

VINICIUS FERREIRA DA PAIXÃO

**CONSTRUÇÃO E EXPRESSÃO HETERÓLOGA DE DOMÍNIO III DA  
PROTEÍNA DE ENVELOPE (E) DOS VÍRUS DENGUE -1E - 3 EM PICHIA  
PASTORIS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para obtenção do título de Magister Scientiae.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2014

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e  
Classificação da Biblioteca Central da UFV

T

- Paixão, Vinicius Ferreira da, 1987-  
P149c      Construção e expressão heteróloga de domínio III da proteína de  
2014      envelope (E) dos vírus dengue -1 e -3 em *Pichia pastoris* / Vinicius  
Ferreira da Paixão. - Vicosa, MG, 2014.  
xix, 41f. : il. ; 29 cm.
- Orientador: Sérgio Oliveira de Paula.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.  
Referências bibliográficas: f.30-35.
1. Dengue - Diagnóstico. 2. Dengue - Vacina. 3. *Aedes aegypti*.  
4. *Pichia pastoris*. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de  
Biologia Geral. Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e  
Estrutural. II. Título.

CDD 22. ed. 616.91852

VINICIUS FERREIRA DA PAIXÃO

**CONSTRUÇÃO E EXPRESSÃO HETERÓLOGA DE DOMÍNIO III DA  
PROTEÍNA DE ENVELOPE (E) DOS VÍRUS DENGUE -1E - 3 EM PICHIA  
PASTORIS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para obtenção do título de Magister Scientiae.

Aprovada: 26 de fevereiro de 2014.

---

Sergio Oliveira de Paula  
(Orientador)

---

Cynthia Canêdo da Silva

---

Wendel Batista da Silveira

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho primeiramente a Deus origem e finalidade de todas as coisas, a meus pais Ricardo e Luzia, a meu irmão Bráulio que nunca mediram esforços para que as oportunidades de realização acontecessem. Também dedico a Mariá por todo suporte e companheirismo, além de dedicar a todos os grandes amigos que muitas vezes sem presença foram fonte de todo estímulo.

"Os mais belos pensamentos nada são sem as obras"  
(Santa Terezinha de Lisieux)

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus pelo dom da vida e infinitas oportunidades que tem me dado. A meus pais; Luzia e Ricardo, os quais jamais mediram esforços para o meu crescimento, a meu irmão, Bráulio, a quem agradeço a amizade fraterna, a dedicação, o companheirismo nas noites de estudo e nos “momentos filosóficos” de conversas sobre a “vida acadêmica: suas nuances e incoerências. A todos meu familiares que sempre se predispuseram em ajudar naquilo que fosse possível. A Mariá Braga, por sempre me mostrar o quanto vale a pena colocar o coração em cada uma das várias coisas que a vida nos pede.

A Ilustríssima instituição da Universidade Federal de Viçosa, excelência em Ensino, Pesquisa e Extensão, que através do programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural realiza este mestrado. A CAPES (Centro de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela bolsa, ao Dr. Prof. e orientador Sérgio Oliveira de Paula, pela imensa atenção, exortações, dedicação e paciência com a dinâmica da vida de mestrando, e, sobretudo, sua liderança! Confesso, atônito, que jamais me esquecerei de suas palavras encorajadoras e arrebatadoras nos momentos difíceis: — “zé, cadê a *proteína?*”. Aos professores Leandro Licursi e Eduardo Marques, pelos sábios conselhos na execução dos trabalhos e por me suportarem em suas salas. A Prof<sup>a</sup>. Marilane Amaro, bem como ao doutorando André Oliveira pela oportunidade de trabalhar e crescer acadêmico-pessoalmente no laboratório de imunologia em seus projetos de pesquisa. A todos os professores do Departamento de Bioquímica, em especial Luciano Fietto (“El yestman”), pelos constantes atendimentos nos corredores do PVA, PVB, “Itaú”, DCE e etc. (loais ideais para se desabafar sobre a crueldade das “terríveis leveduras introvertidas que não se expressam). A Prof<sup>a</sup>. Márcia Rogéria, uma mãe, e a Prof<sup>a</sup>. Juliana Fietto, pelo e carinho e atendimentos psicológicos. Enfim, a todos vocês professores (tanto aqueles que o são por profissão como aqueles que o são por vocação mas não estão nas salas de aula) mestres do ensino. Agradeço a Deus por tê-los encontrados neste percurso, porque, apesar de eu não ser nada, vocês milagrosamente sempre, apesar de minha resistência e ignorância, me deixaram melhor do que me encontraram!

Agradeço a melhor equipe de trabalho da história do Laboratório de Imunovirologia, certamente antes de vocês: Eliziária Cardoso, Ana Carolina Alves, Thalita Rolleigt, Vinícius Medina e Francielle Santana, eu não sabia como a pesquisa

poderia ser tão divertida e extasiante. Ao Prof. Eduardo Honda, homem viajado e culto, por ter enviado os plasmídeos, as cepas de *Pichia*, os kits e outras ferramentas práticas (que tornaram a biologia molecular deste projeto, no mínimo, possível de ser realizada em tempo hábil). Um dia entenderei seus hábitos, no mínimo inovadores, de abrir as placas de cultura e de substituir o tradicional cumprimento de “boa tarde” pela gentil indagação “já almoçou!?”. Ao grande João (johanes), pelos sábios conselhos, solicitude e simpatia com que sempre me tratou no ambiente de trabalho desde quando nele cheguei.

Ao saudoso Trio de Cordas Época; composto pelos violinistas Tiago Costa e Silva (“cox”), Samuel Gomide Freitas (“oroporto”) e eu, como violoncelista, por me mostrar como é importante não deixar de aproveitar cada segundo da vida e de sempre tentar deixar as coisas mais divertidas do que elas são (ou do que elas normalmente merecem ser). E também por me ensinarem que normalmente quem vai te colocar em situações “no mínimo complicadas” serão, por via de regra, os seus amigos!

A todos meus amigos do Laboratório de Imunologia, da Pós-Graduação, da Graduação, da Universidade, do grupo Jovens Seguidores de Cristo, da Paróquia Santa Rita de Cássia, da vida: Jéssica Tibúrcio, Larissa Leite (“lalá”), Itair Araújo, Juliano Tibúrcio e Ivy Lelis (cito aqui ambos unidos pela conjunção “e” por serem casados e eu ser padrinho do casório), Bruno Henrique (“não tenho coragem de listar aqui seus vários apelidos”), Fabrício (“fabriçãomuleque doido”), Angélica Ribeiro Silva, Crislaine Almeida, Paula Toledo, enfim, a todos amigos que por falta de tempo, espaço e imperdoável falta de memória não foram aqui citados, vocês sempre me deram a coragem e muitas vezes foram a força motriz para que eu realizasse muitas coisas. E também agradeço por sempre retribuírem-me com muito mais amor do que lhes dei.

Aos meus “pais espirituais”, Padre Paulo Dionê, Cônego José Geraldo, Padre Paulo Nobre, Padre Sérgio José, Padre Edir Martins, a “tia Dolores” pelo consolo nos momentos de crises existenciais, ora pautadas pela revolta, ora pautadas pelo desespero.

Enfim, agradeço a todos que inegavelmente tornaram a execução deste projeto um crescimento pessoal, intelectual e muito prazeroso e, sobretudo, por me ensinarem que a realização pessoal e a felicidade estarão sempre nas coisas mais simples da vida.

## **BIOGRAFIA**

Vinicius Ferreira da Paixão, filho de Nilon Ricardo da Paixão e Luzia do Rosário Ferreira da Paixão, nasceu em 07 de maio de 1987, em Viçosa – Minas Gerais.

Em Julho de 2011, graduou-se no curso de Bacharelado em Bioquímica pela Universidade Federal de Viçosa na cidade de Viçosa, Minas Gerais.

Em Março de 2012, iniciou o Mestrado em Biologia Celular e Estrutural no Departamento de Biologia Geral da Universidade Federal de Viçosa, concentrando seus estudos na área de Biologia Molecular e Imunologia.



## SUMÁRIO

|                                                                                       |            |
|---------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>LISTA DE QUADROS, FIGURAS E TABELAS</b> -----                                      | <b>ix</b>  |
| <b>LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS</b> -----                                            | <b>xii</b> |
| <b>RESUMO</b> -----                                                                   | <b>xv</b>  |
| <b>ABSTRACT</b> -----                                                                 | <b>xvi</b> |
| <b>1. INTRODUÇÃO</b> -----                                                            | <b>1</b>   |
| <b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>                                                       |            |
| <b>2.1. O Vírus dengue</b> -----                                                      | <b>3</b>   |
| <b>2.1.1. A famíliaFlaviridae</b> -----                                               | <b>3</b>   |
| <b>2.1.2. Epidemiologia</b> -----                                                     | <b>3</b>   |
| <b>2.1.3. Manifestações Clínicas</b> -----                                            | <b>6</b>   |
| <b>2.1.4. Sorotipos e Estruturas</b> -----                                            | <b>7</b>   |
| <b>2.1.5. Proteína E e Domínio III</b> -----                                          | <b>8</b>   |
| <b>2.2. Diagnóstico e Expressão Heteróloga</b> -----                                  | <b>9</b>   |
| <b>2.2.1. Diagnóstico</b> -----                                                       | <b>9</b>   |
| <b>2.2.2. Sistema de Expressão Heteróloga emPichia pastoris</b> -----                 | <b>11</b>  |
| <b>3. OBJETIVO</b> -----                                                              | <b>12</b>  |
| <b>4. MATERIAIS E MÉTODOS-</b>                                                        |            |
| <b>4.1. Materiais e Métodos</b> -----                                                 |            |
| <b>4.1.1. Vetores de clonagem e expressão</b> -----                                   | <b>12</b>  |
| <b>4.1.2. Amplificação do fragmento de DNA do domínio III da proteína E DENV-3 --</b> | <b>13</b>  |
| <b>4.1.3. Preparação de bactérias competentes para a transformação</b> -----          | <b>14</b>  |
| <b>4.1.4. Clonagem do domínio III da proteína E no plasmídeo de clonagem</b>          | <b>14</b>  |
| <b>pTZ57r/t</b> -----                                                                 |            |
| <b>4.1.5. Transformação de células competentes TOP10F com o vetor de</b>              | <b>15</b>  |
| <b>clonagem</b> -----                                                                 |            |
| <b>4.1.6. Análise do DNA plasmidial extraído das colônias transformadas com o</b>     |            |
| <b>vetor de clonagem</b> -----                                                        | <b>16</b>  |
| <b>4.1.7. Ensaios de restrição</b> -----                                              |            |
| <b>4.1.8. Transformação de células competentes TOP10F com o vetor de</b>              | <b>17</b>  |
| <b>expressão</b> -----                                                                |            |
| <b>4.1.9. Análise do DNA plasmidial extraído das colônias transformadas com o</b>     | <b>18</b>  |
| <b>vetor de expressão</b> -----                                                       | <b>18</b>  |

|                                                                                                                                               |          |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------|
| 4.1.10. Transformação em <i>Pichia pastoris</i> -----                                                                                         |          |
| 4.1.11. Análise do DNA extraído das colônias de <i>Pichiapastoris</i> transformadas<br>com o vetor de expressão -----                         | 19<br>20 |
| 4.1.12. Serumsamples -----                                                                                                                    |          |
| 4.1.13. Purificação e caracterização do domínio III da proteína E de dengue-1-                                                                | 20       |
| 4.1.14. Enzyme-LinkedImmunosorbentAssay (ELISA) para a detecção de IgM<br>e IgG                                                               |          |
| 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO-----                                                                                                                | 22       |
| 6. CONCLUSÃO -----                                                                                                                            | 29       |
| 7. PERSPECTIVAS -----                                                                                                                         | 29       |
| 8. REFERÊNCIAS -----                                                                                                                          | 30       |
| 9. ANEXO APlasmídeo pPICzαA-----                                                                                                              | 35       |
| 10. ANEXO B Data of domIII DENV1 and domIIIDENV3 DNA sequence<br>from GenBank and codonoptimezed -----                                        | 36       |
| 11. ANEXO C Article - Dengue-1 envelope protein domain III produced in<br><i>Pichiapastoris</i> :Potential use for serological diagnosis----- | 42       |

## LISTA DE QUADROS, FIGURAS E TABELAS

### INTRODUÇÃO

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |   |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---|
| <b>Figura 01.</b> Ciclo de transmissão do vírus Dengue entre a fêmea do mosquito <i>Aedes</i> e primatas de forma controlada. Salto adaptativo de mudança para hospedeiro humano e estabelecimento de ciclo endêmico. Transmissão horizontal do vírus entre mosquitos infectados e gerações consecutivas. ----- | 1 |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---|

### REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |   |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---|
| <b>Figura 02.</b> Sombreamento cinza-escuro indica países/áreas de risco de transmissão de DENV de 2008. As linhas de contorno indicam os potenciais limites geográficos dos hemisférios norte e sul para todo o ano de sobrevivência de <i>Aedes aegypti</i> , principal mosquito vetor da DENV. ----- | 4 |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---|

-

|                                                                                                          |   |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|---|
| Quadro 01. Casos de Dengue no Brasil no ano de 2013 de acordo com os dados do Ministério da Saúde. ----- | 5 |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|---|

--

|                                                                            |   |
|----------------------------------------------------------------------------|---|
| <b>Figura 03.</b> Espectro de sintomas da infecção por vírus Dengue. ----- | 8 |
|----------------------------------------------------------------------------|---|

-

|                                          |  |
|------------------------------------------|--|
| <b>Figura 04.</b> Vírus da Dengue. ----- |  |
|------------------------------------------|--|

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |   |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---|
| <b>Figura 05.</b> Estrutura da proteína E do vírus dengue-3 presente nas partículas virais maduras. (A) Estrutura primária da proteína E solúvel, apresentando seus três domínios (sem a região de haste e âncora). O domínio I ou central é representado em vermelho, o domínio II ou de dimerização, em amarelo e o domínio III ou tipo Ego, em azul. Os aminoácidos de 393 a 493 representam a região haste âncora (HA) da proteína E, sendo que esta última porção consiste no C-terminal transmembranar dessa proteína. (B) Visão frontal com o eixo duplo de simetria. (C): Vista perpendicular do dímero. Os resíduos glicanas são indicados nos resíduos 67 e 153 do domínio II. ----- | 9 |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---|

-

### CAPÍTULO I

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |                        |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------|
| <b>Figura 6.</b> Mapa do Plasmídeo de Clonagem pTZ57R/T -----                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | <b>13</b>              |
| <b>Figura 7.</b> Mapa do Plasmídeo de Expressão pPICZαA (Anexo A) -----                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | <b>13</b>              |
| <b>Figura 8.</b> (A) gene sintético de EDIII-D1 com os códons otimizados para a expressão. (B) Mapa do plasmídeo pPICZα-EDIII-D1. O gene foi inserido no EDIIID1 nos sítios EcoR I e NotI do pPICZαA vector integrativo, sob o controle do promotor de AOX1 induzível por metanol (AOX1 50) I. (C) Sequência aminoacídica da proteína recombinante.-----                                       | <b>18</b><br><b>17</b> |
| <b>Figura 9.</b> PCR de colônia do inserto de DNA correspondente do domIII de DENV1 e 3 em bactérias transformadas com pTZ57r/t (com resistência a Ampicila):.1 - Marcadores; 2 e 4 - fragmento ampliado de 408 pb correspondente ao domIII da proteína E de DENV1; 3 e 5 - fragmento ampliado de 408 pb correspondente ao dom III de DENV3, 6 - controle positivo, C- controle negativo ----- | <b>23</b>              |
| <b>Figura 10.</b> Dupla digestão com enzimas de restrição NotI e EcoRI da construção 3 -domIIIDENV1/pTZ57r/t; 4 - domIIIDENV3/pTZ57r/t . Em ambos ocorre liberação do fragmento de 408pb correspondente ao inserto de DNA correspondente o domIII de DENV1 (poço 3) e DENV3 (poço 4).-----                                                                                                     | <b>23</b>              |
| <b>Figura 11.</b> Confirmação da transformação por PCR de colônia das bactérias transformadas com resistência a Zeocin®. Respectivamente da esquerda para direita: marcador; ampliação do promotor AOX1 (941 pb) e o inserto de DNA correspondente do domIII de DENV1 (408 pb); ampliação do promotor AOX1 (941 pb) e o inserto de DNA correspondente do domIII de DENV3(408 pb).-----         | <b>24</b>              |
| <b>Figura 12.</b> Confirmação da transformação por eletroporação das leveduras. PCR da extração do genoma das colônias cultivadas em meio com Zeocin™, respectivamente da esquerda para direita: ampliação do inserto de DNA correspondente ao promotor AOX1 (941pb) para DENV1 (D1) e DENV3 (D3), e ampliação do DNA correspondente ao domIII (408pb) de DENV1 e DENV3.---                    | <b>25</b>              |

**Figura 13.** (A) A análise de SDS-PAGE da expressão da proteína (17 kD) no sobrenadante (BC) de controle em branco (G-S115), (Ind) sobrenadante sem indução, e (Ind +) sobrenadante após a indução com metanol. (B) A análise da expressão da proteína recombinante SDS-PAGE após 1, 2, e 3 dias de indução com metanol 1% de 12/12h. (MW) Marcadores de peso molecular (kDa).----- 25

**Figura 14.** Purificação e caracterização da proteína sEDIII-D1. (A) Comassie blue-stained 15% SDS-PAGE reduzida de amostras obtidas a partir de cada um dos passos de purificação de proteínas recombinantes. (1) sobrenadante total após a indução de metanol; (2) da amostra que não interagem com o meio de afinidade; (3) recombinante purificada sEDIII-D1; (PM) de proteínas marcadores de peso molecular (kDa). (B) O imunoblot da sEDIII-D1 após a purificação. Aliquotas de material purificado (3), foram transferidas para nitrocelulose e sondadas com anticorpos anti-HisTag e soro positivo de dengue. (M) marcadores pré-corados de peso molecular (kDa). As setas indicam as posições de electroforese da proteína sEDIII-D1----- 26

-

## LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

|        |                                    |
|--------|------------------------------------|
| %      | Porcentagem                        |
| °C     | Grau Celsius                       |
| µg     | Microgramas                        |
| µL     | Microlitros                        |
| AC     | Acre                               |
| Ag     | Antígeno                           |
| AL     | Alagoas                            |
| AM     | Amazonas                           |
| AP     | Amapá                              |
| BA     | Bahia                              |
| CE     | Ceará                              |
| DENV   | Vírus dengue                       |
| DENV-1 | Vírus dengue-1                     |
| DENV-2 | Vírus dengue-2                     |
| DENV-3 | Vírus dengue-3                     |
| DENV-4 | Vírus dengue-4                     |
| DF     | Distrito Federal                   |
| DF     | Febre da Dengue                    |
| DHF    | Febre da Dengue Hemorrágica        |
| D I    | Domínio I                          |
| D II   | Domínio II                         |
| D III  | Domínio III                        |
| DNA    | Ácido Desoxirribonucleico          |
| DSS    | Síndrome de Choque da Dengue       |
| DTN's  | Doenças Tropicais Negligenciadas   |
| EDTA   | Ácido Etilenodiamino Tetra-acético |
| ELISA  | Enzyme-Linked Immunosorbent Assay  |
| ES     | Espírito Santo                     |
| FC     | Fixação do Complemento             |
| g      | Gramas                             |

|           |                                                        |
|-----------|--------------------------------------------------------|
| GO        | Goiás                                                  |
| GRAS      | Generally Regarded As Safe                             |
| HCL       | Ácido Clorídrico                                       |
| IgG       | Imunoglobulina G                                       |
| IgM       | Imunoglobulina M                                       |
| IH        | Inibição da Hemaglutinação                             |
| Kb        | Kilobases                                              |
| kDa       | Kilodalton                                             |
| LB        | Luria-Bertani                                          |
| MA        | Maranhão                                               |
| MAbs      | Anticorpos Monoclonais                                 |
| MAC-ELISA | IgM antibody-capture enzyme-linked immunosorbent assay |
| MG        | Minas Gerais                                           |
| mL        | Mililitro                                              |
| mM        | Milimol                                                |
| mRNA      | Ácido Ribonucléico mensageiro                          |
| MS        | Mato Grosso do Sul                                     |
| MT        | Mato Grosso                                            |
| NaOH      | Hidróxido de Sódio                                     |
| nm        | Nanômetro                                              |
| OMS       | Organização Mundial da Saúde                           |
| PA        | Pará                                                   |
| PB        | Paraíba                                                |
| pb        | Par de Base                                            |
| PCR       | Reação em Cadeia da Polimerase                         |
| PE        | Pernambuco                                             |
| PI        | Piauí                                                  |
| PR        | Paraná                                                 |
| RJ        | Rio de Janeiro                                         |
| RNA       | Ácido Ribonucléico                                     |
| RN        | Rio Grande do Norte                                    |
| RO        | Rondônia                                               |
| rpm       | Rotações por minuto                                    |

|     |                                           |
|-----|-------------------------------------------|
| RR  | Roraima                                   |
| RS  | Rio Grande do Sul                         |
| SC  | Santa Catarina                            |
| SE  | Sergipe                                   |
| SOC | SuperOptimalbrothwithCataboliterepression |
| SP  | São Paulo                                 |
| TN  | Teste de Neutralização                    |
| TO  | Tocantins                                 |
| UF  | Unidade Federativa                        |



## RESUMO

DA PAIXÃO, Vinicius Ferreira, M. Sc. Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2014. **Construção e expressão heteróloga de domínio III da proteína de envelope (E) dos vírus dengue -1e - 3 em *Pichia pastoris***. Orientador: Sérgio Oliveira de Paula. Coorientador: Silvia Almeida Cardoso.

A dengue é a arbovirose mais importante do mundo colocando em risco quase metade da população mundial, classificada como uma Doença Tropical Negligenciada. É de suma importância o desenvolvimento e melhoramento das metodologias de diagnóstico bem como vacinas para dengue. Entretanto o desenvolvimento dessas são limitados pela dificuldade de produção em grande escala de antígenos a serem usados na captura do anticorpo presente no soro de pacientes infectados e para a imunização de cobaias. Devido a este fator limitante, este trabalho teve como objetivo produzir antígeno em grande quantidade e qualidade do domínio III da proteína E dos VÍRUS DENGUE. Para tanto, a *P. pastoris* foi utilizada por ser uma levedura que tem por natureza um padrão de modificações pós-traducionais em suas proteínas semelhantes dos padrões de mamíferos quando comparamos este gênero (*Pichia*) com outros gêneros de leveduras já utilizados em expressão heteróloga. Sequências de DNA correspondes ao domínio III da proteína E de DENV-1 e -3 foram inseridos na construção pTZ/domIIIDENV1 e pTZ/domIIIDENV3 e clonadas em *E. coli*, e os insertos domIII DENV-1 e de -3 foram liberados por digestão com as enzimas de restrição EcoRI e NotI e, posteriormente ligados ao vetor de expressão pPIC $\alpha$ A em leveduras. As construções resultantes pPIC $\alpha$ A/domIIIDENV1 e pPIC $\alpha$ A/domIIIDENV3 também foram clonadas em *E. coli* e com elas *P. pastoris* GS115 foram transformadas por eletroporação e selecionadas em meio com Zeocin<sup>TM</sup>. Todas as construções e a transformação foram confirmadas através de PCR. Uma vez obtidas as linhagens recombinantes foi feita a expressão da proteína domIIIDENV1, e por técnicas sorológicas como ELISA indireto com IgM e IgG de pacientes soropositivos para Dengue foi confirmada a grande similaridade da proteína heteróloga expressa e a proteína nativa, uma vez que estas técnicas são extremamente sensíveis e específicas por dependerem da ligação antígeno-anticorpo. Este trabalho vem demonstrar o grande potencial para produção em larga escala do antígeno Domínio III da proteína de Envelope dos vírus dengue 1 e 3 para construção de “kits diagnóstico” e melhorias no controle da dengue.

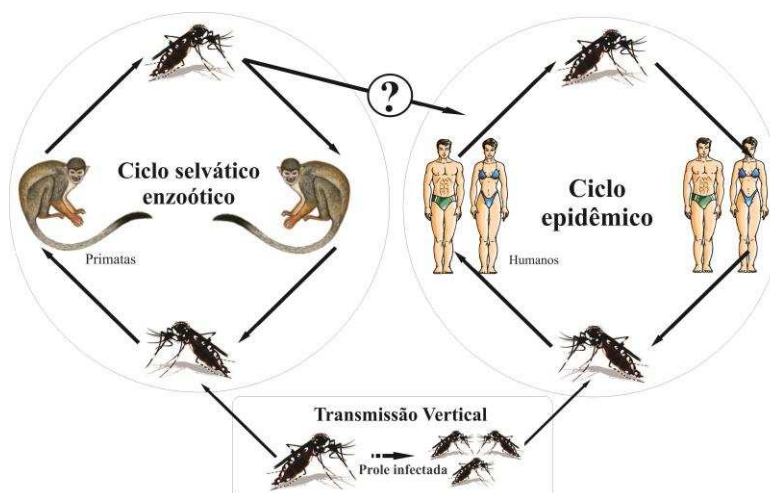
## ABSTRACT

DA PAIXÃO, Vinicius Ferreira, M. Sc. Universidade Federal de Viçosa, February 2014. **Construction and Heterologous expression of dengue virus - 1 and - 3 domain III of envelope(E) protein in Pichiapastoris.** Adviser: Sérgio Oliveira de Paula. Co-adviser: Silvia Almeida Cardoso.

Dengue is the most important arboviral disease in the world risking almost half the world's population, classified as a Neglected Tropical Disease. It is imperative the development and improvement of diagnostic methods and vaccines for dengue. However, the development of these are limited by the difficulty in large-scale production of antigens for use in capturing present in serum of infected patients and antibody to immunize guinea pigs. Due to this limiting factor, this work aimed to produce in large antigen quantity and quality of the domain III of the E protein of dengue virus. Therefore, the *P. pastoris* was used because it is a yeast that has by nature a pattern of post- translational modifications of proteins similar in their patterns of mammals when comparing this genre (*Pichia*) with other genera of yeasts now used in heterologous expression. Sequences respond to it the domain III of the E protein of DENV- 1 and -3 were inserted DNA construction and pTZ/domIIIDENV1 pTZ/domIIIDENV3 and cloned in *E. coli* and inserts domIII DENV -1 and -3 were released by digestion with the restriction enzymes EcoRI and NotI and subsequently linked to the yeast expression vector pPICzαA. The resulting constructs were also pPICzαA/domIIIDENV3 pPICzαA/domIIIDENV1 and cloned in *E. coli* and *P. pastoris* GS115 they were transformed by electroporation and selected in medium with Zeocin™. All constructs and transformation was confirmed by PCR. Once obtained recombinant strains was made domIIIDENV1 protein expression and by serological techniques as ELISA IgG and IgM positive patients was confirmed Dengue the great similarity of the expressed heterologous protein and native protein , since these techniques are highly sensitive and specific for depending on the antigen-antibody binding . This work demonstrates the great potential for large-scale production of antigen Domain III of the envelope protein of dengue virus 1 and 3 for construction of “diagnostic kits” and improvements in dengue control.

## 1 INTRODUÇÃO

A dengue é causada pelos vírus Dengue (DENV), os quais compreendem, até então, quatro sorotipos (DENV-1 a -4) e pertencentes à família Flaviviridae. Até algumas centenas de anos atrás, o vírus da Dengue estava restrito a um ciclo silvestre transmitido entre primatas (não humanos) e mosquitos do gênero *Aedes* nas regiões tropicais e subtropicais da África e Ásia, com raras ocorrências nas populações humanas (HOLMES, EC; TWIDDY, 2003). Com a urbanização dessas áreas, onde tal ciclo era endêmico, teve-se a disseminação do vírus Dengue por todo globo e o homem também se tornou hospedeiro, o qual agora envolve quase que exclusivamente o ciclo de transmissão do vírus. (HALSTEAD, SB 1988). Além do ciclo de vida artrópode-primata tem sido observada a transmissão vertical do vírus entre gerações sucessivas de mosquito para mosquito vetores (HADDOW et al., 2013), como apresentado na Figura 1.



**Figura 1.** Ciclo de transmissão do vírus Dengue entre a fêmea do mosquito *Aedes* e primatas de forma controlada. Salto adaptativo de mudança para hospedeiro humano e estabelecimento de ciclo endêmico. Transmissão vertical do vírus entre mosquitos infectados e gerações consecutivas.

Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) a incidência de dengue tem crescido dramaticamente por todo o globo. Mais de 2,5 bilhões de pessoas, mais de 40% da população mundial, está agora em risco de dengue. Estima-se que atualmente ocorram de 50 a 100 milhões de infecções em todo o mundo a cada ano e que 500 000 pessoas, grande parte crianças, desenvolvem um quadro de dengue grave necessitando de hospitalização e que cerca de 2,5% dos infectados vão a óbito (WHO, 2013). A Dengue é a mais comum das infecções virais transmitida por artrópodes. Em 2012, foi classificada pela OMS como a doença viral transmitida por vetor de mais rápida propagação e maior potencial de epidemia no mundo. Isto torna a dengue a mais importante das Doenças Tropicais Negligenciadas (DTN's) virais do mundo registrando um aumento de 30 vezes na incidência da doença nos últimos 50 anos (WHO, 2013).

O mosquito *Aedes aegypti* apesar de originalmente silvícola, se tornou perito em colonizar os ambientes urbanos, adaptando-se a tal ponto de hoje ser este seu habitat, destacam-se recipientes, pontos de represamento de água, artificiais urbanos como “criadouros” do mosquito. Ao contrário de outras espécies, o *A. aegypti* possui hábitos alimentares diurnos, com o período de pico das picadas ocorrendo predominantemente no início da manhã e ao entardecer. A fêmea do *A. aegypti* pode picar várias pessoas durante um mesmo período de alimentação. Já o *Aedes albopictus*, é um vetor secundário da dengue na Ásia, se espalhou para a América do Norte e Europa. Assim como o *A. aegypti* o *A. albopictus* é altamente adaptável podendo, porém, sobreviver em regiões temperadas mais frias(BÄCK E LUNDKVIST, 2013).

No Brasil o principal vetor da Dengue é a fêmea do mosquito *Aedes aegypti*, em outras regiões é transmitida também pelas espécies *A. albopictus*, *A. polynesiensis* e o *A. scutellaris*. Uma vez no hospedeiro mamífero inicia-se o ciclo de replicação viral nas células estriadas, lisas, fibroblastos e linfonodos locais. Após um período de incubação de 2 a 10 dias ocorre a viremia, com a disseminação do vírus no organismo do indivíduo. A infecção pode ser subclínica assintomática ou pode se manifestar clinicamente indo desde uma doença auto-limitada chamada Febre da Dengue (DF), ou Dengue Clássica, até as formas mais severas, como a Febre da Dengue Hemorrágica (DHF) e a Síndrome de Choque da Dengue (DSS) variando dentro de um espectro contínuo. O fator que determina quão branda ou quão severa será os sintomas da infecção nos hospedeiros ainda permanecem obscuros. Apesar de a pessoa adquirir imunidade duradoura para aquele sorotipo que a infectou(DE PAULA E FONSECA, 2004), estudos apontam que infecções secundárias com sorotipos distintos são um fator de risco para o desenvolvimento de formas mais graves da Dengue, a DHF ou a DSS (RODENHUIS-ZYBERT et. al.,2010).

Apesar destas proporções, até o dado momento não existem quaisquer tratamentos específicos contra o vírus, tal como antivirais, e nem uma vacina no mercado, apenas medidas profiláticas para controlar os vetores, as quais não têm se mostrado eficazes. Experiências práticas apontam que a estratégia para se combater a Dengue passa pelo desenvolvimento de ensaios imunoenzimáticos mais robustos, kits para diagnósticos mais elaborados e de vacinas. Estas tecnologias dependem da obtenção de antígenos da Dengue em grande quantidade e alta similaridade, atualmente os principais centros de pesquisa e diagnóstico do mundo têm apresentado dificuldades na obtenção de preparações com conteúdo adequado de antígeno, necessitando concentrar o antígeno através de centrifugação zonal contínua de sobrenadantes de culturas infectadas, sendo que a produção é relativamente baixa do vírus dengue em culturas celulares. Este quadro ratifica a existência do obstáculo importante, à produção de antígenos, a serem empregados em ensaios usados na captura do anticorpo presente no soro do paciente infectado(WHO,2009).

No Brasil, os antígenos usados para diagnóstico da dengue são proteínas virais estruturais, preparados a partir do cérebro de camundongos recém-nascidos infectados. Porém esta obtenção é extremamente laboriosa e cara. Nesse sentido, os sistemas heterólogos de expressão de proteínas são promissores, portanto este trabalho visou a construção de leveduras recombinantes capazes de produzir o antígeno domínio III da proteína E do vírus dengue-1 e dengue-3, como estratégia para uma obtenção menos laboriosa e padronizável independente da infecção viral, de forma a favorecer o estabelecimento de novas tecnologias no controle, monitoramento e combate da Dengue. (Miller, 2010)

## **2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 O Vírus *dengue***

#### **2.1.1 A família *Flaviridae***

Basicamente a família *Flaviviridae*, composta por três gêneros: *Flavivirus*, *Hepacivirus* e *Pestivirus*, são vírus esféricos e envelopados. O material genético é uma fita simples de Ácido Ribonucléico (RNA) de polaridade positiva, ou seja, o genoma viral tem a mesma polaridade ou orientação do Ácido Ribonucléico mensageiro (mRNA) da célula infectada, com isso, o material genético pode servir como base para a síntese das proteínas virais, por isso é também chamado de RNA infeccioso. Dentre os *Flavivirus*, encontra-se um grupo que tem um comportamento muito específico em seu ciclo, os vírus transmitidos por artrópodes ou arbovírus, sendo eles de grande importância médica e para o campo da Saúde Pública. No quadro atual, as infecções causadas pelos vírus da Dengue são as que assumem maior importância no nosso país (FRANCKI *et al.*, 1991). Este *Flavivirus* possui 4 sorotipos denominados *dengue-1*, *dengue-2*, *dengue-3*, e *dengue-4* e a imunidade adquirida após infecção com cada um dos sorotipos é duradoura (DE PAULA E FONSECA, 2004).

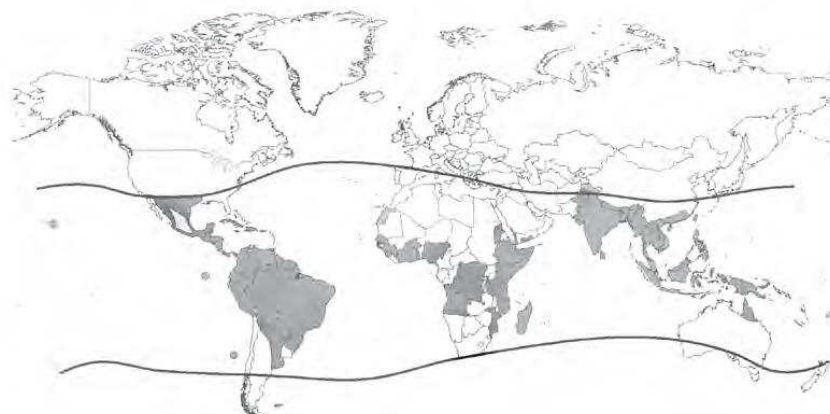
#### **2.1.2 Epidemiologia**

A dengue é a arbovirose mais importante no quadro mundial. Estima-se que, anualmente, as infecções com o vírus dengue ocasionam mais de 100 milhões de casos de dengue clássico e mais de 500 mil de dengue hemorrágico. Nos últimos vinte anos têm sido observados incrementos significativos na atividade epidêmica, expansão da distribuição geográfica, transmissão contínua de vários sorotipos e emergência da Febre Hemorrágica - em áreas onde a doença não era prevalente, o

meio urbano. A incidência de Dengue aumentou 30 vezes nos últimos 50 anos. Estima-se 50 milhões de infecções foram estimadas para ocorrer anualmente, em mais de 100 países endêmicos e a doença continua a se espalhar, sendo que aproximadamente 40% da população mundial, ou seja, 2,5 milhões de pessoas estão em risco (WHO, 2013).

Nos últimos vinte anos têm sido observado um incremento significativo na atividade epidêmica, expansão da distribuição geográfica, transmissão contínua de vários sorotipos e emergência da DHF em áreas onde a doença não era prevalente. A doença é endêmica em mais de 100 países na África, Américas, Leste Mediterrâneo, Sudeste Asiático, e no Oeste Pacífico (WHO 2013, HUANG, *et al.*, 2002). Nessas regiões, 90% dos casos de DHF acometem crianças com idade inferior a 15 anos (NORMILE, 2007; EDELMAN, 2005 e 2007), sendo de longe a arbovirose mais comum e humana nas regiões tropicais e subtropicais (THOMAS E ENDY, 2011). A distribuição global da Dengue (Figura 02) é importante nas áreas tropicais e subtropicais, sendo a transmissão desse vírus feita por mosquitos do gênero *Aedes*, principalmente o *A. aegypti*, caracterizando-se por ser predominantemente urbano na sua distribuição (HALSTEAD, 2007).

No Brasil, no ano de 2013, até o dia 19 de novembro foram notificados 1.476.917 casos de Dengue no país (Tabela 01), 64% a mais em comparação ao último grande mapeamento em 2010, sendo que desses, 6.566 foram casos graves e 573 vieram a óbito. Os estados com maior número absoluto de casos foram Minas Gerais, com 435.828, seguido de São Paulo, com 220.865 e Rio de Janeiro, com 212.933 casos. A região sudeste concentra 63,41% dos casos de Dengue de 2013. Minas Gerais teve 360 casos graves de Dengue registrados e 116 mortes.



**Figura 02.** Sombreamento cinza-escuro indica países/áreas de risco de transmissão de DENV de 2008. As linhas de contorno indicam os potenciais limites geográficos dos hemisférios norte e sul para todo o ano de sobrevivência de *Aedes aegypti*, principal mosquito vetor da DENV.  
Fonte: OMS, 2009.

**Tabela1:** Casos de Dengue no Brasil no ano de 2013 de acordo com os dados do Ministério da Saúde.  
Fonte: SES/SINAN

| UF | CASOS NOTIFICADOS | CASOS GRAVES | ÓBITOS |
|----|-------------------|--------------|--------|
|----|-------------------|--------------|--------|

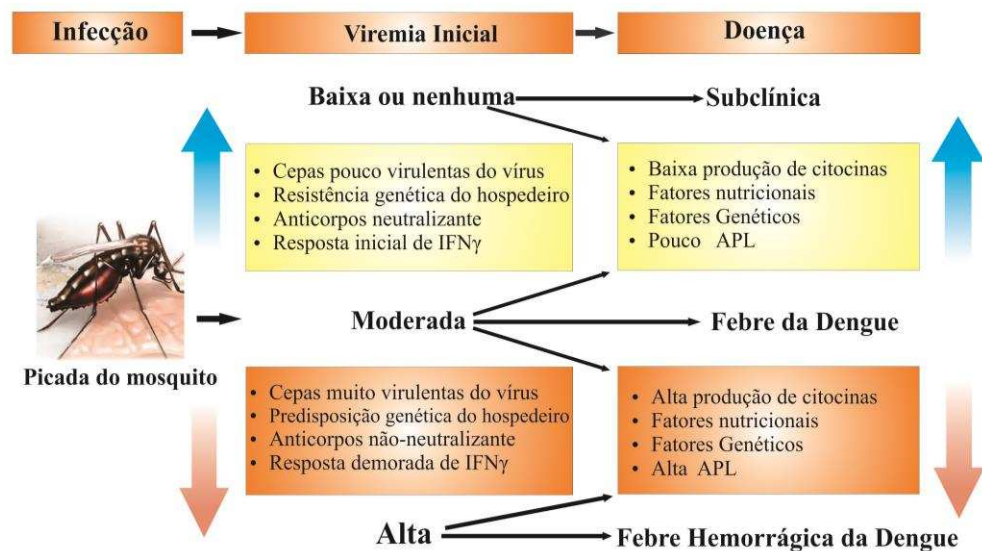
|               |                  |              |            |
|---------------|------------------|--------------|------------|
| <b>RO</b>     | 9.365            | 28           | 3          |
| <b>AC</b>     | 2.577            | 4            | 0          |
| <b>AM</b>     | 16.858           | 96           | 9          |
| <b>RR</b>     | 849              | 1            | 0          |
| <b>PA</b>     | 8.682            | 37           | 10         |
| <b>AP</b>     | 1.667            | 7            | 2          |
| <b>TO</b>     | 8.669            | 17           | 4          |
| <b>MA</b>     | 3.586            | 36           | 12         |
| <b>PI</b>     | 4.664            | 19           | 1          |
| <b>CE</b>     | 32.039           | 159          | 54         |
| <b>RN</b>     | 16.035           | 102          | 8          |
| <b>PB</b>     | 13.050           | 92           | 14         |
| <b>PE</b>     | 8.650            | 42           | 19         |
| <b>AL</b>     | 8.935            | 16           | 4          |
| <b>SE</b>     | 745              | 5            | 3          |
| <b>BA</b>     | 61.974           | 125          | 21         |
| <b>MG</b>     | 435.828          | 360          | 116        |
| <b>ES</b>     | 66.874           | 1.686        | 23         |
| <b>RJ</b>     | 212.933          | 1.207        | 48         |
| <b>SP</b>     | 220.865          | 428          | 72         |
| <b>PR</b>     | 69.444           | 224          | 24         |
| <b>SC</b>     | 370              | 1            | 0          |
| <b>RS</b>     | 485              | 1            | 0          |
| <b>MS</b>     | 81.741           | 695          | 34         |
| <b>MT</b>     | 34.012           | 99           | 27         |
| <b>GO</b>     | 140.399          | 1.063        | 58         |
| <b>DF</b>     | 15.621           | 16           | 7          |
| <b>BRASIL</b> | <b>1.476.917</b> | <b>6.566</b> | <b>573</b> |

Os fatores responsáveis pelo aumento da Dengue como um problema mundial de Saúde Pública nas últimas décadas estão associados com as mudanças sociais e demográficas dos últimos 50 anos. Os maiores fatores têm sido o crescimento populacional sem precedentes e a urbanização sem planejamento e descontrolada, especialmente nos países tropicais em desenvolvimento. No entanto, mudanças epidemiológicas nas Américas foram as mais drásticas. Nas décadas de 50, 60 e

na maior parte da década de 70, epidemias de dengue nas Américas eram raras devido à erradicação do mosquito vetor (DE PAULA e FONSECA, 2004). Entretanto, o programa de erradicação do mosquito foi descontinuado no início dos anos 70 e essa espécie, *Aedes aegypti*, voltou a aparecer, chegando a reocupar, nos anos 90 a distribuição geográfica que tinha antes da erradicação ter iniciado (DE PAULA e FONSECA, 2004; TAPIA-CONYER, *et al.*, 2009).

### 2.1.3 Manifestações Clínicas

A Dengue pode passar despercebida muitas vezes devido ao fato que apenas um caso ser sintomático em cadaquatro casos de infecção, fazendo com que a doença não seja detectada pelo hospedeiro (BHATT, S. *et al.*, 2013). Quando clinicamente detectável a infecção, com quaisquer dos quatro sorotipos existentes do vírus, apresenta sintomas que vão como em um espectro contínuo desde uma doença auto-limitada, que é a DF, até formas mais severas, como a FHD e a DSS (Figura 03) (GUZMAN *et al.*, 2010). As manifestações clínicas mais severas vêm sendo as responsáveis pelos altos índices de morbidade e mortalidade da Dengue (DE PAULA e FONSECA, 2004). Estudos têm mostrado que infecções secundárias com sorotipos distintos é um fator de risco para o desenvolvimento de formas mais graves da Dengue, a DHF/DSS (MORENS, D. M., *et al.*, 2013).



**Figura 03.** Espectro de sintomas da infecção por vírus Dengue.

### 2.1.4 Sorotipos e Estruturas

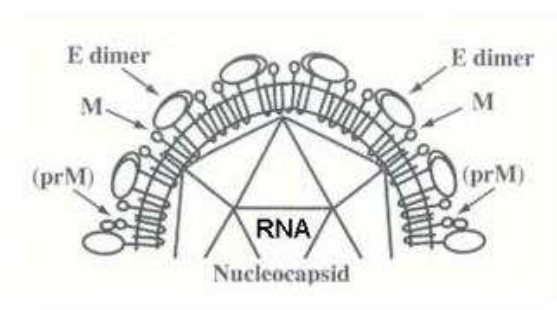
O vírus *dengue* apresenta quatro sorotipos antigenicamente relacionados denominados dengue-1 (DENV-1), dengue-2 (DENV-2), dengue-3 (DENV-3) e dengue-4 (DENV-4). Suas partículas virais maduras consistem de um genoma de RNA fita simples polaridade positiva, que funciona como mRNA após a entrada do mesmo no citosol. Essa molécula de RNA é circundada por



um nucleocapsídeo icosaédrico de 30 nm de diâmetro, recoberto com um envelope lipídico de cerca de 10 nm de espessura derivado da membrana da célula hospedeira (LINDENBACH e RICE, 2001).

O genoma desses vírus, bem como o de todos os *Flavivírus*, consiste de um RNA de fita única de aproximadamente 11 kilobases (Kb) de comprimento de polaridade positiva e com peso molecular aproximado de  $3.3 \times 10^6$  daltons, que expressa as proteínas em uma "long open reading frame" nas quais as proteínas estruturais encontram-se na porção 5' do genoma e as não-estruturais na porção 3'. A organização do genoma e a ordem de expressão destas proteínas é C-prM-E-NS1-NS2a-NS2b-NS3-NS4a-NS4b-NS5 (CHAMBERS, *et al.*, 1990).

O envelope viral apresenta uma bicamada lipídica originada a partir da membrana da célula hospedeira e possui duas proteínas de superfície: prM/M e E (Figura 4) (FIELDS, *et al.*, 1999). A proteína prM (associada à proteína M) forma um heterodímero intracelular, que atua estabilizando a proteína E (LORENZ *et al.*, 2002). prM sofre clivagem durante a exocitose e liberação do vírion, originando a proteína M (LINDENBACH E RICE, 2001), que adquire nova mudança conformacional, a qual é necessária para a correta disposição de E, fato que sugere uma função "chaperona-like" à proteína M (LORENZ *et al.*, 2002).



5

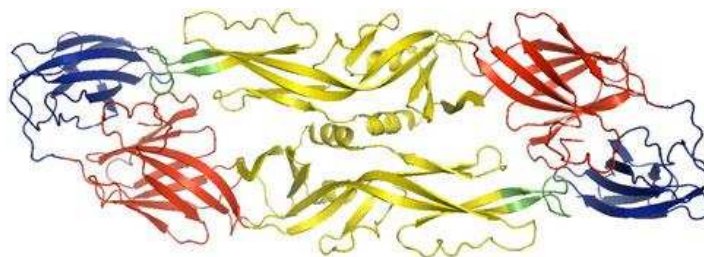
**Figura 04: Estrutura da partícula dos vírus da dengue.** Com as proteínas M, proteína E ocorrendo sob a forma de dimérica e uma representação da proteína prM que é clivada e se torna M durante marcando o amadurecimento do vírus. Fonte: Fields, *et al.*, 1999.

### 2.1.5 Proteína E e Domínio III

A proteína E, uma glicoproteína de 53 a 54 kDa, é o principal componente proteico do envelope viral. Ela participa do processo biológico da adsorção, estando esta proteína relacionada mais diretamente pelo reconhecimento e consequentemente com a fusão à membrana celular durante a penetração viral, por ser uma proteína de superfície ela acaba por estimular o sistema imune, daí sendo descrita na literatura por possuir a capacidade de induzir a produção de anticorpos neutralizantes e resposta de linfócito T (MANDL, *et al.*, 1987; HEINZ, *et al.*, 1990; HENCHAL e PUTNAK, *et al.*, 1990). As principais propriedades biológicas do vírus da dengue estão relacionadas à proteína E, que recobre totalmente a membrana e o genoma.

A proteína E possibilita o tropismo celular e a capacidade de hemaglutinar eritrócitos. Há alguma variação na composição da proteína E entre os vírus da Dengue, inclusive nos epítomos. Esses constituem antígenos de superfície que determinam a resposta imune e a proteção contra o vírus da Dengue em seres humanos. Os anticorpos dirigidos à proteína E determinam a imunidade protetora de mais longa duração (BRICKS, 2004).

Essa proteína apresenta três domínios estruturais (Figura 05): o domínio I (DI) ou domínio central, com aproximadamente 120 resíduos de aminoácidos que contém predominantemente tipos específicos de epítomos não neutralizantes, o que o leva a ser uma região de “dobradilha” molecular envolvida na mudança conformacional desencadeada por baixo pH; o domínio II (DII), ou domínio de dimerização da proteína, representando a interface entre os outros dois domínios e está envolvido na fusão da membrana mediada pelo vírus, além disso, contém muitos epítomos de reação cruzada gerando neutralização e não neutralização de anticorpos monoclonais (MAbs); e o domínio III (DIII), que é caracterizado por uma estrutura semelhante a uma imunoglobulina que forma a maioria dos “loops” da superfície viral. Ele contém múltiplos tipos e subtipos específicos de epítomos que gera somente a neutralização viral por MAbs e tem sido hipoteticamente aquele que contém o local de ligação da célula hospedeira ao anti-receptor. (ROEHRIG *et al.*, 1998 e 1997 e REY *et al.*, 1995).



**Figura 5:** Dímero da proteína Dengue E com três domínios definidos dentro de cada monômero: domínio I em vermelho, domínio II em amarelo com “loop” de fusão em verde e domínio III em azul. Fonte: MODIS Y, OGATA S, CLEMENTS D, HARRISON SC, 2003.

Uma vez que os epítomos do DIII são comprovadamente mais imunogênicos para a produção de anticorpos precoce no hospedeiro definitivo quando comparados aos epítomos dos outros domínios I e II da proteína E (WAYNE D. CRILL e JOHN T. ROEHRIG, 2001), a proteína E tem sido um dos principais alvos no estudo de vacinas e no uso como reagente (antígeno) no diagnóstico de uma infecção por dengue (SUGRUE *et al.*, 1997).

## 2.2 Diagnóstico e Expressão Heteróloga

### 2.2.1 Diagnóstico

A infecção pelos vírus Dengue tem sido diagnosticada através de técnicas de isolamento desses vírus, detecção de antígenos virais ou RNA em soro ou tecidos, ou detecção de anticorpos específicos no soro dos

pacientes (KING, et al., 1991; GUZMAN e KOURI, 1996). Testes sorológicos básicos têm sido usados para diagnóstico da infecção por dengue: Inibição da Hemaglutinação (IH), Fixação do Complemento (FC), Teste de Neutralização (TN), ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) tipo captura e sanduíche (DE PAULA e FONSECA, 2004).

O TN é o teste sorológico mais específico para o vírus Dengue, detectando por longos períodos, praticamente por toda a vida do infectado. Por sua elevada especificidade, o TN pode ser empregado para identificar o sorotipo infectante em infecções primárias por Dengue, isto é devido à relativa resposta monotípica que é observada no soro de pacientes em fase de convalescência (GUBLER e SATHE, 1988; VORDAM & KUNO; 1997).

Os testes rápidos por imunocromatografia foram criados devido à necessidade de uma detecção rápida e eficaz. A realização do teste não necessita instrumentação sofisticada, nem mesmo treinamento especial para sua realização. Esse tipo de teste é extremamente atrativo para clínicas e postos de saúde (Programa da Saúde da Família), consultórios médicos, salas de emergência, pequenos hospitais, e instalações mais isoladas. Esses testes são realizados em uma membrana na qual é fixado um agente marcador utilizado para a identificação do complexo antígeno-anticorpo e, portanto, quantifica ou identifica a presença de um determinado antígeno na amostra analisada (Sanchez, 2001).

Os sistemas imunoenzimáticos têm sido considerados de grande utilidade para o diagnóstico da Dengue devido a sua alta sensibilidade e rapidez. A pesquisa de anticorpos distintos, ou seja, de fase aguda (IgM) e de convalescência (IgG), assim como a pesquisa de antígenos (Ag) é possível pelo método de ELISA. Por sua simplicidade de execução e a necessidade de equipamentos não muito sofisticados, esses testes têm se tornado os métodos sorológicos mais utilizados para o diagnóstico da dengue nos últimos anos. Além disso, por serem muito sensíveis no diagnóstico de anticorpos de fase aguda dispensam a necessidade de uma amostra pareada no período de convalescência (GUBLER & SATHE, 1988; VORDAM & KUNO; 1997).

O MAC-ELISA (*IgM antibody-capture enzyme-linked immunosorbent assay*) tem sido uma valiosa ferramenta na vigilância da dengue clássica e dengue hemorrágica. Em áreas onde a dengue não é endêmica, esse método pode ser usado na detecção clínica dos casos com sinais de infecção viral ou até mesmo ao acaso, através de uma soro-inspeção da população, podendo indicar uma infecção recente. Durante epidemias, uma vantagem do MAC-ELISA é a determinação rápida da propagação da transmissão. Em áreas onde a Dengue é endêmica, MAC-ELISA pode ser usado como um valioso meio na avaliação de um grande número de amostras laboratoriais com relativa facilidade (GUBLER & SATHER, 1988).

O IgG-ELISA tem sido utilizado na diferenciação de infecções primárias e secundárias por dengue (CHUMGUE, et al., 1989). O teste é simples e de fácil manipulação, podendo ser assim

utilizado na análise de grandes volumes de amostras. O IgG-ELISA não é muito específico dando reação cruzada com outros *Flavivírus*, e não pode ser utilizado na identificação dos sorotipos virais da dengue (GUBLER, 1998).

Na atualidade, o maior ao desenvolvimento dos ensaios imunoenzimáticos diz respeito à obtenção dos antígenos. Os principais centros de pesquisa e diagnóstico do mundo têm apresentado grandes dificuldades na obtenção de preparações com conteúdo adequado de antígeno, necessitando concentrar o antígeno através de centrifugação zonal contínua de sobrenadantes de culturas infectadas, sendo que a produção relativamente baixa do vírus Dengue nas culturas celulares surge como um obstáculo importante na produção em larga escala dos antígenos empregados em diversos ensaios usados na captura do anticorpo presente no soro do paciente infectado. No Brasil os antígenos atualmente usados para diagnóstico da Dengue são proteínas virais estruturais, preparados a partir do cérebro de camundongos recém-nascidos artificialmente infectados, sendo essa obtenção de antígenos extremamente laboriosa e cara (MARTINA, *et al.*, 2009).

A realização de testes diagnósticos rápidos e baratos representa uma necessidade crescente no Brasil viabilizando a realização do diagnóstico em larga escala e em todo o País, mesmo nas regiões mais afastadas das grandes cidades (PAHO, 2009). Devido a essa demanda, visou-se, nesse trabalho, obter um antígeno em quantidade e qualidade utilizando um sistema de expressão heteróloga de proteínas em leveduras.

### **2.2.2 Sistema de Expressão Heteróloga em *Pichia pastoris***

Dentre os sistemas de expressão heterólogos descritos na literatura, o interesse pelas leveduras do gênero *Pichia*, um exemplo é como *P. pastoris* que são empregadas para a produção de diversos metabólitos e proteínas de interesse da indústria biotecnológica (ROMANOS, *et al.*, 1992). Quando comparados, os sistemas de expressão desenvolvidos em procariotos e quando desenvolvidos em alguns eucariotos, estas leveduras, se destacam pela facilidade de cultivo, crescimento, manutenção e serem facilmente manipuladas geneticamente. Neste caso em específico, é de suma importância a característica bioquímica deste organismo de ter um padrão de modificações pós-traducionais específicas de células eucarióticas semelhante a dos mamíferos, muitas vezes essenciais para obtenção de produtos biotecnológicos ativos ou adequadamente processados. Os sistemas de expressão em leveduras são econômicos, apresentam em geral melhores rendimentos e demandam menos tempo e esforços quando comparados a outros sistemas de expressão eucarióticos como os baculovírus e células de mamíferos (CREGG E HIGGINS, 1995). O sistema eucarioto *P. pastoris*, amplamente utilizado na biotecnologia tem a capacidade de produzir a maior parte das proteínas recombinantes de forma estável e com modificações pós-traducionais características de proteínas

eucarióticas (COLAO et al., 2006).

A escolha deste organismo como sistema de expressão heterólogo se justifica, além das características citadas acima, pelo fato dessa levedura apresentar o status GRAS (“Generally Regarded As Safe”), bem como sua capacidade de converter 30% a 40% do seu peso em proteínas (RATNER, 1989), e, enfaticamente, ao fato desta levedura glicosilar proteínas de forma mais próxima aos mamíferos, cerca de 8-14 resíduos de manose em cadeias de oligossacarídeos (GRINNA e TSHOOP, 1989).

### 3OBJETIVO

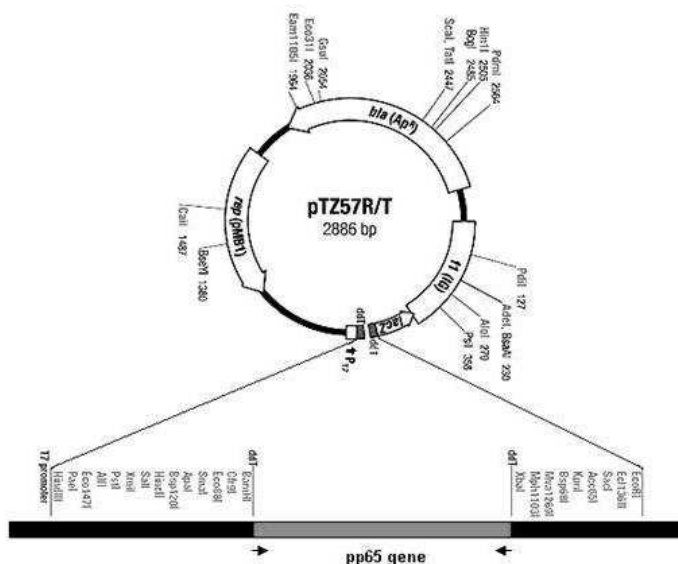
Construir linhagens recombinantes de *Pichia pastoris* capazes de expressar o Domínio III da proteína E do envelope do vírus dengue sorotipos 1 e 3.

## 4 CAPÍTULO I

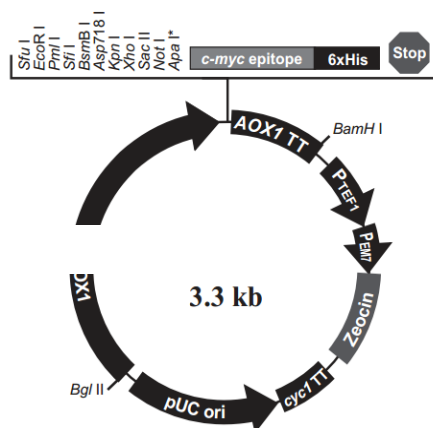
## 4.1 Materiais e Métodos

#### 4.1.1 Vetores de clonagem e expressão

Plasmídeos de clonagem pTZ57R/T (Figura 01) foram adquiridos junto à Promega Corporation, Madison, Wisconsin para inserção dos genes otimizados para leveduras do domínio III da Proteína E (Anexo A) e utilizados para transformação de células de *E. coli* TOP10F competentes previamente preparadas (Item 4.3). O plasmídeo para Expressão utilizado foi o pPIC $\alpha$ A (Figura 2) produzidos pela Invitrogen/USA foram utilizados na transformação de *Pichia pastoris* (The EasySelect™ Pichia Expression Kit).



**Figura 6 - Mapa do Plasmídeo de Clonagem pTZ57R/T**



**Figura 7– Mapa do Plasmídeo de Expressão pPICzαA (Anexo A)**

#### 4.1.2 Amplificação do fragmento de DNA do domínio III da proteína E DENV-1 e DENV-3

Para realizar a amplificação dos fragmentos de Ácido Desoxirribonucleico(DNA) correspondentes aos domínios III da proteína E de DENV-1 e DENV-3, foram utilizados os “primers” ACGAATTCTCACAAGAAGGTGCCATGCAC “sense” e GAGCGGCCGCAGACAACCTTCAAAGCCTTTTC “antisense”, para dengue-1 e ACGAATTCTCTCAAGAAGGTGCCATGCAC “sense” e GAGCGGCCGCATTAATCTTCAAGGCCTTGTC “antisense” para dengue -3 (sendo GAATTC e CGGCCGC os sítios de restrição para as enzimas *EcoRI* e *NotI* respectivamente para os “primers” de ambos os sorotipos) flanqueando a região responsável pela codificação da região foram sintetizados de forma a inserir sítios únicos de restrição para as enzimas *EcoRI* e *NotI*, que também foram utilizadas posteriormente para a clonagem dos mesmos no vetor de expressão pPICzαA. A sequência de DNA utilizada como molde para as sucessivas amplificações, “DNA template”, que vão constituir o inserto de DNA correspondente ao domínio III de DENV1 e o correspondente ao domínio III de DENV3 são filamentos de cDNA sintético do genoma viral que tivera seus códons selvagens substituídos por códons correspondentes preferenciais (Anexo B). Os parâmetros utilizados na PCR foram 31 ciclos com temperatura de desnaturação a 94°C, de anelamento a 55°C e extensão a 72°C.

#### 4.1.3 Preparação de bactérias competentes para a transformação

Bactérias *Escherichia coli* TOP10F, já previamente estocadas em nosso laboratório em meio LB/DMSO 10% (dimetilsulfóxido) foram cultivadas em placas contendo LB/ágar 1,5% com Tetraciclina 10µg/mL, uma vez que a cepa utilizada possui resistência genômica à este antibiótico, e incubadas a 37°C por 18 horas, e uma das colônias fora isolada e inoculada em 5 mL de meio LB

líquido para crescimento durante 18-20 horas a 37 °C em agitação orbital constante de 180 rpm, e então 0,5 mL dessa cultura foram inoculados em 50 mL de meio LB para novo crescimento a 18°C. As referidas bactérias então foram colhidas em fase exponencial de crescimento, que se dá quando os valores de absorbância estão em torno de 0,6 (absorbância a 550 nm em aproximadamente 0,6 – OD<sub>600</sub>). Uma vez certificado a etapa exponencial do cultivo a cultura foi sedimentada por centrifugação a 4.000 x g por 10 minutos a 4°C, e tão logo suspensas em 0,5 volumes de uma solução de CaCl<sub>2</sub> 50 mM. Em seguida a suspensão foi submetida a incubação em gelo por 2 horas, daí as bactérias foram novamente centrifugadas e o precipitado resultante foi suspenso em 0,08 volumes de solução tampão FSB (Acetato de Potássio 10 mM pH 7,5; MnCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O 45 mM; CaCl<sub>2</sub>.2 H<sub>2</sub>O 10 mM; KCl 100 mM; glicerol 10%). Por fim a cultura foi dividida em alíquotas em volumes de 200 µL, e congeladas em nitrogênio líquido e seguidamente levadas para serem estocadas a -80°C em meio DMSO a 10%. (SAMBROOK et al, 1989)

#### **4.1.4 Clonagem do domínio III da proteína E no plasmídeo de clonagem pTZ57r/t**

Os fragmentos de DNA resultantes da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) realizada com os “primers” supracitados com o inserto de domínio III de dengue-1 e insertos de domínio III de dengue-3 sintetizados, de aproximadamente 408 pb cada um, foram adicionados a reação de ligação com plasmídeo de clonagem pTZ57r/t com a enzima T4 DNA Ligase (Invitrogen, Califórnia, EUA). O produto dessa ligação foi totalmente utilizado na transformação de bactérias competentes *Escherichia coli* TOP10F, tendo em vista a produção de clones de plasmídeos recombinantes contendo a região responsável por codificar o domínio III da proteína E do vírus DENV-3. Para realizar a ligação T-A, aproximadamente 3 µL dos produtos da PCR foram numa reação de 10 µL que continha 5 µL da solução tampão 2X, 1 µL do vetor pTZ57r/t e 1 µL da enzima DNA Ligase. A reação foi homogeneizada suavemente e mantida a 4°C por 10 horas. O produto dessa reação foi utilizado para a transformação de células competentes pelo método do choque térmico na presença de CaCl<sub>2</sub> (SAMBROOK et al, 1989).

#### **4.1.5 Transformação de células competentes TOP10F com o vetor de clonagem**

Para a transformação de células competentes com cada produto da reação de ligação, as alíquotas de células foram descongeladas em banho de gelo e 5 µL das reações de ligação foram adicionados às alíquotas, que foram mantidas em gelo por 20 minutos. Em seguida, as células foram levadas ao banho-maria a 42°C por exatamente 60 segundos e depois rapidamente levadas ao gelo. Adicionou-se 800 µL de meio SOC, previamente estabilizado a 37°C, a cada alíquota de células, que

então foram levadas a agitação orbital por 180 rpm por 1 hora a 37°C. Após agitação, 50-100 µL de cada cultura foram semeados com auxílio de uma alça de Drigalski em placas contendo LB/agar 1,5% e antibiótico (Ampicilina 100 µg/mL). As placas foram incubadas a 37°C por 16 horas. As colônias obtidas nas placas de transformação foram processadas para isolamento do DNA plasmidial (modificado de SAMBROOK et al, 1989).

#### **4.1.6 Análise do DNA plasmidial extraído das colônias transformadas com o vetor de clonagem**

Os plasmídeos com inserto (domIIIIDENV1/pTZ57r/t e domIIIIDENV3/pTZ57r/t) foram extraídos por lise alcalina. Para tanto, cada colônia obtida das transformações foi cultivada em placas de poços e em cada poço cotinha 1 mL de meio LB com Ampicilina 100 µg/mL a 37 °C, sob agitação constante de 180 rpm, por aproximadamente 18 horas. As suspensões bacterianas foram então centrifugadas por 10.000 g por 2 minutos. Os sobrenadantes descartados e os precipitados de células suspensos em 200 µL de tampão de suspensão (glicose 50 mM; Tris-HCl 25 mM pH 8,0; EDTA 10 mM pH 8,0) e seguiram para ser incubados a temperatura ambiente por 5 minutos. A cada amostra foram adicionados 400 µL de uma solução alcalina fresca ou tampão de lise (NaOH 0,2N; SDS 1%), e essas por conseguinte homogeneizadas e incubadas em gelo por 5 minutos. Em seguida, 300 µL de solução de acetato de potássio 7,5 M foram adicionados a cada amostra, e essas incubadas em gelo por no mínimo, 40 minutos para a precipitação de RNA de alto peso molecular e DNA cromossomal. Em seguida procedeu-se à centrifugação dessas amostras a 10.000 x g por 3 minutos. Os sobrenadantes foram transferidos para novos tubos de 1,5 mL, e nesses novos recipientes teve-se a adição de 0,6 volumes (aproximadamente 480 µL) de isopropanol, e seguiu-se para a incubação por 20 minutos a temperatura ambiente. As amostras foram novamente centrifugadas por 15.000xg por 10 minutos para a sedimentação do DNA plasmidial. Os precipitados obtidos foram lavados com etanol 70%, e suspensos em 50 µL de água deionizada e armazenados em freezer a -20 °C.

As construções domIIIIDENV1/pTZ57r/t e domIIIIDENV3/pTZ57r/t extraídas das colônias transformantes foram submetidas à reação da PCR para a detecção de clones que foram efetivamente transformados com o vetor pTZ57r/t contendo o segmento de DNA correspondente aos domínios III de DENV-1 e DENV-3. Os produtos da PCR foram visualizados em gel de agarose 1,2% submetido à luz violeta e digitalizado pelo fotodocumentador Vilber Lourmat. Os clones positivos para a presença dos insertos foram estocados a -70 °C, na proporção de 70% de suspensão bacteriana em LB líquido para 30% de glicerol estéril.

#### **4.1.7 Ensaios de restrição**

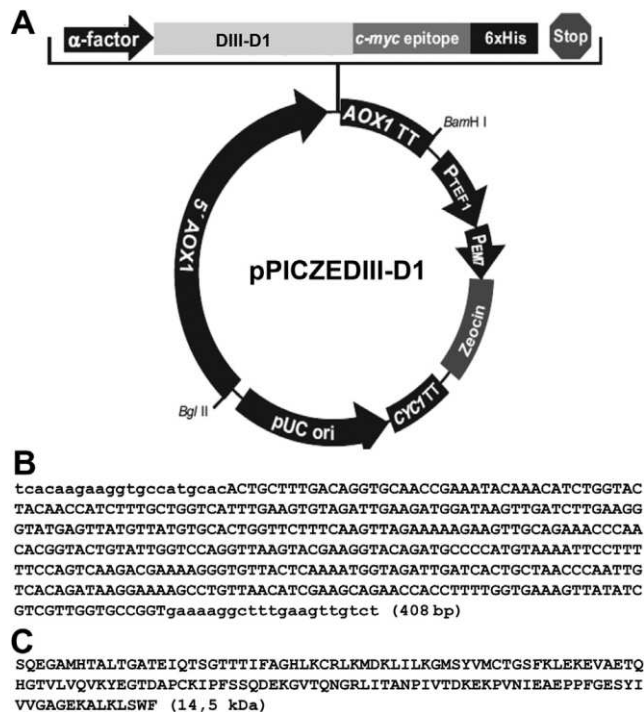


Os plasmídeos recombinantes purificados foram submetidos à digestão enzimática com as enzimas *EcoRI* e *NotI* (Invitrogen, Califórnia, EUA) para a liberação dos fragmentos de aproximadamente 408 pb, correspondentes a região responsável por codificar o domínio III da proteína E de DENV-1 e DENV-3. As reações foram realizadas conforme instruções do fabricante, num volume final de 20 µL contendo 1U da enzima por µg de DNA. Os volumes utilizados foram de 2µL de tampão React 2 µL do plasmídeo pTZ57r/t com o inserto de aproximadamente 408 pb e 1 µL de *NotI*. As reações foram levadas ao banho-maria 37 °C por 8 horas e em seguida, mais 2µL de tampão React 3 e 1 µL de *EcoRI* serão adicionados às reações, mantendo-as novamente em banho-maria 3°C por aproximadamente 5 horas. Os fragmentos de tamanho esperado foram evidenciados em gel de agarose 1,2% visualizado à luz ultravioleta e recuperados do gel pelo “kit” Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega Corporation, Madison, Wisconsin), conforme mencionado anteriormente.

O vetor de expressão pPICZαA foi linearizado com as mesmas enzimas de restrição (*EcoRI* e *NotI*) para a formação de extremidades coesivas capazes de receber o domínio III de DENV1 e DENV3 e ligá-los na orientação correta para correta expressão em cada construção. Os plasmídeos digeridos, bem como os insertos liberados da digestão das construções domínio III de DENV1/pTZ57r/t e domínio III de DENV3/pTZ57r/t, foram visualizados (Figura 03) também em gel de agarose 1% submetido à luz ultravioleta e recuperados do gel através do “kit” de purificação citado anteriormente.

#### **4.1.8 Transformação de células competentes TOP10F com o vetor de expressão**

Para as transformações de células competentes com o vetor de expressão pPICZαA contendo os insertos de interesse, foi utilizada a mesma metodologia para transformação de células *Escherichia coli* TOP10F com o vetor de clonagem (item 4.1.), contudo os vetores utilizados foram os de expressão ligado aos insertos, a construção domínio III de DENV1/pPICZαA e domínio III de DENV3/pPICZαA.



**Figura 8:** (A) gene sintético de EDIII-D1 com os códons otimizados para a expressão. (B) Mapa do plasmídeo pPICZ $\alpha$ -EDIII-D1. O gene foi inserido no EDIIID1 nos sítios *EcoR I* e *NotI* do pPICZ $\alpha$ avector integrativo, sob o controle do promotor de AOX1 induzível por metanol (AOX1 50) I. (C) Sequência aminoacídica da proteína recombinante.

#### 4.1.9 Análise do DNA plasmidial extraído das colônias transformadas com o vetor de expressão

Cada colônia obtida das transformações contendo o vetor de clonagem foi cultivada, em meio seletivo, da mesma forma realizada com as células *Escherichia coli* TOP10F transformadas (item 4.1.6). O DNA plasmidial extraído das colônias transformantes foi submetido à reação da PCR para a detecção de clones que foram efetivamente transformados com o vetor pPICZ $\alpha$  contendo o inserto de interesse. Os produtos da PCR foram visualizados em gel de agarose 1% submetido a luz violeta e digitalizado pelo fotodocumentador Vilber Lourmat. Os clones positivos para a presença dos insertos foram estocados a -70 °C, na proporção de 70% de suspensão bacteriana em LB líquido para 30% de glicerol estéril.

#### 4.1.10 Transformação em *Pichia pastoris*

Células da levedura *Pichia pastoris* GS115 foram cultivadas em meio YPD agar até o crescimento de colônias isoladas. Foi feito um pré-inóculo com 10 ml de YPD em Erlenmeyer de 125 ml utilizando uma colônia isolada e fresca de levedura. O pré-inóculo então foi incubado a 28°C durante a noite em shaker a agitação de 300 rpm. No dia seguinte, quando a OD<sub>600</sub> atingiu 0,2 o pré-inóculo foi adicionado a 100 ml de YPD em Erlenmeyer de 1 L. Quando este inóculo atingiu a OD<sub>600</sub> de 1,4 fez-se a incubação no gelo por 15 minutos para cessar o crescimento. As células então foram centrifugadas a 1.500 x g por 5 minutos a 4°C. O precipitado foi suspenso em 250 ml de água gelada.

Em seguida foi realizada uma outra centrifugação nas mesmas condições anteriores e o *precipitado* suspenso em 59 ml de água estéril gelada por 2 vezes. Após mais uma centrifugação nas mesmas condições, as células foram suspensas em 10 ml de sorbitol 1M gelado. As células então foram aliquotadas e mantidas no gelo. Misturou-se 80 µL de célula com aproximadamente 5µg de DNA linearizado (previamente submetido a reação com enzima de restrição Sal I). A mistura foi colocada em 4 cubetas de 0.2 cm e incubada por 5 minutos no gelo. A eletroporação das 4 cubetas foi realizada com os seguintes parâmetros: 1.500 v, 25 µF, 400 Ω. Imediatamente após a eletroporação, adicionou-se e misturou-se meio YPDS gelado. Seguida de uma incubação a 28°C por 4 horas sem agitação. Após a incubação, foram semeados 120 µL do conteúdo incubado em cada placa de meio YPDS ágar com Zeocin<sup>TM</sup>, totalizando 12 placas, que também foram incubadas a 28°C por 7 dias até o crescimento de colônias. As colônias obtidas nas placas de transformação foram processadas para isolamento do DNA.

#### **4.1.11 Análise do DNA extraído das colônias de *Pichiapastoris* transformadas com o vetor de expressão**

As colônias foram crescidas em 10 ml de meio YPD até atingirem uma OD<sub>600</sub> de 1,5; e centrifugadas a 1.500 x g por 5 minutos em temperatura ambiente. Após a centrifugação, as células sedimentadas foram suspensas com 10 ml de água estéril e centrifugadas novamente como no passo anterior. Em seguida fez-se uma suspensão em 2 ml de tampão SCED (1 M de sorbitol, 10 mM de citrato de sódio – pH 7,5, 10 mM de EDTA e 10 mM de DDT), pH 7,5 e adicionou-se 0,2 mg de zimoliase, seguindo-se para a incubação a 37°C por 50 minutos. Passada a incubação, fez-se a adição de 2 ml de SDS 1%, misturado suavemente, e incubou-se em gelo por 5 minutos. Posteriormente, foi adicionado 1,5 ml de acetato de potássio 5 M – pH 8,9, seguido de centrifugação a 10.000 x g por 10 minutos a 4°C, onde o sobrenadante foi ser recuperado e adicionado de 2 volumes de etanol e incubado a temperatura ambiente por 15 minutos.

Após a incubação, fez-se uma centrifugação a 10.000 x g por 20 minutos a 4°C. O precipitado foi suspenso suavemente em 0,7 ml de buffer TE (Tris-EDTA) pH 7,4 e adicionado a um volume equivalente de fenol:clorofórmio (1:1 v/v), seguido da adição de um mesmo volume de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1). A fase aquosa foi recuperada e dividida em 2 tubos e adicionado de meio volume de acetato de amônio 7,5 M - pH 7,5, e dois volumes de etanol em cada tubo, sendo encubado por 10 minutos em gelo. Posteriormente, o material foi centrifugado a 10.000 x g por 20 minutos a 4°C e os precipitados lavados com 1 ml de etanol 70% e logo após suspenso em 50 µl de água miliQ.

O DNA extraído das colônias transformantes foi submetido à reação da PCR para a detecção

de clones que foram efetivamente transformados com o vetor pPICZαA contendo o inserto de interesse, e os promotores AOX1 (“primers” do fabricante). Os produtos da PCR foram visualizados (Figura 06) em gel de agarose 1% submetido à luz ultravioleta e digitalizado pelo fotodocumentador Vilber Lourmat. Os clones positivos para a presença dos insertos foram estocados a -70°C, na proporção de 50% de suspensão da cultura em YPD líquido para 50% de glicerol estéril.

#### **4.1.12 Produção do domínio III da proteína E de dengue-1**

Uma colônia transformante confirmada (item 4.1.10) foi inoculada em 5mL de meio YPD, e mantida por 24 horas a 30 ° C, 200 rpm de agitação orbital. Este pré-inóculo foi inoculado em 1L de meio BMGY ( 1 % de extrato de levedura ; 2 % de peptona ; 1,34 % de base nitrogenada de levedura; 0,002 % de biotina; fosfato de sódio 100 mM; 1 % de glicerol e 0,004 % de histidina ) com pH 6,0. Esta cultura foi deixada sob 250 rpm de agitação, a 30 ° C durante aproximadamente 3 dias, até atingir um OD<sub>600</sub> de aproximadamente 20. Crescida até este estado, a cultura foi submetida a centrifugação de baixa velocidade para as células serem sedimentadas sem romperem-se, em seguida lavadas com água peptonada estéril ( 1 % de extrato de levedura , 2 % de peptona ). Feito isso as células sedimentadas foram mais uma vez suspensas, diferentemente da etapa anterior, em 100 mL de meio BMMY a pH 6,0 ( 1 % de extrato de levedura; 2 % de peptona; 1,34 % de base nitrogenada de levedura; 0,002 % de biotina; 100 mM fosfato de sódio; 1 % de metanol e 0,004 % de histidina ) para se induzir a expressão da proteína com metanol. A indução foi mantida durante 72 h sob as condições de 250 rpm e 30 ° C. O metanol foi adicionado a cultura para uma concentração final de 1% ( v/v ) em intervalos de 12 h. Terminado o período de indução a cultura foi submetida a centrifugação e o sobrenadante foi recolhido e processado para a purificação do domínio III da proteína E de dengue-1.

#### **4.1.13 Purificação e caracterização do domínio III da proteína E de dengue-1**

O sobrenadante da cultura contendo o domínio III da proteína E de dengue-1 foi diluído na proporção de 1/1 com tampão de ligação a pH 8,0 ( fosfato de sódio 20 mM , NaCl 500 mM ). Esta nova solução foi então submetida a filtração através de membrana de 0,45 µm , e submetido a cromatografia em coluna de afinidade. A coluna de níquel de 1 ml, é ligante a cauda de poli-histidina presente no domínio III heterólogo, a coluna foi previamente equilibrada com tampão de ligação supracitado. Todo processo de cromatografia foi realizado no sistema purificador AKTA (GE Healthcare Life Sciences , Uppsala , Suécia ). Uma vez passado pela coluna toda a solução contendo domínio III um volume de tampão de ligação de dez vezes da coluna foi passado através dela para remover quaisquer outras proteínas diferentes que eventualmente teriam se ligado de forma não específica à coluna e manter ligada à coluna apenas a proteína que interage especificamente. Uma vez

fixado o domínio III da proteína E de dengue-1 foi recuperado a partir da utilização do tampão de eluição ( Fosfato de Sódio 20 mM, NaCl 500 mM, Imidazol 300 mM ). As frações foram recolhidas em tubos de ensaio a partir da fração que apresentou o maior valor de absorbância. E em seguida as frações foram reunidas e dialisadas utilizando dispositivos de filtração centrífuga em membranas de diálise para moléculas com peso de 10.000kDa ( Millipore ) com tampão PBS, pH 8,0. A quantificação do domínio foi determinada com um kit BCA ( Pierce Chemical Co. , Rockford , EUA ) . Para a caracterização , as proteínas purificadas foram submetidas a SDS-PAGE 15 %. As proteínas separadas foram eletro-transferidas para uma membrana de nitrocelulose e processados para análise de imunotransferência usando anticorpos anti- HisTag mAb ( Sigma , EUA ) e anticorpos capazes de reconhecer proteínas de vírus dengue presente nas amostras de soro de pacientes que foram infectados com dengue .

#### **4.1.14 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) para a detecção de IgM e IgG**

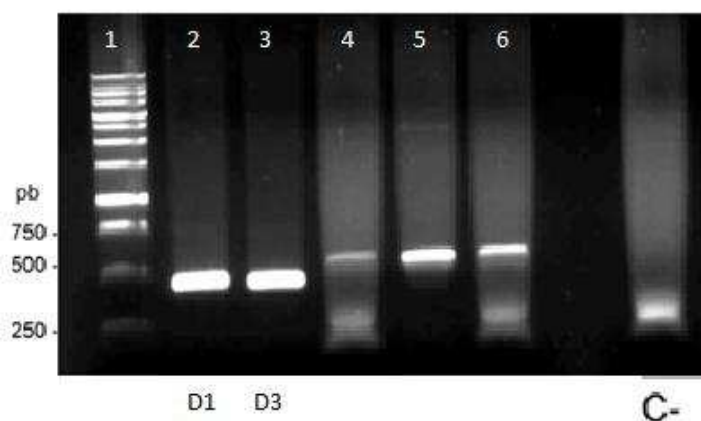
5 Feita a purificação do domínio III da proteína E de dengue -1, ele foi usado como antígeno de revestimento , para a sensibilização ( 1,0 µg/poço ) de placas de poliestireno de 96 poços ( Maxisorp ; Nunc , Roskilde , Dinamarca ) com tampão de carbonato-bicarbonato ( pH 9,6 ) e incubado a 4 ° C por noite . As placas foram bloqueadas com BSA durante 30 min (solução de bloqueio composta por PBS/5 % de soro fetal bovino ) . As amostras de soro de pacientes dengue positivo foram diluídas 1/100 em solução de bloqueio; 100 µL de cada diluição do soro foi testada em duplicata. As placas foram incubadas a 37 ° C durante 2 h e lavadas quatro vezes com uma solução de PBS/1 % de Tween 20. Foram utilizados anticorpos IgM e IgG anti-humano conjugados com peroxidase ( Sigma , EUA ) como anticorpo secundário . Estes foram diluídos 1/2500 em solução de bloqueio, e foram acrescentados às placas, as quais foram incubadas a 37 ° C durante 2 h , em seguida foram feitas cinco lavagens com PBS. Em seguida 100 µL de solução de TMB ( Sigma , EUA ) ( 1 comprimido de TMB , 10 mL de 0,05 M de tampão citrato-fosfato / pH 5,0; 2 µL de peróxido de hidrogénio ) foi adicionado ao sistema em placa . Estas foram então incubadas à temperatura ambiente durante 20 min, decorrido o tempo a reação foi parada com 50 µL de uma solução 2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Finalizando foram feitas as leituras de absorbância das placas foi realizada em espectrofotômetro multicanal ( Multiskan , ThermoScientific , EUA ) com um filtro de 450 nm. **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Este trabalho teve como objetivo a construção de um sistema de expressão heteróloga em *Pichia pastoris* para obtenção do domínio III da proteína estrutural E dos vírus dengue-1 e dengue-

3em larga escala visando abrir caminhos para produção de testes diagnósticos menos onerosos. O sistema de expressão utilizado neste trabalho é de uso frequente, e muito citado na literatura construções de sistemas heterólogos. Sistemas esses com as mesmas linhagens de *P. pastoris*, e mesmos plasmídeos para construção de vetores de clonagem e expressão, além de, consequentemente, os mesmos promotores (GONÇALES e BRUM, 2009). Até o presente momento este modelo tem sido descrito como um modelo promissor de sucesso para produção industrial, principalmente na indústria fármaco-biológica. Um exemplo é seu uso na produção de vacina para hepatite B (Shanvac<sup>TM</sup>), registrado em mais de 30 países.

A glicoproteína E está presente na superfície do DENV, e é responsável pela ligação viral ao receptor celular, sendo responsável pela fusão do envelope viral com a membrana do endossomo e montagem de partículas virais. A referida glicoproteína representa o antígeno dominante do vírus sendo o principal alvo de anticorpos neutralizantes. Dentre os outros dois domínios, o domínio III desta proteína é, neste contexto, o mais relevante pois contém o sítio de ligação a célula hospedeira através do anti-receptor. Isso, juntamente com o fato de ser o domínio mais imunogênico, justifica a sua utilização neste trabalho como antígeno para produção de kits de diagnóstico rápido.

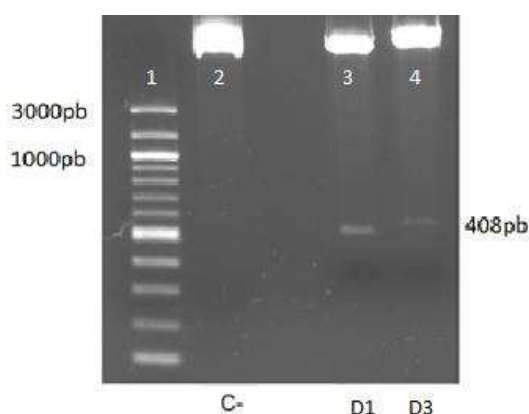
Os resultados apresentados nesse trabalho demonstraram a clonagem da sequência de DNA correspondente ao domínio III da proteína E de DENV-1 e DENV-3 ao confirmar a presença desses nos plasmídios pTZ57r/t e pPICZαA, e por confirmar que estes vetores foram devidamente incorporados aos organismos transformados. O DNA extraído dos transformantes foram ampliados pela PCR e apresentaram 408pb quando utilizados primers específicos, que flanqueiam a região codificante correspondente ao DIII da proteína. A PCR foi analisada em gel de agarose. Esta demonstrou que os produtos da PCR apresentavam bandas de tamanho próximo a 400 pb quando comparado aos marcadores moleculares. Esta similaridade de tamanho comprova que as sequências obtidas correspondem aos DNA correspondente aos domínios DIII da proteína E de DENV-1 e 3 (Figura 9).



**Figura 9.** PCR de colônia do inserto de DNA correspondente do domínio III de DENV1 e 3 em bactérias transformadas com pTZ57r/t (com resistência a Ampicilina): 1- Marcadores; 2 e 4- fragmento ampliado de 408 pb correspondente ao domínio III da proteína E de DENV1; 3 e 5- fragmento ampliado de 408 pb correspondente

ao dom III de DENV3, 6 - controle positivo, C- controle negativo.

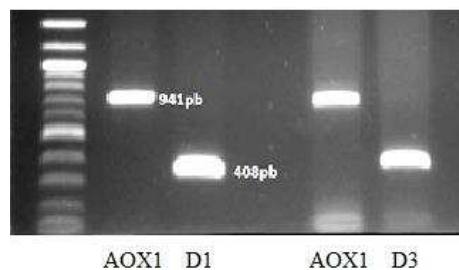
Na primeira etapa deste trabalho o vetor de clonagem foi construído, domIIIDENV1/pTZ57r/t que contem a sequência do DIII de dengue-1 e domIIIDENV3/pTZ57r/t que contem a sequência do domínio III de dengue-3. Estes plasmídeos recombinantes foram utilizados para transformar células de *E. coli* TOP10F, originando bactérias recombinantes que foram utilizadas para produzir múltiplas cópias do genoma plasmidial de interesse. Na etapa seguinte, os fragmentos de DNA correspondentes aos insertos de 408pb foram liberados por reação com as enzimas de restrição *NotI* e *EcoRI* (Figura 10). E em seguida esses insertos de interesse foram ligados no vetor de expressão, pPICZαA, construindo assim os veículos de expressão domIIIDENV1/pPICZαA e domIIIDENV3/pPICZαA.



**Figura 10.** Dupla digestão com enzimas de restrição *NotI* e *EcoRI* da construção 3 -domIIIDENV1/pTZ57r/t; 4 - domIIIDENV3/pTZ57r/t . Em ambos ocorreu liberação do fragmento de 408pb correspondente ao inserto de DNA correspondente o domIII de DENV1 (poço 3) e DENV3 (poço 4).

Esses plasmídeos recombinantes foram utilizados para transformar *Escherichia coli* TOP10F, originando bactérias recombinantes que, bem como no passo anterior, foram cultivadas e tiveram o genoma plasmidial extraído por hidrólise ácida. Em seguida o DNA plasmidial, que é circular, foi submetido a reação de linearização com a enzima de restrição *SacI*. Feita a linearização a amostra foram concentradas até a concentração de 2μg/μL.

Para confirmação plena da transformação *E. coli* TOP10F, tanto do vetor de clonagem quanto no de expressão, foi feita análise por gel de agarose do produto da PCR dos plasmídeos com “primers” específicos para domínio III e para o promotor AOX1. Esta demonstrou bandas de e 408pb, confirmando a presença do inserto do DIII das duas cepas virais e bandas de 941 correspondente ao promotor AOX1 do plasmídeo (Figura 11) .

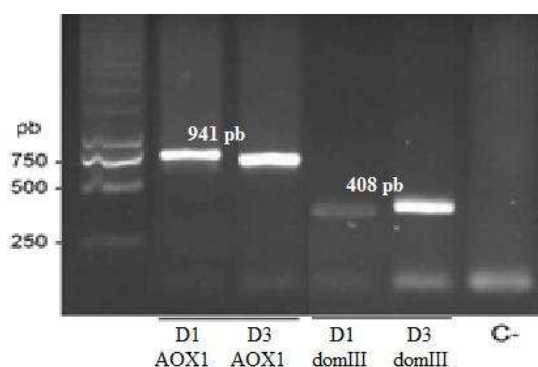


**Figura 11.** Confirmação da transformação por PCR de colônia das bactérias transformadas com resistência a Zeocin®. Respectivamente da esquerda para direita: marcador; ampliação do promotor AOX1 (941 pb) e o inserto de DNA correspondente do domIII de DENV1 (408 pb); ampliação do promotor AOX1 (941 pb) e o inserto de DNA correspondente do domIII de DENV3 (408 pb).

Células de *Pichia pastoris* foram transformadas, com os plasmídeos extraídos e linearizados das *E. coli* TOP10F transformantes, através de eletroporação.

Os vetores de expressão para *Pichia pastoris* como pPICZαA são integrativos possuindo pelo menos uma sequência de DNA homóloga a uma sequência de DNA do genoma da *P. pastoris*. A digestão através de enzimas de restrição (linearização) do vetor pode direcioná-lo de duas formas: por crossover simples (integração de todo o vetor – integração por adição); ou por crossover duplo entre as regiões homólogas provocando a deleção da região homóloga da levedura (integração por deleção). Independente do tipo de integração ocorrida, os transformantes podem não conter o vetor de expressão por causa de eventos de conversão gênica. Isso ocorre quando há recombinação somente entre as regiões homólogas, não ocorrendo qualquer adição da sequência exógena do vetor.

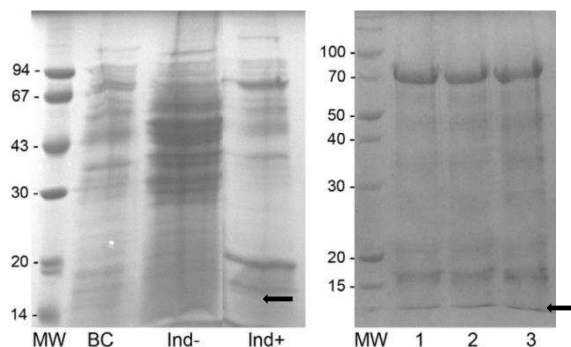
Portanto, para confirmação da efetiva transformação das colônias de *P. pastoris* transformantes que cresceram em meio seletivo YPDS com Zeocin™ foi realizado PCR seguida de análise em gel de agarose, onde se pode constatar a presença da banda de 408 pb, e a banda de aproximadamente 900 pb correspondente ao promotor AOX1, que ratifica a transformação (Figura 12).



**Figura 12.** Confirmação da transformação por eletroporação das leveduras. PCR da extração do genoma das colônias cultivadas em meio com Zeocin™, respectivamente da esquerda para direita: ampliação do inserto de DNA correspondente ao promotor AOX1 (941 pb) para DENV1 (D1) e DENV3 (D3), e ampliação do DNA correspondente ao domIII (408 pb) de DENV1 e DENV3.

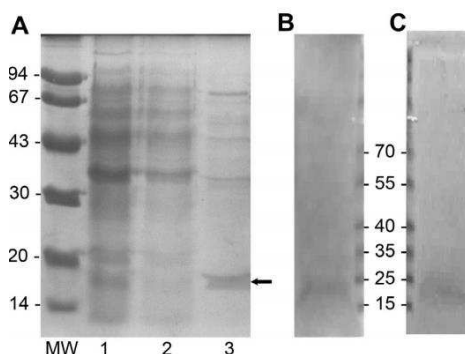


Uma vez concretizadas as criação das *P. pastoris* transformadas, na etapa de expressão do domínio heterólogo, apenas foi possível expressar em níveis detectáveis o domínio III da proteína E de dengue-1. Para isso foram testados e padronizados os meios de cultivo (o meio mínimo, no qual não houve expressão, e o meio enriquecido, no qual houve expressão), diferentes concentrações do indutor Metanol. O pH final do meio precisou ser modificado para 8, pois o meio de cultivo tendeu sempre a atingir o pH 6,5 – 7, e o pI teórico do domínio III é 6,41 (<http://web.expasy.org/cgi-bin/protparam/protparam>). Os resultados (Figura 13 e 14) demonstraram que as melhores condições de cultivo foram as supracitadas (item 4.1.11).



**Figura 13.** (A) A análise de SDS-PAGE da expressão da proteína (17 kD) no sobrenadante (BC) de controle em branco (G-S115), (Ind-) sobrenadante sem indução, e (Ind+) sobrenadante após a indução com metanol. (B) A análise da expressão da proteína recombinante SDS-PAGE após 1, 2, e 3 dias de indução com metanol 1% de 12/12h. (MW) Marcadores de peso molecular (kDa).

Feita a caracterização por massa, as técnicas sorológicas (imunoblotting) confirmaram, por interação antígeno-anticorpo (Figura 7), que a banda encontrada entre 15 e 20kD é de fato o domínio III da proteína E de dengue-1. A diferença entre os valores teóricos de 14,65 kD (<http://web.expasy.org/cgi-bin/protparam/protparam>) e o encontrados certamente se devem a possíveis modificações pós-traducionais, tais como O-glicosilações, uma vez que análises de bioinformática predizem três sítios de possíveis (<http://www.cbs.dtu.dk/cgi-bin/webface2.fcgi?jobid=537D6FEE00007314B33A4B2A&wait=20>). Já as N-glicosilações são menos prováveis pois não foi detectado nenhum sítio possível (<http://genome.cbs.dtu.dk/cgi-bin/webface?jobid=netNglyc,537D6FAF00666E33&opt=none>).



**Figura 14.** Purificação e caracterização da proteína sEDIII-D1. (A) Comassie blue-stained 15% SDS-PAGE reduzida de amostras obtidas a partir de cada um dos passos de purificação de proteínas recombinantes. (1) sobrenadante total após a indução de metanol; (2) da amostra que não interagem com o meio de afinidade; (3) recombinante purificada sEDIII-D1; (PM) de proteínas marcadores de peso molecular (kDa). (B) O imunoblot da sEDIII-D1 após a purificação. Aliquotas de material purificado (3), foram transferidas para nitrocelulose e sondadas com anticorpos anti-HisTag e soro positivo de dengue. (M) marcadores pré-corados de peso molecular (kDa). As setas indicam as posições de electroforese da proteína sEDIII-D1.

Este trabalho abre caminho para a construção de poderosas ferramentas para o desenvolvimento do combate a Dengue a través do desenvolvimento de kits de diagnóstico. Aumentando a eficiência do processo de diagnóstico da Dengue será possível construir ações de vigilância epidemiológica imediata, o que tem como consequência um maior controle da disseminação da doença evitando o surgimento de novos casos.

Experiências práticas têm mostrado que, apesar da facilidade de se criar, cultivar e manipular procariotos transformados para a expressão de proteínas recombinantes de DENV, e subsequente uso de técnicas para “refolding”, não tem sido satisfatória pelo fato da tradução da proteína quase sempre resultar na formação de corpos de inclusão citoplasmático, além do baixo rendimento quando comparado a modelos eucariotos de expressão. Os sistemas de expressão heteróloga em eucariotos têm sido bem sucedidos devido à relativa facilidade de construção de linhagens recombinantes, quando comparados à construção de linhagens recombinantes de bactérias. No cultivo do vírus bem como na produção de proteínas virais recombinantes se tem registros do uso predominantemente de cultura de células de *Albopictus* C6/36 e in vivo utilizando fungos geneticamente modificados para expressão heteróloga. Os modelos de expressão em leveduras apresentam um padrão de folding e modificações pós traducionais, como a glicosilação, por exemplo, muito similar ao padrão dos mamíferos além de uma outra característica de interesse que é a grande capacidade de converter sua biomassa em proteína recombinante (BATRA et al., 2010).

A expressão heteróloga em leveduras demonstra ser econômica, apresenta em geral melhores rendimentos e demanda menos tempo e esforços quando comparados a outros sistemas de expressão eucarióticos como os baculovírus e células de mamíferos (PHAM NGOC TU; et. al., 2013). O sistema em *P. pastoris* é amplamente utilizado na indústria biotecnológica, tem a capacidade de produzir a maior parte das proteínas de forma estável e com modificações pós-traducionais características de proteínas eucarióticas (COLAO et al., 2006), pois como foi demonstrado no Item 4 deste trabalho, as proteínas recombinantes expressadas foram reconhecidas em testes sorológicos, demonstrando a grande similaridade com a proteína nativa.

Entretanto a experiência prática demonstra que apesar da facilidade para a construção da linhagem de *P. pastoris* GS – 115 para a expressão da proteína domIIDENV-3 teve-se,

diferentemente do sorotipo 1, um pequeno rendimento na produção da biomassa da proteína, as causas da pouca produção ainda permanecem não solucionadas. Quanto isso cabem algumas hipóteses: i) Em nível de DNA, a sequência pode ter sofrido recombinação parcial incapacitando a leitura em fase, ou paralisando a transcrição. ii) Em nível nucleossômico a levedura pode ter silenciado esta mutação através de modificações no código de histonas do nucleossomo. iii) Em nível de mRNA através do silenciamento com iRNAs e microRNAs. iv) Em nível de tradução, alguma deleção pode estar provocar uma mudança da fase de leitura e estar sintetizando uma proteína totalmente diferente do domínio III da proteína E de dengue-3. O que demanda mais estudos.

Por fim, a otimização das condições de cultivo tem apontado um caminho promissor para uma produção heteróloga em escala um pouco maiores das DENV proteínas em leveduras do gênero *Pichia*.

## **6 CONCLUSÃO**

Obtiveram-se as linhagens recombinantes de *Pichia pastoris* GS-115 com os vetores de expressão devidamente integrados ao genoma da levedura. As proteínas expressadas pelas linhagens recombinantes com domIIDENV1 foram purificadas através de Cromatografia em coluna de Ni, e reconhecidas em todos os testes sorológicos do tipo ELISA com anticorpos de pacientes soropositivos para Dengue, IgM e IgG, demonstrando o alto grau de analogia entre as estruturas terciárias existe entre às proteínas nativas e as heterólogas deste sistema construído.

Linhagens de leveduras recombinantes contendo a construção domIIDENV3/pPICZ $\alpha$ A de formas estáveis em seu genoma foram obtidas e confirmadas por técnicas de biologia molecular.

## **7 PERSPECTIVAS**

A partir das linhagens recombinantes obtidas faz-se necessário mais estudos na otimização da produção das proteínas heterólogas, sobretudo para se estabelecer uma em escala industrial para a construção dos “kits diagnósticos” e avanços experimentais no campo da vacinologia.

Estudos de condições de cultivo com produtos menos onerosos certamente tornarão a tecnologia mais acessível e praticável em regiões que não possuem grandes centros de pesquisa e medicina.

## 8 REFERÊNCIAS

BALSITIS, S. J. et al. **PLoSPathog**.6, e1000790, 2010.

BHATT, S. et al. **Nature**.496, 504–507, 2013.

CHAMBERS, T.J.; WEIR, R.C.; GRAKOUL, A. Evidence that the N-terminal domain of non-structural protein NS3 from yellow fever virus is a serine protease responsible for site-specific cleavages in the viral protein. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States**. 87: 8898-8902, 1990.

CREGG J.M.; HIGGINS D.R. Production of foreign proteins in the yeast *Pichia pastoris*. **Canadian Journal of Botany**. 73:891-897, 1995.

DE ALWIS, R.; et al. **Proc. Natl Acad. Sci. USA** 109, 2012

DE PAULA, S.O.; FONSECA, B.A.L. Dengue: a review of the laboratory tests a clinician must know to achieve a correct diagnosis. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**. 8(6):390-398, 2004.

DEJNIRATTISAI, W. et al. **Science** 328, 745–748 2010.

FIBRIANSAH, G. et al. **J. Virol**. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.00757-13>, 2013.

FRANCKI, R.I.B.; FAUQUET, G.M.; KNUDSON, D.L.; BROWN, F. Classification and nomenclature of viruses: fifth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. **Archives of Virology**. 2:223-233, 1991.

GUBLER, D.J. Dengue and dengue hemorrhagic fever. **Clinical Microbiology Reviews**. 11(3): 480-496, 1998.

GUBLER, D.J.; SATHE, R. **Laboratory diagnosis of dengue and dengue hemorrhagic fever**. In: A Homma and JF Cunha, proceedings of the international symposium on yellow fever and dengue, pp 291-322, 1988.

GUY, B.; ALMOND, J.W. Towards a dengue vaccine: Progress to date and remaining challenges. **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases**. 31(2-3):239-252, 2008.

GUZMAN, M.G.; KOURI, G. Advances in dengue diagnosis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**. 3:621-627, 1996.

HALSTEAD, S. B. **Adv. Virus Res.** 60, 421–467, 2003.

HALSTEAD, S.B. Dengue. **Lancet**.370(9599), 1644-52, 2007.

HEINZ, F.X.; HOLZMANN, H.; MANDL, C.; GUIRAKHOO, F.; WOLFGANG, T.; KUNZ, C. Molecular basis of antigenicity and attenuation of a Flavivirus: Tick-borne encephalitis virus.**Vaccine**. 90: 97-100, 1990.

HENCHAL, E.A.; PUTNAK, J.R.The dengue viruses.**Clinical Microbiology Reviews**. 3(4):376-396, 1990.

HUANG J.;et al. Potential application of nonstructural protein NS1 serotype-specific immunoglobulin G enzyme-linked immunosorbent assay in the seroepidemiologic study of dengue virus infection: correlation of results with those of the plaque reduction neutralization test.**Journal of Clinical Microbiology**. 40 (5): 1840-1844, 2002.

KANAI, R.;et al.**J. Virol**.80, 11000–11008, 2006.

KING, A.; INNIS, B.L; CAUDLE, L. B-cells are the principal circulating mononuclear cells infected by dengue virus.**Faseb Journal**. 5, A 9998, 1991.

KUHN, R. J. et al.**Cell** 108, 717–725, 2002.

KUNO, G.; GOMEZ, I.E.; GUBLER, D.J. Detecting artificial anti-dengue IgM immune complexes using an enzyme-linked immunosorbent assay.**American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. 36:153-159, 1987.

LINDENBACH, B.D.; RICE, C.M. Flaviviridae: The Viruses and Their Replication. In: **FieldsVirology**, 4a ed, Vol I, Capítulo 32: 991-1041. David M. Knipe, Peter M Houley (eds), Philadelphia, Lippincott William & Wilkins, 2001.

LONG, L.I.S.M.L.; YU, I.M.; ZHANG, Y.; KUHN, R.J., CHEN, J.; ROSSMAN, M.G. The Flavivirus Precursor Membrane-Envelope Protein Complex: Structure and Maturation. **Science**.319: 1830-1834, 2008.

LORENZ, I.C.; ALLISON, S.L.; HEINZ, F.X.; HELENIUS, A. Folding and dimerization of Tick-Borne Encephalitis virus envelope proteins prM and e in the endoplasmic reticulum. **Journal of Virology**.76 (11): 5480- 5491, 2002.

MANDL, C.W.; GUIRAKOO, H.; HOLZMANN, F.X.; KUNZ, C. Anyigenic structure of the flavivirus envelope protein E at the molecular level, using Tick-borne encephalitis virus as a model.**Journal of Virology**. 156: 127-132, 1987.

MEERTENS, L. et al. **Cell Host Microbe** 12, 544–557, 2012.

MODIS, Y.; OGATA, S.; CLEMENTS, D.; HARRISON, S. C.; **Proc. Natl Acad. Sci. USA** 100, 6986–6991, 2003.

MODIS, Y.; OGATA, S.; CLEMENTS, D.; HARRISON, S.C. Variable Surface Epitopes in the Crystal Structure of Dengue Virus Type 3 Envelope Glycoprotein. **Journal of Virology**. 79: 1223–1231, 2005.

MONATH, T.P. Dengue: The risk to develop and developing countries. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. 91: 2395-23400, 1999.

MORENS, D. M.; FOLKERS, G. K. ; FAUCI, A. S. EcoHealth <http://dx.doi.org/10.1007/s10393-013-0825-7>, 2013.

MUKHOPADHYAY, S.; KIM, B.-S.; CHIPMAN, P. R.; ROSSMANN, M. G.; KUHN, R.; J. **Science** 302, 248, 2003.

NYBAKKEN, G. E.; NELSON, C. A.; CHEN, B. R.; DIAMOND, M. S.; FREMONT, D. H.; J. **Virol.** 80, p 11467–11474, 2006.

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION (PAHO). **Dengue en las américas, programa regional de dengue**. Washington: PAHO, 2007.

REY, F.A.; HEINZ, F.X.; MANDL, C.; KUNZ, C.; HARRISON, S.G. The envelope glycoprotein from tick-borne encephalitis virus at 2 Å resolution. **Nature**. (London) 375:291–298, 1995.

ROEHRIG, J.T. Immunochemistry of the dengue viruses, p. 199–219. In D. J. Gubler and G. Kuno (ed.), **Dengue and dengue hemorrhagic fever**. CAB International, New York, N.Y, 1997.

ROEHRIG, J.T.; BOLIN, R.A.; KELLY, R.G. Monoclonal antibody mapping of the envelope glycoprotein of the dengue 2 virus, Jamaica. **Virology**. 246:317–328, 1998.

RUSSELL, P.K.; NISALAK, A. Dengue virus identification by the plaque reduction neutralization test. **Journal of Immunology**. 99:291-296, 1967.

SABCHAREON, A. et al. **Lancet** 380, 1559–1567, 2012.

SAIKI, R.K.; GELFAND, D.H.; STOFFEL, S.; SCHARF, S.J.; HIGUCHI, R.; HORN, G.T.; MULLIS, K.B.; ERLICH, H.A. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science**. 239:487-491, 1998.

SANCHEZ, M.C.A. Testes sorológicos. In: **Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e auto-imunes** 2. ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

SIMMONS, C. P. et al. **PLoS Negl. Trop. Dis.** 6, p 1752, 2012.

SUGRUE, R.J. et al. The production of recombinant dengue virus E protein using *Escherichia coli* and *Pichia pastoris*. **Journal Virology Methods**. v. 69, p. 159-167, 1997.

TAPIA-CONYER, R.; MENDEZ-GALVAN, J.F.; RINCON, H. The growing burden of dengue in Latin America. **Journal of Clinical Virology**. 46:53-56, 2009.

TISONE, T.; CITEAU, H.; MCINTOSH, B. In-line processing trends for lateral-flow immunoassay manufacturing. **IVD Technology**. 13(5). <http://www.ivdtechnology.com>

VALADÃO, A.L.C. **Construção e caracterização de vírus febre amarela (fa) 17d recombinantes expressando o domínio III da proteína e de dengue 2 na região intergênica e/ns1 do vírus fa 17d**. 2008. 135f. (Mestrado em Biologia Parasitária)– FIOCRUZ: Rio de Janeiro, 2008.

VORDAM, V.; KUNO, G. **Laboratory diagnosis of dengue virus infections**. In DJ Guber and G Kuno (ed). *Dengue and dengue hemorrhagic fever*, Cab International, London, United Kingdom, pp 313-334, 1997.

WAYNE, D.C.; JOHN, T.R. Monoclonal Antibodies That Bind to Domain III of Dengue Virus E Glycoprotein Are the Most Efficient Blockers of Virus Adsorption to Vero Cells. **Journal of Virology**. p. 7769–7773, 2001.

World Health Organization. Dengue and severe dengue. Fact Sheet No. 117; [www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en](http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en), 2012.

ZHANG, W. et al. **Nature Struct. Biol.** 10, 907–912, 2003.

ZHANG, W.; CHIPMAN, P.R.; CORVER, J.; JONHSON, P.; ZHANG, Y.; HYAY, S.; BAKER, T.S.; STRAUSS, J.H.; ROSSMANN, M.G.; KUHN, R.J. Visualization of membrane protein domains by cryo-electron microscopy of dengue virus. **Nature Structural Biology**. 10(11):907-912, 2003.

ZHANG, X. et al. **Nature Struct. Mol. Biol.** 20, 105–110, 2013.

ZHANG, X. et al. **Proc. Natl Acad. Sci. USA** 110, p 6795–6799, 2013.

ZHANG, Y. et al. **Structure** 12, 1607–1618, 2004.





## ANEXO – A

### Mapa do Plasmídeo de Expressão pPICZ

5' end of AOX1 mRNA

811 AACCTTTTT TTTATCATCA TTATTAGCTT ACTTTCATAA TTGCGACTGG TTCCAATTGA

5' AOX1 priming site

871 CAAGCTTTTG ATTTTAACGA CTTTAAACGA CAACTTGAGA AGATCAAAAA ACAACTAATT

Sfu I EcoR I Pml I Sfi I BsmB I Asp718 I Kpn I Xho I

931 ATTCGAAACG AGGAATTAC GTGGCCAGC CGGCCGTCTC GGATCGGTAC CTCGAGCCGC

Sac II Not I Apa I myc epitope

991 GGCGGCCGCC AGCTT GGGCCC GAA CAA AAA CTC ATC TCA GAA GAG GAT CTG  
Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu

Polyhistidine tag

1042 AAT AGC GCC GTC GAC CAT CAT CAT CAT CAT CAT TGA GTTTTAGCCT TAGACATGAC  
Asn Ser Ala Val Asp His His His His His His \*\*\*

1098 TGTTCTCAG TTCAAGTTGG GCACTTACGA GAAGACCGGT CTTGCTAGAT TCTAATCAAG

3' AOX1 priming site

1158 AGGATGTCAG AATGCCATT GCCTGAGAGA TGCAGGCTTC ATTTTGTATA CTTTTTTATT

3' polyadenylation site

1218 TGTAACCTAT ATAGTATAGG ATTTTTTTTG TCATTTTGT

5' end of AOX1 mRNA

811 AACCTTTTT TTTATCATCA TTATTAGCTT ACTTTCATAA TTGCGACTGG TTCCAATTGA

5' AOX1 priming site

871 CAAGCTTTTG ATTTTAACGA CTTTAAACGA CAACTTGAGA AGATCAAAAA ACAACTAATT

931 ATTCGAAACG **ATG** AGA TTT CCT TCA ATT TTT ACT GCT GTT TTA TTC GCA GCA  
Met Arg Phe Pro Ser Ile Phe Thr Ala Val Leu Phe Ala Ala

983 TCC TCC GCA TTA GCT GCT CCA GTC AAC ACT ACA ACA GAA GAT GAA ACG GCA  
Ser Ser Ala Leu Ala Ala Pro Val Asn Thr Thr Thr Glu Asp Glu Thr Ala

α-factor signal sequence

1034 CAA ATT CCG GCT GAA GCT GTC ATC GGT TAC TCA GAT TTA GAA GGG GAT TTC  
Gln Ile Pro Ala Glu Ala Val Ile Gly Tyr Ser Asp Leu Glu Gly Asp Phe

1085 GAT GTT GCT GTT TTG CCA TTT TCC AAC AGC ACA AAT AAC GGG TTA TTG TTT  
Asp Val Ala Val Leu Pro Phe Ser Asn Ser Thr Asn Asn Gly Leu Leu Phe

α-factor priming site

1136 ATA AAT ACT ACT ATT GCC AGC ATT GCT GCT AAA GAA GAA GGG GTA TCT CTC  
Ile Asn Thr Thr Ile Ala Ser Ile Ala Ala Lys Glu Glu Gly Val Ser Leu

Xho I

Kex2 signal cleavage

1187 GAG AAA AGA GAG GCT GAA GCG GAATTCAC GTGGCCAG CCGGCCGTC TCGGATCGGT  
Glu Lys Arg Glu Ala Glu Ala

EcoR I Pml I Sfi I BsmB I Asp718 I

Ste13 signal cleavage

Kpn I Xho I Sac II Not I Xba I c-myc epitope

1244 ACCTCGAGCC GCGGCGGCC GCCAGCTTTC TA GAA CAA AAA CTC ATC TCA GAA GAG  
Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu

polyhistidine tag

1299 GAT CTG AAT AGC GCC GTC GAC CAT CAT CAT CAT CAT CAT TGA GTTTGTAGCC  
Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His His His His \*\*\*

1351 TTAGACATGA CTGTTCTCA GTTCAAGTTG GGCATTACG AGAAGACCGG TCTTGCTAGA

3' AOX1 priming site

1411 TTCTAATCAA GAGGATGTCA GAATGCCATT TGCCTGAGAG ATGCAGGCTT CATTTTTGAT

3' polyadenylation site

1471 ACTTTTTTAT TTGTAACCTA TATAGTATAG GATTTTTTTT GTCATTTTGT TTCTTCTCGT

## Anexo- B

**Dominio Envelope DENV1**

**408 base pairs**

[Graphic map](#) | [Table by enzyme name](#)

|                                                                                          |          |
|------------------------------------------------------------------------------------------|----------|
| AccB1I                                                                                   |          |
| Eco64I                                                                                   |          |
| tcacaagaaggtgccatgcacactgctttgacaggtgcaaccgaaatacaaacatctggtactacaaccatcttt base pairs   |          |
| agtggttcttccacggtacgtgtgacgaaactgtccacgttggctttatgtttgtagaccatgatgttggtagaaa 1 to 75     |          |
| BanI                                                                                     |          |
| BshNI                                                                                    |          |
|                                                                                          | Bbv12I   |
|                                                                                          | Alw44I   |
| VneIAspHI                                                                                |          |
| gctgggtcatttgaagtgtagattgaagatggataagttgatcttgaagggtatgagttatgttatgtgcactgggt base pairs |          |
| cgaccagtaaaacttcacatctaacttctacatttcaactagaacttcccatactcaatacaatacacgtgacca 76 to 150    |          |
| ApaLI                                                                                    |          |
|                                                                                          | Alw21I   |
| BsiHKA1                                                                                  |          |
| tctttcaagttagaaaaagaagttgcagaaacccaacacggtactgtattgggtccagggttaagtagaaggtaca base pairs  |          |
| agaaagttcaatctttttcttcaacgtctttgggtgtgccatgacataaccagggtccaattcatgcttccatgt 151 to 225   |          |
|                                                                                          | Ksp22I   |
| AcsIFbaI                                                                                 |          |
| gatgccccatgtaaaattcctttttccagtcaagacgaaaagggtgttactcaaaatggtagattgatcactgct base pairs   |          |
| ctacggggtacattttaaggaaaaagggtcagttctgcttttcccacaatgagttttaccatctaactagtgcga 226 to 300   |          |
| ApoIBclI                                                                                 |          |
| HincII                                                                                   | Van91I   |
| MfeIHindII                                                                               | Esp1396I |
| aaccgaattgtcacagataaggaaaagcctgttaacatcgaagcagaaccaccttttggtgaaagttatatcgtc base pairs   |          |
| ttgggttaacagtgctctattccttttcggacaattgtagcttcgtcttggtggaaaaccactttcaatatagcag 301 to 375  |          |
| MunIHpaIPflMI                                                                            |          |
|                                                                                          | AccB7I   |
| BsrFI                                                                                    |          |
| AccB1I                                                                                   |          |
| Eco64I                                                                                   |          |
| gttggtgccggtgaaaaggctttgaagttgtct base pairs                                             |          |
| caaccacggccacttttccgaaacttcaacaga 376 to 408                                             |          |
| BanI                                                                                     | Bse118I  |
| BshNI                                                                                    | Cfr10I   |
| BssAI                                                                                    |          |

---

**Table by Enzyme Name**

| Enzyme name | No. cuts | Positions of sites | Recognition sequence                   |
|-------------|----------|--------------------|----------------------------------------|
| AccB1I      | 2        | 10 379             | g/gyrcc <a href="#">More info</a>      |
| AccB7I      | 1        | 355                | ccannnn/ntgg <a href="#">More info</a> |
| AcsI        | 1        | 239                | r/aatty <a href="#">More info</a>      |
| Alw21I      | 1        | 145                | gwgwc/c <a href="#">More info</a>      |
| Alw44I      | 1        | 141                | g/tgcac <a href="#">More info</a>      |
| ApaLI       | 1        | 141                | g/tgcac <a href="#">More info</a>      |
| ApoI        | 1        | 239                | r/aatty <a href="#">More info</a>      |
| AspHI       | 1        | 145                | gwgwc/c <a href="#">More info</a>      |
| BanI        | 2        | 10 379             | g/gyrcc <a href="#">More info</a>      |
| Bbv12I      | 1        | 145                | gwgwc/c <a href="#">More info</a>      |
| BclI        | 1        | 290                | t/gatca <a href="#">More info</a>      |
| Bse118I     | 1        | 382                | r/ccggy <a href="#">More info</a>      |
| BshNI       | 2        | 10 379             | g/gyrcc <a href="#">More info</a>      |
| BsiHKA1     | 1        | 145                | gwgwc/c <a href="#">More info</a>      |
| BsrFI       | 1        | 382                | r/ccggy <a href="#">More info</a>      |
| BssAI       | 1        | 382                | r/ccggy <a href="#">More info</a>      |
| Cfr10I      | 1        | 382                | r/ccggy <a href="#">More info</a>      |
| Eco64I      | 2        | 10 379             | g/gyrcc <a href="#">More info</a>      |
| Esp1396I    | 1        | 355                | ccannnn/ntgg <a href="#">More info</a> |
| FbaI        | 1        | 290                | t/gatca <a href="#">More info</a>      |
| HincII      | 1        | 333                | gty/rac <a href="#">More info</a>      |
| HindII      | 1        | 333                | gty/rac <a href="#">More info</a>      |
| HpaI        | 1        | 333                | gtt/aac <a href="#">More info</a>      |
| Ksp22I      | 1        | 290                | t/gatca <a href="#">More info</a>      |
| MfeI        | 1        | 305                | c/aattg <a href="#">More info</a>      |
| MunI        | 1        | 305                | c/aattg <a href="#">More info</a>      |
| PflMI       | 1        | 355                | ccannnn/ntgg <a href="#">More info</a> |
| Van91I      | 1        | 355                | ccannnn/ntgg <a href="#">More info</a> |
| VneI        | 1        | 141                | g/tgcac <a href="#">More info</a>      |

The following endonucleases were selected but don't cut this sequence:

AatI, AatII, Acc113I, Acc16I, Acc65I, AccBSI, AccI, AccIII, AclNI, AcyI, AfeI, AflIII, AflIII, AgeI, AhdI, AlwNI, Ama87I, AocI, Aor51HI, ApaI, AscI, AseI, AsnI, Asp700I, Asp718I, AspEI, AspI, AtsI, AvaI, AviII, AvrII, BalI, **BamHI**, BanII, BanIII, BbeI, BbiII, BbrPI, BbsI, BbuI, Bbv16II, BcgI, BcoI, BfrI, BglI, BglII, BlnI, BlpI, BpiI, BpmI, Bpu1102I, Bpu14I, BpuAI, Bsa29I, BsaAI, BsaBI, BsaHI, BsaI, BsaMI, BsaOI, BsaWI, BscI, Bse21I, Bse8I, BseAI, BseCI, BsePI, BseRI, BsgI, Bsh1285I, Bsh1365I, BsiEI, BsiI, BsiMI, BsiWI, BsmBI, BsmI, BsoBI, Bsp106I, Bsp119I, Bsp120I, Bsp13I, Bsp1407I, Bsp143II, Bsp1720I, Bsp19I, Bsp68I, BspCI, BspDI, BspEI, BspHI, BspLU11I, BspMI, BspTI, BspXI, BsrBI, BsrBRI, BsrDI, BsrGI, BssHII, BssSI, BssT1I, Bst1107I, Bst98I, BstBI, BstD102I, BstDSI, BstEII, BstH2I, BstI, BstMCI, BstPI, BstSFI, BstSNI, BstX2I, BstXI, BstYI, BstZI, Bsul5I, Bsu36I, CciNI, CelII, Cfr42I, Cfr9I, CfrI, ClaI, CpoI, Csp45I, CspI, CvnI, DraI, DraII, DraIII, DrdI, DsaI, EaeI, EagI, Eam1104I, Eam1105I, EarI, Ecl136II, EclHKI, EclXI, Eco105I, Eco130I, Eco147I, Eco24I, Eco255I, Eco31I, Eco32I, Eco47III, Eco52I, Eco57I, Eco72I, Eco81I, Eco88I, Eco91I, EcoICRI, EcoNI, EcoO109I, EcoO65I, **EcoRI**, EcoRV, EcoT14I, EcoT22I, EheI, ErhI, Esp3I, FauNDI, FriOI, FseI, FspI, GsuI, HaeII, HinII, **HindIII**, Hsp92I, KasI, Kpn2I, KpnI, Ksp632I, KspI, LspI, MamI, MflI, MluI, MluNI, Mph1103I, MroI, MroNI, MscI, MslI, Msp17I, MspA1I, MspCI, Mva1269I, NaeI, NarI, NcoI, NdeI, NgoAIV, NgoMI, NheI, NotI, NruI, NsiI, NspBII, NspI, NspV, PacI, PaeI, Paer7I, Pfl23II, PinAI, Ple19I, PmaCI, Pme55I, PmeI, PmlI, Ppu10I, PpuMI, PshAI, PshBI, Psp124BI, Psp1406I, Psp5II, PspAI, PspALI, PspEI, PspLI, PspOMI, **PstI**, PstNHI, PvuI, PvuII, RcaI, RsrII, **SacI**, SacII, SalI, SapI, SbfI, ScaI, SexAI, SfcI, SfiI, Sfr274I, Sfr303I, SfuI, SgfI, SgrAI, **SmaI**, SmiI, SnaBI, SpeI, SphI, SplI, SrfI, Sse8387I, SseBI, SspBI, SspI, SstI, SstII, StuI, StyI, SunI, SwaI, Tth111I, Vha464I, VspI, XbaI, XcmI, **XhoI**, XhoII, XmaI, XmaIII, XmnI, Zsp2I

HMFHLLTRGGEPHMIVSKQERGKSLLFKTSAGVNMCTLIAMDLGELCEDTMTYKCPRITETEPDDVDCWCNATETWVITYG  
TCSQTGEHRRDKRSVALAPHVGLGLETRTETWMSSEGAWKQIQKVETWALRHPGFTVIALFLAHAIGTSITQKGIIFILL  
MLVTPSMAMRCVIGIGNRDFVEGLSGATWVDVVLEHGSCVTTMAKDKPTLDIELLKTEVTNPVLRKLCIEAKISNTTDS  
RCPTQGEATLVEEQDTNFVCRRTFVDRGWNGCGLFGKGLITCAKFKCVTKLEGKIVQYENLKYSVIVTVHTGDQHQVG  
NETTEHGTATITPQAPTSEIQLTDYGALTLDCSPRTGLDFNEMVLLTMKKKSWLVHKQWFLDLPLPWTSGASTSQUETWN  
RQDLLVTFKTAHAKKQEVVVLGSQEGAMHTALTGATEIQTSGTTTTIFAGHLKCRKMDKLLIKGMSYVMCTGSFKLEKEV  
AETQHGTVLVQVKYEGTDAPCKIPFSSQDEKGVTONGRILITANPIVTDKEKPVNIEAEPFGEYSIVVGAGEKALKLSWF  
KKGSSIGKMFETARGARRMAILGDTAWDFGSIGGVFTSVGKLIHQIFGTAYGVLFSGVSWTMKIGIGILLTWLGLNSRS  
TSLSMTCIAVGMVTLYLGVMVQAEF

#### PreM/Envelope Dengue 3 AY923865 - Optimizado Levedura

CATATGTTCCACTTGACATCCAGAGACGGTGAACCTAGAATGATAGTTGGTAAAAATGAAAGAGGTAAAAGTTTGTGTGTT  
TAAGACTGCTTCCGGTATAAATATGTGTACATTGATCGCTATGGATTTGGGTGAAATGTGTGATGACACTGTAACATACA  
AGTGCCCATGATTGCAGAAGTCGAACCTGAAGATATAGACTGTTGGTGCAATTTGACCTCTACTTGGGTACTTACGGT  
ACATGTAACCAAGCAGGTGAACATAGAAGAGATAAAAGATCAGTAGCTTTGGCACCACACGTCGGTATGGGTTTAGACAC  
AAGAACCCAACTTGGATGTCCGCTGAAGGTGCATGGAGACAAGTTGAAAAAGTAGAAACATGGGCTTTGAGACATCCAG  
GTTTTACCATATTGGCATTATTCTTGGCCCACTATATCGGTACCTCTTTGACTCAAAAGGTTGTAATCTTTATTTTGTG  
ATGTTGGTTACACCTTCAATGACCATGAGATGTGTCGGTGTGGTAATAGAGATTTCTGTCGAAGGTTTGTGAGGTGCCAC  
TTGGGTTGACGTCGTTTTAGAACATGGTGGTTGCGTTACTACAATGGCTAAAAACAAGCCAACCTTGGATATTGAATTAC  
AAAAGACTGAAGCTACCCAATTGGCACTTTGAGAAAGTTGTGTATCGAAGGTAAAATCACAAATATTACCACTGGTTCT  
AGATGCCCAACCAAGGTGAAGCAATATTGCCTGAAGAACAAGATCAAACTACGTTTGTAGCATACATACGTAGACAG  
AGGTTGGGGTAACGGTTGCGGTTTGTGTTGGTAAAGGTTCTTTAGTTACTTGTGCTAAGTTCCAATGCTTGAACCAATAG  
AGGGTAAAGTAGTCCAATACGAAAATTTGAAGTACACAGTTATTATAACTGTACACACAGGTGACCAACCACAAGTTGGT  
AACGACACTCAAGGTGTAACAGTTCGAAATTACCCCTCAAGCATCCACTGTGCAAGCCGTTTTGTTAGAAATACGGTACATT  
AGGTTTGAATGTAGTCCAAGAACAGGTTTGGATTTCAACGAAATGATATTGTTGACCATGAAAACCTAAGGCCTGGATGG  
TTCATAGACAATGGTTTTTCGATTTGCCATTGCCCTTGGACAAGTGGTGCTACAACCGAAACACCTACCTGGAACAGAAAG  
GAATTGTTGGTTACTTTTAAGAACGCCCATGCTAAAAAGCAAGAAGTTGTAGTCTTGGGTTCTCAAGAAGGTGCCATGCA  
CACAGCTTTAACCGGTGCAACTGAAATCCAAAATTTCTGGTGGTACATCAATTTTTGCAGGTCACCTGAAGTGTAGATTGA  
AGATGGATAAGTTGGAATTGAAGGGCATGTCTATGCTATGTGCTTGAACACTTTTCGTCTTGAAGAAAGAAGTTAGTGAA  
ACTCAACATGGTACAATCTTGATCAAAAGTTGAATACAAGGTGAAGATGCTCCATGTAAAATTCCTTTTTTCAACAGAAGA  
CGGTCAGGGTAAAGCTCACAATGGTAGATTAATAACCGCAAACCCAGTTGTAACATAAAAGGAAGAACCTGTTAACATCG  
AAGCAGAACCACCTTTCCGTTGAATCCAACATTGTTATAGGTATCGGTGACAAGGCCTTGAAGATTAATTGGTACAAAAAG  
GGTTCTTCAATCGGTAAAATGTTTGAAGCAACTGCCAGAGGTGCCAGAAGAATGGCTATTTTAGGTGACACAGCTTGGGA  
CTTCCGTTCTGTAGGTGGTGTCTTGAACCTCATTGGGTAAAATGGTTCATCAATATTCGGTTCTGCCTACACTGCTTTGT  
TCTCCGGTGTAGTTGGATCATGAAGATAGGTATCGGTGTATTGTTGACCTGGATTGGTTTAAATCCAAGAACACTAGT  
ATGTCCTTTTCTGTATCGTTATCGGTATTATCACTTTGTATTTGGGTGCTGTTGTTCAAGCCGAATTC

### Dominio Envelope DENV3

408 basepairs

[Graphicmap](#) | [Tablebyenzymename](#)

AccB1IPinAIBstXI  
Eco64I  
Bse118I  
AgeI Cfr10I  
AcsI  
tctcaagaagggtgccatgcacacagctttaaccgggtgcaactgaaatccaaaattctggtggtacatcaatTTTT base  
pairs  
agagttcttccacgggtacgtgtgtcgaaattggccacgttgacttttaggttttaagaccaccatgtagttaaaaa 1 to  
75  
BanIBsrFIApoI  
BshNIBssAIXcmI  
BsaWI

BspMINspI  
gcaggtcacttgaagtgtagattgaagatggataagttggaattgaagggcatgtcctatgctatgtgcttgaac base  
pairs  
cgtccagtgaaacttcacatctaacttctacatttcaacctaacttcccgtagcaggatagcagatacagacgaacttg 76  
to 150

Asp700I  
acttttcgtcttgaagaaagaagtttagtgaaactcaacatgggtacaatcttgatcaaagttgaatacaagggtgaa base  
pairs  
tgaaagcagaacttctttcttcaatcactttgagttgtaccatggttagaactagtttcaacttatgttcccactt 151  
to 225  
XmnIBclI

BbsIAseI  
AcsI  
gatgctccatgtaaaaattcctttttcaacagaagacgggtcagggtaagctcacaatggtagattaataaccgca base  
pairs  
ctacgaggtacattttaaggaaaaagttgtcttctgccagtccttccagtggttaccatctaattattggcgt 226  
to 300  
ApoIBpuAIPshBI  
BpiIASnI

HincII  
HindII  
aaccagttgtaactaaaaaggaagaacctgttaacatcgaagcagaaccacctttcggtgaatccaacattggt base  
pairs  
ttgggtcaacattgatttttcttcttggacaattgtagcttcgtcttgggtggaagccacttaggttgtaacaa 301  
to 375  
HpaI

Eco147I  
Pme55I AseI  
AatIVspI  
ataggtatcggtgacaaggccttgaagattaat base pairs  
tatccatagccactgttccggaacttctaatta 376 to 408  
StuIPshBI  
SseBIASnI

---

The following endonucleases were selected but don't cut this sequence:

AatII, Acc113I, Acc16I, Acc65I, AccB7I, AccBSI, AccI, AccIII, AclNI, AcyI,  
AfeI, AflII, AflIII, AhdI, Alw21I, Alw44I, AlwNI, Ama87I, AocI, Aor51HI,  
ApaI, ApaLI, AscI, Asp718I, AspEI, AspHI, AspI, AtsI, AvaI, AviII, AvrII,  
BalI, **BamHI**, BanII, BanIII, BbeI, BbiII, BbrPI, BbuI, Bbv12I, BcgI, BcoI,  
BfrI, BglI, BglII, BlnI, BlpI, BpmI, Bpu1102I, Bpu14I, Bsa29I, BsaAI, BsaBI,  
BsaHI, BsaI, BsaMI, BsaOI, BscI, Bse21I, Bse8I, BseAI, BseCI, BsePI, BseRI,  
BsgI, Bsh1285I, Bsh1365I, BsiEI, BsiHKAI, BsiI, BsiMI, BsiWI, BsmBI, BsmI,  
BsoBI, Bsp106I, Bsp119I, Bsp120I, Bsp13I, Bsp1407I, Bsp143II, Bsp1720I,  
Bsp19I, Bsp68I, BspCI, BspDI, BspEI, BspHI, BspLU11I, BspTI, BspXI, BsrBI,  
BsrBRI, BsrDI, BsrGI, BssHII, BssSI, BssT1I, Bst1107I, Bst98I, BstBI, BstD102I,  
BstDSI, BstEII, BstH2I, BstI, BstMCI, BstPI, BstSFI, BstSNI, BstX2I, BstYI,  
BstZI, Bsu15I, Bsu36I, CciNI, CelII, Cfr42I, Cfr9I, CfrI, ClaI, CpoI, Csp45I,  
CspI, CvnI, DraI, DraII, DraIII, DrdI, DsaI, EaeI, EagI, Eam1104I, Eam1105I,  
EarI, Ecl136II, EclHKI, EclXI, Eco105I, Eco130I, Eco24I, Eco255I, Eco31I,  
Eco32I, Eco47III, Eco52I, Eco57I, Eco72I, Eco81I, Eco88I, Eco91I, EcoICRI,  
EcoNI, EcoO109I, EcoO65I, **EcoRI**, EcoRV, EcoT14I, EcoT22I, EheI, ErhI, Esp1396I,  
Esp3I, FauNDI, FriOI, FseI, FspI, GsuI, HaeII, Hin1I, **HindIII**, Hsp92I,  
KasI, Kpn2I, KpnI, Ksp632I, KspI, LspI, MamI, MfeI, MflI, MluI, MluNI,  
Mph1103I, MroI, MroNI, MscI, MslI, Msp17I, MspAI, MspCI, MunI, Mva1269I,

NaeI, NarI, NcoI, NdeI, NgoAIV, NgoMI, NheI, **NotI**, NruI, NsiI, NspBII, NspV, PacI, PaeI, PaeR7I, Pfl23II, PflMI, PleI9I, PmaCI, PmeI, PmlI, Ppu10I, PpuMI, PshAI, Psp124BI, Psp1406I, Psp5II, PspAI, PspALI, PspEI, PspLI, PspOMI, **PstI**, PstNHI, PvuI, PvuII, RcaI, RsrII, **SacI**, SacII, SalI, SapI, SbfI, ScaI, SexAI, SfcI, SfiI, Sfr274I, Sfr303I, SfuI, SgfI, SgrAI, **SmaI**, SmiI, SnaBI, SpeI, SphI, SplI, SrfI, Sse8387I, SspBI, SspI, SstI, SstII, StyI, SunI, SwaI, Tth111I, Van91I, Vha464I, VneI, XbaI, **XhoI**, XhoII, XmaI, XmaIII, Zsp2I

PreM/Envelope Dengue 3 AY923865 - Optimizado Levedura - Dominio III Envelope

tctcaagaaggtgccatgcacACAGCTTTAACCGGTGCAACTGAAATCCAAAATTCTGGTGGTACATCAATTTTTGCAGG  
TCACTTGAAGTGTAGATTGAAGATGGATAAGTTGGAATTGAAGGGCATGTCCTATGCTATGTGCTTGAACACTTTCGTCT  
TGAAGAAAGAAGTTAGTGAAACTCAACATGGTACAATCTTGATCAAAGTTGAATACAAGGGTGAAGATGCTCCATGTAAA  
ATTCTTTTTTCAACAGAAGACGGTCAGGGTAAAGCTCACAATGGTAGATTAATAACCGCAAACCCAGTTGTAACATAAAAA  
GGAAGAACCTGTTAACATCGAAGCAGAACCACCTTTCGGTGAATCCAACATTGTTATAGGTATCGGTgacaaggccttga  
A  
gattaat (408 pb)

SQEGAMHTALTGATEIQNSGGTSIFAGHLKCRLEKMDKLELKGMSYAMCLNTFVLKKEVSETQHGTILIKVEYKGEDAPCK  
IPFSTEDGQGAHNGLITANPVVTKKEEPPVNIEAEPPFGESNIVIGIGDKALKIN (14,6 kDa)

DENV3 Sense5'- tctcaagaaggtgccatgcac-3' Colocar Sitio Eco RI

DENV3 Ante Sense 5'- attaatcttcaaggccttgtc-3' Colocar Sitio Not I





Contents lists available at ScienceDirect

## Protein Expression and Purification

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/yprep](http://www.elsevier.com/locate/yprep)

## Dengue-1 envelope protein domain III produced in *Pichia pastoris*: Potential use for serological diagnosis



Silvia A. Cardoso <sup>a,1</sup>, Vinícius F. Paixão <sup>a,1</sup>, Michelle D. Oliveira <sup>a</sup>, Eduardo R. Honda <sup>b</sup>, Leandro L. Oliveira <sup>a</sup>,  
Cynthia C. da Silva <sup>a</sup>, Sérgio O. De Paula <sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Laboratory of Molecular Immunovirology, Department of General Biology, Federal University of Viçosa, Viçosa (MG), Brazil

<sup>b</sup> Research Center for Tropical Medicine – CEPEM, Porto Velho (RO), Brazil

### article info

#### Article history:

Received 3 April 2013  
and in revised form 31 July 2013  
Available online 29 August 2013

#### Keywords:

Dengue  
Domain III  
Expression  
Diagnosis  
ELISA  
*Pichia pastoris*

### abstract

Dengue is a major international public health concern. There is no drug to treat dengue virus infections and a vaccine is yet to be licensed. The laboratory diagnosis of dengue virus infection has been greatly improved during the last decade; therefore, the main limiting factor is the production of recombinant viral antigens on a large scale. Domain III of dengue virus envelope protein contains multiplex conformation-dependent neutralizing epitopes, making it an attractive diagnostic candidate. In this work, we have demonstrated the expression of dengue virus type 1 envelope domain III protein (EDIII-D1) in methylotrophic yeast, *Pichia pastoris* GS115. The recombinant secreted protein (sEDIII-D1) was purified by affinity chromatography and characterized by SDS-PAGE. Purified protein was recognized in immunoblot analysis and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) with dengue-infected human serum samples. In conclusion, secreted expressions of domain III protein can be obtained in *P. pastoris* by methanol induction. This product has the potential to be used for the diagnosis of dengue infections.

© 2013 Elsevier Inc. All rights reserved.

### Introduction

Dengue is one of the most serious mosquito-borne flavivirus diseases. Dengue fever (DF) <sup>2</sup> can be caused by any of four serotypes, dengue virus type 1, 2, 3, and 4 (DENV-1, DENV-2, DENV-3 and DENV-4) [1]. People living in tropical and subtropical areas are at risk of dengue virus infection. The World Health Organization estimates that there may be 100 million cases of dengue infections worldwide every year, which result in 250,000–500,000 severe cases (dengue hemorrhagic fever [DHF]/dengue shock syndrome [DSS]) and approximately 25,000 fatalities [2,3]. There is no specific treatment for DF. Diagnosis of acute dengue virus infection on the basis of clinical syndromes is not reliable and, therefore, laboratory studies are normally relied upon to confirm diagnoses because more than half of infected individuals either are asymptomatic or have mild undifferentiated fevers [4].

DENV is a single-stranded RNA virus. The dengue virion has three structural proteins (capsid [C], envelope [E], and membrane

[M]) and RNA codes for seven nonstructural proteins. The envelope of the DENV consists of a lipid bilayer containing two envelope-associated proteins: the E and M proteins; the glycoprotein E has three domains (I, II and III) [5]. Domain III (EDIII) contains approximately 100 amino acid (aa) residues, which are stabilized by a single S–S; it, therefore, lacks glycosylation sites. EDIII can fold independently into an immunoglobulin-like module which undergoes the most significant displacement in fusion transition [3,6,7]. Structural studies of intact virions have shown that EDIII is exposed and accessible on the virion surface [8]. This domain, which is responsible for receptor binding, contains multiple type and sub-type specific neutralizing epitopes [3,9,10]. Furthermore, recombinant EDIII protein [11,12] and EDIII-specific mAbs [13] can block virus infectivity. EDIII is, therefore, an important candidate as a reagent for rapid viral diagnosis because nowadays the greatest current difficulty in conducting immunoassays is obtaining suitable antigens. In Brazil, the antigens currently used for dengue diagnosis are structural viral proteins taken from the brains of artificially infected newborn mice, which is an arduous and expensive method. This is an important obstacle in the large-scale production of antigens used in diagnostic assays of infected patients. Commercially available kits using recombinant proteins or viruses have been used in routine dengue laboratory diagnosis, but are expensive. Worldwide, conducting rapid and inexpensive diagnostic tests is increasingly necessary to allow diagnoses on a larger scale, even in the remote outskirts of large cities. Due to this demand,

\* Corresponding author. Address: Av. PH Rolfs, s/n Campus Universitário, CEP 36570-000 Viçosa (MG), Brazil. Fax: +55 031 3899-2549.

E-mail address: [depaula@ufv.br](mailto:depaula@ufv.br) (S.O. De Paula).

<sup>1</sup> These authors contributed equally to this work.

<sup>2</sup> Abbreviations used: DF, dengue fever; DHF, dengue hemorrhagic fever; DSS, dengue shock syndrome; AOX1, alcohol oxidase 1 gene; YPDG, yeast extract peptone dextrose sorbitol; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; ROC, receiver operating characteristic.





attempts to obtain better quality and higher quantities of antigens are being made using a heterologous system of protein expression in Eukaryotes.

In the last several years, the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* has emerged as a powerful and inexpensive heterologous system for the production of high levels of functionally active recombinant proteins [14,15]. As a eukaryote, *P. pastoris* provides the potential for producing soluble correctly folded recombinant proteins that have undergone all of the post-translational modifications required for functionality [16]. Several S–S-linked proteins such as recombinant hepatitis B surface antigen and insulin have been successfully produced in *P. pastoris* [17–19].

In this study, we expressed the optimized gene encoding protein E domain III of DENV-1 in *P. pastoris* GS115. This system permits secretion of the recombinant protein (sEDIII-D1) into the culture supernatant, free of toxins/pyrogens (unlike *Escherichia coli* derived proteins). The purified protein has shown immunogenic potential.

## Materials and methods

### Microbial host strains and plasmid vector

The host strain used in this study was *P. pastoris* GS115. This strain is defective in the histidine dehydrogenase gene (*his4*) and has a functional copy of the alcohol oxidase 1 gene (*AOX1*). For secretory expression in this yeast, we used the integrative plasmid pPICZaA, which contains an *AOX1* promoter fused to the *Saccharomyces cerevisiae* pre-pro factor secretory signal-encoding sequence and a zeocin-resistance marker for selection of yeast transformants. *P. pastoris* GS115 strain, plasmid pPICZaA, and *E. coli* DH5a used for cloning and replication of the construction were purchased from Invitrogen, Carlsbad, CA.

### Creation of recombinant *P. pastoris* clone carrying EDIII-D1 gene

A 408 base-pair (bp) EDIII-dengue 1 gene (GenBank accession number NC\_023865), codon optimized for expression in *P. pastoris*, was obtained by chemical synthesis (Genscript, NJ, USA). This gene was inserted into the *EcoR* I and *Not* I restriction sites of pPICZaA. The resultant construct, pPICZEDIII-D1, was linearized with *Sac* I and electroporated into *P. pastoris* GS115. In parallel, we also generated a blank control clone, harboring the empty parent vector. Zeocin-resistant high-copy transformants were selected on yeast extract peptone dextrose sorbitol (YPDS) plates containing zeocin (100, 200, and 500  $\mu$ g/ml), as described in the Invitrogen Easy select TMPichia expression kit manual. (Invitrogen's Easy Select *Pichia* Expression kit manual). The presence of the EDIII-D1 gene insert was analyzed by direct colony PCR using a domain III-specific primer pair (Sense 5'-tcacaagaaggtgcatgcac-3', Antisense 5'-agacaactcaagccttttc-3').

### Production of sEDIII-D1 recombinant protein

A verified transformant was inoculated in 5 mL YPD medium to a starter culture and maintained for 24 h at 30 °C in a shaker. This pre-culture was inoculated into 1 L BMGY pH 8.0 (1% yeast extract, 2% peptone, 1.34% yeast nitrogen base, 0.002% biotin, 100 mM sodium phosphate, 1% glycerol and 0.004% histidine). The culture was allowed to shake at 250 rpm at 30 °C for approximately 3 days, until it reached an OD<sub>600</sub> of approximately 20. At this point, cells were pelleted by low-speed centrifugation, washed with sterile peptone water (1% yeast extract, 2% peptone), and re-suspended in 100 mL BMMY pH 8.0 (1% yeast extract, 2% peptone, 1.34% yeast nitrogen base, 0.002% biotin, 100 mM sodium phosphate, 1%

methanol and 0.004% histidine) to induce protein expression. Induction was maintained for 72 h at 250 rpm/30 °C; methanol was added to a final concentration of 1% (v/v) at 12 h intervals. After the induction, the supernatants were collected by centrifugation and processed for the sEDIII-D1 purification.

### Purification and characterization of recombinant protein sEDIII-D1

The culture supernatant containing sEDIII-D1 protein was freshly diluted with an equal volume of binding buffer pH 8.0 (20 mM sodium phosphate, 500 mM NaCl) and clarified by filtration through a 0.45  $\mu$ m membrane, and then subjected to affinity chromatography. The clarified supernatant was loaded into a 1 mL HiTrap FF crude column, previously equilibrated with binding buffer, and attached to an AKTA purifier system (GE Healthcare Life Sciences, Uppsala, Sweden). A ten-column volume of binding buffer was passed through the column to remove non-specifically bound proteins and the specifically bound protein was retrieved from the column using an elution buffer (20 mM sodium phosphate, 500 mM NaCl, 300 mM imidazole). Peak fractions were pooled together and dialyzed against PBS pH 8.0 using centrifugal filtration devices with a 10,000-molecular weight cut-off (Millipore); the protein estimation was determined with a BCA kit (Pierce Chemical Co., Rockford, USA). For characterization, the purified proteins were subjected to 15% SDS-PAGE. Separated proteins were electro-transferred onto a nitrocellulose membrane and processed for immunoblot analysis using anti-HisTag mAb (Sigma, USA) and dengue-infected human serum samples.

### Serum samples

Sera from 171 patients were provided by the Central Public Healthcare Laboratory in the State of Rondônia (LACEN/RO) and the Central Blood Bank of Rondônia State, Brazil (FHEMERON/RO). All sera were tested in accordance with protocols approved by the Central Blood Bank of Rondônia State, Brazil Institutional Human/Animal Care and Use Committee, and all samples were anonymous.

The samples had previously been confirmed as IgM or IgG positive for dengue by MAC-ELISA IgM (Pan-Bio, Australia) and Dengue Duo IgM and IgG ELISA Capture Kits (Sanofi, NJ, USA). Of the 171 samples, 60 were IgG positive and 32 were IgG negative using Dengue Duo IgM and IgG ELISA Capture Kits; 50 were IgM positive and 29 were IgM negative using both kits MAC-ELISA IgM (Pan-Bio, Australia) and Dengue Duo IgM and IgG ELISA Capture Kits (Sanofi, NJ, USA). The totals were 110 positive and 61 negative samples.

### Indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of IgM and IgG

Purified sEDIII-D1 were used as a coating antigen for sensitization (1.0  $\mu$ g/well) of 96-well polystyrene plates (Maxisorp; Nunc, Roskilde, Denmark) in a carbonate-bicarbonate buffer (pH 9.6) and incubated at 4 °C overnight. The plates were blocked for 30 min with block solution (PBS/5% fetal bovine serum). Serum samples were diluted 1/100 in block solution; 100  $\mu$ L of each serum dilution was assayed in duplicate. The plates were incubated at 37 °C for 2 h and washed four times with PBS/1% Tween 20. Secondary anti-human IgM or IgG antibodies peroxidase-conjugated (Sigma, USA) was diluted 1/2500 in block solution added to the plates, which were incubated at 37 °C for 2 h, followed by five washes; 100  $\mu$ L of TMB (Sigma, USA) substrate solution (1 tablet TMB, 10 mL of 0.05 M phosphate-citrate buffer/pH 5.0, 2  $\mu$ L of hydrogen peroxide) was then added. Plates were then incubated at room temperature for 20 min and the reaction was stopped with 50  $\mu$ L of 2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. The plates were read with a multichannel



spectrophotometer (Multiskan, Thermo Scientific, USA) with a 450 nm filter.

#### Statistical analysis

Receiver operating characteristic (ROC) curves were analyzed to estimate the diagnostic cut off, sensitivity, and specificity (INSTAT software, GraphPad, San Diego, CA, USA).

#### Results

##### Creation of a recombinant *P. pastoris* clone expressing EDIII-D1

To create an EDIII-D1 secretory *P. pastoris* clone, we constructed an expression vector pPICZEDIII-D1 (Fig. 1B) by inserting a codon-optimized synthetic gene (Fig. 1A) into the plasmid pPICZaA. In this system, protein expression is under the control of the AOX1 promoter in response to methanol induction. The EDIII-D1 sequence was fused in frame to the *S. cerevisiae* pre-pro  $\alpha$ -factor secretory signal and integrated into the genome of the *P. pastoris* host strain GS115 using the single cross-over strategy.

The recombinant protein EDIII of DENV-1 encoded in this system is composed of 138 amino acid residues; these domains possess the single S–S bond that is critical for structural and anti-genic integrity [20]. The EDIII-D1 is predicted to be 14.5 kDa in size and was expressed as fusions to a C-terminal polyhistidine (6xHis) tag to aid in detection and purification.

Transformants harboring the EDIII-D1 expression cassette were selected in the presence of 500  $\mu$ g/mL zeocin, and then the presence of the integrated EDIII-D1 gene was further confirmed by direct colony PCR (Fig. 2A). A DNA fragment of about 400 bp was amplified from transformed GS115 cells, using specific an EDIII-D1 primer pair. The amplification with AOX1 primers confirmed that the domain gene had been integrated into the AOX1 locus on the genome of the *P. pastoris* GS115 host.

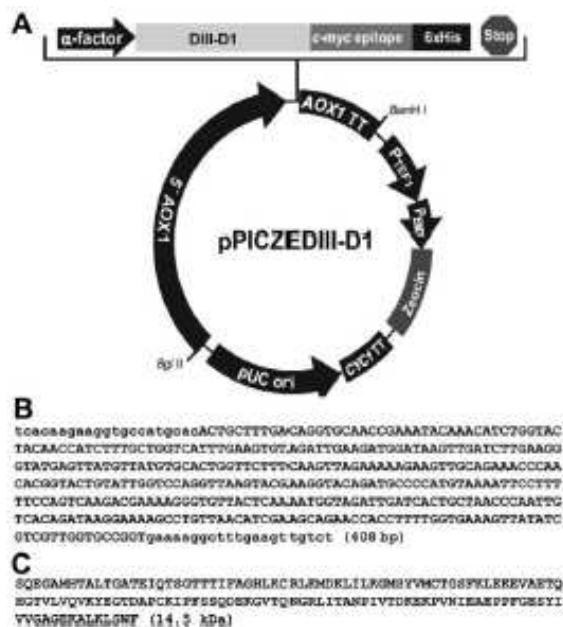


Fig. 1. The envelope domain III from dengue-1 antigen expression. (A) Codon-optimized synthetic gene of EDIII-D1. (B) Map of plasmid pPICZ-EDIII-D1. The EDIII-D1 gene was inserted into the EcoRI and NotI sites of the integrative vector pPICZaA under the control of the methanol-inducible AOX1 promoter (5' AOX1). (C) Recombinant protein sequence.

A PCR-confirmed clone was assayed for the expression of EDIII-D1 gene product in small-scale testing with methanol induction for 3 days. Secreted expression of the recombinant protein is indicated by a 15 kDa protein band corresponding to the expected molecular weight of EDIII-D1 in the supernatant fraction (Fig. 2B). No similar band appeared in the blank control or in the supernatant without methanol induction. After confirmation of the secretion, this protein was called sEDIII-D1. Expression of the sEDIII-D1 protein was obtained during the first 24 h; therefore, induction with methanol for 3 days resulted in the maximal sEDIII-D1 expression (Fig. 2C). A nonspecific band of approximately 70 kDa, can also be observed in the material after methanol induction, but this band was not revealed in Western blot analysis (Fig. 3B and C).

##### Expression and purification of recombinant sEDIII-D1

The expression of recombinant sEDIII-D1 was done in conditions developed by Barr and collaborators that closely resembled the requirements of fermentor systems [21]. Therefore, the culture was conducted in two stages, first via the generation of biomass in a repressive buffered media, and then by the production phase, where the cells were re-suspended in small volumes of methanol induction-buffered media. The use of a buffered medium (pH 3.0–6.0) is known significantly reduce the proteolysis of the secreted recombinant protein [22,23].

Since the recombinant sEDIII-D1 protein contains a polyhistidine tag, it was recovered from the clarified methanol-induced supernatant by Ni-affinity chromatography. The entire process of purification was controlled and monitored by connecting the column to an AKTA system. Aliquots of fractions collected during the purification were analyzed by SDS-PAGE (Fig. 3A). It is evident that the bound fraction contains a major band of 15 kDa which is consistent with the predicted size of the sEDIII-D1 protein. An immunoblot analysis of the purified protein using anti-HisTag mAb and dengue positive serum appeared to confirm its identity (Fig. 3B and C). These data were confirmed by high sensitivity and specificity of IgM anti-dengue using sEDIII-D1 (Table 1).

##### Indirect ELISA for the detection of IgM and IgG anti-dengue

A panel of the 160 serum samples was evaluated with the purified and characterized sEDIII-D1 with an indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA); they were used to evaluate IgM and IgG anti-dengue. These samples had previously been characterized by commercially available serological tests (114 positive and 46 negative). For the IgM anti-dengue, the cut-off was defined at the point at which 0.204 nm, 99.12% specificity, and 86.96% sensitivity were observed. Therefore, the cut-off for IgG anti-dengue was 0.300 nm, 65.25% specificity, and 86.67% sensitivity (Fig. 4, Table 1).

#### Discussion

The global prevalence of dengue has grown dramatically in recent decades. This viral disease affects people in tropical and sub-tropical regions around the world, predominantly in urban and semi-urban areas, threatening more than 2.5 billion [24]. In endemic areas, secondary infections are most common and more highly associated with mortality [25,26]. Therefore, there is genuine demand for the rapid detection and differentiation of dengue virus infection diagnostic assays.

The dengue viral envelope protein is responsible for viral attachment by binding to cellular receptors [27,28]. Hence, the Ig-like envelope domain III protein, an independently folding domain that plays an important role in host receptor interactions,



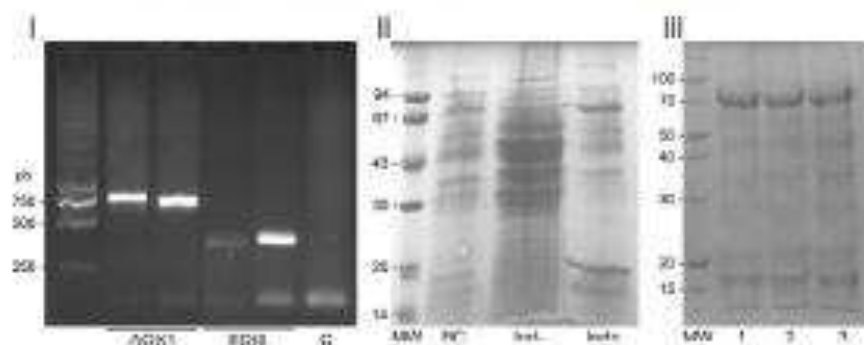


Fig. 2. Construction of *P. pastoris* expressing EDIII-D1 recombinant protein. (A) PCR amplification of AOX1 gene (AOX1) or dengue-1 domain III gene (EDIII) from two representative baculovirus-transformants. (B) SDS-PAGE analysis of protein expression in the supernatant (SC) blank control (GS115), (Ind.) supernatant without induction, and (Ind+) supernatant after methanol induction. (C) SDS-PAGE analysis of recombinant protein expression after 1, 2, and 3 days of methanol induction. (MW) Protein molecular weight markers (kDa).

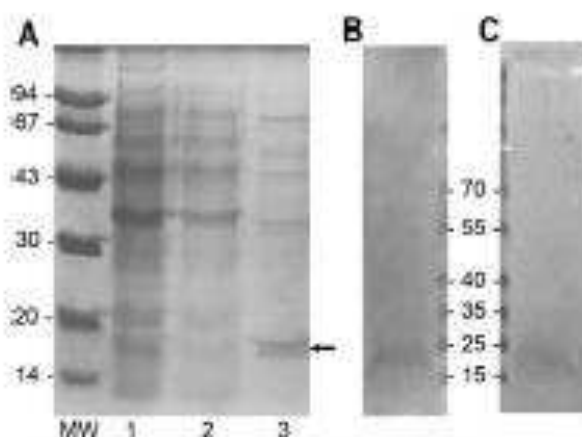


Fig. 3. Purification and characterization of the sEDIII-D1 protein. (A) Coomassie blue-stained 15% reduced SDS-PAGE of samples obtained from each of the recombinant protein purification steps. (1) Total supernatant after methanol induction; (2) sample that did not interact with the affinity medium; (3) purified recombinant sEDIII-D1. (MW) Protein molecular weight markers (kDa). (B) Immunoblot of sEDIII-D1 after the purification. Aliquots of the purified material (3) were transferred to nitrocellulose and probed with anti-HisTag antibodies and dengue positive serum. (M) Pre-stained molecular weight markers (kDa). The arrow indicates the electrophoretic positions of the sEDIII-D1 protein.

Table 1  
Sensitivity and specificity of IgM and IgG anti-dengue using sEDIII-D1. Receiver operating characteristic (ROC) curves were analyzed to estimate the diagnostic sensitivity and specificity.

|     | % Sensitivity | % Specificity |
|-----|---------------|---------------|
| IgM | 99.96         | 99.12         |
| IgG | 99.67         | 99.25         |

containing multiple serotype-specific conformation-dependent neutralizing epitopes [12,29] and exhibiting a very high degree of stability [30,31], has become an attractive candidate as a reagent for diagnosis of dengue infections.

During the last years, successful expressions of recombinant envelope protein dengue viruses have been demonstrated in different vector systems [32–34]. Although prokaryotic expression systems such as *E. coli* are simple to perform, they lack the modification mechanism of eukaryotic expression and it is difficult to purify recombinant proteins from inclusion bodies. The baculo-virus expression system is usually used to produce recombinant proteins in eukaryotic cells, but they are not suitable for large-scale expression of foreign proteins. In the present study, the *P. pastoris* yeast expression system was used to produce dengue virus type 1

domain III proteins because of the simplicity of techniques needed for molecular genetic manipulation and its ability to produce foreign proteins extra cellularly. Furthermore, many post-translational modifications of eukaryotic systems, such as disulfide bond formation, can be performed in the yeast system. The recombinant vector pFCDIII-D1 described above was constructed with the EDIII-D1 gene in frame downstream from the sequence encoding the *S. cerevisiae* signal peptide and upstream from the sequence encoding His-tag.

In accordance with the above objective, we demonstrated the secretory expression of the sEDIII-D1 protein in a two-phase cultivation, which included a glycerol batch phase, to accumulate bio-mass followed by an induction phase with methanol. The secretion of the recombinant protein into the growth medium is an important advantage because only low levels of endogenous pro-teins are secreted to the media by the yeast itself, a process that facilitates following the protein purification steps [35,36]. The sEDIII-D1 recombinant protein was purified in Ni-affinity column chromatography and characterized by its electrophoretic mobility and its reactivity to 6xHis Tag mAb and dengue-positive human serum.

Further purified and characterized sEDIII-D1 was successfully tested for the diagnosis of dengue infection in an indirect ELISA. From the 100 total human serum samples, the sensitivity was 99.67% and specificity 99.25% for IgG; sensitivity was 99.96% and specificity was 99.12% for IgM. The immunodominant epitopes preserved in the recombinant sEDIII-D1 protein certainly contributed to a high degree of sensitivity and specificity for the diagnosis of dengue infections. The common problem with dengue serological assays lies in detection of circulating cross-reactive antibodies against other Flaviviruses. Cross-reactivity was found to be minimum while identifying dengue virus infection, with in-house indirect ELISA employing pre-coated EDIII-D1 proteins.

Fry and collaborators reported that ideal results are obtained by combining antigen or antibody detection methods, thereby increasing the sensitivity and the specificity of serological tests [37]. Previous research indicates that variables such as infecting serotype, primary or secondary infection, time of sample collection, and the individual responses of patients are factors that can cause variations in the sensitivity and specificity of serological tests from 66% to 100% [3,37,38]. The sensitivity and specificity of sEDIII-D1 proteins in detecting antibodies from dengue-infected patients renders hope that it may be a promising candidate for the development of commercial and inexpensive dengue diagnostic kits. A similar strategy could lead to the production of recombinant domain III proteins of other serotypes. The level of purification facilitated by protein secretion has the potential to make this a highly cost-effective approach for dengue diagnosis, in a large scale production.

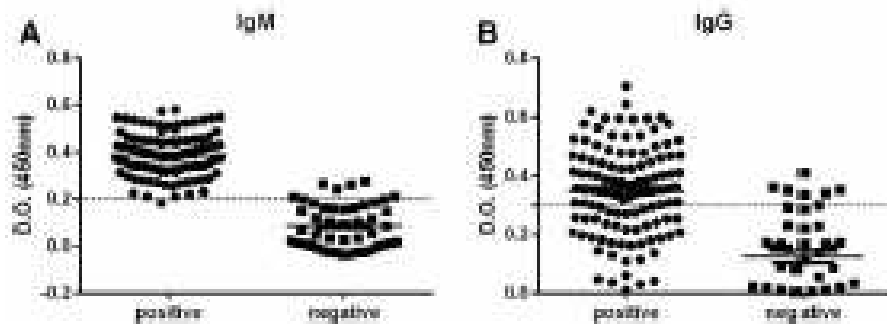


Fig. 4. Indirect ELISA using sEDIII-CH. Results of dengue-positive and negative (healthy individuals) samples in IgM (A) and IgG (B) detection. The horizontal line indicates the cutoff value of the assay.

#### Acknowledgments

This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brazil (Pronex Grant # 550165/2010-0 and INCT Dengue Grant # 471221/2008-2) and FAPESP. M.D.C. and Y.P. were supported by a scholarship from the CAPES.

#### References

- [1] D.J. Gubler, G. Kuro, L. Marzoff, P. Pantham, in: D.M. Knipe, P.M. Howley (Eds.), *Fields Virology*, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2007, pp. 1103–1252.
- [2] S.B. Halstead, *Dengue*, Lancet 370 (2007) 1564–1565.
- [3] M.G. Guzman, S.B. Halstead, H. Anzoni, F. Buchy, J. Paster, D.J. Gubler, E. Hunsberger, A. Koenig, H.S. Margolis, E. Mathias, M.B. Nathan, J.L. Pelegriño, C. Simmons, S. Yoksan, R.W. Peeling, Dengue: a continuing global threat, *Nat. Rev. Dis. Public Health* 10 (2010) 57–67.
- [4] S.D. Sacdalan, R.G. Jaraman, R.V. Gibbons, A. Tangnuchitchanchoi, M.P. Memmen Jr., A. Hissak, S. Kuleyevskoy, M.S. Bailey, R. Premaratne, R.J. de Silva, N.P. Day, D.G. LaSoo, Comparison of seven commercial antigen and antibody enzyme-linked immunosorbent assays for detection of acute dengue infection, *Clin. Vaccine Immunol.* 19 (2012) 804–810.
- [5] W. Zhang, P.R. Chipman, J. Connor, P.R. Johnson, Y. Zheng, S. Mahapatray, T.S. Deiler, J.H. Strauss, M.G. Roseman, R.J. Kuhn, Visualization of membrane protein domains by cryo-electron microscopy of dengue virus, *Nat. Struct. Mol. Biol.* 10 (2003) 907–913.
- [6] Y. Maeda, S. Ogata, G. Clements, S.C. Harrison, A ligand-binding pocket in the dengue virus envelope glycoprotein, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100 (2003) 5899–5904.
- [7] S. Swaminathan, N. Khanna, Dengue: recent advances in biology and current status of translational research, *Curr. Mol. Med.* 9 (2009) 153–173.
- [8] R.J. Kuhn, W. Zhang, M.G. Roseman, S.V. Planey, J. Connor, E. Lénich, C.T. Jones, S. Mahapatray, P.R. Chipman, E.G. Strauss, T.S. Deiler, J.H. Strauss, Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation, and fusion, *Cell* 106 (2001) 717–725.
- [9] G.D. Gromowski, N.D. Barrett, A.D. Barrett, Characterization of dengue virus complex-specific neutralizing epitopes on envelope protein domain III of dengue 2 virus, *J. Virol.* 82 (2008) 8839–8847.
- [10] S. Sukolichakul, S.K. Austin, W.E. Purtha, T. Copher, G.E. Hybels, J.J. Schlegel, J.T. Roehrig, G.D. Gromowski, A.D. Barrett, D.H. Fremont, M.S. Diamond, Type- and auto-complex-specific neutralizing antibodies against domain III of dengue virus type 2 envelope protein recognize adjacent epitopes, *J. Virol.* 81 (2007) 12816–12826.
- [11] J.F. Chin, J.J. Chin, M.L. Ng, The envelope glycoprotein domain III of dengue virus serotypes 1 and 2 inhibit virus entry, *Molecular Infect.* 9 (2007) 1–6.
- [12] S. Jaiswal, N. Khanna, S. Swaminathan, High-level expression and one-step purification of recombinant dengue virus type 2 envelope domain III protein in *Escherichia coli*, *Protein Expr. Purif.* 33 (2004) 80–91.
- [13] W.D. Cui, J.T. Roehrig, Monoclonal antibodies that bind to domain III of dengue virus E glycoprotein are the most efficient blockers of virus adsorption to Vero cells, *J. Virol.* 75 (2001) 7769–7773.
- [14] G.P. Caraghi, J.L. Caraghi, C. Igar, J.M. Cragg, Production of recombinant proteins in fermenter cultures of the yeast *Pichia pastoris*, *Curr. Opin. Biotechnol.* 13 (2002) 329–333.
- [15] S. Masuoka-Petrick, M.L. Papetta, B. McVat, L.M. Harvey, Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system, *Yeast (Chichester, England)* 22 (2005) 249–270.
- [16] R. Daly, M.T. Hawn, Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production, *J. Mol. Recognit.* 18 (2005) 119–136.
- [17] J.M. Cragg, J.P. Tadpole, G. Seltman, R. Siegel, M. Akong, W.S. Crag, R.G. Buckholz, K.R. Madden, P.A. Kallala, G.R. Davis, S.L. Smiley, J. Cruz, R. Tomasz, G. Velicci, G.P. Thil, High-level expression and efficient assembly of hepatitis B surface antigen in the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*, *Nature Biotechnology* 5 (1987) 475–482.
- [18] T. Halstead, A.P. Fritzsche, M. Hach, Secretory expression and characterization of insulin in *Pichia pastoris*, *Biochem. Appl. Biochem.* 10 (1993) 79–86.
- [19] A. Vasileva, D.A. Chugh, S. Swaminathan, N. Khanna, Effect of copy number on the expression levels of hepatitis B surface antigen in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*, *Protein Expr. Purif.* 21 (2001) 71–80.
- [20] J.T. Roehrig, K.E. Volpe, J. Spence, A.R. Hunt, S.S. Davis, G.L. Chang, Contribution of disulfide bridging to epitope expression of the dengue type 2 virus envelope glycoprotein, *J. Virol.* 78 (2004) 2949–2952.
- [21] K.A. Sam, S.A. Nopkha, K. Sreelakshna, Protocol for efficient secretion of HSA developed from *Pichia pastoris*, *Pharm. Eng.* 12 (1992) 40–51.
- [22] J.M. Cragg, T.S. Vaidich, W.C. Reaschke, Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris*, *Nat. Biotechnol.* 11 (1993) 905–910.
- [23] K. Sreelakshna, R.G. Rankamp, R.E. Kopp, D.T. Bankership, J.T. Tasy, P.L. Smith, J.D. Wierchick, A. Subramaniam, L.A. Schenberger, Strategies for optimal synthesis and secretion of heterologous proteins in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*, *Gene* 190 (1997) 55–60.
- [24] D.J. Gubler, Reemerging vector-borne diseases as a global health problem, *Emerg. Infect. Dis.* 4 (1998) 442–450.
- [25] S.L. Innis, Antibody response to dengue virus infection, in: D.J. Gubler, G. Kuro (Eds.), *Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever*, CAB International, New York, NY, 1997, pp. 221–242.
- [26] K. Ruchaisant, K. Morita, M. Tanaka, S. Yongchana, S. Rojanasuphot, P. Wierchick, K. Kariya, P. Thongchul, P. Nimsakorn, S. Kinsungit, A. Igasaki, Daily observation of antibody levels among dengue patients detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), *J. Trop. Med. Hyg.* 22 (1994) 6–12.
- [27] Y. Chen, T. Maguire, R.E. Hillman, J.R. Proom, J.D. Eiko, R.J. Linhart, R.M. Marks, Dengue virus infectivity depends on envelope protein binding to target cell heparan sulfate, *Nat. Med.* 3 (1997) 805–811.
- [28] J.J. Hong, M.T. Hawn, M.J. Young, C.L. Kim, C.C. King, W. Chang, An external loop region of domain III of dengue virus type 2 envelope protein is involved in serotype-specific binding to mosquito but not mammalian cells, *J. Virol.* 78 (2004) 378–388.
- [29] P. Pathman, J.P. Eiko, S.K. Verma, V. Thi, P.V. Rao, Bacterially expressed and purified envelope protein (domain III) of dengue virus type-4 blocks heparan sulfate, *J. Chromatogr.* 848 (2007) 154–164.
- [30] S. Bhattach, M. Holbrook, R.E. Shope, A.D. Barrett, S.J. Wiatovich, Biophysical characterization and vector-specific antagonistic activity of domain III of the *Aedes albopictus* envelope protein, *J. Virol.* 75 (2001) 4003–4007.
- [31] S. Wang, R. He, R. Anderson, Pre- and cell-binding domains of the dengue virus E protein, *J. Virol.* 73 (1999) 2547–2551.
- [32] S. Feighny, J. Surous, B. Putnak, Dengue type-2 virus envelope protein made using recombinant baculovirus protects mice against virus challenge, *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 50 (1994) 323–328.
- [33] Y. Maitono, M. Tadono, S. Anikuni, T. Fukunaga, Potential use of a baculovirus-expressed dengue-4 E protein as a diagnostic antigen in regions endemic for dengue and Japanese encephalitis, *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 45 (1991) 636–640.
- [34] P.W. Mason, M.U. Zuger, A.R. Sanpront, M.J. Fournier, T.L. Mason, The antigenic structure of dengue type 1 virus envelope and NS1 proteins expressed in *Escherichia coli*, *J. Gen. Virol.* 71 (Pt 2) (1990) 2107–2114.
- [35] J.L. Caraghi, J.M. Cragg, Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*, *FEMS Microbiol. Rev.* 24 (2000) 45–66.
- [36] M. Waidner, M. Taup, S.J. Hallam, Expression of recombinant proteins in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*, *J. Mol. Exp.* (2010).
- [37] S.R. Py, M. Meyer, H.G. Sempke, C.P. Simmons, S.D. Sekaran, J.C. Huang, O. McDine, C.Y. Huang, A. Valle, P.R. Young, M.A. Cooper, The diagnostic sensitivity of dengue rapid test assays is significantly enhanced by using a combined antigen and antibody testing approach, *PLoS Negl. Trop. Dis.* 5 (2011) e1199.
- [38] V. Duong, S. Ly, P. Lam Thy, A. Taisakun, S. Ong, H. Chansung, A. Luchshut, I. Lepore-Goffert, V. Deulac, S. Yong, P. Buchy, Clinical and virological factors influencing the performance of a NS1 antigen-capture assay and potential use as a marker of dengue disease severity, *PLoS Negl. Trop. Dis.* 5 (2011) e1244.