

USO DE POLIPEPTÍDIO ELASTINA-LIKE PARA PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNA NS1 DO VÍRUS DENGUE EXPRESSA EM PLANTA

Kalil Andrade Mubarak Romcy (1); Livia Érika Carlos Marques (2); Ilana Carneiro Lisboa Magalhães (3); Maria Lorena Bonfim Lima (4); Maria Izabel Florindo Guedes (5)

- 1.Universidade Estadual do Ceará (UECE), kakkd12@gmail.com
- 2.Universidade Estadual do Ceará (UECE), liviaerika@hotmail.com
- 3.Universidade Estadual do Ceará (UECE), ilanamagalhaes@hotmail.com
- 4.Universidade Federal do Ceará (UFC), lorenabonfim17@gmail.com
- 5.Universidade Estadual do Ceará (UECE), florinfg@uol.com.br

INTRODUÇÃO

A dengue é uma doença infecciosa causada pelo vírus dengue (DENV), que se apresenta, até então, sob a forma de 4 sorotipos, (DENV 1,2,3 e 4), pertencente à família Flaviviridae (FIGUEIREDO, 2012). Segundo a Organização Mundial da Saúde, a incidência da dengue tem crescido dramaticamente por todo o globo, cerca de 2,5 bilhões de pessoas estão sob risco de contrair dengue (OMS, 2009). O vírus dengue possui genoma de RNA fita simples, cuja expressão codifica uma poliproteína que após processamento segmenta-se em três proteínas estruturais: cápsideo (C), proteína da membrana (M) e glicoproteína do envelope (E), e sete proteínas não estruturais: NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5 (ISLAM, 2015).

Devido ao crescente aumento da incidência desta arbovirose nas Américas, o teste de diagnóstico de laboratório tornou-se ainda mais importante para confirmar a etiologia dessas doenças (CDC, 2016). Das diversas formas de diagnóstico da dengue, os testes sorológicos baseados na captura de anticorpos IgM (MAC)-ELISA, IgG-ELISA e captura de antígenos NS1-ELISA, são os de maior aplicabilidade prática, pois são menos laboriosos e de custo mais acessível, quando comparados aos métodos de isolamento viral ou detecção de ácidos nucleicos (PEELING, 2010). Há uma enorme demanda por antígenos a serem utilizados como reagentes na fabricação de kits de diagnóstico bem como na formulação de vacinas. Todavia, uma vacina segura deve oferecer proteção contra os quatro sorotipos do vírus e isso tem sido um desafio para pesquisadores ao redor do mundo (GHOSH, 2015). A proteína NS1 merece especial destaque devido ao seu potencial imunogênico e propriedades que favorecem a detecção, sendo elegida como marcador biológico adequado para diagnóstico viral precoce (ZHANG, 2014). Esta proteína pode permanecer nas células infectadas ou ser secretada, podendo ser detectada na corrente sanguínea desde o início da infecção (AMORIM, 2013). O emprego de plantas para a produção transiente de antígenos em larga

escala apresenta-se de forma economicamente atrativa e de manuseio fácil, quando comparada às plataformas tradicionais, tendo como vantagem expressão rápida de altos níveis de acumulação de proteínas recombinantes (TSCHOFEN, 2016).

A possibilidade de otimização da plataforma vegetal acresce ainda mais à utilidade desse sistema. A adição de fusões proteicas às proteínas de interesse, possibilitam a aplicação de métodos alternativos de purificação, o que facilita e reduz os custos do processo de obtenção de antígenos, dispensando o uso cromatografia. (CHILKOTI, 1999). A cauda de elastina (ELP) têm demonstrado grande potencial enquanto peptídeo de fusão, não somente no seu papel na purificação, mas também no aumento dos níveis de acumulação das proteínas recombinantes (CONLEY, 2009). Pensando nisso, o presente estudo tem como objetivo a produção e purificação da proteína NS1 do vírus dengue fusionada a ELP pelo método do Ciclo de Transição Inversa.

METODOLOGIA

Foi realizada uma busca de genomas do dengue vírus, depositados no National Center for Biotechnology Information (NCBI), visando obter a sequência mais adequada para a expressão da proteína NS1. A espécie vegetal utilizada para a expressão heteróloga transiente foi a *N. benthamiana*. A sequência foi sintetizada e clonada no vetor pDONRTM (Invitrogen, Carlsbad, USA), e posteriormente subclonada em vetores de expressão binária pCamGate, utilizando Technology® Gateway, foram gerados dois cassetes de expressão, ambos com direcionamento ao retículo endoplasmático (ER), NS1 ER e outro NS1 fusionada a cauda elastina (NS1 ER-ELP).

Uma suspensão de *Agrobacterium tumefaciens* transportando a construção de expressão foi misturada com uma quantidade igual de cultura de *A. tumefaciens* contendo o supressor de silenciamento de genes pós-transcricional p19 e co-infiltrada em folhas de *N. benthamiana*, com seis semanas de idade, através da parte inferior das folhas, utilizando uma seringa. As plantas infiltradas foram mantidas em condições controladas em câmara de crescimento durante 4 dias a 22°C, com um 16 h de fotoperíodo. Para cada planta, três discos de folhas (7 mm de diâmetro) de tecido infiltrado foram recolhidos a partir de diferentes folhas de três plantas independentes para criar três replicatas biológicas. O tecido foi recolhido em tubos de 2 ml, contendo contas de cerâmica 2,3 milímetros e foi rapidamente congelado em nitrogênio líquido e armazenados a -80°C até à sua utilização.

Para a extração de proteínas, as amostras de tecido foram colocadas para homogeneização em blocos pré-arrefecidos no -80°C e foram homogeneizadas duas vezes por 30 segundos usando TissueLyser (Qiagen). As proteínas totais solúveis foram extraídas do tecido utilizando o tampão de extração de proteica (TEP) contendo tampão fosfato gelado (PBS), pH 7,4 com 0,1% de Tween-20, 2% polivinilpirrolidona (PVPP), 1 mM de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), 100 mM ascorbato de sódio, 1mM fenilmetilsulfonil fluoreto (PMSF) e 1 $\mu\text{g/ml}$ de leupeptina. A extração de proteínas a partir de uma planta controle infiltrada com p19 como um controle negativo foi também realizada sob condições semelhantes e a concentração de proteína total solúvel (TSP) foi determinada pelo ensaio de Bradford utilizando albumina de soro bovino (BSA) como padrão.

Para a purificação proteica empregou-se a técnica de Transição Cíclica Inversa, do inglês Inverse Transition Cycling (TCI) com sulfato de amônio. Após a extração proteínas totais, usando o tampão de extração TEP o extrato foi adicionado a tubos previamente pesados contendo diferentes concentrações de sulfato de amônio, testando-se, inicialmente, as concentrações de 0.4M, 0.6M, 0.8M e 1.0M à 23°C objetivando encontrar a concentração ideal para máxima recuperação das proteínas de interesse. O extrato bruto contendo sulfato de amônio foi homogeneizado cuidadosamente por inversão e incubado à 23°C . Em seguida efetuou-se uma centrifugação de 20000g à 23°C por 40 minutos, o sobrenadante 1 (S1) foi removido, o pellet foi ressuspenso em tampão fosfato (PBS) 1X (contendo 0,1% (v/v) de Tween-20) gelado para ressolubilizar as proteínas, posteriormente foi efetuada outra centrifugação de 20000g à 4°C por 10 minutos. Logo após, o sobrenadante contendo a proteína solubilizada (S2) foi coletado e o pellet remanescente foi recuperado em tampão PBS 1X gelado para análises. Uma segunda etapa de purificação foi realizada, onde, manteve-se a concentração de 1.0M e foi adicionada a concentração de 1.2M, ambas testadas sob diferentes temperaturas (23°C e 37°C).

Posteriormente à purificação, foi realizado eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) (4% stacking gel e 10% main gel), seguida de transferência para membrana de PVDF, para análises de western blotting das proteínas purificadas pelo método TCI.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A NS1 foi expressa com sucesso em sistema vegetal. O western blotting revelou acumulação de NS1 de aproximadamente 0,1% de proteína total solúvel (TSP) no ER, mas quando essa proteína foi fusionada a ELP também endereçada ao ER apresentou níveis de acumulação aproximadamente

quarenta vezes maiores de até 1,3% de TSP e um rendimento de 150 mg/kg por peso fresco de folha. Constituindo-se de uma repetição pentapeptídica de aminoácidos, a capacidade da cauda de ELP afetar o rendimento proteico também decorre da quantidade de repetições da mesma na proteína fusionada, como apontado por Meyer et al, 2001, que analisou os efeitos de ELPs com comprimento variando de 90 a 20 repetições. Porém cabe salientar que estudos prévios apontaram uma proporção inversa no rendimento e comprimento da cauda na expressão em *N. benthamiana* (CONLEY, 2009). Desta forma um intermediário com 30 repetições foi utilizado no presente trabalho, objetivando um tamanho adequado para viabilizar a purificação com o mínimo de perdas, se mostrou adequado para purificação das proteínas recombinantes do vírus dengue produzidas em planta. Tal escolha do número de repetições também corrobora com resultados da literatura (CONLEY, 2009).

As análises de purificação por TCI mostraram que a concentração de 0.4M e 0.6M de sal, testadas à 23°C, propiciaram um maior acúmulo de proteínas no sobrenadante 1 (S1). Desta forma, evidenciou-se que estas condições não são suficientes para induzir uma agregação completa da proteína fusionada à ELP, ou seja, ambas as concentrações de sal avaliadas não foram suficientes para precipitar as proteínas recombinantes. Com o aumento da concentração de sal para 0.8M e 1.0M, foi vista uma agregação quase que completa da proteína fusionada, com bandas fracas evidenciadas em S1. Porém, a maior parte das proteínas foram detectadas no pellet (P) na sua forma insolúvel.

Foram feitas novas análises de purificação da proteína NS1 ER ELP nas condições de 1.0M e 1.2M à 23°C e 37°C, visando o acúmulo de proteínas no sobrenadante 2, na sua forma solúvel. Os melhores resultados de recuperação de proteína recombinante testada foram obtidos na concentração de 1.2M à 23°C com aproximadamente 50% da NS1 ER ELP, recuperada na fração S2, em sua forma solúvel e a outra metade recuperada no pellet. Embora metade da proteína permaneceu no pellet, a partir dele foram realizadas sucessivas solubilizações com (PBS) 1X (contendo 0,1% (v/v) de Tween-20) e centrifugações onde foi possível recuperar aproximadamente 75% da proteína recombinante na sua forma solúvel. Entretanto, apesar da proteína na sua forma solúvel seja a desejável no desenvolvimento de testes de diagnóstico em formato ELISA, as proteínas que permaneceram insolúveis podem ser utilizadas em ensaios de imunização de camundongos, onde as macromoléculas, insolúveis ou agregadas geralmente são mais imunogênicas

do que as pequenas e solúveis, porque as moléculas maiores são mais prontamente fagocitadas e processadas.

Visto que a combinação das proteínas recombinantes com elastina pode reduzir os custos de purificação, dispensando o uso de cromatografia, após a confirmação da imunogenicidade da NS1-ELP-ER na presença dos anticorpos dos soros dos pacientes com dengue, análises de purificação foram realizadas a fim de escolher a melhor estratégia de obtenção dessa proteína. As condições ótimas para a purificação da proteína foram estabelecidas utilizando o ciclo de transição inversa, para obter a maior recuperação das proteínas fusionadas a ELP, onde foi possível obter níveis elevados, com a recuperação proteína recombinante quase em sua totalidade, quando somadas as proteínas solúveis do segundo sobrenadante (S2) e as obtidas no pellet, na forma insolúvel. Diante dos resultados apresentados, a expressão de proteínas do vírus dengue de até 150µg/g de peso fresco de folha aqui estabelecida é uma quantidade de sólida base econômica, o que facilita processamento, a purificação, bem como a formulação da vacina e desenvolvimento de um ensaio de diagnóstico de baixo custo para dengue.

CONCLUSÃO

A tag polipeptídeo elastina-like aumentou a acumulação da proteína recombinante no ER, bem com, facilitou a sua obtenção por método simples e barato de purificação. Assim, a adição da elastina a outras proteínas de aplicações clínicas e industriais considerando as vantagens da plataforma de produção vegetal é bastante promissora para obtenção de níveis desejáveis de proteínas recombinantes

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMORIM, Jaime Henrique et al. The dengue virus non-structural 1 protein: Risks and benefits. *Virus Research*, São Paulo, v. 181, p.53-60, mar. 2014.

CHILKOTI, Dan E. Meyer And Ashutosh. Purification of recombinant proteins by fusion with thermally-responsive polypeptides. *Nature america*, Durham, v. 17, n. 4, p. 1112-1115, jul. 1999.

CONLEY, A. J. et al. Optimization of elastin-like polypeptide fusions for expression and purification of recombinant proteins in plants. *Biotechnology and bioengineering*, Canada, v. 103, n. 3, p. 562-573, fev. 2009.

FIGUEIREDO, Luiz Tadeu Moraes. Dengue in Brazil. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Ribeirão Preto, v. 45, n. 3, p. 30-38, mai./jun. 2012.

GHOSH, A; DAR, L. Dengue vaccines: challenges, development, current status and prospects. Indian Journal of Medical Microbiology, India, v. 33, n. 1, p. 3-15, jul./set. 2015.

ISLAM, Rashedul et al. Dengue epidemiology and pathogenesis: images of the future viewed through a mirror of the past. Virologica Sinica, Bangladesh, v. 30, n. 5, p.326-343, out. 2015.

KOMAROVA, et al. Transient expression systems for plant-derived biopharmaceuticals. Expert Review Of Vaccines, Russia, v. 9, n. 8, p.859-876, ago. 2010.

MEYER, D.e.; TRABBIC-CARLSON, K.; CHILKOTI, A.. Protein Purification by Fusion with an Environmentally Responsive Elastin-Like Polypeptide: Effect of Polypeptide Length on the Purification of Thioredoxin. Biotechnology Progress, v. 17, n. 4, p.720-728, 3 ago. 2001.

PEELING, R. W. et al. Evaluation of diagnostic tests: dengue. Nature Diagnostics, v. 103, p. 30-38, dez. 2010.

Revised diagnostic testing for Zika, chikungunya, and dengue viruses in US Public Health Laboratories, CDC, Division of Vector-Borne Diseases, Memorandum, February 7, 2016.

TSCHOFEN, Marc et al. Plant Molecular Farming: Much More than Medicines. Annual Review Of Analytical Chemistry, v. 9, n. 1, p.271-294, 12 jun. 2016

World Health Organization (WHO). OMS. Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control -- New edition. Suíça, 2009. 160 p.

ZHANG, Hao et al. NS1-based tests with diagnostic utility for confirming dengue infection: a metaanalysis. International Journal Of Infectious Diseases, China, v. 26, p.57-66, set. 2014.