodies and sequence comparison with BHV-5. **Virology**, v. 206, p. 242-253, 1995.

DIEL, D. G.; et al. O Herpesvirus bovino tipo 5 (BoHV-5) pode utilizar as rotas olfatória ou trigeminal para invadir o sistema nervoso central de coelhos, dependendo da via de inoculação. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 25, n. 3, p. 164-170, 2005.

DUMMER, L. A.; et al. Cloning and expression of a truncated form of envelope glycoprotein D of Bovine herpesvirus type 5 in methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **Journal of Virological Methods**, v. 161, p. 84-90, 2009.

GELLISSSEN, G. Heterologous protein production in methylotrophic yeasts. **Applied Microbiology & Biotechnology**, v. 54, p. 741-750, 2000.

HOLZ C. L.; et al. Soroprevalência de herpesvírus bovinos tipos 1 e/ou 5 no Estado do Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n. 9, p. 767-773, 2009.

MEYER, G.; et al. Comparative pathogenesis of acute and latent infections of calves with Bovine Herpesvirus types 1 and 5. **Archives in Virology**, v. 146, p. 633-652, 2001.