

## AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

# RENATURAÇÃO DA PROTEÍNA DE ENVELOPE DO VÍRUS DA ZIKA E DO DOMÍNIO III DA MESMA PROTEÍNA UTILIZANDO ALTAS PRESSÕES

#### DAVID PETERS DOS SANTOS

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do Grau de Mestre em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear - Aplicações

Orientadora: Profa. Dra. Lígia Ely Morganti Ferreira Dias

São Paulo 2018

## INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES Autarquia associada à Universidade de São Paulo

# RENATURAÇÃO DA PROTEÍNA DE ENVELOPE DO VÍRUS DA ZIKA E DO DOMÍNIO III DA MESMA PROTEÍNA UTILIZANDO ALTAS PRESSÕES

#### DAVID PETERS DOS SANTOS

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do Grau de Mestre em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear - Aplicações

Orientadora: Profa. Dra. Lígia Ely Morganti Ferreira Dias

Versão Corrigida

São Paulo 2018

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por tudo que tem realizado em minha vida.

Agradeço aos meus amigos e familiares que sempre me apoiaram e ajudaram nos momentos mais difíceis.

Agradeço à Dra Lígia por toda dedicação no desenvolvimento do trabalho.

Agradeço a todos os colaboradores do IPEN que ajudaram de alguma forma no que foi necessário.

#### RESUMO

# SANTOS, D.P. **RENATURAÇÃO DA PROTEÍNA DE ENVELOPE DO VÍRUS DA ZIKA E DO DOMÍNIO III DA MESMA PROTEÍNA UTILIZANDO ALTAS PRESSÕES.** 2018. 55 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Nuclear) Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo.

Grande parte das proteínas de importância biomédica são encontradas em concentrações pequenas nas suas formas nativas. Uma alternativa para obtenção de proteínas em grande escala é síntese por bactérias Escherichia coli geneticamente modificadas. Entretanto, frequentemente essas proteínas são produzidas como agregados insolúveis e inativos, denominados de corpos de inclusão (CI). Para se tornarem bioativas as proteínas nos CI devem ser renaturadas. O nosso objetivo foi o estabelecimento de um processo rápido e eficiente de obtenção da proteína de envelope (E) e do domínio III desta mesma proteína (EDIII) do vírus da ZIKA (ZIKV) solúveis e com atividade imunológica a partir de CI. A utilização destas proteínas se justifica pela sua relevância para o desenvolvimento de ensaios diagnósticos e para a produção de vacinas de ZIKV. A associação de alta pressão e pH alcalino se mostrou eficiente para a solubilização dos CI. A incubação dos CI em alta pressão (2,4 kbar por 90 min e 0,4 kbar por 14,5 h) em pH de 10,5 foi a melhor condição encontrada na qual foi obtida solubilização eficiente dos CI com baixa desnaturação proteica. O enovelamento das proteínas presentes nos sobrenadantes das suspensões submetidas à alta pressão foi obtido por diálise em tampão em pH de 8,5. A recuperação do E solúvel nesta condição foi de mais de 90% e a de EDIII foi de 80% em relação às quantidades totais dessas proteínas nos CI e os rendimentos foram de 130 mg de E e de 35 mg de EDIII/L de cultura bacteriana. As proteínas E e EDIII permaneceram imunologicamente ativas e foram recuperadas principalmente como monômeros e dímeros. O procedimento proposto representa uma alternativa para a produção de proteínas recombinantes imunologicamente ativas expressas como CI.

**Palavras chave:** Biologia molecular, biotecnologia, renaturação de proteínas, corpos de inclusão de ZIKV.

## ABSTRACT

SANTOS, D.P. Refolding of zika virus envelope protein and domain III of the same protein using high pressures. 2018. 55 p. Dissertation (Master in Nuclear Technology) Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo.

Most proteins of biomedical importance are found in small concentrations in their native forms. An alternative for obtaining large-scale proteins is synthesis by genetically modified Escherichia coli bacteria. However, these proteins are often produced as insoluble and inactive aggregates, called inclusion bodies (IBs). To become bioactive, the proteins in the IB must be refolded. Our objective was to set up a fast and efficient process to obtain soluble and immunologically active ZIKA virus (ZIKV) envelope protein (E) and its domain III (EDIII) from IB. The use of these proteins is justified by their relevance for the development of diagnostic tests and production of ZIKV vaccines. The association of high pressure and alkaline pH was shown to be efficient for IB solubilization. The incubation of the IB at high pressure (2.4 kbar for 90 min and 0.4 kbar for 14.5 h) at a pH of 10.5 was the best condition found in which efficient IB solubilization and low protein denaturation was obtained. The folding of the proteins present in the supernatants of suspensions subjected to high pressure was obtained by dialysis in buffer at pH 8.5. The recovery of the soluble E in this condition was higher than 90% and that of EDIII was of 80 % relative to the total amounts of those proteins in the IB and the yields were of 130 mg of E and of 35 mg of EDIII/L bacterial culture. E and EDIII proteins remained immunologically active and were recovered mainly as monomers and dimers. The proposed procedure represents an alternative for the production of immunologically active recombinant proteins expressed as IB.

**Key-words:** Molecular biology, biotechnology, renaturation of proteins, inclusion bodies of ZIKV

# LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Porcentagens de isoformas de E nos sobrenadantes de CI submetidos à	
pressão	. 38
Tabela 2. Rendimento de renaturação de proteína E de ZIKV	. 40
Tabela 3. Rendimento de renaturação de EDIII de ZIKV	. 53

# LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática do efeito da pressão nas proteínas 12
Figura 2. Diagrama esquemático da organização do domínio para ZIKV-E 16
Figura 3. Mudanças conformacionais na proteína E durante o processo de fusão
e infecção por flavivírus de uma célula hospedeira17
Figura 4. Efeito da alta pressão sobre a solubilização de CI de proteína E de
ZIKV monitorado por leituras de espalhamento de luz
Figura 5. Efeito do pH, presença de GdnHCI e arginina sobre a solubilização dos
CI de proteína E de ZIKV, monitorado por leituras de espalhamento de luz 25
Figura 6. Efeito do pH sobre a solubilização de CI de E de ZIKV monitorado por
SDS-PAGE
Figura 7. CI de proteína E de ZIKV analisados por microscopia eletrônica de
varredura
Figura 8. Fluorescência de Trp dos CI de proteína E de ZIKV
Figura 9. Deslocamento de $\lambda$ máximos de CI de proteína E submetidos à
pressão crescente
Figura 10. Efeito do pH, presença de GdnHCl e arginina no $\lambda$ máximo dos Cl de
proteína E de ZIKAV
Figura 11. Efeito do pH, GdnHCI e arginina sobre a concentração de proteína E
de ZIKV renaturada
Figura 12. Efeito do pH sobre a dissociação de proteína E em alta pressão
analisado por cromatografia de exclusão molecular
Figura 13. Cromatogramas em coluna de exclusão molecular de sobrenadantes
de CI diluídos em pH 8,5 35
Figura 14. Efeito do pH e presença de arginina sobre a renaturação de proteína E
analisado por cromatografia de exclusão molecular36
Figura 15. Análise por SDS-PAGE de sobrenadantes de suspensões de CI de E
de ZIKV
Figura 16. Análise por SDS-PAGE do efeito da presença do par redox na
renaturação de E de ZIKV 39
Figura 17. Avaliação da reatividade de proteína E de ZIKV em teste de ELISA. 41
Figura 18. Proteína E de ZIKV mutante (A264C) analisada por SEC42

Figura 19. Efeito da alta pressão sobre CI de EDIII de ZIKV monitorado por
leituras de espalhamento de luz 44
Figura 20. SDS Efeito do pH na solubilização de CI de EDIII de ZIKV analisado
por SDS-PAGE 45
Figura 21. CI de EDIII de ZIKV analisados por microscopia eletrônica de
varredura
Figura 22. Fluorescência intrínseca do Trp de CI de EDIII de ZIKAV 47
Figura 23 Efeito do pH, presença de GdnHCl e de arginina no $\lambda$ máximo dos Cl
de EDIII
Figura 24. Efeito do pH, GdnHCI e arginina sobre o rendimento de renaturação
de EDIII de ZIKV
Figura 25. Efeito da presença de arginina sobre a renaturação de EDIII analisada
por SDS-PAGE
Figura 26 Análise por SDS-PAGE do efeito da presença de arginina e glutationas
sobre a renaturação de EDIII 52
Figura 27 Avaliação da reatividade de EDIII de ZIKV em teste de ELISA 54

# LISTA DE ABREVIATURAS

μ	Micro
А	Absorbância
aa	Aminoácido
arg	Arginina
BSA	Albumina bovina sérica
С	Proteína nucleocapsideo
CAPS	3-(Cyclohexylamino)-1propanesulfonic acid
CHIKV	Vírus da chikungunya
CI	Corpos de Inclusão
D.O.	Densidade óptica
Da	Daltons
DENV	Vírus da dengue
DTT	1,4-ditiotreitol
E	Proteína de Envelope
E-coli	Escherichia coli
EDE	E dimer epitope
EDIII	Domínio III de Zika Vírus
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
FL	Laço de Fusão
FLA	Fase de leitura aberta
FLE	Fusion loop epitope
g	Força centrífuga relativa
GdnHCl	Hidrocloreto de guanidina
GFP	green fluorescente protein
Glut	Glutationa
GSH	Glutationa reduzida
GSSG	Glutationa oxidada
HHP	Alta Pressão Hidrostática
IPTG	Isopropyl β-D-tiogalactopiranosídeo
kbar	quilobar
Μ	Mol

7

MEV	Microscopia eletrônica de varredura
mg	Miligramas
ng	Nanogramas
nm	Nanômetros
NS	Não estrutural
OPD	1,2-Diaminobenzeno 1,2-Phenilenodiamina
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
рН	Potencial hidrogeniônico
SDS	Dodecil sulfato de sódio
TBEV	Vírus da Encefalite
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
Trp	Triptofano
Tween 20	Polioxietileno sorbitol monolaureato
u.a.	Unidade arbitrária.
UTR	Região não traduzida
WNV	Vírus do oeste do Nilo Ocidental
YFV	Vírus da febre amarela
ZIKV	Vírus da Zika

# Sumário

1. INTRODUÇÃO	10
1.1 PROTEÍNA DE ENVELOPE E DOMÍNIO III DE ZIKA VÍRUS	13
2. OBJETIVO GERAL	19
3. METODOLOGIA	19
3.1 Equipamentos utilizados	19
3.2 Expressão das proteínas recombinantes e lavagens dos CI	20
3.3 Medidas de fluorescência e espalhamento de luz	21
3.4 Compressão dos agregados	22
3.5 Eletroforese em gel de poliacrilamida e coloração	22
3.6 Purificação e análise em coluna de exclusão molecular	22
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
4.1 Proteína E de ZIKV	23
4.2 Domínio III de proteína E de ZIKV (EDIII)	43
5. CONCLUSÕES	55
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57

## 1 INTRODUÇÃO

#### 1.1 Produção de proteínas recombinantes

Grande parte das proteínas de importância biomédica são encontradas em concentrações pequenas nas suas formas nativas. Um microorganismo muito útil para produção em grande escala e também para estudos estruturais e funcionais de proteínas recombinantes é a bactéria *Escherichia coli*. Algumas proteínas possuem a tendência a formar ligações intermoleculares, a agregar e acumular como corpos de inclusão insolúveis (CI) no citoplasma das bactérias recombinantes (de Groot & Ventura, 2006). Um grande benefício na produção das proteínas como CI em relação a sua produção de forma solúvel é a possibilidade de separação física entre os corpos de inclusão e os contaminantes solúveis do hospedeiro. A aplicação de protocolos eficientes de extração e lavagens dos CI pode proporcionar a obtenção de proteínas com alto grau de pureza da proteína de interesse, dispensando assim, etapas de purificação que costumam ser trabalhosas e caras.

A solubilização dos agregados é o primeiro passo para a renaturação, ou seja, a obtenção das proteínas bioativas a partir de CI. Os agregados de proteínas em CI geralmente são solubilizados em agentes caotrópicos como hidrocloreto de guanidina ou uréia em concentrações altas, resultando na completa desnaturação das proteínas. O enovelamento proteico ocorre quando os agentes desnaturantes são removidos por meio de diálise, por diluição adicional, ou por outro processo. Normalmente a reagregação é favorecida sobre a renaturação e a reagregação só é minimizada em concentrações proteicas muito baixas (Clark, 1998; Eiberle & Jungbauer, 2010). Torna-se necessária a avaliação de um grande número de condições de renaturação para encontrar as condições que levem a rendimentos aceitáveis (Rathore, Bade, Joshi, Pathak, & Pattanayek, 2013; Vincentelli et al., 2004).

Em altas pressões são favorecidos os estados proteicos de menores volumes e a alta pressão promove a entrada de água nas cavidades que não são usualmente expostas a este solvente. A entrada de água induz a quebra de ligações eletrostáticas e hidrofóbicas e em altíssimas pressões (geralmente acima

de 10 kbar), à perda das cavidades não expostas à água. As ligações covalentes também não são normalmente rompidas em pressões abaixo de 10 kbar (Silva et al., 2014). A estrutura secundária das proteínas (α-hélices, folhas β e voltas) são pouco afetadas pela ação da pressão, devido à pouca sensibilidade das pontes de hidrogênio. De fato, em alguns casos, as estruturas secundárias podem ser estabilizadas pela alta pressão. Por este motivo, a pressão tende a converter proteínas em segmentos parcialmente enovelados, ou glóbulos fundidos (Figura 1 A e B). A aplicação de pressões entre 2-3 kbar é eficaz para dissociar agregados proteicos, pois esta condição desfavorece as interações intermoleculares hidrofóbicas e eletrostáticas. A vantagem da utilização destes níveis de pressão para a solubilização dos agregados é que eles são capazes de manter estruturas secundárias e em geral são relativamente pouco desnaturantes (Silva & Weber, 1993; Silva, Foguel, & Royer, 2001).



**Figura 2. Representação esquemática do efeito da pressão nas proteínas**. Em (a) Efeito da pressão nas cavidades (superfície azul dentro do modelo de proteína). Sob pressão, as moléculas de água (esferas) se infiltram na proteína levando as cavidades (malha azul dentro do modelo de proteína) a se desfazerem, ocorrendo o desenovelamento. (b) Diagrama esquemático que ilustra os efeitos do aumento da pressão sobre as proteínas. As cavidades presentes nos estados de 1 a 4 são preenchidos com o aumento de pressão. A proteína enovelada é representada como um elefante (Silva et al., 2014).

Um outro fator capaz de solubilizar os agregados proteicos é o pH alcalino (Singh, Upadhyay, Upadhyay, Singh, & Panda, 2015). A solubilização dos agregados neste caso se deve à repulsão eletrostática entre os aminoácidos (Sen, Ahmad, & Khan, 2008). Ambos os processos são capazes de solubilizar os agregados proteicos sem desnaturar completamente as proteínas presentes nestas estruturas, mantendo as estruturas secundárias e terciárias semelhantes às estruturas das proteínas nativas, que geralmente estão presentes nos CI. No entanto, a utilização concomitante dos dois processos, físico e químico, para a solubilização e posterior renaturação de proteínas em CI somente recentemente foi descrita na literatura pelo nosso grupo de pesquisa e também foi submetido um pedido de patente com este mesmo assunto.

#### 1.2 ZIKV

Em 2015, mais de 1,5 milhão de pessoas foram infectadas com ZIKV no Brasil (Samarasekera & Triunfol, 2016). A disponibilização dos testes diagnósticos que determinam anticorpos IgG e IgM ZIKV-específicos é importante tanto para o tratamento clínico como para o planejamento de ações em saúde pública. Atualmente não se encontram disponíveis no mercado ensaios sorológicos para a detecção de anticorpos contra o vírus da zika (ZIKV) que não apresentem reação cruzada falso-positiva com soros de indivíduos infectados por dengue (DENV) ou chikungunya (CHIKV), o que é um problema, pois estas viroses apresentam circulação simultânea com a ZIKV atualmente no Brasil. Além disso, os soros de pessoas que adquiriram imunidade por essas viroses, através de imunização também apresentam resultados positivos. Alguns testes como RT-PCR utilizando oligonucleotídeos iniciadores específicos foram demonstrados no diagnóstico de ZIKV (Balm et al., 2012). No entanto, este método só é sensível para a determinação de RNA de ZIKV na fase inicial da doença, tornando-se negativo após o período de viremia. Por estes motivos é importante produzir antígenos ZIKV-específicos que possam ser usados em ensaios sorológicos.

Podemos também destacar a importância dos estudos direcionados para a produção de vacinas que sejam eficientes para a profilaxia da ZIKV. Frequentemente se utilizam vírus atenuados ou inativados na produção de vacinas. Pesquisas com proteínas recombinantes, ajudam a direcionar respostas imunológicas focadas em antígenos que demonstrem capacidade de promover respostas imunes protetoras e, além disso, podem ser uma alternativa para o desenvolvimento de vacinas eficientes e mais seguras. Já foi demonstrada a importância de domínios antigênicos contendo epítopos com a conformação nativa para a geração de anticorpos neutralizantes (Amorim, Alves, Boscardin, & Ferreira, 2014). Portanto, tanto para o caso da utilização em ensaios diagnósticos, quanto para a utilização na produção de vacinas de subunidades, é necessária a obtenção de proteínas recombinantes que mantenham suas estruturas conformacionais preservadas.

O vírus Zika (ZIKV) é um RNA de fita simples que pertence ao gênero Flavivirus na família Flaviviridae. O ZIKV foi descoberto na floresta Zika em Uganda em 1947 (Musso et al., 2016). Este vírus está intimamente relacionado com os quatro sorotipos da dengue vírus (DENV), com o vírus do Nilo Ocidental (WNV), com o vírus da encefalite transmitida por carrapato (TBEV) e com o vírus da febre amarela (YFV) (Lazear & Diamond, 2016).

Em 1954, foram reportados os 3 primeiros casos de infecções em humanos na Nigéria. Historicamente, infecções sintomáticas de ZIKV foram limitadas a casos esporádicos ou pequenos grupos de pacientes. Este padrão mudou em 2007, quando o primeiro grande surto de infecção por ZIKV ocorreu nos Estados Federados da Micronésia, quando aproximadamente 73% da população foi infectada e a doença sintomática se desenvolveu em aproximadamente 18% da população (Duffy et al., 2009). Desde então, infecções por ZIKV se espalharam rapidamente. Ocorreram surtos em diversos locais e mais recentemente nas Américas. O ZIKV foi primeiramente reportado nas Américas em maio de 2015 no Brasil, onde 440.000 a 1.300.000 pessoas foram subsequentemente infectadas (Plourde & Bloch, 2016).

A infecção do mosquito pelo ZIKV ocorre durante a ingestão de sangue. O vírus é então replicado e transmitido durante o próximo episódio de ingestão de sangue para um reservatório animal. Existem indicações de que podem existir vários reservatórios animais, como primatas não humanos e outros animais domésticos e selvagens (Haddow et al., 2012).

A infecção provocada pelo ZIKV provavelmente se assemelha a de outras flaviviroses. O vírus penetra nas células da pele por meio de receptores celulares, possibilitando a migração para os linfonodos e para a corrente sanguínea (Hamel et al., 2015). O período de incubação da doença entre a picada do inseto até o desenvolvimento dos sintomas é de aproximadamente 3 a 12 dias. A infecção é assintomática em aproximadamente 80% dos casos e quando os sintomas ocorrem, eles desaparecem em 2 semanas, são tipicamente brandos e não específicos, semelhantemente a outras infecções por flaviviroses, o que pode dificultar o diagnóstico.

O ZIKV é transmissível da mãe para o feto durante a gravidez. Em recémnascidos de mães que se infectaram durante a gestação, o RNA viral foi detectado no líquido amniótico e no sistema nervoso central do feto. A mais séria complicação da infecção por ZIKV em mulheres grávidas, que se tornou um sinal alarmante para as autoridades de saúde mundiais, é a sua associação com microcefalia e outras complicações neurológicas sérias no feto em desenvolvimento (Panchaud, Stojanov, Ammerdorffer, Vouga, & Baud, 2016). A causa mais provável para a microcefalia é que o ZIKV infecta as células primarias progenitoras do sistema neurológico prevenindo o seu crescimento. Existe a suspeita de que por volta de 3.000 casos de microcefalia em recém-nascidos no Brasil se devam à infecção pelo ZIKV (Vogel, 2016). Por estes motivos é importante o desenvolvimento de uma vacina profilática eficaz para prevenir a infecção por ZIKV (Yang, Dent, Lai, Sun, & Chen, 2017).

O genoma do ZIKV é composto de RNA de cadeia positiva de aproximadamente 10 kb, contendo uma única fase de leitura aberta (FLA) flanqueada pelas regiões não traduzidas (RNT) em ambas as extremidades. A FLA é composta por três proteínas estruturais: proteína de nucleocapsideo (C), proteína de envelope (E), proteína de membrana (M) e sete proteínas não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5). As proteínas não estruturais estão envolvidas nos aspectos intracelulares como a replicação viral, montagem dos virions, proteólise, maturação e regulação da imunidade do hospedeiro (Roby, Setoh, Hall, & Khromykh, 2015). A proteína estrutural C é responsável pelo encapsulamento e pela proteção do material genético. A PrM, que é formada pela hidrólise por proteases durante a infecção viral tardia, participa na formação do envelope viral e tem um papel importante na manutenção da estrutura espacial da proteína E. Ambas as proteínas se localizam na superfície da estrutura dos vírions (Zhang et al., 2007).

#### 1.3 Proteína E

A proteína E consiste em três domínios: um domínio amino-terminal com estrutura em barril composta de 8 folhas  $\beta$  (domínio I, DI), um domínio de dimerização (domínio II, DII) que é formado por dois segmentos que se ligam em uma estrutura semelhante a dedos (finger-like) com um núcleo altamente estável composto de 5 folhas  $\beta$  antiparalelas e duas  $\alpha$  hélices a partir da qual uma folha  $\beta$  de 3 folhas se expande formando dois laços. O terceiro domínio é composto de uma estrutura em barril formada por folhas  $\beta$ , se assemelha a imunoglobulinas e está localizado na porção carboxi-terminal da proteína (domínio III, DIII) (Dai et al., 2016) (Figura 2).



**Figura 3. Diagrama esquemático da organização dos domínios de E de ZIKV.** Em (a) DI (vermelho), DII (amarelo) e DIII (azul). (b) Dímero de ZIKV-E. ZIKV-E tem três domínios distintos: DI em forma de  $\beta$ -barril, DII em forma de dedo II e DIII em forma de imunoglobulina. O DII é responsável pela dimerização do ZIKV-E (Mittal et al., 2017).

A proteína E forma 90 homodímeros anti-paralelos, que ficam ancorados no domínio transmembrana dos vírions. Durante a fusão entre o vírus e a célula do hospedeiro existe uma mudança na conformação desta proteína. Em pH ácido o laço de fusão em DII (FL) é exposto ao meio extracelular. A proteína E sofre mudanças conformacionais irreversíveis e forma uma estrutura semelhante a grampo de cabelo, e o FL é adsorvido pela membrana do hospedeiro. Os dímeros de proteína E se transformam em trímeros e ocorre a fusão entre as membranas viral e do hospedeiro. Quando o vírus penetra nas células do hospedeiro a proteína E, interage com receptores celulares. Dentro da célula o pH ácido desencadeia a fusão do envelope viral com os endossomos e ocorre a liberação do RNA viral (Figura 3). O vírus se replica e novos vírus são montados pelo brotamento no retículo endoplasmático em uma formação imatura não infectante. Os vírus recém-formados são então transportados para a superfície celular para liberação por exocitose (Zhang et al., 2007).



Figura 4. Mudanças conformacionais na proteína E durante o processo de fusão e infecção por flavivírus de uma célula hospedeira. Em (A) Alterações conformacionais da proteína E durante a fusão. 1. Os monômeros da proteína E dimerizam e são ancorados através do domínio transmembrana; 2. O circuito de fusão EDII (FL, vermelho) é exposto ao ambiente extracelular e sob condições de pH baixo, ocorrem alterações conformacionais da proteína E, enquanto o FL adsorve a membrana celular hospedeira; 3. A proteína E muda de dímero para trímero; 4. As membranas virais e da célula hospedeira se fundem; 5. Formação pós-fusão. Em (B) a proteína E é responsável pela ligação viral, fusão de membrana e montagem de viriões; 1. Quando o vírus entra nas células hospedeiras, a proteína E interage com os receptores celulares, como a proteína 1 (LRP1) relacionada ao receptor de lipoproteínas, o sulfato de heparano e a proteína ribossômica SA (RPSA). Em pH baixo o envelope viral se funde com os endossomas; 2. Liberação do RNA do genoma viral; 3/4. O vírus replica e se agrupa por brotação no retículo endoplasmático (RE) em uma formação não infecciosa imatura; 5. Os vírus da progênie amadurecem no complexo de Golgi; 6. Os vírus da progenitura são então transportados para a superfície celular para liberação por exocitose (Zhang et al., 2007).

A proteína E de flavivirus é uma proteína de ligação ao receptor e um importante antígeno na obtenção de anticorpos neutralizantes durante a resposta imune (Ye et al., 2016). Um problema na busca por vacinas eficientes contra os flavivirus é a dominância do "fusion loop epitope" (FLE), um segmento da proteína E que é escondido na interface dos dímeros de proteína E que cobrem as partículas virais maduras. Anticorpos anti-FLE possuem ampla reatividade cruzada e são pouco neutralizantes. Em contraste, o epítopo que fica exposto na interface de dimerização entre dois monômeros de E ("E dimer epitope", EDE) induz a formação de anticorpos que são neutralizantes (Dejnirattisai et al., 2016).

Estudos funcionais e de mapeamento de epítopos demonstraram que os três domínios são antigênicos e reconhecidos por anticorpos neutralizantes que inibem o processo de entrada viral nas células do hospedeiro (Kostyuchenko et al., 2016). O EDIII da proteína E de flavivírus contém importante ligação aos receptores celulares e foram descritos epítopos neutralizantes específicos do tipo que induzem respostas do hospedeiro e / ou imunidade protetora com afinidade por este domínio (Sukupolvi-Petty et al., 2010). O EDIII foi o domínio utilizado para o desenvolvimento de vacinas de subunidades protetoras contra a YFV e TBEV e também se mostrou um potente indutor de resposta imune neutralizante em camundongos, sendo um possível candidato para o desenvolvimento de vacina

Recentemente, foram avaliados alguns candidatos a vacina baseados em mRNA modificado encapsulado em nanopartículas lipídicas, vetor de DNA plasmídial ou vetor de adenovírus expressando a premembrana (prM) e proteína E de ZIKV. Se mostrou a formação de anticorpos neutralizantes e proteção contra o desafio de ZIKV em modelos de camundongo e macacos rhesus (Abbink et al.; Abbink et al., 2016; Dowd et al., 2016; Larocca et al., 2016). Também foi observada proteção em macacos rhesus quando o vírus purificado e inativado foi utilizado para vacinação (Abbink et al., 2016).

Alguns artigos da literatura descrevem os processos de renaturação (tradução de *refolding*) de proteína E ou EDIII de DENV no qual os CI são solubilizados em condições desnaturantes na presença de agentes caotropicos em altas concentrações (Ganguly, Malabadi, Das, Suresh, & Sunwoo, 2013) e de EDIII (Chu et al., 2005; Combe et al., 2017; Pattnaik, Babu, Verma, Tak, & Rao,

2007; Zhang et al., 2007) Entretanto, não foi descrito processo de renaturação de E ou de EDIII de ZIKV.

## **2 OBJETIVOS**

O presente estudo tem como objetivo a padronização de um processo rápido e eficiente para a produção de altos rendimentos de proteína E e do domínio EDIII desta proteína a partir de CI produzidos por bactérias *E. coli* geneticamente modificadas. Com a finalidade de atingirmos os objetivos, utilizamos a associação de alta pressão e pH alcalino para a solubilização dos CI e subsequente enovelamento da proteína solubilizada para uma condição estável em solução.

## 3 METODOLOGIA

#### 3.1 Equipamentos utilizados

Agitador, modelo Ts-2000<sup>a</sup>, Vertex; Aparelho Mili-Q Plus, purificador de água, Milipore; Balança analítica, modelo ATX224, Shimadzu; Balança semi-analítica, modelo UX620H, Shimadzu; Banho-maria, modelo 100, Fanem; Centrífuga Refrigeradora automática, modelo 5810R, Eppendorf; Coluna de exclusão molecular, modelo Superdex 200 10/300, GE Healthcare; Espectrofluorímetro, modelo Cary Eclipse, Varian; Estufa para cultura bacteriana, modelo Q-316B, Quimis; Forno de micro-ondas, LG; Freezer -20 °C, Bosh; Incubadora refrigerada com agitação, modelo TE421, Tecnal; Microscopia Eletrônica de Varredura, modelo TM3000, HITACHI; Seladora a vácuo, modelo TM 150, TecMag; Sistema de eletroforese vertical, modelo Tetra System, Bio-Rad; Sonicador, modelo 3000, Biologics;

Vaso de alta pressão, modelo R4-6-40 e bomba, modelo p40, High Pressure Equipment;

## 3.2 Expressão das proteínas recombinantes e lavagens dos CI

A seguir estão as sequências de cDNA de ZIKV-E e ZIKV-EDIII. Os resíduos sublinhados a 3' e a 5'dos genes fazem parte das sequências utilizada para clonagem ou são etiquetas de 6 histidinas:

#### cDNA de E de ZIKV:

MASIRCIGVSNRDFVEGMSGGTWVDVVLEHGGCVTVMAQDKPTVDIELVTTTVSNMAE VRSYCYEASISDMASDSRCPTQGEAYLDKQSDTQYVCKRTLVDRGWGNGCGLFGKG SLVTCAKFACSKKMTGKSIQPENLEYRIMLSVHGSQHSGMIVNDTGHETDENRAKVEIT PNSPRAEATLGGFGSLGLDCEPRTGLDFSDLYYLTMNNKHWLVHKEWFHDIPLPWHA GADTGTPHWNNKEALVEFKDAHAKRQTVVVLGSQEGAVHTALAGALEAEMDGAKGRL SSGHLKCRLKMDKLRLKGVSYSLCTAAFTFTKIPAETLHGTVTVEVQYAGTDGPCKVPA QMAVDMQTLTPVGRLITANPVITESTENSKMMLELDPPFGDSYIVIGVGEKKITHHW<u>LEH</u> HHHHH.

cDNA de EDIII de ZIKV:

<u>MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMASMTGGQQMGRGS</u>AFTFTKIPAETLHGTVTVEVQY AGTDGPCKVPAQMAVDMQTLTPVGRLITANPVITESTENSKMMLELDPPFGDSYIVIGV GEKKITHHWHRS<u>LEHHHHHH</u>

Os dois cDNAs foram clonados no vetor plasmídico pET28a As proteínas correspondentes foram expressas em bactérias *Escherichia coli*, cepa BL21(DE3) no laboratório de desenvolvimento vacinal (LDV), do Dr. Luis Carlos de Souza Ferreira, do Departamento de Microbiologia do ICB-USP. Os cultivos foram realizados em erlenmeyers em shaker a 37°C. A expressão dos genes foi induzida quando a absorbância (600 nm) se encontrava entre 0,6 e 0,8, pela adição de IPTG a uma concentração final de 0,5 mM em 1 litro de meio de cultura LB e a seguir a temperatura foi abaixada para 30°C e as culturas foram mantidas sob agitação por mais 16 horas. Para a lise bacteriana e lavagens dos CI, as bactérias foram centrifugadas a 8000 x g durante 10 minutos à temperatura de 4°C. O

precipitado foi ressuspenso em 50 ml do tampão A1 (0,1 M Tris-HCl pH 8,5 + 5 mM EDTA), foi adicionada lisozima (50 µg/mL) à suspensão e a mesma foi incubada em temperatura ambiente, durante 15 minutos. Foi então adicionado 0,1% de deoxicolato de sódio à suspensão. A lise bacteriana ocorreu pela sonicação da suspensão em gelo até que a mesma perdesse a viscosidade e logo em seguida novamente foi centrifugada a 8000 x g por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspenso em 50 mL do tampão A2 (0,1 M Tris-HCl pH 8,5 + 5mM EDTA e 0,1% de deoxicolato de sódio) e a suspensão foi novamente sonicada, desta vez rapidamente para a desfazer os grumos. Foi realizada a centrifugação das suspensões a 8000 x g em 10 minutos a 4°C e foi repetido o procedimento de lavagem dos CI e a suspensão foi ressuspensa em tampão 0,1 M Tris HCl pH 8,5 + 1 mM EDTA. As leituras das absorbâncias das suspensões foram feitas em espectrofotômetro em comprimento de onda de 350 nm. As suspensões de CI foram separadas em alíquotas de 1 mL que foram mantidas em freezer a -20°C até o momento do uso.

#### 3.3 Medidas de fluorescência e espalhamento de luz

Foi utilizado o espectrofluorímetro Cary Eclipse (Varian) para leitura do espalhamento de luz e da fluorescência. Para as leituras, foram utilizadas cubetas de quartzo de 1 cm de caminho óptico, e foram feitas leituras em um ângulo de 90° relacionado à luz incidente com tempo de resposta de 1 segundo e velocidade de leitura de 240 nm/minuto. Foram realizadas leituras do espalhamento de luz com excitação em 320 nm e a emissão foi medida em 315 a 325 nm. Com relação às medidas de fluorescência intrínseca do Triptofano (Trp), elas foram coletadas entre 300 e 400 nm, com excitação em 290 nm.

As curvas de dissociação dos CI foram realizadas em concentrações crescentes de Arginina (0 a 0,6M), ou de GdnHCI (0 a 6M) e diferentes pHs (7 a 12).

#### 3.4 Compressão dos agregados

As suspensões dos CI de ZIKV-E e ZIKV-EDIII foram descongeladas e as determinações de absorbância a 350 nm das suspensões foram refeitas em espectrofotômetro. Normalmente as suspensões foram diluídas para uma absorbância de 2 em tampão Tris HCl pH 8,5. As suspensões de Cl foram diluídas em tampão adequado para um volume de 1 mL e foram colocados em pequenos pacotes de plástico, que foram selados e em seguida todos os pacotes foram inseridos em um pacote maior também de plástico que foi selado a vácuo. As suspensões foram colocadas em um vaso de pressão (R4-6-40, High Pressure Equipment), que foi fechado e pressurizado em altas pressões (2,4 kbar) pela injeção de óleo utilizando um sistema de compressor de ar e bomba (PS-50, High pressure equipment) adequados. Após 90 minutos foi realizada descompressão para 0,4 kbar, condição na qual permaneceu por um período de 14 h 30 min. Após a descompressão, as amostras foram retiradas do equipamento e foram feitas leituras de espalhamento de luz e de fluorescência. Alternativamente as amostras foram centrifugadas a 12000 x g durante 15 minutos para retirada de agregados insolúveis e em seguida foram dialisadas para retirada dos aditivos, novamente centrifugadas e estocadas a -20°C para análises posteriores.

#### 3.5 Eletroforese em gel de poliacrilamida e coloração

As análises em eletroforese de poliacrilamida foram realizadas em gel à 12%, utilizando o mesmo método proposto por LAEMMLI (Laemmli, 1970) e os géis foram coradas com Coomassie Blue G-250. As amostras de CI passaram por aquecimento de 5 minutos a 95°C em tampão de amostra contendo glicerol, SDS e azul de bromofenol. DTT foi adicionado às amostras em concentração de 100 mM para redução.

#### 3.6 Purificação e análise em coluna de exclusão molecular

As amostras de ZIKV-E e ZIKV-EDIII foram analisadas em coluna de exclusão molecular modelo Superdex 200 10/300 (GE Healthcare), que foi

acoplada a um sistema AKTA (GE Healthcare). Os tampões utilizados estão indicados em cada figura.

### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 4.1 Proteína E de ZIKV

A solubilização dos agregados é a primeira etapa para estabelecer um processo de renaturação proteica. Na Figura 4 analisamos a solubilização dos agregados de Proteína E de ZIKV durante aplicação da pressão. Notamos que os níveis de espalhamento de luz caíram consideravelmente até por volta de 90 segundos e a partir desse tempo os valores se mantiveram estáveis, o que demonstra que a solubilização dos CI promovida pela alta pressão é bastante rápida. Além de aplicarmos alta pressão (2,4 kbar por 90 minutos e 0,4 kbar por 14,5 horas – 2,4 kbar/0,4 kbar) para a solubilização dos CI também utilizamos pH alcalino. Avaliamos também a associação de HHP e do agente desnaturante GdnHCl para promover a solubilização dos agregados. A arginina é considerada um agente que diminui as interações proteína-proteína e a agregação proteica (Arakawa et al., 2007) e por este motivo também analisamos a utilidade da presença de arginina na solubilização dos CI. Para determinarmos se a alta pressão associada ao pH alcalino, à presença de GdnHCl ou de arginina, são capazes de proporcionar a solubilização eficaz dos CI de ZIKV com baixo grau de desnaturação, suspensões de CI em pH entre 7 e 12, presença de 0 a 6 M de GdnHCI (em pH 8,5) ou de 0 a 1M de arginina (em pH 11,0) foram incubadas em alta pressão (2,4 kbar/0,4 kbar) ou em pressão atmosférica (1bar) e a avaliação do grau de solubilização foi monitorada por meio de leituras de espalhamento de luz visível (em 320 nm). A solubilização dos agregados foi indicada pela queda nos valores de espalhamento de luz.



Figura 5. Efeito da aplicação de 2, 4 kbar sobre a solubilização de CI de proteína E de ZIKV monitorado por leituras de espalhamento de luz.

Quedas importantes nos valores de espalhamento de luz das amostras incubadas em pressão atmosférica só ocorreram em pH a partir de 10 (Figura 5A) ou na presença de GdnHCI (Figura 5B), enquanto a partir de pH 8 já se observa queda nos valores das amostras submetidas à alta pressão. A solubilização dos CI foi eficiente mesmo na ausência de arginina, como esperado, pois a associação de alta pressão e pH 11 promove dissociação eficiente dos CI (Figura 5A). A queda nos valores de LS indica que a presença de arginina teve pequeno efeito na solubilização dos CI nas condições testadas (Figura 5C).



Figura 6. Efeito do pH, presença de GdnHCl e arginina sobre a solubilização dos Cl de proteína E de ZIKV, monitorado por leituras de espalhamento de luz. T=0 indica o tempo inicial em que as amostras foram preparadas e analisadas imediatamente. As outras amostras foram incubados em 2,4 kbar/0,4 kbar ou em 1 bar por 16 horas. As medidas foram realizadas em espectrofluorímetro com excitação de 320 nm e emissão entre 315 e 325 nm. A) Curva de pH em B) Curva de Guanidina (pH 8,5) e em C) Curva de Arginina (pH 11,0).

O perfil em SDS-PAGE das amostras dos sobrenadantes das suspensões de CI de proteína E indica que a solubilização dos agregados para a forma monomérica somente foi obtida em pH 12 quando a incubação foi realizada em pressão atmosférica (Figura 6A). Entretanto, a proteína E foi solubilizada das suspensões submetidas a 2,4 kbar/0,4 kbar em pH a partir de 9 (Figura 6B), o que demonstra que a aplicação de alta pressão aumentou a eficiência de solubilização, abaixando o pH necessário para a solubilização.



**Figura 7. Efeito do pH sobre a solubilização de CI de E de ZIKV monitorado por SDS-PAGE.** Em (A) suspensões incubadas por 16 horas em 1bar; (B) suspensões incubadas em 2,4 kbar/0,4 kbar. As amostras foram reduzidas e fervidas.

A Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) foi utilizada para analisar o efeito da alta pressão sobre a solubilização dos CI de proteína E de ZIKV. As figuras 7A e C mostram os CI não tratados e as Figuras 7B e D mostram a fração insolúvel dos CI após tratamento em HHP e pH de 11,0. A concentração de CI diminuiu consideravelmente após tratamento em HHP, o que mostra que de fato os agregados foram solubilizados pela aplicação de alta pressão.



Figura 8. CI de proteína E de ZIKV analisados por microscopia eletrônica de varredura. Em A e C, suspensões de CI e em B e D, frações insolúveis de CI que foram tratados em HHP. Em A e B, imagens ampliadas em 1000x. Em C e D, imagens ampliadas em 8000x.

O Triptofano (trp) é um ótimo indicador do estado de enovelamento de uma proteína, pois o seu espectro de fluorescência se desloca para comprimentos de ondas maiores, conforme este resíduo hidrofóbico é exposto ao solvente quando do desenovelamento, indicando maior grau de desnaturação proteica (Burstein, Vedenkina, & Ivkova, 1973). O Trp se trata de uma sonda local. A proteína E de ZIKV apresenta 6 Trp.

Nas amostras de suspensão de CI de proteína E de ZIKV foi observado um pico máximo da fluorescência em 341,7 nm para os CI em pH 7,0 e a desnaturação da proteína em 6M de GdnHCI promoveu o deslocamento de 13,3 nm para um  $\lambda$  máximo em 355,0 nm (Figura 8). A fluorescência do Trp foi utilizada para monitorarmos o grau de desenovelamento de proteína E de uma suspensão de CI que foi submetida à pressão crescente de 0,5 em 0,5 kbar permanecendo em cada

condição por 15 minutos antes de aplicarmos um novo patamar de pressão. Em 1 bar a elevação de pH de 7 para 11 levou ao deslocamento do  $\lambda$  da proteína E para maiores comprimentos de onda em aproximadamente 4 nm, sugerindo que o pH alcalino leva a um desenovelamento proteico parcial. O incremento de pressão também promove o deslocamento do pico de  $\lambda$  máximo chegando em 355,0 nm em 2,5 kbar em pH de 11,0, indicando seu completo desenovelamento. Entretanto, o  $\lambda$  máximo é novamente deslocado para menor comprimento de onda (347,9 nm), indicando que o desenovelamento é parcialmente revertido após descompressão (Figura 9).



Figura 9. Fluorescência de Trp dos Cl de proteína E de ZIKV. Os valores foram obtidos utilizando excitação de 290 nm e emissão entre 300 e 400 nm.



Figura 10. Deslocamento de  $\lambda$  máximos de Cl de proteína E submetidos à pressão crescente. As suspensões de Cl foram incubadas por 15 minutos em cada condição de pressão antes da aplicação do próximo nível de pressão.

A incubação dos CI em alta pressão em pH alcalino, leva ao deslocamento do pico de fluorescência do Trp para comprimentos de onda maiores, indicando maior grau de desenovelamento da proteína do que na condição em pH 7,0 (Figura 10). Em pH 12 observamos pico de fluorescência em 346,9 nm, indicando um deslocamento de 4,2 nm em relação à suspensão não tratada, porém, bem menor do que os 13,3 nm de deslocamento para 355,0 nm quando da completa desnaturação pela presença de 6M de GdnHCI. Os resultados obtidos indicam que todos os quatro fatores: elevação de pH, presença de GdnHCI, de arginina e a alta pressão promoveram o desenovelamento proteico, mas a associação de alta pressão e pH alcalino (10-12) foi a condição que mostrou solubilização eficiente (Figuras 5 a 7) com menor desnaturação proteica (Figura 10).



Figura 11. Efeito do pH, presença de GdnHCI e arginina no  $\lambda$  máximo dos CI de proteína E de ZIKAV. Os valores foram obtidos utilizando excitação de 290 nm com emissão entre 300 e 400 nm. A) Curva de  $\lambda$  máximo x pH; B) Curva de  $\lambda$  máximo x concentração de GdnHCI (pH 8,5); C) Curva de  $\lambda$  máximo x concentração de Arginina (pH 11,0).

Foram determinadas por leitura de absorbância em comprimento de onda de 280 nm as concentrações de proteína E de ZIKV nos sobrenadantes das suspensões de CI que foram submetidas à alta pressão ou que foram incubados em pressão atmosférica na presença dos agentes caotrópicos e diferentes níveis de pH, nas condições mostradas nas Figuras 5, 6 e 10, seguido de diálise em TrisHCI 50mM pH 8,5 e centrifugadas a 12000 x g para retirada dos agregados insolúveis. O valor maior de absorbância, que indica a maior concentração de proteína E, foi observado no sobrenadante da suspensão que foi submetido à 2,4 kbar/0,4 kbar em pH 11,0 seguido de diálise (Figura 11A). Os dados de leitura de espalhamento de luz indicam que houve solubilização eficiente dos CI quando a suspensão foi submetida à alta pressão na presença de GdnHCI (Figura 5B), e por isso os baixos valores de absorbância observados para os sobrenadantes das suspensões incubadas em alta pressão na presença de GdnHCl sugerem que houve reagregação da proteína solubilizada durante a diálise (Figura 11B). A presença de arginina aparentemente não teve efeito positivo na concentração de proteína E solúvel após diálise (Figura 11C).

As leituras de absorbância das amostras que foram solubilizadas em pressão atmosférica foram menores do que os das amostras submetidas à alta pressão, neste caso provavelmente devido ao baixo grau se solubilização. Portanto na busca pelas melhores condições de renaturação da proteína E de ZIKV, resolvemos investir nossos esforços, em condições que foram obtidos maiores rendimentos de proteína solúvel, que foi a aplicação da alta pressão associado ao pH alcalino na ausência ou na presença de até 0,2M de arginina.



**Figura 12. Efeito do pH, GdnHCI e arginina sobre a concentração de proteína E de ZIKV renaturada.** Solubilização monitorada por espectrofotometria a 280nm dos sobrenadantes de CI incubados por 16 horas em pressão atmosférica ou 2,4 kbar/0,4 kbar. As amostras foram centrifugadas para retirada dos agregados insolúveis, logo após realizada diálise em TrisHCI 50mM pH8,5 e em seguida centrifugadas novamente. A, Curva de A<sub>280</sub> x pH; B, Curva de A<sub>280</sub> x concentração de GdnHCI; C, Curva A<sub>280</sub> x concentração de Arginina.

Sobrenadantes das suspensões de CI solubilizadas em 2,4 kbar/0,4 kbar e pH entre 7 e 12 foram analisadas por cromatografia de exclusão molecular em coluna Superdex 200 10/300. Esta coluna foi calibrada com padrões de peso molecular de 44 kDa a 88 kDa (monômero, e dímero de ovalbumina, com massa molecular de 44,4 kDa e monômero de albumina bovina, com massa molecular de 66,4 kDa). Foi obtida a curva de regressão linear: Y= -26,0 X + 385,7 (N= 3, r<sup>2</sup>= 9,989). Monômeros de proteína E de zika apresentam massa molecular de 44,988 kDa. Os sobrenantes dos CI que foram submetidos à pressão em pH entre 7 e 9 mostram picos pequenos em volumes de eluição que correspondem ao volume de exclusão da coluna (8,2 mL) e provavelmente se tratam de oligômeros de proteína E apresentando alto peso molecular. Os picos com volumes de eluição de aproximadamente 11,0 mL que se tornam mais intensos nos pHs entre 10 e 12 possivelmente se tratam de dímeros de proteína E, pois a massa molecular calculada para este volume de eluição pela reta de regressão linear é de 99,7 kDa (Figura 12). Esses dados confirmam os resultados anteriores: que a proteína E é eficientemente solubilizada em pH acima de 10 e incubação em alta pressão.



Figura 13. Efeito do pH sobre a dissociação de proteína E em alta pressão analisado por cromatografia de exclusão molecular. Análise de sobrenadantes de CI submetidos a 2,4 kbar/0,4 kbar em diferentes pH em coluna Superdex 200 10/300. Para a análise dos sobrenadantes das amostras solubilizadas em pH entre 7 e 9 a coluna foi ambientada e as amostras foram eluidas em TrisHCI 50 mM, pH 8,5. Para as amostras de pH entre 10 e 12 foi utilizado tampão CAPS 50 mM com pH de 11 para ambientação da coluna e eluição.

A proteína E que foi solubilizada em 2,4 kbar/0,4 kbar e pH 11,0 se manteve estável, não reagregando após diluição em tampão Tris HCl 50 mM pH 8,5 (Figura 13). A concentração de proteína no experimento mostrado na Figura 13 foi de 0,17 mg/ml. Os cromatogramas da amostra não diluida e das amostras diluidas apresentam picos que provavelmente correspondem ao dímero (volume de eluição = 10,9 mL: 101,9 kDa) e monômero (volume de eluição = 12,2 mL: 68,1 kDa) de proteína E.



Figura 14. Cromatogramas em coluna de exclusão molecular de sobrenadantes de CI diluídos em pH 8,5. Análise de sobrenadantes de CI submetidos a 2,4 kbar/0,4 kbar em pH 11 sem diluir, dluídas 2x ou diluídas 4x em coluna Superdex 200 10/300 ambientada com TrisHCI 50 mM pH 8,5. Os valores de absorbância foram normalizados para as intensidades da amostra não diluída. As amostras foram diluídas em TrisHCI 50 mM, pH 8,5.

Na Figura 14 analisamos a cromatografia por exclusão molecular dos sobrenantes dos CI que foram submetidos à pressão de 2,4 kbar/0,4 kbar em pH 10,0 e 10,5 na presença ou ausência de arginina e posteriormente dializados. O pico de absorbância mais intenso do sobrenadante solubilizado em pH 10 é o que eluiu em volume de 8,5 mL, se tratando possivelmente de oligômeros de E com alta massa molecular. Este pico com maior intensidade é deslocado para maiores volumes de eluição quando do incremento do pH para 10,5 ou pela presença de arginina, o que sugere que os oligômeros são possivelmente solubilizados para dímeros (aproximadamente 11,0 mL) e monômeros (12,5 mL) de E.



**Figura 14. Efeito do pH e presença de arginina sobre a renaturação de proteína E analisado por cromatografia de exclusão molecular**. Amostras submetidas à 2,4 kbar/0,4 kbar em pH 10,0 e 10,5 na ausência e na presença de 0,2 M de arginina, com diálise posterior para pH 8,5.

Bandas de proteína E com intensidades similares em SDS-PAGE foram obtidas para os sobrenadantes da suspensão de CI submetidos à 2,4 kbar/0,4 kbar em pH 10 a 11 com diálise posterior para pH 8,5 o que indica que foram obtidos altos rendimentos de proteína E solúvel e estável a partir dos agregados insolúveis. O rendimento calculado a partir da análise das bandas em SDS-PAGE utilizando-se o programa Image J foi de aproximadamente 90%. A presença de arginina não teve efeito significativo na solubilização ou na estabilização da proteína E (Figura 15).



**Figura 15.** Análise por SDS-PAGE de sobrenadantes de suspensões de CI de E de ZIKV. A, amostras submetidas à 2,4 kbar/0,4 kbar em pH 10,0, pH 10,5 e pH 11,0 na ausência ou na presença de 0,2 M de arginina e diálise posterior em Tris HCI 50 mM pH 8,5; B, amostras submetidas à 2,4 kbar/0,4 kbar em pH 10,0, pH 10,5 e pH 11,0 na ausência ou na presença de 0,2 M de arginina, com diálise posterior em Tris HCI 50 mM pH 8,5

Com base nos cromatogramas de exclusão molecular da figura 14, foram calculados os percentuais de oligômeros, dímeros e monômeros de proteína E de ZIKV (Tabela 1). A amostra solubilizada em pH 10 e ausência de arginina apresentou mais de 50% de oligômeros e menor porcentual de dímeros e monômeros. Foram obtidos porcentagens similares entre as amostras solubilizadas em pH 10,5 na ausência de arginina e aquelas solubilizadas em pH 10,0 e 10,5 que foram solubilizadas na presença de arginina: por volta de 52 % de dímeros, de 41% de monômeros e menos de 10% de oligômeros. Esses dados confirmam os resultados analisados anteriormente, que mostram que a proteína E é solubilizada eficientemente em alta pressão associado com pH alcalino. Estes resultados também demonstraram que a presença de arginina em pH de 10 auxilia a dissociação dos oligômeros para isoformas de menor massa molecular.

	Oligômeros (%)	Dímeros (%)	Monômeros (%)
рН 10,0	51,9	33,0	15,0
pH 10,0 + arg	8,5	53,9	37,4
рН 10,5	8,9	52,8	38,1
pH 10,5 + arg	4,9	48,1	46,8

Tabela 1. Porcentagens de isoformas de E nos sobrenadantes de CI submetidos à pressão

A proteína E de ZIKV apresenta 12 cisteínas, com 6 pontes S-S intramoleculares. Realizamos um experimento para determinar se a formação de pontes dissulfeto poderia ser facilitada na presença de um par oxido-redutor. Algumas publicações demonstraram processos eficazes de renaturação de proteínas em alta pressão hidrostática utilizando os reagentes oxidante e redutor (par glutationa oxidada, GSSG e Glutationa reduzida, GSH) para estimular a formação correta das pontes S-S intramoleculares (Chura-Chambi, Genova, Affonso, & Morganti, 2008; St John, Carpenter, & Randolph, 2002). Baseado nestes estudos utilizamos o mesmo princípio para a renaturação de proteína E de ZIKV aplicando pressão de 2,4 kbar/0,4 kbar a uma suspensão de CI em pH 11 e presença de 0,2 M de arginina contendo as seguintes proporções de glutationas: 2 mM GSH: 0,2 mM GSSG. Após a diálise em TrisHCL 50mM pH 8,5 e centrifugação das amostras os sobrenadantes foram analisados por SDS-PAGE. Aparentemente a presença do par oxido-redutor não afetou o rendimento de obtenção de proteína E solúvel (Figura 16 A). As amostras que foram reduzidas pela adição do reagente oxidante DTT ao tampão de amostra do SDS-PAGE tiveram um deslocamento eletroforético menor do que as amostras que não foram reduzidas, que é o padrão esperado, pois a formação de pontes S-S intramoleculares dá estabilidade à proteína e confere à mesma um menor volume do que a proteína teria sem o enovelamento decorrente dessas ligações.



Figura 15. Análise por SDS-PAGE do efeito da presença do par redox na renaturação de E de ZIKV. A, análise por SDS-PAGE de suspensão de CI e amostras de sobrenadantes das suspensões de CI submetidas à 2,4 kbar/0,4 kbar em pH 11 na ausência e na presença de 0,2 M de arginina e na presença ou ausência de 1mM de GSH e 0,1mM de GSSG, com diálise posterior em TrisHCI 50 mM pH 8,5. B, Porcentagem de rendimento de E solúvel em relação às concentrações de proteína na suspensão de CI.

Considerando que o nível de contaminação dos CI de E de ZIKV por proteínas de *E. coli* é baixo, como podemos verificar no géis de eletroforese (por exemplo da Figura 16), usamos o metodo de determinação de absorbância a 280nm para quantificação da ZIKV-E, utilizando o valor de Abs 0,1% = 1,204. A quantificação de proteína E solubilizada pela aplicação de alta pressão e o rendimento de proteína por litro de cultura bacteriana de alguns experimentos realizados separadamente são apresentados na tabela 2. O rendimento de renaturação de ZIKV-E foi baixo quando a suspensão foi submetida em pressão com pH de 7, mas os valores aumentaram em pH até 9 e estabilizaram em pH mais elevados. A fim de comparação, na mesma tabela apresentamos também o rendimento de proteína E de ZIKV utilizando o protocolo descrito em Amorim e cols. (Amorim et al., 2010) para a renaturação da proteína NS1 de DENV em pressão atmosférica e que utilizou a mesma proteína E, produzida com o mesmo sistema de expressão. O rendimento volumétrico da proteína renaturada pela aplicação de 2,4 kbar/0,4 kbar em pH 10,5, seguido de diálise foi alto, de 131,6 mg/L de cultura, aproximadamente 40 vezes maior do que o rendimento obtido utilizando-se o processo de renturação em pressão atmosférica.

Com base nos resultados da Tabela 2, que demonstram bons rendimentos de renaturação de proteína E pela aplicação de pressão aos CI em pH a partir de 10,0, dos resultados da Tabela 1 que mostram a presença de oligômeros de E no sobrenadante da suspensão de CI submetidos à compressão em pH de 10,0, mas que estes oligômeros são solubilizados na presença de arginina ou em pH de 10,5 e também dos resultados da Figura 10, que indicam que houve pouca desnaturação da proteína E submetida à compressão em pH 10,0-11,0, concluímos que as condições menos desnaturantes em que foram obtido bons rendimentos de proteína, foram a aplicação de pressão à suspensão de CI em pH 10,0 na presença de arginina ou em pH 10,5 na ausência ou na presença deste aminoácido.

Condições de solubilização	Quantificação de proteína E no sobrenadante pós dialise	Proteína E por L de cultura bacteriana
pH 7,0	0,039 mg/mL	29,6 mg/L
pH 8,0	0,070 mg/mL	53,2 mg/L
pH 9,0	0,107 mg/mL	81,4 mg/L
pH 10,0	0,164 mg/mL	124,8 mg/L
pH 10,5	0,173 mg/mL	131,6 mg/L
pH 11,0	0,170 mg/mL	129,3 mg/L
pH 11,0 + Arg 0,2M	0,155 mg/mL	117,9 mg/L
pH 11,0 + Arg 0,2M + GSH 2mM/GSSH0,2mM	0,151 mg/mL	114,9 mg/L
LDV: ZIKV-E reenovelada no Laboratório de Desenvolvimento Vacinal **	-	3,2 mg/L*

Tabela 2. Rendimento de renaturação de proteína E de ZIKV.

\* Informação pessoal

\*\* Para a renaturação de ZIKV-E foi utilizado o protocolo descrito em Amorim e cols (Amorim, 2014).

Foram realizados testes de ELISA a fim de avaliarmos a reatividade proteína E de ZIKV renaturada em alta pressão e pH de 10,5 na presença de arginina e par redox. O soro de indivíduo exposto a este vírus apresentou reatividade pelas amostras analisadas enquanto o soro de indivíduo não exposto apresentou baixa reatividade (Figura 17), resultado que indica a utilidade da proteína renaturada nestas condições para a realização de ensaios diagnósticos.



Figura 16. Avaliação da reatividade de proteína E de ZIKV em teste de ELISA. Amostras obtidas pela solubilização dos CI em 2,4 kbar/0,4 kbar em pH de 10,5. Alíquotas das proteínas (2ng/µl) foram utilizadas como antígeno de fase sólida em ensaio de ELISA empregando soro obtido de paciente previamente infectado (barras pretas) ou não (barras brancas) com o ZIKV.

Rouvinski e cols (Rouvinski et al., 2017) demonstraram que a proteína E de DENV contendo uma mutação que substitui o resíduo de alanina 259 por um de cisteína (A259C) no domínio II é expressa como dímeros em células S2 de Drosophila. Os autores demonstraram que os dímeros são estabilizados por pontes dissulfeto inter-subunidades. As vantagens da E dimérica para a produção de vacinas de subunidades seria a menor exposição do epítopo FLE que induz a formação de anticorpos com ampla reação cruzada e pouco neutralizantes e maior exposição do epítopo EDE que é muito potente e altamente neutralizante (Dejnirattisai et al., 2015). O artigo de Slon Campos e cols também descreveu a produção de mutante de E de ZIKV (A264C) em células de mamífero e obtenção de dímeros estabilizados por ponte S-S (Slon Campos et al., 2017). Acreditando que poderíamos ter resultados similares aos obtidos nestes estudos foi produzido um plasmídeo contendo um inserto do clone de proteína E de ZIKV com a mesma mutação (A264C). Os CI produzidos pelas bactérias transformadas foram submetidos ao procedimento de renaturação em pH de 11,0 a 2,4 kbar/0,4 kbar e o sobrenadante foi posteriormente submetido à diálise. Acreditávamos na possibilidade de elevação da concentração de dímeros e redução da presença de monômeros. Entretanto, o cromatograma da proteína A264C enovelada nessas condições foi muito similar ao da E selvagem (Figura 14): presença de dímeros e monômeros, semelhantemente aos resultados obtidos pela análise da proteína selvagem. Não realizamos mais experimentos com essas proteínas mutantes devido ao fato de não termos obtido os resultado esperados.



**Figura 17. Proteína E de ZIKV mutante (A264C) analisada por SEC.** Os CI foram submetidos a 2,4 kbar/0,4 kbar em pH de 11,0, dializado contra TrisHCI 50 mM pH 8,5 e analizado em coluna Superdex 200 10/300 no mesmo tampão.

#### 4.2 Domínio III de proteína E de ZIKV (EDIII)

A solubilização dos CI de EDIII de ZIKV pela ação de alta pressão (2,4 kbar/0,4 kbar) e em pH de 7,0 a 12,0 também foi monitorada por leituras de LS. Em pH a partir de 10,0 podemos observar valores muito baixos de espalhamento de luz visível nas amostras submetidas à pressão (Figura 19A). As bandas de EDIII solubilizadas das suspensões de CI que foram submetidas a 2,4 kbar/0,4 kbar e pH a partir de 10,0 apresentam intensidades similares às bandas deste fragmento na suspensão de CI (Figura 20A e 20B), o que sugere que estas condições foram muito eficientes na solubilização dos agregados. A presença de GdnHCl, principalmente a partir de 1 M em associação com a alta pressão induziu a uma queda considerável nos valores de espalhamento de luz, indicando dissociação eficiente dos agregados (Figura 19B). A presença de arginina não provocou queda no valor de espalhamento de luz em relação à suspensão submetida à pressão na ausência de arginina devido ao fato de que a curva de arginina foi realizada em pH 11,0 e em 2,4 kbar/0,4 kbar, condição que já induz dissociação dos agregados (Figura 19C). Conforme esperado, a solubilização de CI de EDIII das suspensões incubadas em 1 bar foram menos eficientes do que a das amostras submetidas à alta pressão (Figuras 19 e 20).



**Figura 18. Efeito da alta pressão sobre CI de EDIII de ZIKV monitorado por leituras de espalhamento de luz.** Amostras submetidas à alta pressão (2,4 kbar/0,4 kbar) ou pressão atmosférica (1bar). T=0 indica o tempo inicial em que as amostras foram preparadas. Em (a) curva de LS x pH; (b) Curva de LS x concentração de GdnHCI (pH 8,5) e (c) Curva LS x concentração de Arginina em pH 11,0. As amostras foram analisadas em espectrofluorímetro com excitação de 320 nm. A emissão foi determinada entre 315 e 325 nm.



Figura 19. SDS Efeito do pH na solubilização de CI de EDIII de ZIKV analisado por SDS-PAGE. Em (a) incubação em pressão atmosférica; em (b) CI incubação em 2,4 kbar/0,4 kbar.

Assim como nas suspensões dos CI da proteína E de ZIKV, também analisamos o efeito da alta pressão nos CI de EDIII por MEV. Os CI de EDIII (Figuras 21A e 21C) foram quase completamente suprimidos após tratamento em HHP e pH de 11,0 (Figuras 21B e 21D), o que demonstra que os agregados foram eficientemente solubilizados pela aplicação de alta pressão e pH alcalino.



**Figura 20. CI de EDIII de ZIKV analisados por microscopia eletrônica de varredura.** A e C, suspensões de CI e em B e D, frações insolúveis de CI que foram tratados em HHP em pH de 10,5. Em A e B, imagens ampliadas em 1000x. C e D, imagens ampliadas em 8000x.

A proteína EDIII apresenta somente 1 resíduo de Trp. A suspensão do CI de EDIII em pH 7 apresenta um pico máximo de fluorescência em 338 nm. A desnaturação total, promovida na presença de 6M de GdnHCI promoveu o deslocamento de 17,7 nm do pico de Trp para 355,7 nm (Figura 22). Como já era esperado, houve deslocamento dos picos de fluorescência para comprimentos de onda maiores, com uma diferença de 9,2 nm com a elevação do pH para 11,0 e de 11,7 nm com a elevação do pH para 12,0 mostrando que houve a exposição do resíduo Trp ao solvente e uma desnaturação proteica parcial (Figura 23). A presença de arginina promoveu um deslocamento significativo do pico de fluorescência, enquanto que a presença de GdnHCI em 3M levou à desnaturação quase total da proteína que foi submetida à alta pressão e também aquela incubada em pressão atmosférica com pico em 353,7 nm (Figura 23).



Figura 21. Fluorescência intrínseca do Trp de CI de EDIII de ZIKAV.



Figura 22 Efeito do pH, presença de GdnHCl e de arginina no  $\lambda$  máximo dos Cl de EDIII. Amostras submetidas à 2,4 kbar/0,4 kbar ou incubados em 1 bar. Em (a) Curva de  $\lambda$  máximo x pH; em (b) Curva de  $\lambda$  máximo x concentração de GdnHCl pH 8,5; e em (c) Curva  $\lambda$  máximo x concentração de arginina (pH 11,0). Os valores foram obtidos utilizando-se excitação de 290 nm e a emissão foi determinada entre 300 e 400 nm.

A absorbância em 280 nm foi utilizada para a determinação da concentração de EDIII nos sobrenadantes das suspensões que foram submetidas aos processos de aplicação de alta pressão e diálise dos sobrenadantes. A EDIII solubilizada em alta pressão e na presença de GdnHCI comportou-se de modo semelhante à proteína E: foi obtido valor menor de absorbância em relação aos sobrenadantes das suspensões submetidas à alta pressão em pH alcalino na presença de arginina ou não. Este comportamento possivelmente ocorre devido à reagregação (Figura 24). Os sobrenadantes das suspensões mantidas em 1 bar também apresentaram valores baixos de absorbância, indicando baixa concentração proteica, refletindo o baixo grau de solubilização dos CI.

Portanto, estabelecemos que as condições para obtermos o melhor rendimento de EDIII solúvel e estável é a associação do pH alcalino com aplicação de alta pressão na ausência ou na presença de até 0,2M de arginina.



**Figura 23. Efeito do pH, GdnHCI e arginina sobre o rendimento de renaturação de EDIII de ZIKV.** Solubilização monitorada por espectrofotometria a 280nm dos sobrenadantes de CI submetidos a pressão atmosférica e alta pressão hidrostática. Em (a) curva de A<sub>280</sub> nm x pH; em (b) curva de A<sub>280</sub> nm x concentração de arginina; e em (c) curva A<sub>280</sub> nm x concentração de GdnHCI.

A EDIII apresenta 14,762 kDa. SDS-PAGE foi utilizado para análise da EDIII nos sobrenadantes das suspensões de CI submetidas a alta pressão em pH 10,0, pH 10,5 e pH 11,0 na presença de 0,2 M de arginina ou na sua ausência e submetidos à diálise em pH 8,5. Foram obtidas bandas com intensidade levemente mais intensas nos sobrenadantes das amostras submetidas à pressão na ausência de arginina do que nos sobrenadantes das amostras que haviam sido submetidas à pressão na presença de arginina, o que indica que a presença de arginina não auxiliou na solubilização dos agregados insolúveis ou na estabilização desta proteína (Figura 25).



**Figura 24. Efeito da presença de arginina sobre a renaturação de EDIII analisada por SDS-PAGE.** Amostras de sobrenadantes das suspensões de CI em pH 10,0, pH 10,5 e pH 11,0 na ausência e na presença de 0,2 M de arginina e submetidas à diálise posterior em TrisHCI 50 mM pH 8,5.

SDS-PAGE foi também utilizado para análise de EDIII solubilizada pela aplicação de 2,4 kbar/0,4 kbar à suspensão de CI em pH 11,0 na presença de arginina em 0,2M e na ausência de glutationas ou na presença de 2 mM de GSH e 0,2 mM de GSSG. A presença de glutationas provocou uma leve diminuição na intensidade das bandas de EDIII solúvel, conforme podemos observar nas amostras reduzidas do SDS-PAGE (Figura 26). A presença de bandas de aproximadamente 30 kDa, possivelmente dímeros, podem ser observadas nas amostras não reduzidas e que foram submetidas à pressão na ausência do par redox. A presença de dímeros que são dissociados para monômeros em condições redutoras (Figura 26) indica que estas isoformas podem ser estabilizados por ligações dissulfeto.



Figura 25 Análise por SDS-PAGE do efeito da presença de arginina e glutationas sobre a renaturação de EDIII. Amostras de sobrenadantes das suspensões de CI submetidas à 2,4 kbar/0,4 kbar em pH 11,0 na presença e ausência de arginina e par redox. A, SDS-PAGE de suspensão de CI e amostras de sobrenadantes das suspensões de CI submetidas à 2,4 kbar/0,4 kbar em pH 11,0 na presença de arginina e ausência ou presença de 2 mM GSH e 0,2 mM GSSG e submetidas à diálise posterior em TrisHCI 50 mM pH 8,5. B, rendimento solúvel em relação à quantidade de proteína na suspensão de CI.

Para quantificação da EDIII utilizamos o método de determinação de absorbância a 280nm, utilizando o valor de Abs 0,1% = 0,574. O rendimento de enovelamento de EDIII foi se tornando mais elevado conforme o pH foi sendo aumentado em pH entre 7,0 e 10,0 e atingindo a estabilidade a partir deste pH (Tabela 3). A quantificação pela absorbância indicou valores semelhantes de EDIII nos sobrenadantes da amostras submetidas à pressão na presença ou na ausência de arginina. O rendimento de enovelamento utilizando a alta pressão foi por volta de 35 vezes mais elevado do que o valor obtido para a amostra renaturada no LDV utilizando técnica tradicional em pressão atmosférica descrito em Amorim e cols (Amorim, 2014).

Deverão ser realizados testes posteriores para verificarmos se existe diferença de reatividade das proteínas obtidas em diferentes pH e na presença ou ausência de arginina. A condição escolhida com base nos dados que dispomos para a renaturação de proteína E foi a de compressão dos CI em pH de 10,0.

Condições de Renaturação	Quantificação de EDIII no sobrenadante pós diálise	EDIII /L de cultura bacteriana
pH 7,0	0,092 mg/mL	13,1 mg/L
pH 8,0	0,102 mg/mL	14,5 mg/L
pH 9,0	0,111 mg/mL	15,8 mg/L
pH 10,0	0,222 mg/mL	31,6 mg/L
pH 10,5	0,247 mg/mL	35,2 mg/L
pH 11,0	0,241 mg/mL	34,2 mg/L
pH 11,0 + Arg 0,2M	0,251 mg/mL	35,7 mg/L
pH 11,0 + Arg 0,2M + GSH 2mM/GSSH0,2mM	0,220 mg/mL	31,3 mg/L
LDV: ZIKV-E enovelada no Laboratório de Desenvolvimento Vacinal	-	1,0 mg/L
* Informação pessoal		

Tabela 3. Rendimento de renaturação de EDIII de ZIKV.

Como esperado, a reatividade de anticorpos de paciente previamente exposto ao ZIKV ao fragmento EDIII renaturado em alta pressão, determinada em ensaio de ELISA foi maior do que a reatividade de indivíduo não exposto a este vírus (Figura 27).



**Figura 26 Avaliação da reatividade de EDIII de ZIKV em teste de ELISA.** Amostras obtidas pela solubilização dos CI em 2,4 kbar/0,4 kbar em pH 10,5 em diferentes condições. Alíquotas das proteínas (2ng/µI) foram utilizadas como antígeno de fase sólida em ensaio de ELISA empregando soro controle obtido de pacientes previamente infectado (barras pretas) ou não (barras brancas) com o ZIKV. Os valores são expressos em média ± erro dos títulos de anticorpos IgG antígeno específicos.

#### 5. CONCLUSÕES

Pelo que é de nosso conhecimento não constam na literatura artigos que descrevam processos de renaturação de proteína E ou do fragmento de EDIII de ZIKV. Os nossos resultados demonstraram que conseguimos estabelecer um processo rápido, fácil e eficiente para a renaturação desta proteína e do seu fragmento. Além disso, utilizamos um processo inovador que é a associação de utilização de alta pressão e pH alcalino para a solubilização dos agregados. Esta associação se mostrou eficiente para promover a solubilização e pouco desnaturante em relação aos processos tradicionais que utilizam altas concentrações de uréia com a mesma finalidade. A vantagem é a manutenção de estruturas secundárias e até terciárias semelhantes às estruturas nativas que estão presentes nos CI produzidos por *E. coli* geneticamente modificadas. Foram obtidos os rendimentos volumétricos de 130 mg de proteína E e 35 mg de EDIII por litro de cultura bacteriana, valores 35 a 40 vezes superiores do que os obtidos utilizando-se um protocolo tradicional de renaturação pela solubilização dos CI utilizando-se 8M de uréia (Amorim et al., 2010). O artigo de Ganguly e cols. descreve o processo de renaturação de proteína E de DENV a partir de CI. Foi obtido um rendimento de 12-16 mg/L de cultura bacteriana de proteína E de DENV solubilizada em uréia 8M e purificada por cromatografia de afinidade por metais imobilizados (Ganguly et al., 2013). O artigo de Pattnaik e cols (Pattnaik et al., 2007) descreve o processo de renaturação de EDIII de DENV tipo 4, mas não cita o rendimento de renaturação. O artigo de Zhang e cols (Zhang et al., 2007) descreve um rendimento de 25 mg de EDIII de DENV tipo 2 purificada/L de cultura, rendimento inferior ao obtido no nosso estudo para a EDIII de ZIKV. Todos estes processos são mais trabalhosos e demorados do que o descrito no presente estudo. Nenhum destes artigos cita, entretanto, a porcentagem de renaturação de proteína E ou EDIII de DENV em relação à quantidade dessas proteínas nas suspensões de CI e por isso não podemos fazer a comparação entre os nossos dados e os da literatura. Entretanto, a comparação entre as porcentagens dos rendimentos obtidos utilizando-se o processo descrito no presente estudo, que foram de 92% de recuperação de E e de 80% de recuperação de EDIII, foram muito mais elevados do que os obtidos utilizando-se o processo de renaturação

em pressão atmosférica (Amorim et al., 2010), que foram de 3,5% e de 2,3%, respectivamente.

Os resultados do presente estudo demonstram a padronização de um processo extremamente eficiente de produção de proteína de envelope e de seu fragmento EDIII de ZIKV, que poderá ser utilizado para a produção de reagentes para ensaios diagnósticos e possivelmente para a produção de vacinas de subunidades. Além disso, este processo inovador poderá também ser utilizado para a produção de outras proteínas de interesse.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- Abbink P, Larocca RA, De La Barrera RA, et al.: Protective efficacy of multiple vaccine platforms against Zika virus challenge in rhesus monkeys. Science 353:1129-1132.
- Abbink P, Larocca RA, De La Barrera RA, et al.: Protective efficacy of multiple vaccine platforms against Zika virus challenge in rhesus monkeys. Science 353:1129-1132, 2016.
- Amorim JH, Porchia BFMM, Balan A, et al.: Refolded dengue virus type 2 NS1 protein expressed in Escherichia coli preserves structural and immunological properties of the native protein. Journal of Virological Methods 167:186-192, 2010.
- Amorim JH, Alves RP, Boscardin SB, et al.: The dengue virus non-structural 1 protein: risks and benefits. Virus Res 181:53-60, 2014.
- Arakawa T, Ejima D, Tsumoto K, et al.: Suppression of protein interactions by arginine: a proposed mechanism of the arginine effects. Biophys Chem 127:1-8, 2007.
- Balm MN, Lee CK, Lee HK, et al.: A diagnostic polymerase chain reaction assay for Zika virus. J Med Virol 84:1501-1505, 2012.
- Burstein EA, Vedenkina NS, Ivkova MN: Fluorescence and the location of tryptophan residues in protein molecules. Photochem Photobiol 18:263-279, 1973.
- Chu JJH, Rajamanonmani R, Li J, et al.: Inhibition of West Nile virus entry by using a recombinant domain III from the envelope glycoprotein. Journal of General Virology 86:405-412, 2005.

Chura-Chambi RM, Genova LA, Affonso R, et al.: Refolding of endostatin from inclusion bodies using high hydrostatic pressure. Anal Biochem 379:32-39, 2008.

Clark EDB: Refolding of recombinant proteins. Curr Opin Biotechnol 9:157-163, 1998.

- Combe M, Lacoux X, Martinez J, et al.: Expression, refolding and bio-structural analysis of a tetravalent recombinant dengue envelope domain III protein for serological diagnosis. Protein Expr Purif 133:57-65, 2017.
- Dai LP, Song J, Lu XS, et al.: Structures of the Zika Virus Envelope Protein and Its Complex with a Flavivirus Broadly Protective Antibody. Cell Host & Microbe 19:696-704, 2016.
- de Groot NS, Ventura S: Effect of temperature on protein quality in bacterial inclusion bodies. FEBS Lett 580:6471-6476, 2006.

- Dejnirattisai W, Wongwiwat W, Supasa S, et al.: A new class of highly potent, broadly neutralizing antibodies isolated from viremic patients infected with dengue virus. Nat Immunol 16:170-177, 2015.
- Dejnirattisai W, Supasa P, Wongwiwat W, et al.: Dengue virus sero-cross-reactivity drives antibody-dependent enhancement of infection with zika virus. Nature Immunology 17:1102-1108, 2016.
- Dowd KA, Ko SY, Morabito KM, et al.: Rapid development of a DNA vaccine for Zika virus. Science 354:237-240, 2016.
- Duffy MR, Chen TH, Hancock WT, et al.: Zika virus outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. N Engl J Med 360:2536-2543, 2009.
- Eiberle MK, Jungbauer A: Technical refolding of proteins: Do we have freedom to operate? Biotechnol J 5:547-559, 2010.
- Ganguly A, Malabadi RB, Das D, et al.: Enhanced prokaryotic expression of dengue virus envelope protein. J Pharm Pharm Sci 16:609-621, 2013.
- Haddow AD, Schuh AJ, Yasuda CY, et al.: Genetic characterization of Zika virus strains: geographic expansion of the Asian lineage. PLoS Negl Trop Dis 6:e1477, 2012.
- Hamel R, Dejarnac O, Wichit S, et al.: Biology of Zika Virus Infection in Human Skin Cells. J Virol 89:8880-8896, 2015.
- Kostyuchenko VA, Lim EXY, Zhang SJ, et al.: Structure of the thermally stable Zika virus. Nature 533:425-+, 2016.
- Laemmli UK: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227:680-685, 1970.
- Larocca RA, Abbink P, Peron JPS, et al.: Vaccine protection against Zika virus from Brazil. Nature 536:474-+, 2016.
- Lazear HM, Diamond MS: Zika Virus: New Clinical Syndromes and Its Emergence in the Western Hemisphere. J Virol 90:4864-4875, 2016.
- Musso D, Richard V, Teissier A, et al.: Detection of Zika virus RNA in semen of asymptomatic blood donors. Clin Microbiol Infect, 2016.
- Panchaud A, Stojanov M, Ammerdorffer A, et al.: Emerging Role of Zika Virus in Adverse Fetal and Neonatal Outcomes. Clin Microbiol Rev 29:659-694, 2016.
- Pattnaik P, Babu JP, Verma SK, et al.: Bacterially expressed and refolded envelope protein (domain III) of dengue virus type-4 binds heparan sulfate. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 846:184-194, 2007.
- Plourde AR, Bloch EM: A Literature Review of Zika Virus. Emerg Infect Dis 22:1185-1192, 2016.

- Rathore AS, Bade P, Joshi V, et al.: Refolding of biotech therapeutic proteins expressed in bacteria: review. Journal of Chemical Technology and Biotechnology 88:1794-1806, 2013.
- Roby JA, Setoh YX, Hall RA, et al.: Post-translational regulation and modifications of flavivirus structural proteins. J Gen Virol 96:1551-1569, 2015.
- Rouvinski A, Dejnirattisai W, Guardado-Calvo P, et al.: Covalently linked dengue virus envelope glycoprotein dimers reduce exposure of the immunodominant fusion loop epitope. Nat Commun 8:15411, 2017.
- Samarasekera U, Triunfol M: Concern over Zika virus grips the world. Lancet 387:521-524, 2016.
- Sen P, Ahmad B, Khan RH: Formation of a molten globule like state in bovine serum albumin at alkaline pH. Eur Biophys J 37:1303-1308, 2008.
- Silva JL, Weber G: Pressure stability of proteins. Annu Rev Phys Chem 44:89-113, 1993.
- Silva JL, Foguel D, Royer CA: Pressure provides new insights into protein folding, dynamics and structure. Trends Biochem Sci 26:612-618, 2001.
- Silva JL, Oliveira AC, Vieira TC, et al.: High-pressure chemical biology and biotechnology. Chem Rev 114:7239-7267, 2014.
- Singh A, Upadhyay V, Upadhyay AK, et al.: Protein recovery from inclusion bodies of Escherichia coli using mild solubilization process. Microb Cell Fact 14:41, 2015.
- Slon Campos JL, Marchese S, Rana J, et al.: Temperature-dependent folding allows stable dimerization of secretory and virus-associated E proteins of Dengue and Zika viruses in mammalian cells. Sci Rep 7:966, 2017.
- St John RJ, Carpenter JF, Randolph TW: High-pressure refolding of disulfide-cross-linked lysozyme aggregates: thermodynamics and optimization. Biotechnol Prog 18:565-571, 2002.
- Sukupolvi-Petty S, Austin SK, Engle M, et al.: Structure and function analysis of therapeutic monoclonal antibodies against dengue virus type 2. J Virol 84:9227-9239, 2010.
- Vincentelli R, Canaan S, Campanacci V, et al.: High-throughput automated refolding screening of inclusion bodies. Protein Sci 13:2782-2792, 2004.
- Vogel G: A race to explain Brazil's spike in birth defects. Science 351:110-111, 2016.
- Yang M, Dent M, Lai H, et al.: Immunization of Zika virus envelope protein domain III induces specific and neutralizing immune responses against Zika virus. Vaccine 35:4287-4294, 2017.
- Ye Q, Liu ZY, Han JF, et al.: Genomic characterization and phylogenetic analysis of Zika virus circulating in the Americas. Infect Genet Evol 43:43-49, 2016.

Zhang ZS, Yan YS, Weng YW, et al.: High-level expression of recombinant dengue virus type 2 envelope domain III protein and induction of neutralizing antibodies in BALB/C mice. J Virol Methods 143:125-131, 2007.



INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES Diretoria de Pesquisa, Desenvolvimento e Ensino Av. Prof. Lineu Prestes, 2242 – Cidade Universitária CEP: 05508-000 Fone/Fax(0XX11) 3133-8908 SÃO PAULO – São Paulo – Brasil http://www.ipen.br

O IPEN é uma Autaquia vinculada à Secretaria de Desenvolvimento, associada à Universiade de São Paulo e gerida técnica e administrativamente pela Comissão Nacional de Energia Nuclear, órgão do Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação.