

JOHN WILLIANS OLIVEIRA PRATES

**EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS NÃO ESTRUTURAL 1 (NS1) DOS VÍRUS  
DENGUE-1, DENGUE-3 E DENGUE-4 EM *Pichia pastoris***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2017

Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade Federal de  
Viçosa - Campus Viçosa

T

P912e  
2017 Prates, John Willians Oliveira, 1989-  
Expressão das proteínas não estrutural 1 (NS1) dos vírus Dengue-  
1, Dengue-3 e Dengue-4 em *Pichia pastoris* / John Willians Oliveira  
Prates. - Viçosa, MG, 2017.  
ix, 34f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Sérgio Oliveira de Paula.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.  
Referências bibliográficas: f.30-34.

1. Proteínas. 2. Dengue. 3. *Pichia pastoris*. I. Universidade  
Federal de Viçosa. Departamento de Biologia Geral. Programa de Pós-  
graduação em Microbiologia Agrícola. II. Título.


CDD 22 ed. 572.6

JOHN WILLIANS OLIVEIRA PRATES

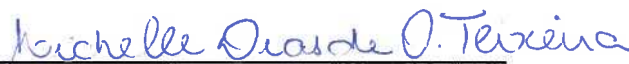
**EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS NÃO ESTRUTURAL 1 (NS1) DOS VÍRUS  
DENGUE-1, DENGUE-3 E DENGUE-4 EM *Pichia pastoris***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 20 de Julho de 2017.



Monique Renon Eller



Michelle Dias de Oliveira Teixeira  
(Coorientadora)



Sérgio Oliveira de Paula  
(Orientador)

## AGRADECIMENTOS

Sou eternamente grato a Deus, meu pai celestial, por ter me confiado à profissão de Biomédico, por ter me concedido esse dom e me proporcionar à oportunidade de seguir a carreira acadêmica. O senhor sempre esteve iluminando os meus caminhos, protegendo, acalmando nos momentos difíceis e mostrando que a vitória vem depois da tempestade.

Agradeço a minha família, em especial, a minha avó Miralva Olga Prates, meu pai Alix Prates e minha tia Mônica Prates, que mesmo distantes, sempre estiveram presentes, me apoiando, se preocupando e incentivando sempre a seguir em frente.

Agradeço ao meu orientador Sérgio Oliveira de Paula, por ter aberto as portas do seu laboratório para mim, pela confiança, orientação, compreensão quando precisei, e por ter sido uma pessoa legal e amigável sempre.

Um agradecimento mais que especial a minha amiga e colega de trabalho Mariana Xisto, exemplo de competência, inteligência e dedicação, por toda orientação, pela boa vontade que sempre teve em ajudar, pelas explicações, pelas conversas e boas risadas e pela amizade que sempre dedicou. Obrigado por tudo e por ter me apoiado até o final, a luta foi grande rsrs

A minha co-orientadora Michelle Dias de Oliveira, pela orientação, pelos conhecimentos compartilhados, pelo apoio e ajuda durante o tempo que estive no laboratório.

Agradeço a toda galera do laboratório de Imunovirologia Molecular da UFV, que de alguma forma ajudaram e contribuíram para o meu aprendizado.

Ao programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, os professores pelos conhecimentos compartilhados, pelo direcionamento e à CAPES pelo auxílio concedido durante o curso.

Aos amigos de Barro Preto que sempre torceram, incentivaram e acreditaram em mim e hoje estão felizes por mais essa vitória.

Aos amigos que fiz em Viçosa, em especial, Juliana Almeida, Sara Domiciano, Gabriel Miquelito, Djalma Pereira e Johnny Gravina, nunca vou esquecer dos momentos felizes que passamos juntos, sempre serão especiais para mim.

E por fim, a todos que de alguma forma contribuíram para a realização desse sonho.

## **BIOGRAFIA**

John Willians Oliveira Prates, filho de Alix Prates e Ana Luiza de Oliveira Rocha, nasceu em 02 de Maio de 1989, na cidade de Barro Preto, Bahia. Cursou o ensino médio no Colégio Estadual Lomanto Júnior/Barro Preto-BA, e em 2011 iniciou a Graduação em Biomedicina na Universidade Estadual de Santa Cruz- UESC/Ilhéus-BA, obtendo o título de Bacharel em Biomedicina em janeiro de 2015. No segundo período do mesmo ano, ingressou no programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, nível mestrado acadêmico, da Universidade Federal de Viçosa-UFV/Viçosa, submetendo-se á defesa de dissertação em 20 de Julho de 2017.

## SUMÁRIO

RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	ix
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	2
3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	10
4. MATERIAL E MÉTODOS .....	11
4.1 Obtenção do gene otimizado da proteína NS1 do vírus dengue-4 .....	11
4.2 Preparo de <i>E. coli</i> TOP10F competente.....	11
4.3 Transformação da bactéria <i>E. coli</i> TOP10F com o plasmídeo pUC57/NS1DENV4 .....	12
4.4 Extração de DNA plasmidial (Miniprep).....	13
4.5 Clonagem do gene da proteína NS1 do DENV-4 no vetor de expressão pPICZ $\alpha$ A .....	13
4.6 PCR de colônia .....	14
4.7 Transformação de leveduras <i>Pichia pastoris</i> KM71H .....	15
4.7.1 Preparo de <i>Pichia pastrois</i> para tranformação .....	15
4.7.2 Transformação por eletroporação.....	15
4.8 Extração do DNA genômico das leveduras <i>Pichia pastoris</i> transformadas .....	16
4.9 PCR do DNA genômico das leveduras <i>Pichia pastoris</i> KM71H transformadas... ..	17
4.10 Indução da expressão da proteína NS1 do DENV-4. ....	17
4.11 Purificação das proteínas obtidas por cromatografia de afinidade... ..	17
4.12 Análises das proteínas NS1 purificadas por SDS-PAGE e Western Blot... ..	18
4.13 Indução da expressão das proteínas NS1 dos vírus dengue- 1 e -3..	18

<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>20</b>
<b>5.1 Síntese do gene da proteína NS1 do vírus dengue-4.....</b>	<b>20</b>
<b>5.2 Ligação do gene da proteína NS1 do vírus dengue-4 no vetor de expressão pPICZ<math>\alpha</math>A . .....</b>	<b>20</b>
<b>5.3 Confirmação da transformação de leveduras <i>Pichia pastoris</i> KM71H com o plasmídeo pPICZ<math>\alpha</math>A/NS1DENV4 .....</b>	<b>23</b>
<b>5.4 Expressão da proteína NS1 de DENV4.....</b>	<b>24</b>
<b>5.5 Confirmação da transformação de leveduras <i>Pichia pastoris</i> KM71H com os plasmídeos pPICZ<math>\alpha</math>A/NS1DENV1 e pPICZ<math>\alpha</math>A/NS1DENV3 .....</b>	<b>25</b>
<b>5.6 Expressão das proteínas NS1 dos vírus DENV-1 e DENV-3 .....</b>	<b>26</b>
<b>6. CONCLUSÕES .....</b>	<b>28</b>
<b>7. PERSPECTIVAS .....</b>	<b>29</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>30</b>

## RESUMO

PRATES, John Willians Oliveira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2017. **Expressão das proteínas não-estrutural 1 (NS1) dos vírus dengue-1, dengue-3 e dengue-4 em *Pichia pastoris***. Orientador: Sérgio Oliveira de Paula. Coorientadoras: Cynthia Canedo da Silva e Michelle Dias de Oliveira Teixeira.

A dengue é uma doença amplamente distribuída pelo mundo, e representa um grande problema de saúde pública em vários países. As manifestações clínicas podem variar desde uma síndrome viral inespecífica e benigna, até um quadro grave e fatal de doença hemorrágica com choque. O diagnóstico na sua fase inicial é muito importante, pois auxilia no tratamento sintomático do paciente e na adoção de medidas para o controle do vetor, prevenindo a dispersão da doença. Nesse contexto, a detecção de antígenos virais, especialmente a proteína não estrutural 1 (NS1), é uma alternativa muito eficaz para realizar o diagnóstico da dengue. Essa proteína é sintetizada pelas células infectadas, podendo ser detectada nos sobrenadantes das culturas ou no soro de pacientes infectados. Dessa forma, ela pode ser utilizada como antígeno para o desenvolvimento de kits de diagnóstico. No entanto, um grande problema no desenvolvimento de tais kits, consiste na obtenção desses antígenos, que geralmente é realizado por métodos caros, trabalhosos e de difícil execução. Nesse contexto, objetivou-se nesse trabalho utilizar um sistema de expressão eucariótico para produzir as proteínas NS1 dos vírus dengue-1, -3 e -4, e avaliar a sua antigenicidade. O gene otimizado da proteína NS1 do vírus dengue-4 foi clonado no plasmídeo pPICZ $\alpha$ A, o qual foi utilizado para transformar leveduras *Pichia pastoris* por eletroporação. Posteriormente, a levedura transformada foi submetida à indução da expressão da proteína NS1. Outras duas leveduras transformadas, de maneira independente, com dois plasmídeos diferentes (pPICZ $\alpha$ A/NS1DENV1 e pPICZ $\alpha$ A/NS1DENV3) também foram induzidas a expressar as proteínas NS1 dos vírus dengue-1 e dengue-3. Proteínas de 60 kDa (NS1 DENV4), e duas de 50 kDa (NS1 DENV-1 e NS1 DENV-3) foram obtidas. Essas proteínas mostraram-se antigênicas no teste de

Western Blot, demonstrando o seu potencial para serem utilizadas como antígenos para aplicações diagnósticas.

## ABSTRACT

PRATES, John Willians Oliveira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2017. **Expression of the nonstructural proteins 1 (NS1) of the dengue-1, dengue-3 and dengue-4 viruses in *Pichia pastoris*.** Adviser: Sérgio Oliveira de Paula. Co-advisers: Cynthia Canedo da Silva and Michelle Dias de Oliveira Teixeira.

Dengue is a disease widely distributed throughout the world and represents a major public health problem in several countries. Clinical manifestations may range from a benign non-specific viral syndrome to severe and fatal hemorrhagic shock syndrome. The diagnosis in its initial phase is very important, since it assists in the symptomatic treatment of the patient and in the adoption of measures for the control of the vector, preventing the dispersion of the disease. In this context, detection of viral antigens, especially nonstructural protein 1 (NS1), is a very effective alternative for the diagnosis of dengue. This protein is synthesized by infected cells and can be detected in culture supernatants or in the serum of infected patients. In this way, it can be used as antigen for the development of diagnostic kits. However, a major problem in the development of such kits is the procurement of these antigens, which is usually accomplished by costly, laborious and difficult methods. In this context, the objective of this study was to use a eukaryotic expression system to produce the NS1 proteins of dengue-1, -3 and -4 viruses, and to evaluate their antigenicity. The optimized NS1 protein gene of the dengue-4 virus was cloned into the plasmid pPICZ $\alpha$ A, which was used to transform *Pichia pastoris* yeasts by electroporation. Subsequently, the transformed yeast was subjected to the induction of NS1 protein expression. Two other yeasts independently transformed with two different plasmids (pPICZ $\alpha$ A/NS1DENV1 and pPICZ $\alpha$ A/NS1DENV3) were also induced to express the NS1 proteins of the dengue-1 and dengue-3 viruses. Proteins of 60 kDa (NS1 DENV4) and two of 50 kDa (NS1 DENV1 and NS1 DENV3) were obtained. These proteins were shown to be antigenic in the Western Blot test, demonstrating their potential to be used as antigens for diagnostic applications.

## 1. INTRODUÇÃO

A dengue é uma doença causada pela infecção do vírus dengue, um arbovírus que pertence ao gênero *Flavivirus* e à família *Flaviviridae*. Ele é classificado em quatro sorotipos antígenicamente distintos, denominados dengue-1, dengue-2, dengue-3 e dengue-4 (CDC, 2014). O seu genoma é constituído de uma molécula de RNA fita simples, senso positivo, contendo uma única ORF, a qual codifica uma poliproteína que é clivada para dar origem as proteínas estruturais (C, prM/M e E) e as proteínas não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5) (LEITMEYER et al., 1999). A proteína NS1, foco desse trabalho, é secretada pelas células infectadas, e pode ser detectada no sangue dos pacientes desde o começo dos sintomas, sendo considerada um marcador muito útil de infecção recente pelo vírus dengue (ALCON et al., 2002).

O desenvolvimento de kits diagnósticos rápidos, baratos e de fácil execução é uma necessidade para a população, visto a epidemia atual que muitos países se encontram. Normalmente, a produção de antígenos para serem utilizados em kits diagnósticos é realizada por vias muito laboriosas, e de alto custo para produção em larga escala. Dessa forma, uma boa alternativa para resolver esse problema na produção de antígenos, seria a utilização de um sistema de expressão heteróloga em leveduras (TEIXEIRA, 2014).

Portanto, o objetivo geral desse trabalho foi expressar as proteínas NS1 dos vírus dengue-1, dengue-3 e dengue-4 em *Pichia pastoris*, e avaliar o seu potencial para uso em aplicações diagnósticas.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A dengue é uma doença viral sistêmica, causada pela infecção do vírus dengue (DENV), o qual é transmitido ao homem através da picada de mosquitos do gênero *Aedes* (GALULA et al., 2014). Suas manifestações clínicas podem variar desde um quadro simples chamado Febre da Dengue (DF), uma doença auto limitada até um quadro grave e fatal como a Febre Hemorrágica da Dengue (DHF) e a Síndrome do Choque da Dengue (DSS) (GUZMAN; HARRIS, 2015). Após a infecção primária com um sorotipo do DENV, o risco de desenvolver as formas graves da doença é maior, pois se ocorrer uma infecção secundária com outro sorotipo diferente, os anticorpos não neutralizantes com reatividade cruzada gerados na infecção inicial, podem se ligar ao novo sorotipo do DENV, aumentando a sua captação por monócitos e macrófagos via FcγR (Fc- γ receptor), resultando em amplificação da cascata de citocinas e ativação do sistema do complemento, fenômeno conhecido como Agravamento Dependente de Anticorpos (ADE) (KIRKPATRICK et al., 2016; SCHERWITZL; MONGKOLSAPAJA; SCREATON, 2017).

A dengue é a principal arbovirose amplamente distribuída pelo mundo (BHATT et al., 2012) (Figura 1). Sintomas relacionados a essa doença foram registrados em uma enciclopédia médica Chinesa de 992 d.C, sugerindo que ela é uma doença historicamente conhecida (GUBLER, 2006).

Durante os anos de 1960-1970 houve uma queda significativa dos casos de dengue nas Américas, devido à erradicação do mosquito *Aedes aegypti*, consequência das campanhas realizadas para prevenir a transmissão da febre amarela (GUBLER, 1989). Como as medidas utilizadas para o controle do vetor tiveram sucesso por pouco tempo, o mosquito transmissor foi reintroduzido nessas regiões, levando a circulação dos sorotipos do vírus, principalmente o DENV-2, seguido do DENV-1 e -4 em países da América Latina e Caribenhos, no final da década de 70 e início dos anos 80 (ISTÚRIZ; GUBLER; BREA DEL CASTILLO, 2000). No Brasil, entre 1986–1987 surtos da doença foram relatados (FIGUEIREDO; CAVALCANTE; SIMÕES, 1990).



Figura 1. Distribuição global da Dengue (GYAWALI; BRADBURY; TAYLOR-ROBINSON, 2016).

Atualmente a dengue representa um grande problema de saúde pública em mais de 120 países. Estima-se que a cada ano cerca de 390 milhões de pessoas são infectadas e um grande número de pacientes, incluindo crianças, desenvolvem o quadro grave da dengue, precisando de hospitalização (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016). As condições ambientais, o crescimento da população, a urbanização e a globalização, são fatores que aumentam a dispersão da doença, e como não existe tratamento, sua prevenção está concentrada no controle do vetor (ORELLANO et al., 2016).

A origem do vírus dengue, agente etiológico da doença, foi relatada ser africana, com a sua dispersão para outras regiões atribuída ao transporte marítimo. Por outro lado, acredita-se que a sua origem está relacionada a um ciclo silvestre envolvendo primatas inferiores e mosquitos na Península da Malásia (SIRISENA; NOORDEEN, 2014). Seres humanos e macacos posteriormente expostos ao vírus nas florestas serviram como carreadores até as áreas urbanas (GUBLER, 2004).

O vírus dengue é um arbovírus que pertence ao gênero *Flavivirus* e à família *Flaviviridae*. Ele pode ser classificado em quatro sorotipos relacionados, mas antigenicamente distintos (DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4) os quais são os agentes etiológicos da doença. Seu principal vetor e reservatório é o mosquito *Aedes aegypti*, mas o vírus também pode ser

transmitido pelo mosquito *Aedes albopictus* em algumas regiões (CDC, 2014). A partícula viral apresenta a forma icosaédrica, medindo cerca de 40 a 60 nm de diâmetro e é composta por um ácido nucléico e pelas proteínas estruturais (C, prM/M e E) (CABEZAS; GRUPO DE TRABAJO DE DENGUE, 2005) (Figura 2). O genoma viral é composto por uma molécula de RNA fita simples senso positivo com cerca de 11kb, contendo uma única janela aberta de leitura (ORF), e é flanqueado por duas regiões não traduzidas 5' UTR e 3'UTR. A ORF codifica uma única poliproteína, sintetizada a partir do mRNA e clivada por enzimas celulares e virais para dar origem as três proteínas estruturais, que formam o capsídeo viral, e sete proteínas não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, e NS5) (LEITMEYER et al., 1999) (Figura 3). A partícula viral é montada utilizando as proteínas estruturais, e as proteínas não estruturais são usadas nos processos de síntese do RNA genômico viral e na tradução protéica que ocorre durante o ciclo de multiplicação viral (LINDENBACH; RICE, 2003) (Tabela 1).

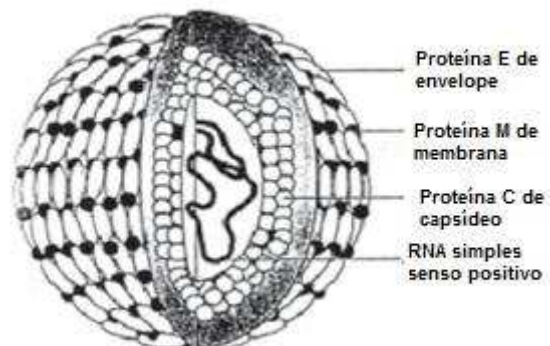


Figura 2. Partícula viral do vírus dengue. A partícula viral apresenta a forma icosaédrica, medindo cerca de 40 a 60 nm de diâmetro e é composta por um ácido nucléico e pelas proteínas estruturais (C, prM/M e E) (CABEZAS; GRUPO DE TRABAJO DE DENGUE, 2005).

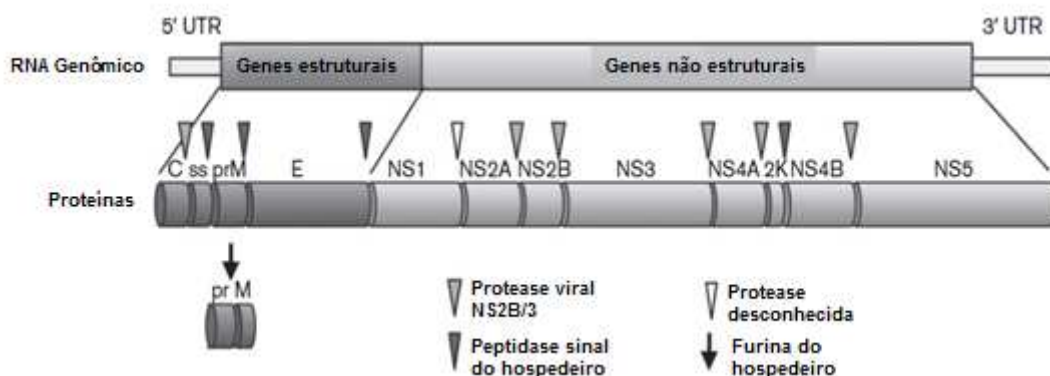


Figura 3. Organização do genoma dos Flavivirus. Genoma viral composto por uma molécula de RNA fita simples sentido positivo, com uma única ORF, flanqueado por duas regiões não traduzidas 5' UTR e 3'UTR. A ORF é traduzida em uma única poliproteína, clivada por enzimas celulares e virais para dar origem as proteínas estruturais e não estruturais (ROBY et al., 2015).

Tabela 1. Proteínas estruturais e não estruturais do vírus dengue (IDRIS; MUHARRAM; DIAH, 2016)

Proteína	Tamanho	Subunidades	Funções
C	100 aminoácidos	-	Facilita a montagem do capsídeo
prM/M	21KDa/8 KDa	-	Interage e estabiliza a proteína E Forma o envelope
E	53 KDa	-	Capacidade de ligação ao receptor
NS1	48 KDa	-	Cliva a junção NS1-NS2A Envolvida nas etapas iniciais da replicação viral
NS2	22 KDa	NS2A, NS2B	NS2A tem papel na síntese do RNA, maturação do virion e como ativador do correto processamento de NS1 NS2B atua como um ativador de NS3, permitindo sua correta função
NS3	618 aminoácidos	-	Atua como protease quando combinada com NS2B Funciona como uma helicase de RNA e RTPase/NTPase
NS4	16 KDa	NS4A, NS4B	Papel no dobramento da membrana e facilita as interações proteína-proteína
NS5	104 KDa	-	Essencial para a replicação e transcrição do genoma viral

A proteína não estrutural 1 (NS1) é uma glicoproteína que possui o peso molecular de 43-48 kDa e pode se apresentar sob diferentes formas: monômeros, dímeros e hexâmeros (AMORIM et al., 2014). Ela é expressa nas células infectadas como monômeros solúveis, e é transportada para o lúmen do retículo endoplasmático por meio de um peptídeo sinal codificado pelos resíduos C terminais do gene da proteína E (FALGOUT; CHANOCK; LAI,

1989). No lúmen do RE ela é clivada, pois possui uma sequência octopeptídica que é conservada entre todos os flavivírus, e por isso é considerada região alvo para terapias antivirais (HORI; LAI, 1990). Ela também sofre N-glicosilações por glicosidades presentes no retículo, as quais adicionam resíduos de carboidratos aos dois sítios de glicosilações, em Asn-130 e Asn-207 (AKEY et al., 2014). A região C terminal de NS1 contém 12 resíduos de cisteína que são altamente conservados e formam pontes dissulfeto, além de estarem envolvidos na formação dos dímeros, estabilizando a proteína, o que confere certo grau de hidrofobicidade (WALLIS et al., 2004). A proteína NS1 pode ancorar-se a lipídeos ou a glicosilfosfatidilinositol (GPI), e ser transportada para membrana ou ao complexo de Golgi para completa maturação e secreção (LINDENBACH; RICE, 1997). No complexo de Golgi, glicosidades e glicosiltransferases removem resíduos de açúcares para formar NS1 hexamérica, a qual é secretada das células infectadas (BROOKS, 2006).

A infecção pelo vírus dengue pode levar ao aparecimento de uma ampla variedade de sintomas, muitos deles comuns a outras doenças (gripe, sarampo, zika, chikungunya, febre amarela etc.) o que torna o diagnóstico clínico muito difícil. Dessa forma, para um diagnóstico eficaz deve-se correlacionar os sintomas clínicos com os resultados laboratoriais (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2009). Diversos métodos laboratoriais podem ser utilizados para realizar o diagnóstico da dengue, como o isolamento viral, a detecção de antígenos virais, testes moleculares e sorológicos (MULLER; DEPELSENAIRE; YOUNG, 2017). A detecção de produtos virais, como a proteína NS1, consiste em uma abordagem muito útil para o diagnóstico de infecção recente pelo DENV, pois ela é secretada pelas células infectadas desde o começo dos sintomas da doença até cerca do 9º dia (ALCON et al., 2002). Em infecções secundárias, sua detecção em altos níveis pode indicar progressão para as formas graves da doença (LIBRATY et al., 2002). Na sorologia, a detecção de anticorpos contra o vírus é realizada empregando-se diversos testes básicos, como por exemplo: teste de inibição da hemaglutinação (IH), teste de fixação do complemento (FC), teste de dot-blot, western blotting, imunofluorescência indireta, teste de neutralização e ELISA de captura de IgM e IgG, o qual tem se tornado o método de rotina nos laboratórios (MULLER; DEPELSENAIRE; YOUNG, 2017). Em infecções primárias, IgM pode aparecer

entre o 3º- 5º dia e permanecer detectável por várias semanas ou meses. O anticorpo IgG geralmente não está presente na fase aguda da infecção primária, mas seus níveis altos são vistos em infecções secundárias, provavelmente devido a uma resposta a epítomos compartilhados entre o vírus que infectou inicialmente e o responsável pela infecção secundária. Dessa forma, a detecção desses anticorpos pode ser utilizada para identificar o tipo de infecção a qual o paciente se encontra, ou seja, se é uma infecção primária ou secundária por outro sorotipo viral diferente (Figura 4) (DE PAULA; FONSECA, 2004).

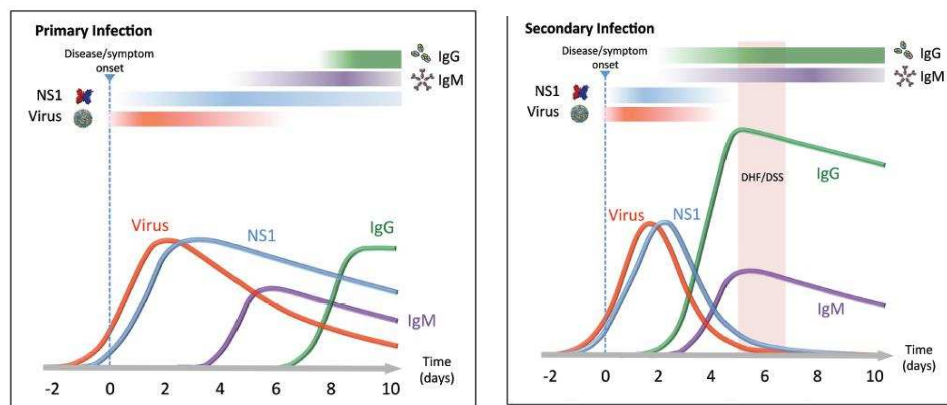


Figura 4. Biomarcadores presentes em infecções primárias e secundárias pelo vírus dengue. Em infecções primárias, a proteína NS1 está presente desde o início dos sintomas, enquanto que a sua presença em infecções secundárias pode sugerir progressão para as formas graves. IgM aparece ao redor do 3º dia em infecções primárias, enquanto que IgG geralmente é detectado em altos níveis a partir do 3º dia em infecções secundárias (MULLER; DEPELSENAIRE; YOUNG, 2017).

*Pichia pastoris* é uma levedura muito utilizada para a produção de proteínas recombinantes, pois ela cresce em altas densidades celulares, são facilmente cultivadas e manipuladas geneticamente, e apresentam um sistema de secreção muito eficiente (BALAMURUGAN et al., 2010). Elas são leveduras metilotróficas, ou seja, apresentam a capacidade de metabolizar o metanol como fonte de carbono, pois possuem dois genes, AOX1 e AOX2, os quais codificam enzimas com função de álcool oxidase. Devido a essa capacidade de utilizar o metanol como fonte de carbono, três fenótipos dessa levedura são

possíveis: Mut<sup>+</sup> (alta utilização de metanol), Mut<sup>S</sup> (baixa utilização de metanol) e Mut<sup>-</sup> (utilização de metanol deletada) (FABER et al., 1995). As leveduras Mut<sup>+</sup> possuem os dois genes AOX funcionais, e podem atingir altas taxas de crescimento utilizando o metanol, enquanto que as Mut<sup>S</sup> apresentam apenas o gene AOX2, resultando em uma utilização do metanol mais reduzida, e as Mut<sup>-</sup> não são capazes de utilizar o metanol (KIM et al., 2009). As cepas Mut<sup>S</sup>, como a KM71H utilizada nesse trabalho, são de maior interesse para a indústria, pois apresentam diversas vantagens em relação as outras, como por exemplo: o baixo requerimento do metanol para o seu crescimento, reduz os riscos de manejo durante o processo; elas secretam baixos níveis de proteínas nativas, o que auxilia na purificação da proteína de interesse; apresentam níveis maiores de expressão de proteínas recombinantes (KRAINER et al., 2012).

Quando comparado a outros sistemas de expressão, como *Escherichia coli* e *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris* tem demonstrado ser mais eficiente para a produção de proteínas recombinantes em larga escala (PYATI; FITCHES; GATEHOUSE, 2014). *E. coli* é um microrganismo procariótico, dessa forma, não apresenta a maquinaria necessária para realizar modificações pós-traducionais típicas de eucariotos, e não são capazes de realizar o dobramento protéico adequado, sendo um sistema inviável para a expressão de proteínas recombinantes eucarióticas (MARSTON, 1986). *S. cerevisiae* é um sistema eucariótico para expressão de proteínas que apresenta um rendimento menor quando comparado a *P. pastoris*, devido ao fato de que muitas proteínas secretadas por ela não são encontradas livres no meio, e sim no espaço periplasmático, dificultando a purificação. Além disso, as proteínas secretadas por *S. cerevisiae* podem ser hiperglicosiladas, resultando na alteração de diversas características dessas proteínas, como a imunogenicidade, atividade e sua retenção no soro (BUCKHOLZ; GLEESON, 1991). *Pichia pastoris* possui a capacidade de secretar a proteína para o meio na forma solúvel, e também secreta níveis baixos de proteínas nativas, facilitando o isolamento e purificação da proteína recombinante, além de utilizar o promotor forte AOX1 o que permite a obtenção de níveis mais altos de proteína (SPOHNER et al., 2015).

Para a expressão utilizando o sistema eucarioto *Pichia pastoris*, vetores carreando o gene da proteína de interesse são utilizados para transformar

essas leveduras, os quais integram-se no seu genoma com o objetivo de produzir clones com alta capacidade de expressão protéica. O melhor clone, ou seja, aquele que possui o maior número de cópias do gene em seu genoma pode ser determinado através da seleção dos transformantes obtidos, utilizando meio com diferentes concentrações de antibiótico apropriado ou por meio de PCR em tempo real (BYRNE, 2015).

### 3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Clonar o gene da proteína NS1 do vírus dengue-4 no vetor de expressão pPICZ $\alpha$ A;
- Expressar individualmente as proteínas recombinantes NS1 dos vírus dengue-1, dengue-3 e dengue-4 em leveduras *Pichia pastoris* KM71H;
- Analisar as proteínas obtidas por SDS-PAGE e Western Blot.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Obtenção do gene otimizado da proteína NS1 do vírus dengue-4

O gene da proteína NS1 do vírus dengue-4 foi sintetizado e clonado pela empresa GenScript no vetor de clonagem pUC57, originando o plasmídeo pUC57/NS1DENV4 (Figura 5). Esse gene foi sintetizado com sua sequência otimizada segundo os códons preferenciais para expressão em leveduras, com o objetivo de aumentar sua expressão e conseqüentemente a síntese protéica.

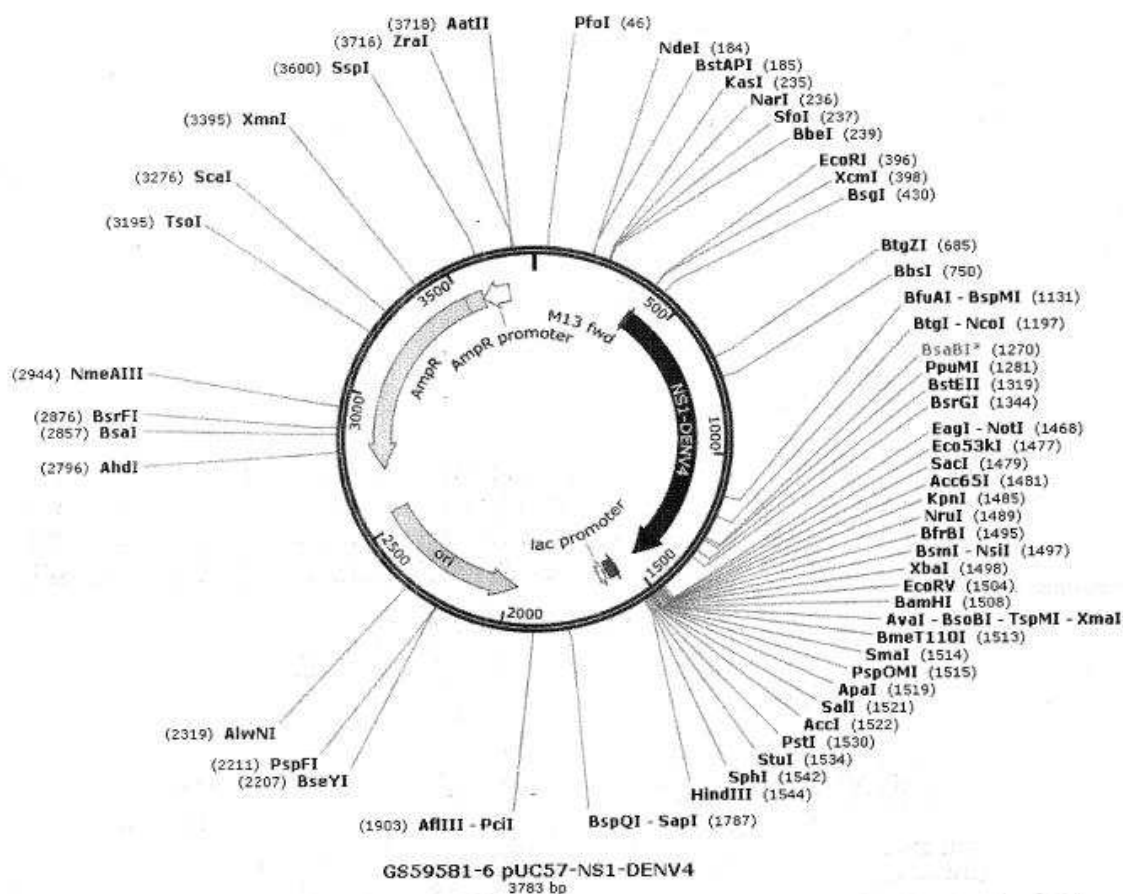


Figura 5. Vetor de clonagem PUC57/NS1DENV4 (GenScript)

### 4.2 Preparo de *E. coli* TOP10F competente

Células de *E. coli* TOP10F foram preparadas para serem transformadas por choque térmico, por meio da indução de competência com cloreto de cálcio. Inicialmente, realizou-se um pré-inóculo da bactéria em 5 mL de meio LB líquido (10 g/L de triptona, 5 g/L de extrato de levedura e 10 g/L de NaCl,

pH 7,0) e incubou-se a 37° C, por 12 horas sob agitação de 250 rpm. Após o período de incubação, transferiu-se o pré-inóculo para 250 mL de meio LB líquido e realizou-se uma nova incubação, também a 37° C, 250 rpm, até atingir a densidade ótica de 0,4/0,5, na absorvância de 600 nm (A600). Posteriormente, realizou-se uma centrifugação da cultura em tubos falcons estéreis, a 4.500 x g por 10 minutos, a 4° C e o precipitado obtido foi suspenso em 15 mL de CaCl<sub>2</sub> (50 mM) gelado. Incubou-se a solução no gelo por 10 minutos e realizou-se uma nova centrifugação a 4.500 x g, 10 minutos, a 4°C. O precipitado foi suspenso em 2,85 mL de CaCl<sub>2</sub> (50 mM) gelado, e adicionou-se 150 µL de glicerol puro estéril. Por fim, 200 µL da solução foram aliqotados em tubos, colocados no nitrogênio líquido e estocados a -80 ° C.

#### **4.3 Transformação da bactéria *E. coli* TOP10F com o plasmídeo pUC57/NS1DENV4**

As células de *E. coli* TOP 10F competentes foram transformadas por choque térmico com o plasmídeo pUC57/NS1DENV4, com o objetivo de aumentar o número de cópias dos plasmídeos recombinantes e formar um estoque dos mesmos. Para tanto, adicionou-se 2 µL da solução de plasmídeo recombinante ao tubo contendo 200 µL das bactérias *E. coli* TOP10F competentes, e incubou-se por 30 minutos no gelo. Posteriormente, incubou-se a mistura a 42° C por 1 minuto, e após esse tempo, transferiu-se para o gelo, e deixou-se por 15 minutos, obtendo o choque térmico. Em seguida, foi adicionado 110 µL de meio SOC (20 g/L de bacto triptose, 5 g/L de extrato de levedura e 0,5 g/L de NaCl e 20mM de glicose) e incubou-se a 37° C por 30 minutos, sob agitação de 150 rpm. Finalmente, realizou-se o plaqueamento das bactérias transformadas em meio LB sólido contendo o antibiótico ampicilina (100 µg/mL), para permitir a seleção dos transformantes, e incubou-se a 37°C até o aparecimento das colônias. As colônias que cresceram foram transferidas, uma a uma, para 5 mL de meio LB líquido com ampicilina (100 µg/mL), incubou-se cerca de 12 horas, a 37° C, sob agitação de 180 rpm, e realizou-se um estoque das bactérias obtidas a -80 ° C com 50% de glicerol.

#### **4.4 Extração de DNA plasmidial (Miniprep)**

As bactérias *E. coli* TOP10F transformadas com o plasmídeo pUC57/NS1 DENV4 foram submetidas a uma extração de DNA plasmidial, pelo método de lise alcalina. Para isso, inoculou-se 100 µL das bactérias em 10 mL de meio LB líquido com ampicilina (100 µg/mL), e incubou-se a 37° C, por 18 horas, sob agitação de 180 rpm. Realizou-se uma centrifugação da cultura a 10.000 x g por 2 minutos, e o sobrenadante foi descartado. Logo após, o sedimento obtido foi suspenso em 200 µL de tampão TE (Tris-HCL 10 mM, EDTA 1 mM), e adicionou-se 360 µL de solução alcalina fresca (NaOH 0,2 M, SDS 1%). Incubou-se a mistura por 5 minutos a temperatura ambiente, e em seguida, adicionou-se 300 µL de solução de Acetato de potássio e Ácido acético glacial (Acetato de potássio 5 M, Ácido acético glacial 100%). Centrifugou-se a 10.000 x g por 5 minutos, e transferiu-se o sobrenadante para um novo tubo. Adicionou-se 750 µL de isopropanol e realizou-se uma nova centrifugação a 10.000 x g por 5 minutos. O sobrenadante obtido foi descartado, e o precipitado suspenso em 200 µL de tampão TE + RNase (100 µg/mL). Incubou-se por 30 minutos a 37° C, e após, foi adicionado 110 µL de acetato de amônia 7,5 M, misturou-se vigorosamente. Centrifugou-se a 10.000 x g por 10 minutos, e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo. Adicionou-se 750 µL de etanol 100%, e centrifugou-se a 10.00 x g por 5 minutos. Descartou-se o sobrenadante, e o precipitado obtido foi lavado com etanol 70%. Por fim, realizou-se uma centrifugação final a 10.00 x g, por 2 minutos, descartou-se o sobrenadante, e o precipitado foi seco e suspenso em 30 µL de água pura estéril.

#### **4.5 Clonagem do gene da proteína NS1 do DENV-4 no vetor de expressão pPICZαA**

Para a transferência das regiões codificadoras da proteína NS1 para o vetor de expressão pPICZαA (Figura 6), o plasmídeo pUC57/NS1DENV4 foi clivado pelas enzimas de restrição *EcoRI* e *NotI* (Promega) conforme as instruções do fabricante. O fragmento contendo a região de interesse foi purificado utilizando-se o kit QIAquick Gel Extraction (Qiagen) e clonado no vetor de expressão pPICZαA previamente linearizado também com as enzimas

*EcoRI* e *NotI* (Promega). A reação de ligação entre o inserto e o vetor foi realizada pela enzima T4 ligase (Sigma), e o produto da ligação utilizado para transformar bactérias *E. coli* TOP10F competentes, por choque térmico. Após a transformação, as bactérias foram plaqueadas pela técnica de "spread plate" em meio LB com baixa concentração de sal (0,5 % NaCl) contendo 25 µg/mL do antibiótico Zeocin, e incubadas a 37° C por cerca de 18 horas. Para a confirmação da ligação entre o inserto e o vetor, foi realizado um PCR de colônia, seguido de uma extração de DNA plasmidial e uma reação de digestão dupla com as enzimas de restrição *EcoRI* e *NotI* (Promega).

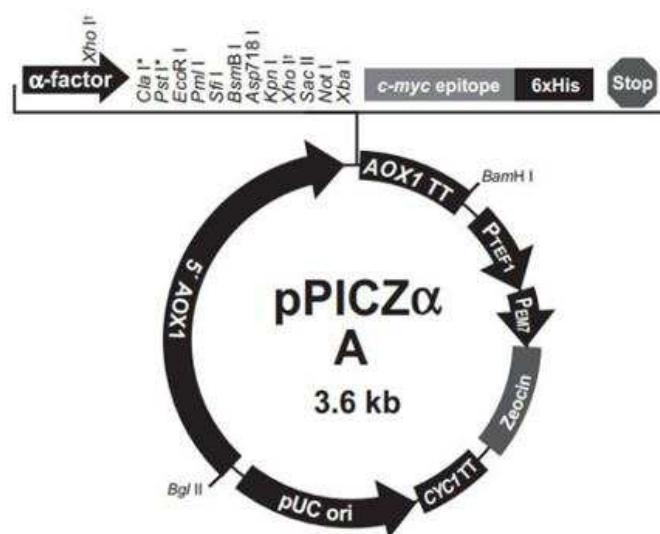


Figura 6. Mapa do vetor de expressão pPICZαA (Invitrogen,EUA)

#### 4.6 PCR de colônia

As colônias das bactérias transformadas que cresceram no meio LB sólido foram transferidas, uma a uma, para 5 mL de meio LB líquido com Zeocin (25 µg/mL), e incubadas a 37° C, por cerca de 12 h , sob agitação de 180 rpm. Para a reação de PCR, utilizou-se 3 µL da cultura, 0,4 mM de cada primer (sense e antisense) para a região AOX1 do plasmídeo pPICZαA (Invitrogen), tampão da enzima 1X , 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de dNTPs, e 2,5 unidades de Taq DNA polimerase (Promega). Em seguida, realizou-se um ciclo de aquecimento inicial a 94° C, seguido de 25 ciclos a 94 ° C para desnaturação da fita de DNA, 55° C para o anelamento dos primers, 72°C para

a extensão da fita, e um ciclo final de 7 minutos também a 72°C.

#### **4.7 Transformação de leveduras *Pichia pastoris* KM71H**

O vetor de expressão pPICZ $\alpha$ A clonado com o gene NS1DENV4, foi submetido a uma reação de restrição com a enzima *Sac I* (Promega), precipitado com NaCl 5 M, e utilizado para transformar leveduras *Pichia pastoris* KM71H pelo método de eletroporação, seguindo os parâmetros descritos para *Saccharomyces cerevisiae* (2500V, 25  $\mu$ F, 200  $\Omega$ ).

##### **4.7.1 Preparo de *Pichia pastrois* para tranformação**

Cultivou-se 100  $\mu$ L das leveduras em 5 mL de meio YPD (1% de extrato de levedura, 2% de peptona e 2% de glicose), por 24 horas, a 30°C, sob agitação de 200 rpm. Posteriormente, transferiu-se 500  $\mu$ L do pré-inóculo para 500 mL de meio YPD, e incubou-se novamente a 30° C, por cerca de 19 horas (DO 1,3-1,5). Quando a DO apropriada foi atingida, centrifugou-se a cultura a 1500 x g, 4° C, por 5 minutos. Descartou-se o sobrenadante, e as células obtidas foram suspensas em 300 mL de água gelada estéril, e novamente submetidas a centrifugação. Descartou-se o sobrenadante e as células foram suspensas em 150 mL de água estéril gelada. Realizou-se uma nova centrifugação nas mesmas condições anteriores, descartou-se o sobrenadante, e as células foram suspensas em 12 mL de água com Sorbitol 1 M gelada. Por fim, realizou-se uma nova centrifugação das células a 1500 x g , 4°C, por 5 minutos. Descartou-se o sobrenadante, e as células foram suspensas em 700  $\mu$ L de água com Sorbitol 1 M, e mantidas no gelo.

##### **4.7.2 Transformação por eletroporação**

Para a transformação, 80  $\mu$ L das células de *Pichia pastoris* KM71H eletrocompetentes foram misturadas com cerca de 10  $\mu$ g do plasmídeo pPICZ $\alpha$ A/NS1DENV4 linearizado. Transferiu-se a mistura para a cubeta de eletroporação e incubou-se no gelo por 5 minutos. Em seguida, as células foram pulsadas seguindo os parâmetros descritos para *Saccharomyces*

*cerevisiae*. Imediatamente, adicionou-se 1 de água com Sorbitol 1 M na cubeta, homogeneizou-se gentilmente, e transferiu-se todo o volume para um novo tubo. Incubou-se a 30° C, por 2 horas, sem agitação. As leveduras foram plaqueadas em meio YPDS sólido (1% de extrato de levedura, 2% de peptona, 2% de glicose, sorbitol 1 M, 2% de ágar) contendo o antibiótico Zeocin (100 µg/mL). Após cerca de 5 dias, as colônias obtidas foram transferidas, uma a uma, para o meio YPD líquido com 50 % de glicerol e estocadas a -80° C.

#### **4.8 Extração do DNA genômico das leveduras *Pichia pastoris* transformadas**

Um dos clones das leveduras transformadas estocado foi cultivado em meio YPD, com o objetivo de extrair o DNA genômico, o qual posteriormente foi submetido à reação de PCR para a confirmação da transformação da levedura com o plasmídeo pPICZαA/NS1DENV4. Para a extração do DNA genômico, cultivou-se 100 µL de *Pichia pastoris* transformada em 5 mL de meio YPD líquido, por 24 horas, 30° C sob agitação de 200 rpm. Após esse período, realizou-se uma centrifugação da cultura por 5 minutos, a 12.000 rpm. Descartou-se o sobrenadante e as células obtidas foram suspensas em 400 µL de tampão de extração (Triton 100 X, SDS 10%, NaCl 1 M, Tris-HCl 1 M pH 8,0, EDTA 0,5 M pH 8,0) mais 0,3 g de “beads”. Agitou-se vigorosamente por 2 minutos para romper as células, e centrifugou-se por 10 minutos, 12.000 rpm. Em seguida, transferiu-se o sobrenadante para um novo tubo, e adicionou-se 200 µL de fenol-clorofórmio (100 µL de fenol, 96 µL de clorofórmio e 4 µL de álcool isopropílico). Centrifugou-se por 10 minutos, 12.000 rpm. Coletou-se a fase superior, e transferiu-se para um novo tubo. Realizou-se uma precipitação com 1/10 volume de acetato de potássio 5 M e 2 volumes de etanol gelado. Deixou-se a temperatura ambiente por 2 minutos. Logo após, centrifugou-se por 5 minutos a 12.000 rpm, descartou-se o sobrenadante, e lavou-se as células com etanol 70%. Finalmente, centrifugou-se por 5 minutos a 12.000 rpm, descartou-se o sobrenadante e deixou-se o DNA secar. O DNA foi então suspenso em 20 µL de tampão TE mais RNase, e incubou-se por 30 minutos a 37° C.

#### **4.9 PCR do DNA genômico das leveduras *Pichia pastoris* KM71H transformadas**

O DNA genômico das leveduras *Pichia pastoris* KM71H transformadas foi submetido a uma reação de PCR, utilizando-se oligonucleotídeos específicos para a região de AOX1 do plasmídeo pPICZ $\alpha$ /NS1DENV4. A reação foi realizada nas mesmas condições descritas em 4.6, com exceção da quantidade de DNA utilizada, que aqui foi cerca de 1  $\mu$ g .

#### **4.10 Indução da expressão da proteína NS1 do DENV-4.**

Após a confirmação da transformação das leveduras *Pichia pastoris* KM71H, um clone positivo foi submetido ao experimento de indução para expressar a proteína NS1. Realizou-se um pré-inóculo de 50  $\mu$ L das leveduras em 5 mL de meio BMGY (1% de extrato de levedura, 2% de peptona, 1.34% de YNB, 4 x 10<sup>-5</sup> % de biotina, 100 mM de fosfato de potássio pH 6 e 1% de glicerol) e incubou-se a 30° C, por 24 horas, sob agitação de 200 rpm. Após esse período, transferiu-se o pré-inóculo para 250 mL de meio BMGY e realizou-se uma nova incubação a 30° C, 200 rpm, por 72 horas. Centrifugou-se a cultura a 3.000 x g por 5 minutos, 22° C, descartou-se o sobrenadante e as células foram suspensas em 150 mL de meio BMMY (1% de extrato de levedura, 2% de peptona, 1.34% de YNB, 4 x 10<sup>-5</sup> % de biotina, 100 mM de fosfato de potássio pH 6 e 0,5 % de metanol). Em seguida, incubou-se a 30° C, 200 rpm, por 24 horas, e logo após, iniciou-se a adição de metanol 0,5 % a cada 12 horas por 3 dias. Centrifugou-se as células a 3.000 x g por 10 minutos, e transferiu-se o sobrenadante para um erlenmyer. O sobrenadante da cultura foi então diluído com volume igual de tampão de ligação (Fosfato de sódio 20 mM, NaCl 500 mM) pH 7,4, e clarificado sob filtração a vácuo em membrana de 0,45  $\mu$ m.

#### **4.11 Purificação das proteínas obtidas por cromatografia de afinidade**

A purificação das proteínas foi realizada por cromatografia de afinidade utilizando coluna His Trap FF de 1 mL acoplada ao sistema de purificação AKTA Prime Plus. Primeiramente, a coluna foi equilibrada com cerca de 7 mL

de tampão de ligação, e posteriormente, a amostra foi submetida a purificação. Um volume do tampão de ligação correspondente a 7 vezes o volume da coluna foi passado através da mesma com o objetivo de remover proteínas que interagiram de maneira não específica com a coluna. As proteínas ligadas especificamente na coluna foram coletadas por meio da aplicação de tampão de eluição (20 mM de fosfato de sódio, 500 mM de NaCl e 300 mM de imidazol), e as frações que apresentaram valores maiores de absorvância a 280 nm, foram precipitadas com TCA (Ácido tricloroacético) 10%, suspensas em Tris-HCL 1,5 M pH 8,8, e armazenadas a -80 ° C até a realização dos testes.

#### **4.12 Análises das proteínas NS1 purificadas por SDS-PAGE e Western Blot**

As proteínas NS1 purificadas do vírus DENV-4 foram avaliadas inicialmente por SDS-PAGE 12%. Posteriormente, elas foram submetidas ao teste de Western Blot para confirmação. Para esse teste, as proteínas foram separadas eletroforicamente e transferidas para a membrana de nitrocelulose. Foi realizado um bloqueio da membrana com gelatina 1% por 30 minutos a temperatura ambiente. Logo após, realizou-se lavagens com tampão PBS-Tween 20 0,5%, e as proteínas adsorvidas a membrana foram incubadas overnight com soros de pacientes positivos para dengue, obtidos das unidades básicas de saúde da rede pública ambulatorial de Ribeirão Preto, durante a epidemia de 2001. Realizou-se lavagens com tampão PBST, e foi feita uma nova incubação de 2 horas com anticorpo secundário anti-IgM Humano (Sigma) diluído 1:30000. Esse anticorpo secundário é conjugado com a enzima fosfatase alcalina, a qual possui o p-Nitrophenyl Phosphate (pNPP)( Sigma) como substrato, adicionado para revelar a reação.

#### **4.13 Indução da expressão das proteínas NS1 dos vírus dengue- 1 e -3**

Leveduras *Pichia pastoris* KM71H transformadas com os genes das proteínas NS1 dos vírus dengue-1 e dengue-3, estocadas a -80 °C no Laboratório de Imunovirologia Molecular da UFV, foram cultivadas em meio

YPD e submetidas a extração de DNA genômico. É importante salientar que essas leveduras foram transformadas com dois plasmídeos recombinantes diferentes, o pPICZ $\alpha$ /NS1DENV1 e pPICZ $\alpha$ /NS1DENV3, ambos clonados com os genes das proteínas NS1 do DENV-1 e DENV-3, respectivamente. A extração do DNA genômico foi realizada como descrito em **4.8**, e o PCR para confirmação da transformação como descrito em **4.9**.

Após a confirmação da transformação das leveduras por PCR, escolheu-se dois clones positivos, um referente a *Pichia pastoris* transformada com pPICZ $\alpha$ /NS1DENV1 e o outro a *Pichia pastoris* transformada com pPICZ $\alpha$ /NS1DENV3, e posteriormente foram submetidos ao experimento de indução da expressão das proteínas NS1 da mesma forma que foi realizado para a expressão de NS1 de DENV-4( Descrito em **4.10**). As proteínas obtidas foram purificadas (como em **4.11**) e analisadas por SDS-PAGE e Wester blot como descrito em **4.12**.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Síntese do gene da proteína NS1 do vírus dengue-4

Com o objetivo de aumentar os níveis de expressão da proteína NS1 do vírus dengue-4, foi realizada uma otimização do gene responsável pela codificação dessa proteína, utilizando os códons preferenciais de leveduras. A sequência obtida é apresentada na figura 7. O gene otimizado foi adquirido junto à empresa GenScript, clonado no vetor de clonagem pUC57.

```
>NS1-DENV4 Optimized for yeast expression
GAATTCATGGGCTGTGCAGTGTCTTGGTCTGGTAAGGAGTTGAAATGTGGAAGTGGAAATCTTCGTGATTG
ATAATGTTCATAACATGGACAGAGCAGTATAAGTTCCAACCAGAATCTCCTGCTAGATTGGCTTCCGCTAT
CTTGAACGCACATGAAGATGGCGTTTGTGGTATCAGGTCAACTACTAGATTAGAGAACATCATGTGGAAG
CAGATTACCAATGAGTTAACTATGTATTGTGGGAAGGTGGTCACGATTTGACTGTAGTTGCTGGCGATG
TCAAAGGTGTCTTGTCCAAAGGTAAGAGAGCTTTAGCTCCACCTGTCAATGACTTGAAGTATTCTTGGAA
GACATGGGGAAAGGCCAAGATATTCCTCCAGAGGCCAAGAAGTCAACATTCTTAATCGACGGACCTGAT
ACCAGTGAATGTCCTAATGAACGTAGAGCATGGAACCTCTTGGAAAGTGGAAAGATTATGGCTTTGGAATGT
TTACAACAAACATCTGGATGAAGTTTCGTGAAGGTTCCAGTGAAGTTTGGCGATCATAGATTGATGTCTGC
TGCCATCAAAGACCAGAAAGCTGTTTCATGCAGATATGGCTATTGGATTGAGAGTCAAAGAATCAAAC
TGGCAGATAGAGAAAGCCTCTTTGATCGAAGTTAAGACATGCTTATGGCCAAAGACACATACATTGTGGA
GTAACGGAGTGTAGAGTCCCAAATGTTGATTCCCTAAAGCCTACGCAGGTCCATTCTCACAGCACAAC
CAGACAAGGTTACGCAACTCAAACCGTTGGTCCATGGCATTGGGTAAGTTAGAAATTGATTTCCGGTGAA
TGTCCAGGTACAACCTGTTACAATCCAAGAAGATTGCGATCACAGAGGTCCTTCTTTGAGAACTACTACTG
CAAGTGGCAAGTTGGTCACCCAATGGTGTGTCGTTCCGTGACAATGCCACCTTTGAGATTCTTAGGTGA
AGATGGCTGTTGGTACGGCATGGAAATTCGTCCATTGTCAGAGAAAGAAGAGAACATGGTGAATCTCAA
GTTAGTGCTGGCCAAGGTACAGCGGCCGC
```

Figura 7. Sequência gênica otimizada da proteína NS1 do vírus dengue-4 (GenScript).

### 5.2 Ligação do gene da proteína NS1 do vírus dengue-4 no vetor de expressão pPICZαA .

O produto da reação de digestão do PUC57/NS1DENV4 pelas enzimas *EcoRI* e *NotI*, foi analisado em gel de agarose na concentração de 1% e a banda de interesse contendo o fragmento de DNA referente ao gene NS1 de DENV-4, foi observada na altura de cerca de 1000 pb. Também observa-se uma banda na altura de cerca de 3000 pb, coerente com o tamanho do vetor de clonagem PUC57 (Figura 8).

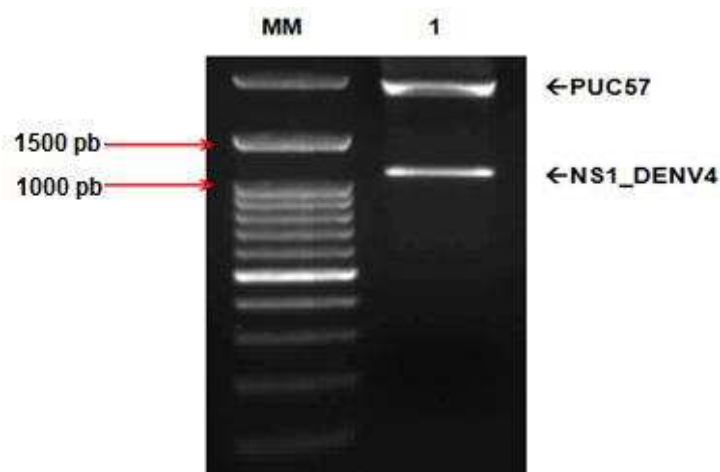


Figura 8. Produto da digestão do PUC57/NS1DENV4, em gel de agarose 1%. MM- Marcador de peso molecular de 100 bp (KASVI); 1-Plasmídeo PUC57/NS1DENV4 digerido com *EcoRI* e *NotI*.

O vetor de expressão pPICZ $\alpha$ A também foi submetido a uma reação de linearização com as enzimas de restrição *EcoRI* e *NotI*, podendo-se observar no gel de agarose um fragmento maior que 3000 pb, tamanho esperado para esse vetor, que possui 3600 pb (Figura 9).

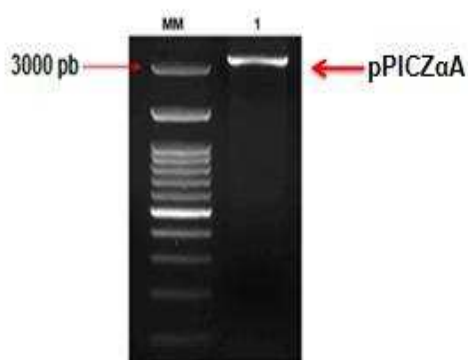


Figura 9. Produto da digestão do plasmídeo pPICZ $\alpha$ A (Ivitrogen) com *EcoRI* e *NotI*. MM- Marcador de peso molecular de 100 bp (KASVI); 1- Plasmídeo pPICZ $\alpha$ A digerido.

O produto da reação de ligação entre o inserto NS1 de DENV-4 e o vetor pPICZ $\alpha$ A foi inserido em *E.coli* TOP10F, e a transformação confirmada pela amplificação do gene AOX1, como ficou evidenciado na figura 10. Podemos observar bandas na altura de cerca de 1500 pb (Amostras 1-8), resultado compatível com o controle positivo (Amostra 9), e contrastante com o controle negativo utilizado (Amostra 10).

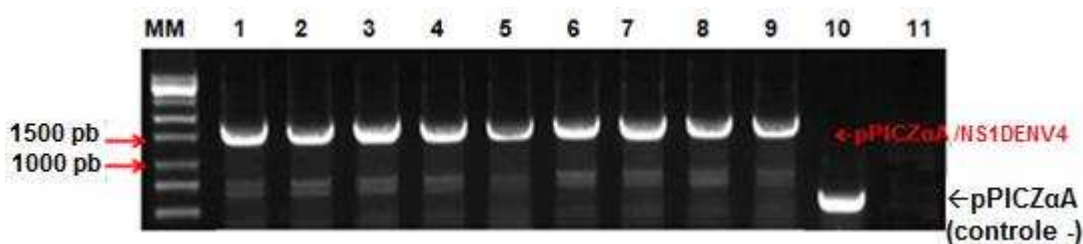


Figura 10. PCR de colônia de bactérias *E.coli* TOP10F transformadas com o pPICZ $\alpha$ A/NS1DENV4. MM- Marcador de peso molecular de 1 kb (Ludwing Biotec); 1-8- Fragmentos de DNA amplificados das bactérias *E. coli* transformadas; 9- Plasmídeo pPICZ $\alpha$ A clonado com o gene NS1 de dengue-1, utilizado como controle positivo; 10- pPICZ $\alpha$ A não clonado; 11- controle negativo com H<sub>2</sub>O.

O DNA obtido das colônias confirmadas por PCR, digerido com as enzimas *EcoRI* e *NotI*, foi identificado no gel de agarose 1% como duas bandas em alturas distintas, uma superior, de mais de 3600 pb referente ao plasmídeo pPICZ $\alpha$ A, e outra mais inferior, cerca de 1000 pb, coerente com o tamanho do gene da proteína NS1 de DENV-4 (Figura 11). Diante desses resultados, a confirmação da ligação entre inserto e vetor foi realizada com sucesso.

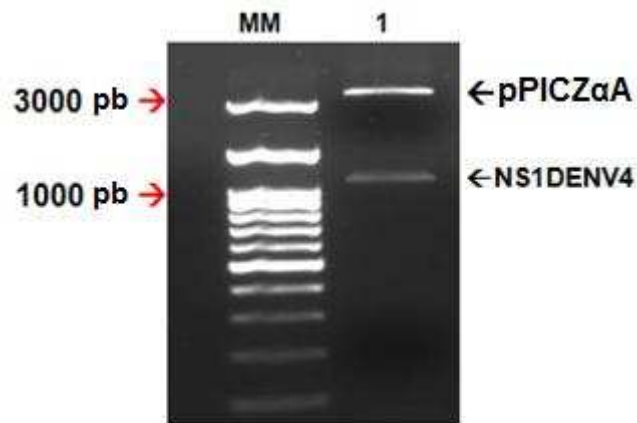


Figura 11. Produto da reação de digestão do plasmídeo pPICZ $\alpha$ A/NS1DENV4 com *Eco*RI e *Not*I. MM- Marcador de peso molecular de 100 bp (KASVI); 1- pPICZ $\alpha$ A/NS1DENV4 digerido.

### 5.3 Confirmação da transformação de leveduras *Pichia pastoris* KM71H com o plasmídeo pPICZ $\alpha$ A/NS1DENV4

A transformação das leveduras *Pichia pastoris* foi confirmada por meio de PCR, utilizando oligonucleotídeos para a região de AOX1 do pPICZ $\alpha$ A/NS1DENV4. O produto da reação de PCR foi visualizado em gel de agarose 1%, o qual apresentou resultados coerentes com o controle positivo (plasmídeo pPICZ $\alpha$ A clonado com o gene de NS1 de DENV1)(Figura 12). A amostra 1, é referente ao DNA genômico das leveduras transformadas com o plasmídeo pPICZ $\alpha$ A/NS1DENV4, e as bandas apresentadas estão em torno de 1500 pb. O controle positivo (amostra 2) também apresentou uma banda na mesma altura da amostra da levedura, enquanto que o controle negativo (amostra 3) apresentou uma banda de cerca de 500 pb.

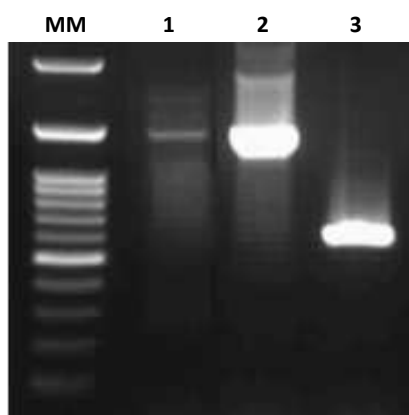


Figura 12. Produto da reação de PCR do DNA genômico das leveduras *Pichia pastoris* transformadas com o vetor de expressão pPICZ $\alpha$ A/NS1DENV4. MM- Marcador de peso molecular de 100 bp(KASVI); 1-DNA de *Pichia pastoris* transformada; 2- pPICZ $\alpha$ A clonado com o gene da NS1 de DENV1 utilizado como controle positivo; 3- pPICZ $\alpha$ A não clonado utilizado como controle negativo.

#### 5.4 Expressão da proteína NS1 de DENV4

A proteína NS1 purificada do vírus dengue-4, foi observada no gel SDS-PAGE 12 % como uma banda na altura de cerca de 60 kDa (Figura 13). Através do teste de Western Blot foi possível confirmar que essa banda de 60 kDa, realmente corresponde a proteína NS1. A altura da banda observada representa a forma monomérica da proteína, obtida quando a mesma foi submetida ao aquecimento a 100° C na presença de Ditioneitol (DTT), um agente redutor que desfaz as pontes dissulfetos da proteína. Esse aquecimento rompe as interações hidrofóbicas nas proteínas, responsáveis pela manutenção da forma hexamérica, o que resulta na conversão para a forma monomérica observada (Figura 14). Esse resultado é coerente com os encontrados por FALCONAR e ROMERO-VIVAS (FALCONAR; ROMERO-VIVAS, 2013). Eles realizaram o ensaio de Western Blot para detecção de NS1 de todos os sorotipos dos vírus dengue, e obtiveram quase todas as proteínas na forma monomérica, devido ao tratamento a 100° C durante 1 minuto.

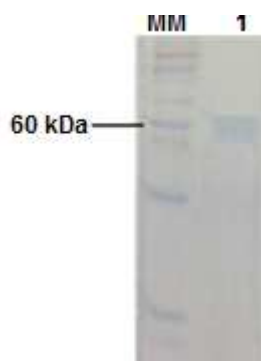


Figura 13. Proteína NS1 de DENV4 em gel de SDS-PAGE 12%. MM- Marcador de peso molecular; 1- Proteína NS1 de DENV4.



Figura 14. Western Blot para NS1 de DENV4. MM- Marcador de peso molecular; 1 e 2- Proteína NS1 de DENV4.

### 5.5 Confirmação da transformação de leveduras *Pichia pastoris* KM71H com os plasmídeos pPICZαA/NS1DENV1 e pPICZαA/NS1DENV3

A confirmação da transformação das leveduras foi realizada pela reação de PCR, utilizando-se primers específicos para a região de AOX1 dos plasmídeos recombinantes. Como apresentado na figura 15, nas amostras 1 e 2, referentes ao DNA genômico das leveduras transformadas, é possível observar as bandas obtidas na altura de cerca de 1500 pb, resultado compatível com o controle positivo ( amostra 3).

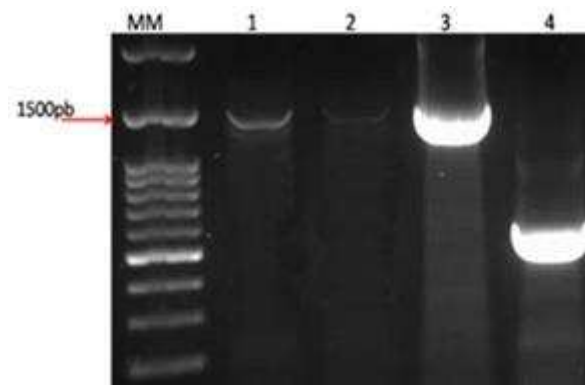


Figura 15. PCR do DNA genômico de *Pichia pastoris* transformada. MM- Marcador de peso molecular; 1- DNA de *Pichia pastoris* transformada com pPICZ $\alpha$ A/NS1DENV1; 2- DNA de *Pichia pastoris* transformada com pPICZ $\alpha$ A/NS1DENV3; 3- Plasmídeo pPICZ $\alpha$ A/NS1DENV1 utilizado como controle positivo; pPICZ $\alpha$ A não clonado( controle -).

### 5.6 Expressão das proteínas NS1 dos vírus DENV-1 e DENV-3

Finalmente, as proteínas NS1 dos vírus dengue-1 e dengue-3, também foram analisadas por SDS-PAGE e Western Blot. O SDS-PAGE mostrou a presença de duas bandas de cerca de 50 kDa (Figura 16), as quais foram detectadas por Western Blot na mesma altura ( Figura 17)

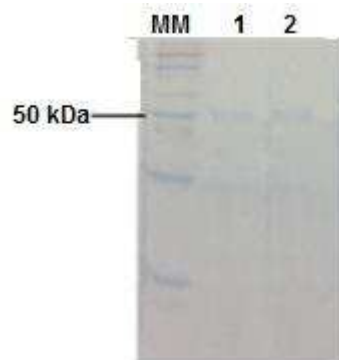


Figura 16. SDS-PAGE 12 % para NS1 do vírus dengue-1 e dengue-3. MM- Marcador de peso molecular; 1- Proteína NS1 de DENV1.



Figura 17. Western Blot para NS1 de DENV1 e DENV3. A) MM- Marcador de peso molecular; 1- Proteína NS1 de DENV1; 2- Sobrenadante purificado da cultura de *Pichia pastoris* não transformada (controle -). B) MM- Marcador de peso molecular; 1- Proteína NS1 de DENV3.

A proteína NS1 do DENV é um biomarcador específico e altamente conservado, muito útil para o diagnóstico inicial da Dengue, marcando o período de viremia. Ela é secretada das células infectadas e pode ser detectada desde o começo dos sintomas da doença, ou seja, do 1º dia até 18 dias após o início da febre, com sensibilidade alta nos primeiros 3 dias. Esse diagnóstico inicial é muito importante, pois auxilia no tratamento adequado do paciente (BUONORA et al., 2017; MULLER; YOUNG, 2013). O desenvolvimento de kits diagnósticos rápidos e baratos utilizando antígenos como a proteína NS1 consiste em uma alternativa muito promissora para o diagnóstico da Dengue, alcançando toda população, inclusive as mais afastadas dos centros urbanos, possibilitando o manejo adequado dos pacientes infectados.

Os resultados desse trabalho mostram claramente que o sistema eucariótico *Pichia pastoris* foi um hospedeiro muito eficaz para a produção das proteínas NS1 dos vírus dengue-1, -3 e -4. Essas proteínas foram expressas de forma solúvel no sobrenadante das culturas, e mostraram-se antigênicas quando utilizadas nos testes de Western Blot, indicando que elas possuem um grande potencial para serem utilizadas como antígenos para fins diagnósticos, pois foram produzidas em uma conformação que foi reconhecida pelos anticorpos policlonais presentes nos soros de pacientes infectados com dengue.

## CONCLUSÕES

Os resultados apresentados nesse trabalho nos permite concluir que:

- Os genes otimizados da proteína NS1 do vírus dengue-4 foram eficientemente clonados no vetor de expressão pPICZαA.
- Leveduras *Pichia pastoris* KM71H foram transformadas com o plasmídeo pPICZαA/NS1DENV4 por eletroporação.
- As proteínas NS1 dos vírus dengue-1,- 3 e- 4, foram produzidas de forma eficaz pelas leveduras *Pichia pastoris* KM71H.
- As proteínas NS1 obtidas mostraram-se antigênicas quando avaliadas por Western Blot, sendo úteis para o desenvolvimento de kits de diagnóstico para a dengue.

## 6. PERSPECTIVAS

- Otimização das condições de indução da expressão das proteínas NS1;
- Análise imunológica dos antígenos obtidos;
- Utilização dos antígenos NS1 DENV 1, 3 e 4 para o desenvolvimento de testes imunocromatográficos , que auxiliem o diagnóstico rápido da Dengue.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKEY, D. L. et al. Flavivirus NS1 Structures Reveal Surfaces for Associations with Membranes and the Immune System. **Science**, v. 343, n. 6173, p. 881–885, 21 fev. 2014.

ALCON, S. et al. Enzyme-linked immunosorbent assay specific to Dengue virus type 1 nonstructural protein NS1 reveals circulation of the antigen in the blood during the acute phase of disease in patients experiencing primary or secondary infections. **Journal of clinical microbiology**, v. 40, n. 2, p. 376–81, fev. 2002.

AMORIM, J. H. et al. The dengue virus non-structural 1 protein: risks and benefits. **Virus research**, v. 181, p. 53–60, 2014.

BALAMURUGAN, V. et al. Recombinant protein-based viral disease diagnostics in veterinary medicine. **Expert Review of Molecular Diagnostics**, v. 10, n. 6, p. 731–753, 9 set. 2010.

BHATT, S. et al. The global distribution and burden of dengue. **NIH-PA Author Manuscript Nature**, v. 496, n. 7446, p. 504–507, 2012.

BROOKS, S. A. Protein glycosylation in diverse cell systems: implications for modification and analysis of recombinant proteins. **Expert Review of Proteomics**, v. 3, n. 3, p. 345–359, 9 jun. 2006.

BUCKHOLZ, R. G.; GLEESON, M. A. G. Yeast Systems for the Commercial Production of Heterologous Proteins. **Bio/Technology**, v. 9, n. 11, p. 1067–1072, 1 nov. 1991.

BUONORA, S. N. et al. Increased sensitivity of NS1 ELISA by heat dissociation in acute dengue 4 cases. **BMC infectious diseases**, v. 17, n. 1, p. 204, 11 mar. 2017.

BYRNE, B. *Pichia pastoris* as an expression host for membrane protein structural biology. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 32, p. 9–17, 2015.

CABEZAS, C.; DE TRABAJO DE DENGUE, G. Dengue En El Perú: Aportes Para Su Diagnóstico Y Control. **Rev Peru Med Exp Salud Publica**, v. 22, n. 3, p. 212–228, 2005.

CDC. **Epidemiology | Dengue | CDC** National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases, Division of Vector-Borne Diseases. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/dengue/epidemiology/index.html>>. Acesso em: 2 set. 2017.

DE PAULA, S. O.; FONSECA, B. A. L. DA. Dengue: a review of the laboratory tests a clinician must know to achieve a correct diagnosis. **The Brazilian journal of infectious diseases: an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases**, v. 8, n. 6, p. 390–8, dez. 2004.

FABER, K. N. et al. Methylophilic yeasts as factories for the production of foreign proteins. **Yeast**, v. 11, n. 14, p. 1331–1344, nov. 1995.

FALCONAR, A. K.; ROMERO-VIVAS, C. M. A simple, inexpensive, robust and sensitive dot-blot assay for equal detection of the nonstructural-1 glycoprotein of all dengue virus serotypes. **Virology Journal**, v. 10, n. 1, p. 126, 22 abr. 2013.

FALGOUT, B.; CHANOCK, R.; LAI, C. J. Proper processing of dengue virus nonstructural glycoprotein NS1 requires the N-terminal hydrophobic signal sequence and the downstream nonstructural protein NS2a. **Journal of virology**, v. 63, n. 5, p. 1852–60, maio 1989.

FIGUEIREDO, L. T.; CAVALCANTE, S. M.; SIMÕES, M. C. Dengue serologic survey of schoolchildren in Rio de Janeiro, Brazil, in 1986 and 1987. **Bulletin of the Pan American Health Organization**, v. 24, n. 2, p. 217–25, 1990.

GALULA, J. U. et al. Virus-Like Particle Secretion and Genotype-Dependent Immunogenicity of Dengue Virus Serotype 2 DNA Vaccine. **Journal of Virology**, v. 88, n. 18, p. 10813–10830, 2014.

GUBLER, D. Dengue/dengue haemorrhagic fever: history and current status. **Novartis Found Symp.**, v. 277, p. 3–16; discussion 16–22, 71–3, 251–3., 2006.

GUBLER, D. . The changing epidemiology of yellow fever and dengue, 1900 to 2003: full circle? **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 27, n. 5, p. 319–330, set. 2004.

GUBLER, D. J. Aedes aegypti and Aedes aegypti-Borne Disease Control in the 1990s: Top Down or Bottom Up. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 40, n. 6, p. 571–578, 1 jun. 1989.

GUZMAN, M. G.; HARRIS, E. Dengue. **The Lancet**, v. 385, n. 9966, p. 453–465, 2015.

GYAWALI, N.; BRADBURY, R. S.; TAYLOR-ROBINSON, A. W. The epidemiology of dengue infection: Harnessing past experience and current knowledge to support implementation of future control strategies. **Journal of Vector Borne Diseases**, v. 53, n. 4, p. 293–304, 2016.

HORI, H.; LAI, C. J. Cleavage of dengue virus NS1-NS2A requires an octapeptide sequence at the C terminus of NS1. **Journal of virology**, v. 64, n. 9, p. 4573–7, set. 1990.

IDRIS, F.; MUHARRAM, S. H.; DIAH, S. Glycosylation of dengue virus glycoproteins and their interactions with carbohydrate receptors: possible targets for antiviral therapy. **Archives of Virology**, v. 161, n. 7, p. 1751–1760, 11 jul. 2016.

ISTÚRIZ, R. E.; GUBLER, D. J.; BREA DEL CASTILLO, J. Dengue and dengue hemorrhagic fever in Latin America and the Caribbean. **Infectious disease clinics of North America**, v. 14, n. 1, p. 121–40, ix, mar. 2000.

KIM, S.-J. et al. Optimization of the functional expression of Coprinus cinereus peroxidase in Pichia pastoris by varying the host and promoter. **Journal of microbiology and biotechnology**, v. 19, n. 9, p. 966–71, set. 2009.

KIRKPATRICK, B. D. et al. The live attenuated dengue vaccine TV003 elicits complete protection against dengue in a human challenge model. **Science Translational Medicine**, v. 8, n. 330, p. 330ra36-330ra36, 2016.

KRAINER, F. W. et al. Recombinant protein expression in Pichia pastoris

strains with an engineered methanol utilization pathway. **Microbial Cell Factories**, v. 11, n. 1, p. 22, 13 fev. 2012.

LEITMEYER, K. C. et al. Dengue virus structural differences that correlate with pathogenesis. **Journal of virology**, v. 73, n. 6, p. 4738–47, jun. 1999.

LIBRATY, D. H. et al. High Circulating Levels of the Dengue Virus Nonstructural Protein NS1 Early in Dengue Illness Correlate with the Development of Dengue Hemorrhagic Fever. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 186, n. 8, p. 1165–1168, 15 out. 2002.

LINDENBACH, B. D.; RICE, C. M. trans-Complementation of yellow fever virus NS1 reveals a role in early RNA replication. **Journal of virology**, v. 71, n. 12, p. 9608–17, dez. 1997.

LINDENBACH, B. D.; RICE, C. M. Molecular biology of flaviviruses. **Advances in virus research**, v. 59, p. 23–61, 2003.

MARSTON, F. A. The purification of eukaryotic polypeptides synthesized in Escherichia coli. **The Biochemical journal**, v. 240, n. 1, p. 1–12, 15 nov. 1986.

MULLER, D. A.; DEPELSENAIRE, A. C. I.; YOUNG, P. R. Clinical and Laboratory Diagnosis of Dengue Virus Infection. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 215, n. suppl\_2, p. S89–S95, 2017.

MULLER, D. A.; YOUNG, P. R. The flavivirus NS1 protein: molecular and structural biology, immunology, role in pathogenesis and application as a diagnostic biomarker. **Antiviral research**, v. 98, n. 2, p. 192–208, 2013.

ORELLANO, P. W. et al. Cost-utility analysis of dengue vaccination in a country with heterogeneous risk of dengue transmission. **Vaccine**, v. 34, n. 5, p. 616–621, 2016.

PYATI, P.; FITCHES, E.; GATEHOUSE, J. A. Optimising expression of the recombinant fusion protein biopesticide ??-hexatoxin-Hv1a/GNA in Pichia pastoris: Sequence modifications and a simple method for the generation of multi-copy strains. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 41, n. 8, p. 1237–1247, 2014.

ROBY, J. A. et al. Post-translational regulation and modifications of flavivirus structural proteins. **Journal of General Virology**, v. 96, n. 7, p. 1551–1569, 1 jul. 2015.

SCHERWITZL, I.; MONGKOLSAPAJA, J.; SCREATON, G. Recent advances in human flavivirus vaccines. **Current Opinion in Virology**, v. 23, p. 95–101, 2017.

SIRISENA, P. D. N. N.; NOORDEEN, F. Evolution of dengue in Sri Lanka—changes in the virus, vector, and climate. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 19, p. 6–12, fev. 2014.

SPOHNER, S. C. et al. Expression of enzymes for the usage in food and feed industry with *Pichia pastoris*. **Journal of Biotechnology**, v. 202, p. 118–134, 2015.

TEIXEIRA, M. D. O. Expressão dos genes sintéticos prM e E do vírus dengue-3 em *Pichia pastoris* : avaliação do uso em diagnóstico da dengue e análise do potencial imunogênico das proteínas. 2014. 112 f. Tese (Doutorado em Análises quantitativas e moleculares do Genoma; Biologia das células e dos tecidos) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2014.

WALLIS, T. P. et al. Determination of the Disulfide Bond Arrangement of Dengue Virus NS1 Protein. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 20, p. 20729–20741, 14 maio 2004.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention, and control. **Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases**, p. x, 147, 2009.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **WHO | Dengue and severe dengue**. World Health Organization, 2016. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/>>. Acesso em: 2 set. 2017