

Expressão, Solubilização e Purificação das proteínas NS1 e EDIII recombinantes do DENV-2 produzidas em plataforma bacteriana**Expression, Solubilization and Purification of NS1 and EDIII recombinant proteins of DENV-2 produced on bacterial platform**

DOI:10.34117/bjdv6n8-075

Recebimento dos originais: 08/08/2020

Aceitação para publicação: 10/08/2020

Danielle Ferreira de Oliveira

Doutora em Biotecnologia da Saúde pela Rede Nordeste de Biotecnologia – RENORBIO
Instituição: Universidade Estadual do Ceará
E-mail: danielle_oliveira83@hotmail.com

Tatiane Rodrigues de Oliveira

Doutora em Farmácia pela Universidade de São Paulo - USP
Instituição: Universidade Estadual do Ceará
E-mail: tatianerroliveira@gmail.com

Eduarda Nattaly Ferreira Nobre Santos

Mestra em Biotecnologia em Saúde Humana e Animal pela Universidade Estadual do Ceará -
UECE
Instituição: Universidade Estadual do Ceará
E-mail: nattalynobre@hotmail.com

Cícero Matheus Lima Amaral

Graduado em Nutrição pela Universidade Estadual do Ceará -UECE
Instituição: Universidade Estadual do Ceará – UECE
E-mail: cicero.matheus@hotmail.com

Bruno Bezerra da Silva

Doutor em Biotecnologia da Saúde pela Rede Nordeste de Biotecnologia – RENORBIO
Instituição: Universidade Estadual do Ceará – UECE
E-mail: brunoxbezerra@gmail.com

Daniel Freire Lima

Graduado em Nutrição pela Universidade Estadual do Ceará -UECE
Instituição: Universidade Estadual do Ceará – UECE
E-mail: freirelimadaniel@gmail.com

Mario Alberto Maestre Herazo

Doutor em Biotecnologia da Saúde pela Rede Nordeste de Biotecnologia – RENORBIO
Instituição: Universidade Estadual do Ceará – UECE
E-mail: mario.brasil.doc@gmail.com

Maria Izabel Florindo Guedes

Doutora em Bioquímica pela Universidade Federal do Ceará - UFC

Instituição: Universidade Estadual do Ceará – UECE

E-mail: izabel.florindo@uece.br

RESUMO

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a expressão das proteínas recombinantes NS1 e EDIII do DENV-2 produzidas em plataforma bacteriana (*Escherichia coli*). Bactérias contendo os genes de interesses foram crescidas e induzidas à expressão em diferentes concentrações de IPTG (0,1 mM; 0,5 mM e 1,0 mM), em seguida, foram solubilizadas em solução contendo 8 M de úreia. As proteínas solúveis foram purificadas por cromatografia de afinidade em coluna de resina Ni-NTA e, posteriormente, quantificadas em aparelho de nanodrop. Ao fim, foram obtidos aproximadamente 63 mg/L para ambas as proteínas. Nossos resultados mostraram que é possível expressar proteínas de interesse em sistema procarioto. Entretanto, faz-se necessário expandir a escala de produção dessas proteínas visando utilização em ensaios de imunodiagnósticos.

Palavras-chave: Dengue, Expressão de proteínas heterólogas, Biotecnologia.

ABSTRACT

The objective of the present work was to evaluate the expression of recombinant proteins NS1 and EDIII of DENV-2 produced in a bacterial platform (*Escherichia coli*). Bacteria containing the genes of interest were grown and induced to expression in different concentrations of IPTG (0.1 mM; 0.5 mM and 1.0 mM), then they were solubilized in a solution containing 8 M urea. The soluble proteins were purified by affinity chromatography on a Ni-NTA resin column and subsequently quantified in a nanodrop apparatus. At the end, approximately 63 mg / L were obtained for both proteins. Our results showed that it is possible to express proteins of interest in a prokaryotic system. However, it is necessary to expand the scale of production of these proteins with a view to use in immunodiagnostic assays.

Keywords: Dengue, Expression of heterologous proteins, Biotechnology.

1 INTRODUÇÃO

A dengue é uma doença infecciosa considerada como um problema global de saúde pública, a sua transmissão é feita pela picada de mosquitos infectados (*Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*) que possuem ampla distribuição geográfica, fato este que faz com que milhões de pessoas sofram risco de serem infectadas por dengue (FAHIMI *et al.*, 2018).

O dengue é composto por uma fita simples de RNA, pertence ao gênero flavivírus da família flaviviridae, possui quatro sorotipos virais (DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4) e é capaz de codificar 3 proteínas estruturais e 7 não estruturais. Dentre estas, destacam-se a proteína estrutural do envelope (E) e a proteína não estrutural 1 (NS1) (GUZMAN *et al.*, 2010).

A glicoproteína NS1 é muito bem conservada nos 4 sorotipos do vírus dengue e sua expressão parece ser crucial para a multiplicação do vírus, sendo relacionada, em alguns trabalhos,

com a patogênese da doença devido ao fato de ter sido encontrado níveis elevados desta proteína no soro de pacientes infectados com dengue (WATANABE *et al.*, 2012).

A proteína E é uma glicoproteína rica em resíduos de cisteína, possui 3 domínios (EDI, EDII e EDIII) e é responsável por estimular a resposta imune do hospedeiro. O domínio III da proteína E (EDIII) apresenta conformação relativamente estável e muitos epítomos específicos, isso faz com que este domínio seja visto como promissor para o desenvolvimento de vacinas com fins diagnósticos (FAHIMI *et al.*, 2018). Atualmente, proteínas virais de importância reconhecida podem ser aplicadas na tecnologia do DNA recombinante, esta tecnologia possibilitou grandes avanços na biotecnologia aplicada à saúde por facilitar a utilização de proteínas para fins terapêuticos (NETO *et al.*, 2009).

Diante disso, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a expressão das proteínas recombinantes NS1 e o domínio III da proteína E do DENV-2 produzidas em plataforma bacteriana (*Escherichia coli*).

2 METODOLOGIA

2.1 EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS NS1 E EDIII RECOMBINANTES DO DENV-2

Bactérias *E. coli* contendo os genes que codificam para a produção das proteínas NS1 e EDIII recombinantes foram crescidas em meio Luria-Bertani (LB) caldo com canamicina, 37°C, 200rpm, overnight. O inóculo crescido foi adicionado na proporção de 1:25 em meio LB, incubados por 2h, 37°C, 200 rpm. Em seguida, foi realizada análise espectrofotométrica da Densidade Óptica (D.O.) das culturas microbianas, devendo estar entre 0,6 - 0,8 nm, lidas em comprimento de onda de 600 nm. Posteriormente, foi adicionado Isopropyl β -D-1- thiogalactopyranoside – IPTG (indutor) em diferentes concentrações (1,0 mM; 0,5 mM e 0,1 mM) incubados por 3 h, 37 °C, 200 rpm. Como controle negativo da indução foi utilizado culturas crescidas nas mesmas condições anteriores, sem adição do indutor. As culturas foram centrifugadas a 8000 rpm, 15 min., 4°C. O pellet resultante da centrifugação foi ressuscitado em tampão de lise (20 mM Tris-HCl, 200 μ g de lisozyrna, 2 mM PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride), 20 mM NaCl e 10% Triton), na proporção de 1:10, seguido de lise por sonicação com amplitude de 45 em 15 ciclos de 15 segundos alternados com 15 segundos de gelo (Q55 SONICATOR - QSONICA). Após as amostras foram centrifugadas a 8000 rpm, 15 min., 4 °C, sendo separados os pellets e os sobrenadantes para análise por eletroforese e western blotting. No western blotting utilizou-se como anticorpo primário anti-Histidina (1:3000) e secundário anti-IgG mouse (1:5000).

2.2 SOLUBILIZAÇÃO DA EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS NS1 E EDIII DO DENV-2

Após expressão das proteínas recombinantes, o pellet resultante da indução foi ressuspenso em tampão de solubilização (500 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, 8 M Úreia, 10% Glicerol) e incubado por 2 h, 37 °C e 200 rpm . Em seguida, a amostra foi centrifugada por 15 min, 37 °C e 5000 rpm (RODRIGUES *et al.*, 2005). Foi separado o sobrenadante e o pellet resultantes para análise por eletroforese e western blotting. No western blotting utilizou-se como anticorpo primário anti-Histidina (1:3000) e secundário anti-IgG mouse (1:5000).

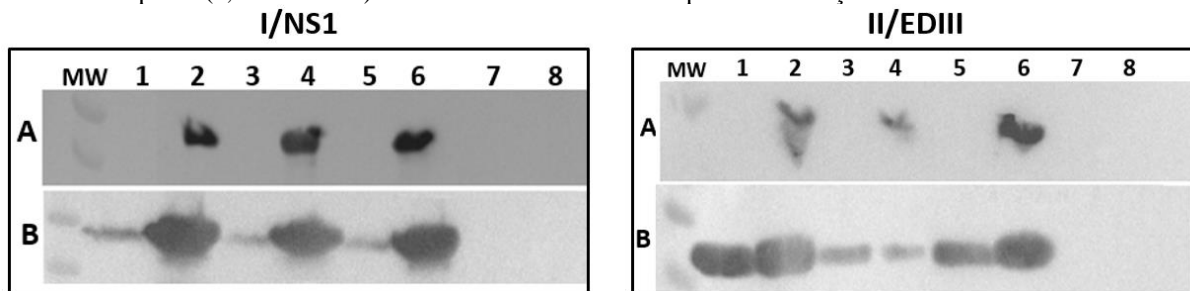
2.3 PURIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES NS1 E EDIII DENV-2

Para purificar as proteínas foi utilizado o método de cromatografia de afinidade em coluna de resina Ni-NTA, segundo protocolo descrito por Rodrigues *et al.* (2005). Após a purificação, as alíquotas das proteínas eluídas e a fração não-ligada foram analisadas por eletroforese e western Blotting, conforme descrito anteriormente. As concentrações das proteínas obtidas foram determinadas pelo método de Bradford, utilizando albumina de soro bovino como padrão, em nanoespectrofotômetro NanoDrop™ spectrophotometers (Thermo Scientific™).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Amorim *et al.* (2014) e Fahimi *et al.* (2014) descrevem que as glicoproteínas NS1 e EDIII do DENV-2 tem peso molecular aparente de 43-48 KDa e 13 KDa, respectivamente. Na figura 1-Ia e 1-IIa, é possível observar o aparecimento de bandas de elevadas intensidades em altura que corrobora com os achados dos autores. Para otimizar a expressão das proteínas recombinantes fez-se uso de um indutor (IPTG), sendo observada a expressão das proteínas igualmente eficiente nas diversas concentração avaliadas. Assim, pode-se utilizar a menor concentração do agente indutor (0,1 mM) por apresentar níveis de expressão semelhantes as demais concentrações.

Figura 1. Western blotting da expressão e solubilização das proteínas recombinantes NS1 e EDIII do vírus Dengue 2, marcada com anticorpo anti-Histidina (1:3000). Em I, proteína NS1 DENV-2 (A) indução e (B) solubilização da proteína. Em II, proteína EDIII DENV-2 (A) indução e (B) solubilização da proteína. MW: marcador de peso molecular. Em 1 e 2: sobrenadante e pellet (0,1 mM IPTG). Em 3 e 4: sobrenadante e pellet (0,5 mM IPTG). Linha 5 e 6: sobrenadante e pellet (1,0 mM IPTG). Linha 7 e 8: sobrenadante e pellet sem adição de IPTG.

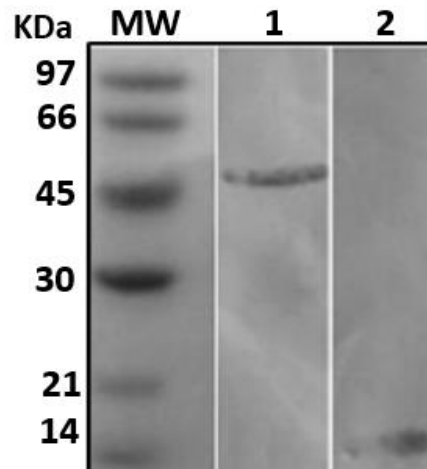


Foi avaliado também se as diferentes concentrações deste agente indutor influenciavam na solubilização das proteínas expressas. Como resultado, detectamos as proteínas associadas as frações insolúveis no lisado celular, Figura 1-I/NS1(A) e Figura 1-II/EDIII(A). Esses achados são indicativos da formação de corpos de inclusão. A utilização de microrganismos como plataforma de expressão de proteínas é uma técnica largamente empregada, de fácil cultivo e manipulação, entretanto, frequentemente durante o processo de tradução da proteína resulta na formação de corpos de inclusão (BATRA *et al.*, 2010).

Diante da formação de corpos de inclusão, foi necessário realizar a solubilização das proteínas com elevadas concentrações de uréia, uma vez que, em concentrações menores de uréia foi visualizada a presença de agregados. Na figura 1-I/NS1(B) nota-se que a proteína NS1 foi pouco solúvel em condições desnaturantes com solução de ureia 8M, enquanto que a proteína EDIII mostrou-se mais solúvel nesta etapa, Figura 1-II/EDIII(B).

As proteínas solúveis foram purificadas (Figura 2) por cromatografia de afinidade aos íons metálicos (Ni^{2+}), que interagem imobilizados na coluna, facilitando a purificação da proteína alvo (ALLONSO *et al.*, 2011). Após a purificação as proteínas foram quantificadas e o rendimento obtido foi de aproximadamente 63 mg/L para ambas as proteínas. Lee *et al.* (2015) e Combe *et al.* (2017) relatam em seus estudos rendimento para as proteínas NS1 e EDIII tetravalente de 40 mg/L e 215 mg/L, respectivamente.

Figura 2. Western blotting da purificação das proteínas recombinantes NS1 e EDIII do vírus Dengue 2 por cromatografia de afinidade Ni-NTA, marcada com anticorpo anti-Histidina (1:3000). MW: marcador de peso molecular. Em 1: proteína NS1. Em 2: proteína EDIII.



4 CONCLUSÃO

A otimização das condições de cultivo tem apontado um caminho promissor para a produção de proteínas heterólogas do DENV. Nossos resultados mostraram que é possível expressar as proteínas de interesse em sistema procarioto com aplicação biotecnológica. Entretanto, faz-se necessário expandir a escala de produção dessas proteínas como objetivo de obter proteínas para utilização em ensaios de imunodiagnósticos.

REFERÊNCIAS

- ALLONSO, D. et al. Polyclonal antibodies against properly folded Dengue virus NS1 protein expressed in *E. coli* enable sensitive and early Dengue diagnosis. **J. Virol. Meth.**, Amsterdam, v. 175, n. 1, p. 109–116, 2011.
- AMORIM, J. H.; et al. The dengue virus non-structural 1 protein: Risks and benefits. **Virus Research**, [s.l.], v. 181, p.53-60, mar. 2014.
- BATRA, G. et al. *Pichia pastoris*-expressed dengue vírus type 2 envelope domain III elicits vírus-neutralizing antibodies. **J. Virol. Meth.**, (S.1), v. 167, n. 1, p. 10-16, 2010
- COMBE, M. et al. Expression, refolding and bio-structural analysis of a tetravalent recombinant dengue envelope domain III protein for serological diagnosis. **Prot. Exp. Purif.**, v. 133, p. 57-65, 2017.
- FAHIMI, H. et al. Dengue viruses and promising envelope protein domain III-based vaccines. **Applied Microbiology And Biotechnology**, [s.l.], v. 102, n. 7, p.2977-2996, 22 fev. 2018.
- FAHIMI, H. et al. Dengue virus type-3 envelope protein domain III; expression and immunogenicity. **Iranian Journal Of Basic Medical Sciences**, [s.i], v. 17, n. 11, p.836-843, 2014

GUZMAN, M. G.; et al. Dengue: a continuing global threat. **Nature Reviews Microbiology**, [s.l.], v. 8, n. 12, p.7-16, dez. 2010. LEE, J. et al. Development and clinical evaluation of a highly accurate Dengue NS1 rapid test: from the preparation of a soluble NS1 antigen to the construction of an RDT. **Diagn. Microb. Inf. Dis.**, v. 82, p. 128–134, 2015.

LEE, J. et al. Development and clinical evaluation of a highly accurate Dengue NS1 rapid test: from the preparation of a soluble NS1 antigen to the construction of an RDT. **Diagn. Microb. Inf. Dis.**, v. 82, p. 128–134, 2015.

NETO, C. R. S.; et al. Biotecnologia para saúde humana: tecnologias, aplicações e inserção na indústria farmacêutica. **BNDES Setorial**, Rio de Janeiro, n. 29 , p. 359-392, mar. 2009.

RODRIGUES, M. H. C.; et al. Antibody response of naturally infected individuals to recombinant Plasmodium vivax apical membrane antigen-1. **International Journal for Parasitology**, São Paulo, v. 35, n. 2, p. 185–192, 2005.

WATANABE, S.; et al. The magnitude of Dengue virus NS1 protein secretion is strain dependent and does not correlate with severe pathologies in the mouse infection model. **J. Virol.**, v. 86, n. 10, p. 5508–14, 2012.