

## CLONAGEM E EXPRESSÃO DA GLICOPROTEÍNA DO VÍRUS RÁBICO EM *PICHIA PASTORIS*

SOUZA, L.L.<sup>1\*</sup>; GONÇALVES JUNIOR, A.S.<sup>3</sup>; MORAES, C.M.<sup>1</sup>; LEITE, F.P. L.<sup>2</sup>; GIL-TURNES, C.<sup>3</sup>.

### 1- INTRODUÇÃO

A raiva é uma doença infecciosa que acomete o homem e todos os animais de sangue quente. É uma zoonose transmitida pela inoculação do vírus rábico, contido na saliva do animal infectado, principalmente pela mordedura. O vírus da raiva é um vírus RNA, fita simples pertencente à Ordem *Mononegavirales*, Família *Rhabdoviridae*, Gênero *Lyssavirus*. Seu genoma está composto por cinco genes, os quais codificam para nucleoproteína (N), fosfoproteína (P), proteína da matriz (M), glicoproteína (G) e para uma RNA polimerase (Warrel et al., 2004). A glicoproteína é o principal antígeno capaz de induzir a formação de anticorpos neutralizantes e de conferir imunidade protetora contra raiva. Ela está inserida na membrana externa do vírus e organizada como um trímero na superfície viral. A glicoproteína também tem um papel importante na patogenia da Raiva já que é responsável pela ligação do vírus à membrana da célula alvo e fusão entre a membrana celular e o vírus durante o processo de endocitose (Gaudin et al., 1997; Ross et al., 2008)). O sistema de expressão *Pichia pastoris* tem obtido importante aceitação como organismo hospedeiro para produção de proteínas exógenas. A crescente utilização desse sistema de expressão pode ser atribuída a diversos fatores, tais como a necessidade de técnicas simples para manipulação genética, a habilidade da *P. pastoris* em produzir altas concentrações de proteínas exógenas, a capacidade de realizar algumas modificações eucarióticas pós-tradução e a disponibilidade de um sistema de expressão comercialmente acessível (Cereguino & Cregg, 2000). O uso da glicoproteína do vírus rábico é uma escolha lógica para o desenvolvimento de subunidades vacinais que podem ser usadas para imunização contra a raiva humana e animal. O presente trabalho descreve a *P. pastoris* como um sistema de expressão da glicoproteína do vírus rábico como uma alternativa à produção de antígenos vacinais.

---

<sup>1</sup> Centro de Biotecnologia, UFPel. Campus Universitário, CP 354, 96010-900, Pelotas/RS.

\* Autora; E-mail: lorena.leonardo@uol.com.br

<sup>2</sup> Instituto de Biologia, UFPel.

<sup>3</sup> Faculdade de Veterinária, UFPel.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

*Primers* específicos para o gene da glicoproteína do vírus rábico cepa ERA foram desenhados a partir de seqüências depositadas no GeneBank, com a utilização do programa VectorNTI 8.0 (Informax Inc.). A amplificação da glicoproteína foi realizada em uma reação de PCR e os produtos foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 0,8% e posteriormente purificados com GFX PCR DNA and GEL BAND Purification Kit (GE Healthcare, USA). Após a purificação o gene da glicoproteína foi digerido com a enzima de restrição Kpn I em uma reação de 60µl, contendo: 50µl de DNA, 6µl de tampão (React 4) 2µl de enzima kpn I e 2µl de água Milli-Q. Para digestão do vetor também foi montada uma reação de 45µl contendo 35µl de vetor (pPICZalfab), 4,5µl de tampão (React 4), 2µl de enzima kpn I e 3,5µl de água Milli-Q. Após 1h de digestão a uma temperatura de 37°C, a enzima kpn I foi inativada a 65°C por 10 minutos. Posteriormente, o gene da glicoproteína foi digerido com a enzima EcoR I em uma reação de 70µl contendo 60µl da primeira reação, 7µl de tampão (React 3), 2µl de enzima EcoR I e 1 µl de água. Para a segunda digestão do vetor foi montada uma reação de 55µl contendo 45µl de vetor digerido com kpn I (pPICZalfab), 5,5µl de tampão (React 4), 2µl de enzima EcoR I e 2,5µl de água Milli-Q. A digestão ocorreu a 37°C por 2h. Após a digestão o material digerido foi purificado com Kit GFX e uma alíquota de cada DNA foi verificada em gel de agarose a 0,8%. A ligação do gene da glicoproteína ao vetor pPICZaB foi obtida através de reações que continham a enzima T4 DNA Ligase (Invitrogen™) e o tampão da reação apropriado. A reação de ligação foi deixada a 16°C por duas hora. Após a ligação dos fragmentos os mesmos foram transformados em *E. coli* cepa Top10F (Invitrogen) e semeados em placas contendo meio LB (Low – Salt) e zeocina. As placas foram incubadas a 37°C por 24h. Para verificação das colônias recombinantes, foi realizada uma triagem de células recombinantes, através de uma extração rápida do plasmídeo diretamente das colônias com fenol-clorofórmio (JOUGLARD *et al.*, 2002). As colônias de bactérias contendo o inserto de interesse foram crescidas em meio líquido LB contendo zeocina mantidas a 37°C, sob agitação, por uma noite, e após tiveram seus plasmídeos extraídos por lise alcalina com o Kit GFX™ Micro Plasmid Prep GE Healthcare, conforme recomendações do fabricante. Após a extração, os genes foram submetidos à eletroforese em gel e purificados com o Kit (DNA and Gel Band Purification, GE Healthcare). Os plasmídeos recombinantes foram linearizados com a enzima PmeI para permitir a recombinação com o a levedura *Pichia pastoris* (Kit comercial EasySelect™ *Pichia Expression* - Invitrogen). Para análise dos clones, colônias recombinantes foram repicadas em YPD líquido e incubadas a 28°C *overnight* sob agitação constante. No dia seguinte os cultivos foram centrifugados e o sobrenadante descartado. O *pellet* foi ressuscitado em BMMY (Buffered Methanol-Complex Medium) e incubado a 28°C *overnight* sob agitação constante, para que as células recombinantes iniciassem a expressão de proteínas. Durante seis dias, periodicamente coletou-se 80 µl de sobrenadante e adicionou-se 100 µl de metanol. As amostras coletadas foram analisadas quanto ao nível de expressão de proteínas por *Dot Immunobinding Assay* (DIBA) e Western Blot com anticorpo monoclonal (MAb) anti-histidina

conjugado à peroxidase (Sigma) e anticorpo anti-rábico para confirmar a expressão da glicoproteína.

### 3- RESULTADO E CONCLUSÃO

A expressão da glicoproteína foi confirmada pelas técnicas de *Dot Immunobinding Assay* (DIBA) e Western Blot, onde a glicoproteína reagiu especificamente com anticorpo monoclonal anti-histidina. A proteína demonstrou ser antigênica ao ser reconhecida por anticorpos anti-rábicos proveniente de animais experimentalmente infectados com o vírus rábico. Este resultado permite concluir que a *P. pastoris* é capaz de expressar a glicoproteína do vírus da raiva com características antigênicas sugerindo que a expressão de antígeno rábico em *P. pastoris* é uma alternativa viável para a produção de imunógeno. Este fato se torna mais relevante visto que a utilização deste sistema exclui a necessidade de trabalhar com o vírus nativo, já que este sendo uma zoonose se torna um risco pessoal durante a produção desta vacina. Entretanto, a continuidade destes estudos se faz necessários para o melhor entendimento das propriedades imunológicas da glicoproteína expressada por *P. pastoris* como uma alternativa à produção de imunobiológicos.

### 4- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

GAUDIN, Y. F. Folding of rabies virus glycoprotein: epitope acquisition and interaction with endoplasmic reticulum chaperones. *Journal Virology*, v.71, p.3742-3750, 1997.

JOUGLARD S.D.; MEDEIROS M.A.; VAZ E.K.; BASTOS R.G.; DA CUNHA C.W.; ARMOA G.R.G.; DELLAGOSTIN O.A. An Ultra-Rapid and Inexpensive Plasmid Preparation Method for Screening Recombinant Colonies. *Abstracts American Society for Microbiology*, 71, p.234, 2002.

ROSS A. B.; FAVI, M. C.; VÁSQUEZ, A. V. Glicoproteína del vírus rábico: Estructura, inmunogenicidad y rol em la patogenia. *Revista Chilena de Infectología*, v.25, p.14-18, 2008.

WARRELL, M. J.; WARRELL, D. A. Rabies and other lyssavirus diseases. *The Lancet*, v., p.959-969, 2004.