

JÉSSICA AMARAL MARTINHO

Produção de proteínas do envelope (E) mutadas no *loop* de fusão dos quatro sorotipos do vírus da dengue e do vírus Zika.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro

Orientador: Profa. Dra. Silvia Beatriz Boscardin.

Versão original

São Paulo
2020

RESUMO

MARTINHO, J.A. **Produção de proteínas do envelope (E) mutadas no loop de fusão dos quatro sorotipos do vírus da dengue e do vírus Zika.** [98 páginas. Dissertação (Mestrado em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro)]. Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; São Paulo, 2020.

A reatividade cruzada presente nos vírus da família Flaviviridae é um dos fatores que levam a resultados falsos positivos no diagnóstico dessas infecções. Desta forma, o uso de reagentes eficientes que permitam o diagnóstico preciso é essencial. Este trabalho tem como objetivo a produção de proteínas do envelope (E) dos quatro sorotipos do vírus da dengue e do vírus Zika, contendo quatro mutações pontuais próximas e na região do *loop* de fusão, com o objetivo de reduzir a reatividade cruzada desses flavivírus. Para tal, utilizamos sequências consenso das proteínas E dos quatro sorotipos do vírus da dengue e do vírus Zika contendo mutações nos seguintes aminoácidos: T76R, Q77E, W101R e L107R conforme descrito previamente. As sequências foram submetidas a otimização de códons e clonadas em vetor de expressão para células de *Drosophila melanogaster*. Após a confirmação da expressão das proteínas na forma solúvel por transfecção transiente, foram estabelecidas linhagens estáveis. Neste trabalho foi possível obter linhagens estáveis expressando três das quatro proteínas E mutadas do vírus da dengue (DENV2, DENV3 e DENV4) e a proteína E do vírus Zika. A caracterização das proteínas obtidas foi realizada por ELISA utilizando-se anticorpos monoclonais humanos previamente gerados em nosso laboratório (MT600-A3, MT479-C4, MT479-D2 e MT479-F11) e anticorpos monoclonais murinos (4G2, 1A10 e anti-HisTag) contra a proteína E, além das proteínas E do DENV2 e DENV3 selvagens como controles. Os anticorpos monoclonais humanos foram capazes de reconhecer melhor as proteínas selvagens. Para as proteínas mutadas, os anticorpos MT479-C4 e MT479-D2 foram capazes de reconhecer a proteína E mutada do DENV4. O anticorpo MT479-F11 não foi capaz de reconhecer as proteínas mutadas. Já o MT600-A3 não teve um reconhecimento significativo para qualquer das proteínas mutadas. Quando analisamos os anticorpos murinos, observamos que o 1A10 e o 4G2 apresentaram elevado reconhecimento para as proteínas E selvagens em comparação com as proteínas E mutadas, que foram mais fracamente reconhecidas. A obtenção destas proteínas abre perspectivas para sua testagem em testes

sorológicos que visem melhorar a especificidade e separar de forma segura infecções pelos vírus dengue e Zika.

Palavras-chave: Dengue; Proteína do envelope; Células S2; Zika; Imunidade humoral

ABSTRACT

MARTINHO, J.A. **Production of envelope (E) proteins mutated in the fusion loop derived from the four dengue virus serotypes and from zika virus.** [98 pages. Master Thesis (Parasitology)] – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; São Paulo, 2020.

The cross-reactivity present in the viruses of the family Flaviviridae is one of the factors that leads to false positive results in the diagnosis of these infections. Therefore, the use of efficient reagents that allow an accurate diagnosis is essential. This work aimed to produce envelope (E) proteins from the four dengue virus serotypes and from zika virus, containing four point mutations close to and in the fusion loop region, with the objective of reducing the cross-reactivity of these flaviviruses. For this, we used consensus sequences of E proteins of the four serotypes of dengue virus and of zika virus containing mutations in the following amino acids: T76R, Q77E, W101R and L107R, as previously described. The sequences were subjected to codon optimization and cloned into an expression vector for *Drosophila melanogaster* cells. After confirmation of protein expression in the soluble form by transient transfection, stable cell lines were established. In this work it was possible to obtain stable cell lines expressing three of the four mutated E proteins of the dengue virus (DENV2, DENV3 and DENV4) and the protein E of zika virus. The characterization of the obtained proteins was performed by ELISA using human monoclonal antibodies previously generated in our laboratory (MT600-A3, MT479-C4, MT479-D2 and MT479-F11), and murine monoclonal antibodies (4G2, 1A10 and anti-HisTag) against protein E, in addition to wild-type DENV2 and DENV3 E proteins as controls. Human monoclonal antibodies were able to better recognize wild-type proteins. For the mutated proteins, the MT479-C4 and MT479-D2 antibodies were able to recognize the DENV4 mutated E protein. MT479-F11 antibody was unable to recognize mutated proteins. MT600-A3 did not present significant recognition for any of the mutated proteins. When we analyzed the murine antibodies, we found that 1A10 and 4G2 showed high recognition for wild type E proteins compared to mutated E proteins, which were more poorly recognized. Obtaining these proteins opens up perspectives for their testing in serological tests that aim to improve specificity and safely separate infections by dengue and zika viruses.

Keywords: Dengue; Zika; Envelope protein; S2 cells; Humoral immunity