

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

CRISLAINE KELLY DA SILVA ROCHA

**PRODUÇÃO DE IMUNORREAGENTES ANCORADOS À SUPERFÍCIE CELULAR
DA LEVEDURA *Saccharomyces cerevisiae***

**RECIFE
2022**

CRISLAINE KELLY DA SILVA ROCHA

**PRODUÇÃO DE IMUNORREAGENTES ANCORADOS À SUPERFÍCIE CELULAR
DA LEVEDURA *Saccharomyces cerevisiae***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia. Área de concentração: Microbiologia, Bioprocessos e Bioprodutos.

Orientador: Prof. Dr. Antônio Carlos de Freitas
Co-orientadora: Profa. Dra. Fernanda Cristina Bezerra Leite

**RECIFE
2022**

Catálogo na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB4/1788

Rocha, Crislaine Kelly da Silva

Produção de imunorreagentes ancorados à superfície celular da levedura
Saccharomyces cerevisiae / Crislaine Kelly da Silva Rocha. – 2022.

90 f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Antônio Carlos de Freitas.

Coorientadora: Profa. Dra. Fernanda Cristina Bezerra Leite

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco.
Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Biotecnologia,
Recife, 2022.

Inclui referências e anexos.

1. Fungos. 2. Leveduras. 3. Biotecnologia. I. Freitas, Antônio Carlos de (orientador). II. Leite, Fernanda Cristina Bezerra (coorientadora). III. Título.

579.5

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2022-195

CRISLAINE KELLY DA SILVA ROCHA

**PRODUÇÃO DE IMUNORREAGENTES ANCORADOS À SUPERFÍCIE CELULAR
DA LEVEDURA *Saccharomyces cerevisiae***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia. Área de concentração: Microbiologia, Bioprocessos e Bioprodutos.

Aprovado em: 24/08/2022

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Antônio Carlos de Freitas (Orientador)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Marcos Antonio de Morais Júnior (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Dra. Danielle Maria Nascimento Moura (Examinadora externa)
Instituto Aggeu Magalhaes – Fiocruz/PE

Dedico esta etapa da minha vida em
memória às partes minhas que
partiram, Mara, Nino e Lana.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus por me guiar durante toda essa jornada desafiadora e ter me dado forças para permanecer firme e não desistir, mesmo diante de todas as dificuldades enfrentadas.

À minha falecida tia Mara por ter sido a força interna que me ajudou a lutar e seguir adiante.

Ao meu companheiro e melhor amigo, Wendel Gomes, por estar sempre presente e me apoiar quando eu mais precisei, sem você chegar até aqui teria sido tortuoso. Muito obrigada por me motivar a ir atrás dos meus sonhos, sempre ver o melhor de mim.

Aos meus filhos de quatro patas, Lawffy e Remille que me fizeram companhia nos momentos mais angustiantes e solitários. Chegaram no momento certo e se tornaram minha alegria.

À minha família, Vó, Mãe, Jane, Lu, Gogue, Nadya, Pietra, Miguel e Cauã por todo apoio e compreensão mesmo nos momentos em que não pude estar presente. Vocês são a razão de eu lutar tanto para ser sempre minha melhor versão.

Ao meu orientador Antônio Carlos pela oportunidade e toda confiança depositada durante o decorrer do trabalho.

À minha orientadora Fernanda por todo apoio, confiança e ensinamentos que me concedeu durante a execução deste trabalho. Não tenho palavras para expressar minha gratidão a Deus por ter tido a oportunidade de ter sido sua aluna. Desejo que todos os aspirantes a cientistas pudessem ter o privilégio de ter uma orientadora como ela, ao passo que te fornece toda bagagem científica necessária também está presente para te acolher como amiga. Reconheço todas as oportunidades concedidas e deixo claro que levarei comigo todos os ensinamentos passados. Torço para que um dia possamos trabalhar juntas novamente.

Ao professor Diogo Simões por ser sempre uma inspiração como pesquisador, me apoiar e fornecer ensinamentos únicos durante o decorrer do presente trabalho.

À minha amiga, Rhavenna, por ter compartilhado toda essa experiência de desenvolver uma dissertação de mestrado junto comigo. Mesmo de longe você se fez sempre presente, me apoiou e fez toda essa caminhada ser mais fácil.

Aos amigos de laboratório, Danielli, Alicia e Eduardo, por tornarem qualquer dia de experimento mais animador. Foi incrível ter a experiência de auxiliar de perto um

aluno de graduação e neste processo construir uma amizade que vou levar para a vida toda, Alicia, muito obrigada por todas aquelas tardes juntas, por junto a mim sonhar com um futuro diferente, logo estaremos juntas na Europa. Agradeço ainda a Danielli por todos ensinamentos que me forneceu, por me mostrar que a vida acadêmica pode ser mais leve e que não devemos desistir nunca.

Aos laboratórios parceiros que permitiram que este trabalho fosse executado. Primeiramente, ao laboratório de estudos moleculares e terapia gênica (LEMTE, Prof. Antônio C. Freitas) por todo apoio operacional e disponibilidade para auxiliar os experimentos realizados, em especial a Anna Jéssica que se dispôs a me auxiliar sempre que necessário e se fez presente para tirar dúvidas. Ao laboratório de bioquímica de proteína (profs. Thiago Napoleão e Patrícia Paiva) por toda ajuda fornecida. Ao laboratório de enzimologia (LABENZ, Prof. Ranilson Bezerra) pela disponibilização e suporte em diferentes experimentos, em especial a Caio de Assis que infelizmente faleceu a três meses atrás, aproveito este momento para agradecer tudo, sempre se mostrou disponível para me ajudar, onde quer que você esteja sempre será lembrado por seus colegas do departamento de bioquímica. Ao núcleo de Pesquisa em Inovação terapêutica (LINAT) pela disponibilização de equipamentos, em especial à técnica Thacianna por toda a ajuda.

Às minhas colegas de turma Daniella, Eliana, Jackelly, Maryana, Luana e Michelle, compartilhar essa etapa com vocês foi incrível sou muito grata por toda amizade construída e por todas experiências compartilhadas.

Às universidades que possibilitaram a execução deste trabalho, Universidade Federal de Pernambuco e Universidade Federal Rural de Pernambuco.

Ao programa de pós-graduação em Biotecnologia que possibilitou a execução do presente trabalho, em especial ao secretário Klayton Silva que foi essencial para fornecer todo o suporte durante o decorrer do curso, sendo sempre muito atencioso e disponível.

À coordenação de aperfeiçoamento de pessoa de nível superior (CAPES) pelo auxílio financeiro fornecido através de bolsa de estudo a qual foi essencial para minha continuidade na pós-graduação.

Ao conselho nacional de desenvolvimento científico e tecnológico (CNPq) e Fundação de amparo a ciências de Pernambuco (FACEPE) pelo apoio financeiro aos projetos de pesquisa relacionados a este trabalho.

“Natura nusquam magis est tota quam in minimis”

- Plínio, o Velho (23-79 d.c.)

“Em parte alguma encontramos a natureza na sua totalidade como em suas menores criaturas”

RESUMO

Diante do cenário atual de emergência e reemergência de doenças infecciosas virais, como o surgimento da COVID-19 e a possibilidade de novos surtos de Zika vírus (ZIKV), a busca por estratégias capazes de conter a propagação destas infecções torna-se uma prioridade mundial de saúde pública. O sistema de ancoragem de proteínas à superfície celular da levedura *Saccharomyces cerevisiae* vem sendo apontado como ferramenta promissora para o enfretamento de epidemias emergentes através do desenvolvimento de imunorreagentes baseados em proteínas antigênicas. Este trabalho teve como objetivo o estabelecimento de uma plataforma de obtenção de imunorreagentes baseada na ancoragem de antígenos virais à superfície de *S. cerevisiae*. Para demonstrar a aplicabilidade deste sistema, foram construídas duas linhagens de *S. cerevisiae* expressando um epítipo (N4P5-SARS) da proteína nucleocapsídeo do SARS-COV-2 e o ectodomínio (E80-ZIKV) da proteína do envelope do Zika vírus. Para obtenção dos vetores recombinantes, os genes que codificam E80-ZIKV e N4P5-SARS foram clonados no vetor pYD1, confirmados por sequenciamento de DNA e utilizados para transformar células de *S. cerevisiae* EBY100. As leveduras recombinantes confirmadas por PCR, foram utilizadas para indução da expressão proteica. Para estabelecer uma boa produção das proteínas virais, analisamos a indução da expressão das proteínas quanto a variação da temperatura (20 e 30°C) e do tempo de indução (24, 48 e 72h). Utilizando as leveduras recombinantes como antígenos em ensaios de ELISA (*Yeast-ELISA*) com anticorpo direcionado à tag 6xHIS presente no N-terminal das proteínas, foi possível determinar que a melhor condição testada foi 20°C por 72 horas, na qual EBY100:E80-ZIKV e EBY100:N4P5-SARS apresentaram sinal de ancoragem de 1,8 e 5,4 vezes maiores em relação ao controle. A ancoragem das proteínas virais também foi confirmada por microscopia de imunofluorescência e citometria de fluxo, apresentando cerca de 1,11 e 15,1% da população analisada positiva. A imunorreatividade da proteína E80-ZIKV foi também avaliada por *Yeast-ELISA*, citometria e microscopia utilizando um anticorpo anti-envelope, onde foi possível detectar sua reatividade a um anticorpo comercial específico, apesar do baixo nível de expressão. Todos os experimentos realizados para E80-ZIKV confirmam sua baixa eficiência de ancoragem. Hipotetizamos que o tamanho desta proteína (400 aminoácidos) pode estar interferindo na eficiência de ancoragem, em contraste com a alta expressão detectada

para N4P5-SARS (45 aminoácidos). Apesar de sua expressão em baixos níveis, a ancoragem de E80-ZIKV em *S. cerevisiae* pode ser detectada mesmo após 38 dias de estoque a 4°C. Finalmente, demonstramos que as proteínas virais ancoradas na superfície celular de *S. cerevisiae* podem ser recuperadas num passo único de incubação em reagente redutor, as quais puderam ser utilizadas com sucesso em ensaios de ELISA para detecção da tag 6xHIS. Este método pode gerar uma alternativa rápida e barata para produção de insumos para imunoenaios que se baseiam no uso de proteínas antigênicas purificadas. Juntos, estes achados auxiliam no desenvolvimento de linhagens recombinantes que podem ser utilizadas como imunorreagentes capazes de serem aplicados em estudos para desenvolvimento de estratégias vacinais anti-ZIKV e anti-SARS-CoV-2, e na sua utilização como ferramentas de diagnósticos para rastrear e evitar a propagação destas infecções virais.

Palavras-chave: Ancoragem de proteínas em leveduras; SARS-CoV-2; Zika vírus.

ABSTRACT

Given the current scenario of emergency and re-emergence of viral infectious diseases, such as the emergence of COVID-19 and the possibility of new outbreaks of Zika virus (ZIKV), the search for strategies capable of containing the spread of these infections becomes a global priority of public health. The Yeast Surface Display of recombinant proteins using *Saccharomyces cerevisiae* has been pointed out as an alternative tool for facing emerging epidemics through the development of immunoreagents based on antigenic proteins and peptides. Here, we aimed to establish a standardized platform for obtaining immunoreagents based on viral antigens display on the cell surface of *S. cerevisiae*. To demonstrate the applicability of this system, two strains of *S. cerevisiae* were constructed expressing an epitope (N4P5-SARS) of the SARS-COV-2 nucleocapsid protein and the ectodomain (E80-ZIKV) of the Zika virus envelope protein. To obtain the recombinant vectors, the genes encoding E80-ZIKV and N4P5-SARS were cloned into the pYD1 vector, confirmed by DNA sequencing and used to transform *S. cerevisiae* EBY100 cells. Recombinant Yeasts confirmed by PCR were used to induce protein expression. To establish a good production of the viral proteins used in this study, we analyzed the induction of protein expression in terms of temperature (20 and 30°C) and induction time (24, 48 and 72h). Using recombinant Yeasts as antigens in ELISA assays (Yeast-ELISA) with antibody directed to the 6xHIS tag present at the N-terminus of the proteins, it was possible to determine that the best condition tested was 20°C for 72 hours, in which EBY100:E80-ZIKV and EBY100:N4P5-SARS showed a display detection of 1.8 and 5.4-fold than the control. The displayed viral proteins were also confirmed by immunofluorescence microscopy and flow cytometry, which showed 1.11 and 15.1% of the positive population. The immunoreactivity of the E80-ZIK protein was also evaluated by Yeast-ELISA, cytometry and microscopy using an anti-envelope antibody, where it was possible to detect its reactivity, despite the low expression. All experiments performed for E80-ZIKV confirm its low anchoring efficiency. We hypothesized that the size of this protein (400 amino acids) may be interfering with the display efficiency, in contrast to the high expression detected for N4P5-SARS (45 amino acids). Despite its expression at low levels, E80-ZIKV displayed in *S. cerevisiae* can be detected even after 38 days of storage at 4°C. Finally, we demonstrated that viral proteins displayed on the cell surface of *S. cerevisiae* can be recovered in a single step of incubation in reducing

reagent, which could be successfully used in ELISA assays for detection of the 6xHIS tag. This method can generate a fast and cheap alternative to produce immunoassays that are based on purified antigenic proteins. Together, our findings support the development of recombinant strains that can be used as immunoreagents capable of being applied in studies to develop anti-ZIKV and anti-SARS-CoV-2 vaccine strategies, and in their use as diagnostic tools to screen and prevent the spread of these viral infections.

Key-words: *Yeast surface display*, SARS-CoV-2; Zika virus.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação das diversas aplicações do sistema de ancoragem de proteínas à superfície celular de <i>S. cerevisiae</i>	28
Figura 2 - Representação da estrutura da parede celular de <i>S. cerevisiae</i> e principais proteínas utilizadas como âncoras.	29
Figura 3 - Esquema de representação do vetor pYD1 e da expressão em superfície utilizando esse vetor.....	35
Figura 4 - Representação esquemática da proteína do envelope de Zika vírus evidenciando a porção referente ao ectodomínio (E80).....	39
Figura 5 - Representação do vetor pBSK-ZIKV.....	41
Figura 6 - Esquema de amplificação do gene que codifica a proteína do envelope do Zika vírus e seu ectodomínio (E80).....	41
Figura 7 - Representação da estratégia de síntese do gene codificante do epítipo N4P5 da proteína do nucleocapsídeo do SARS-CoV-2.	42
Figura 8 - Representação do vetor de expressão e ancoragem pYD1.....	44
Figura 9 - Representação da verificação da correta orientação do inserto N4P5-ZIKV no vetor pYD1.	48
Figura 10 - Representação do resultado esperado após indução da expressão proteica e ancoragem das proteínas em superfície das linhagens utilizadas neste trabalho. .	50
Figura 11 - Obtenção dos fragmentos de DNA (Biobricks) para obtenção dos vetores recombinantes via clonagem USER.....	54

Figura 12 - PCR de colônia de bactéria para confirmação da obtenção do vetor recombinante pYD1:E80.	55
Figura 13 - Eletroforese de DNA para análise da obtenção do vetor pYD1 digerido com a enzima de restrição XhoI.....	56
Figura 14 - Eletroforese de DNA apresentando os resultados da digestão com a enzima XhoI do vetor pUC57:N4P5-SARS e obtenção do N4P5-SARS.	57
Figura 15 - Eletroforese de DNA apresentando os resultados obtidos com a PCR de verificação dos 12 transformantes pYD1:N4P5-SARS analisados.....	59
Figura 16 - Eletroforese de DNA apresentando os resultados da segunda etapa de verificação dos clones pYD1:N4P5-SARS.	60
Figura 17 - Eletroforese de DNA ilustrando os resultados da PCR de confirmação da presença do vetor recombinante pYD1:E80 em células de <i>S. cerevisiae</i> EBY100. ..	61
Figura 18 - Eletroforese de DNA ilustrando os resultados da PCR de confirmação da presença do vetor recombinante pYD1:N4P5-SARS em células de <i>S. cerevisiae</i> EBY100.	62
Figura 19 - Yeast-ELISA direto para avaliação das condições de expressão e ancoragem das proteínas E80-ZIKV e N4P5-SARS na superfície celular de <i>S. cerevisiae</i>	63
Figura 20 - Citometria de fluxo das linhagens de levedura.....	65
Figura 21 - Microscopia de imunofluorescência das linhagens de levedura.....	66
Figura 22 - Yeast-ELISA indireto para avaliar a ancoragem da proteína E80-ZIKV na superfície celular de <i>S. cerevisiae</i> EBY100 pela detecção da tag 6xHIS.	68

Figura 23 - Yeast-ELISA indireto para avaliar a imunorreatividade da proteína E80-ZIKV ancorada na superfície celular de <i>S. cerevisiae</i> EBY100 utilizando anticorpo anti-ENV.....	69
Figura 24 - Segundo ensaio de citometria de fluxo para avaliação da imunorreatividade da proteína E80-ZIKV em <i>S. cerevisiae</i>	70
Figura 25 - Microscopia de imunofluorescência para avaliar a imunorreatividade da proteína E80-ZIKV ancorada em superfície celular de <i>S. cerevisiae</i>	71
Figura 26 - Yeast-ELISA indireto para avaliar a ancoragem e imunorreatividade da proteína E80-ZIKV após estocagem das células de levedura.	72
Figura 27 - ELISA com as proteínas recuperadas da superfície celular.....	74

LISTA DE SIGLAS E ABREVIações

Abreviação/Sigla	Significado
6xHis	Tag com seis histidinas para reconhecimento por anticorpo comercial
ACE2	Angiotensin-converting enzyme 2 (enzima conversora de angiotensina 2)
AGA1	Gene que codifica a subunidade Aga1p da aglutinina A Sub-unidade de ancoragem da proteína a-aglutinina à parede celular
AGA2	Gene que codifica a subunidade Aga2p da aglutinina A Sub-unidade de interação da proteína a-aglutinina com alfa-aglutinina, usada para fusão da proteína de interesse
BSA	Bovine sérum albumin (Albumina do soro bovino)
CIAP	Calf intestinal alkaline phosphatase (fosfatase alcalina intestinal de bezerros)
COVID-19	doença por coronavírus 2019
DMSO	Dimetilsóxido
DNA	Ácido deoxirribonucleico
DNTPs	Deoxirribonucleotídeos
DO	Densidade óptica
DO600	Densidade óptica lida à 600 nm
DpnI	Enzima de restrição específica para sítios metilados isolada de <i>Diplococcus pneumoniae</i>
E80	Ectodomínio
EBY100	Linhagem de <i>S. cerevisiae</i>
EDIII	Domínio III da proteína do envelope do Zika vírus
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay (Ensaio imunoenzimático)
FACS	<i>fluorescence-assisted cell sorters</i> (triagem de células marcadas por fluorescência)
GAL1	Promotor indutível galactose
GAP	Promotor constitutivo

GLUASP	peptídeo sinal da glucoamilase de <i>Rhizopus oryzae</i>
GPD	Promotor constitutivo da Gliceraldeido-3-fosfato desidrogenase
GPI	Glicosilfosfatidilinositol
GRAS	<i>generally recognized as safe (geralmente reconhecido como Seguro)</i>
GS linker	Peptídeo espaçador baseado em sequencias repetitivas de glicina e serina
H4N1	Vírus da influenza
HCl	Ácido clorídrico
HRP	Horseradish peroxidase (peroxidase de rábano)
IgG	Imunoglobulina G
KCl	Cloreto de potássio
KH ₂ PO ₄	Monopotassio fosfato
KOH	Hidróxido de potássio
LB	Meio de cultura Luria-Bertani
MCS	Multiple cloning site (sítio múltiplo de clonagem)
MF α 1SP	fator alfa do feromônio do acasalamento
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
MgSO ₄	Sulfato de magnésio
NaCl	Cloreto de Sódio
NaH ₂ PO ₄	Monosódio fosfato
NaOH	Hidróxido de sódio
NS	Não significativo
OMS	Organização mundial da saúde
PBS	Phosphate buffered saline (tampão fosfato-salino)
PBST	Tampão fosfato-salino com Tween 20
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PGK1	Promotor constitutivo da 3-fosfoglicerato quinase
PYD1	Vetor de expressão e ancoragem de proteínas
RBD	Receptor-binding domain (domínio de ligação ao receptor)
SARS-CoV-2	Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2

SED1	Promotor constitutivo da proteína de parede celular de resposta ao estresse (<i>sed1</i>)
SOC	Super optimal broth with catabolite repression (meio super ótimo de repressão catabólica)
TDH3	Promotor constitutivo da Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
TMB	substrato 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine
Trp1	Gene triptofano 1
UFC	Unidades formadoras de colônias
USER	Uracil specific excision reagent (reagente específico para excisão de uracilas)
V5	Peptídeo para detecção por anticorpos comerciais (tag)
XhoI	Enzima de restrição isolada de <i>Xanthomonas holcicola</i>
Xpress	Peptídeo para detecção por anticorpos comerciais (tag)
YNB	<i>Yeast</i> nitrogen base (base de nitrogênio de levedura)
YPD	<i>Yeast extract</i> (extrato de levedura), Peptone (peptona), Dextrose (destrose)
YSD	<i>Yeast surface display</i> (ancoragem de proteínas à superfície celular de levedura)
ZIKV	Zika vírus

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
2 OBJETIVOS	22
2.1 OBJETIVO GERAL	22
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	22
3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	23
3.1 PRODUÇÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES	23
3.2 A LEVEDURA <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i> NA GERAÇÃO DE BIOPRODUTOS.....	24
3.3 SISTEMA DE ANCORAGEM DE PROTEÍNAS NA SUPERFÍCIE DE LEVEDURAS.....	26
3.3.1 Escolha dos componentes: Proteínas âncora	28
3.3.2 Escolha dos componentes: Sinal de secreção	31
3.3.3 Escolha dos componentes: Promotores	32
3.3.4 Avaliação das condições de produção da proteína alvo	32
3.3.5 Sistema de ancoragem de proteínas baseado em <i>S. cerevisiae</i> EBY100 e vetor pYD1	34
3.4 O PAPEL DO SISTEMA DE ANCORAGEM DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES EM LEVEDURAS NO DESENVOLVIMENTO DE IMUNORREAGENTES E VACINAS	36
3.5 EMERGÊNCIA E REEMERGÊNCIA DE DOENÇAS INFECCIOSAS VIRAIS: UM PROBLEMA MUNDIAL DE SAÚDE PÚBLICA.....	37
3.5.1 COVID-19: SARS-CoV-2	37
3.5.2 Zika vírus.....	38
4 MATERIAIS E MÉTODOS	40
4.1 MATERIAIS.....	40
4.1.1 Linhagens de microrganismos e meios de cultura	40
4.1.2 Genes, <i>primers</i> e plasmídeos utilizados	40
4.2 MÉTODOS.....	43
4.2.1 Obtenção do vetor recombinante pYD1:E80-ZIKV.....	43
4.2.2 Obtenção do vetor recombinante pYD1-N4P5-SARS	47
4.2.3 Transformação de levedura	48

4.2.4	Ensaio de avaliação das condições ideais de indução da expressão das proteínas E80-ZIKV e N4P5-SARS	49
4.2.5	Avaliação da ancoragem de proteínas por Ensaio de <i>Yeast-ELISA</i> direto	51
4.2.6	Avaliação da imunorreatividade por <i>Yeast-ELISA</i> indireto.....	51
4.2.7	Recuperação das proteínas ancoradas	52
4.2.8	Citometria de fluxo e microscopia de imunofluorescência	52
4.2.9	Análise estatística	53
5	RESULTADO	54
5.1	OBTENÇÃO DO VETOR RECOMBINANTE PYD1:E80-ZIKV.....	54
5.2	OBTENÇÃO DO VETOR RECOMBINANTE PYD1:N4P5-SARS	55
5.3	OBTENÇÃO DAS LEVEDURAS RECOMBINANTES.....	60
5.4	YEAST-ELISA: AVALIAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE INDUÇÃO DA EXPRESSÃO E ANCORAGEM DAS PROTEÍNAS VIRAIS.....	62
5.5	AVALIAÇÃO DA ANCORAGEM DAS PROTEÍNAS VIRAIS.....	64
5.6	AVALIAÇÃO DA IMUNORREATIVIDADE DA PROTEÍNA E80-ZIKV POR YEAST-ELISA	67
5.7	AVALIAÇÃO DA IMUNORREATIVIDADE DA PROTEÍNA E80-ZIKV POR CITOMETRIA DE FLUXO E MICROSCOPIA DE IMUNOFLUORESCÊNCIA	69
5.8	AVALIAÇÃO DA IMUNORREATIVIDADE DAS LEVEDURAS ESTOCADAS ...	71
5.9	RECUPERAÇÃO DAS PROTEÍNAS ANCORADAS.....	73
6	DISCUSSÃO	75
7	CONCLUSÕES.....	82
	REFERENCIAS.....	83

1 INTRODUÇÃO

A produção de proteínas recombinantes em sistemas de expressão heteróloga utilizando a levedura *Saccharomyces cerevisiae* tem sido largamente empregada por diversas vantagens deste microrganismo como plataforma biotecnológica. Esta levedura é considerada um organismo seguro para consumo humano (GRAS – *generally recognized as safe*), o que facilita seu uso para produção de biofármacos. *S. cerevisiae* possui suas características genéticas e fisiológicas bem fundamentadas, resultando num abundante número de técnicas moleculares disponíveis para este organismo. Sua capacidade de realizar modificações pós-traducionais relacionadas à eucariotos superiores, possibilita a expressão de proteínas eucarióticas com maior eficiência e fidelidade em comparação com o uso de bactérias. Vantagens na produção e cultivo celulares, tais como, sua capacidade em ser cultivada em altas densidades celulares e em meios de cultura baratos posicionam este microrganismo como hospedeiro ideal para geração de proteínas heterólogas para diversos fins (NIELSEN, 2013; LITI, 2015; SABU; MUFEEFHA; PRAMOD, 2019).

É possível utilizar em *S. cerevisiae* sistemas nativos de ancoragem de proteínas à superfície celular (*Yeast Surface Display*) como alternativa para secretar, selecionar e purificar proteínas heterólogas. Algumas vantagens deste sistema são: a dispensabilidade de etapas de purificação das proteínas (LIU *et al.*, 2022; UEDA, 2016), a utilização das células de leveduras como potencializadoras de resposta imunológica quando aplicadas a apresentação de antígenos ao sistema imunológico (LEI *et al.*, 2021; GAO *et al.*, 2021) e a possibilidade de seleção das células através de métodos baseados na detecção de fluorescência, como FACS (*Fluorescence-activated cell sorting*) (TEIXEIRA, *et al.*, 2021; BOWEN, *et al.*, 2021; OH, *et al.*, 2020). A possibilidade de expressar antígenos virais na superfície celular da levedura *S. cerevisiae* e utilizar estas células para produção de imunorreagentes já é descrita na literatura e possui grande potencial para viabilizar a obtenção destes bioprodutos (NGUYEN, *et al.*, 2020; CHEN, *et al.*, 2021; LEI *et al.*, 2021; GAO *et al.*, 2021).

Esta abordagem pode ser uma importante ferramenta para combater epidemias emergentes, visto que vem sendo empregada no desenvolvimento de imunorreagentes através da ancoragem de antígenos na superfície da levedura, viabilizando a apresentação de antígenos ao sistema imune e a triagem de proteínas

com base na sua capacidade de ligação à anticorpos (SHIBASAKI, 2019; SHIBASAKI; UEDA, 2016).

Diante do cenário atual de emergência e reemergência de doenças infecciosas virais, como por exemplo, o surgimento da COVID-19 e os novos surtos de Zika vírus, Chikungunya e febre amarela, a produção de vacinas e imunorreagentes capazes de diagnosticar e conter a propagação dessas infecções torna-se uma prioridade mundial de saúde pública.

Neste trabalho, demonstramos a construção genética de duas linhagens recombinantes de *S. cerevisiae* expressando em sua superfície celular uma proteína contendo um epítipo imunodominante (N4P5-SARS) da proteína do nucleocapsídeo do SARS-CoV-2 com potencial para aplicação diagnóstica, bem como o ectodomínio (E80-ZIKV) da proteína do envelope do Zika vírus, o qual vem sendo descrito como alvo potencial para desenvolvimento de uma estratégia vacinal anti-ZIKV. Demonstramos a avaliação das condições de indução da expressão destas proteínas virais na qual o sinal de ancoragem destas proteínas é capaz de ser detectado por anticorpos comerciais, assim como a imunorreatividade e estabilidade da proteína E80-ZIKV.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliação de uma plataforma de produção de imunorreagentes virais utilizando o sistema de ancoragem de proteínas à superfície celular (*Yeast Cell Display*) da levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Construção de duas linhagens geneticamente modificadas de *S. cerevisiae* expressando o ectodomínio da proteína do envelope (E) do Zika vírus e o epítopo N4P5 da proteína do nucleocapsídeo do SARS-CoV-2;
- Avaliação da ancoragem das proteínas virais à superfície celular de *S. cerevisiae*;
- Avaliação do tempo e temperatura ideais para indução da expressão das proteínas recombinantes em *S. cerevisiae*;
- Demonstração da imunorreatividade das proteínas virais ancoradas na superfície de *S. cerevisiae*.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 PRODUÇÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES

A descoberta da tecnologia do DNA recombinante na década de 1970 possibilitou a identificação, isolamento, e expressão de diferentes genes no genoma de organismos modelos. Baseada no uso de vetores capazes de carrear informação gênica, enzimas de restrição responsáveis por cortar regiões específicas do DNA, e organismos modelo utilizados como hospedeiro, tornou-se uma das principais técnicas na engenharia genética. Desde então, seu uso viabilizou estudos clássicos na identificação e análise de função gênica de diversos organismos e permitiu o desenvolvimento biotecnológico na área de produção de fármacos, transgênicos, vacinas, terapia genética, diagnósticos de doenças e produção de energia (KHAN, *et al.*, 2016).

A primeira proteína recombinante produzida e comercializada foi a insulina humana, que já era utilizada como medicamento usado para o tratamento de pacientes com diabetes, no entanto sua produção era derivada da extração e purificação de insulina suína e bovina (BAESHEN, *et al.*, 2014). A tecnologia do DNA recombinante, permitiu que pudéssemos produzir insulina humana em larga escala de forma mais acelerada e segura, para o tratamento da diabetes. Além disso, a produção de proteínas recombinantes potencializou a produção de biofármacos por permitir seu desenvolvimento em larga escala, como menor custo de produção e maior rendimento. Não há dúvidas de que a produção de proteínas recombinantes é de suma importância para melhorar a qualidade de vida humana e contribuir para o desenvolvimento sustentável (TRIPATHI; SHRIVASTAVA, 2019).

O processo de produção de proteínas recombinantes é iniciado com a identificação da proteína alvo, que irá depender do objetivo geral de estudo, e então é necessário isolar e expressar o gene codificante desta proteína em um organismo hospedeiro (GUPTA, *et al.*, 2016). Ao escolher o sistema de expressão heteróloga ideal, alguns fatores devem ser considerados, tais como, as características e funcionalidade da proteína de interesse, bem como, o rendimento e taxa de produção da proteína recombinante de interesse (DEMAIN; VAISHNAV, 2009). Diversos organismos modelos são utilizados para produção heteróloga de proteínas, tais como, bactérias, fungos, plantas, insetos e células de mamíferos (GUPTA *et al.*, 2019;

SWIECH; PICANÇO-CASTRO; COVAS, 2012). Cada um dos modelos utilizados possui suas vantagens e desafios para a produção de proteínas heterólogas. Apesar disso, a maior parte dos produtos farmacêuticos baseados em proteínas recombinantes é produzida em células de mamíferos (TRIPATHI; SHRIVASTAVA, 2019).

A utilização de microrganismos para geração de produtos de interesse humano é uma das mais antigas formas de biotecnologia conhecidas. Devido aos inúmeros benefícios que os microrganismos trazem às nossas vidas, eles são utilizados para produzir alimento e bebida a milhares de anos. Outras aplicações dos microrganismos como plataforma biotecnológica podem ser vistas na produção de compostos químicos, materiais poliméricos, produtos terapêuticos, biorremediação, produção de combustíveis e entre diversos outros processos (NANDY; SRIVASTAVA, 2018).

A bactéria *Escherichia coli* foi um dos primeiros microrganismos procariotos a serem utilizados para produção de proteínas recombinantes, devido principalmente a facilidade de manipulação e baixo custo de produção. No entanto, com a necessidade de expressão de proteínas terapêuticas eucarióticas, esse hospedeiro não se torna tão atraente por ser incapaz de processar corretamente esse tipo de proteína que requer uma maquinaria de modificações pós-traducionais (ALTENBUCHNER; MATTERS, 2004; DEMAINE; VAISHNAV, 2009), fato este que levou ao aumento da utilização de leveduras e outros organismos eucariotos para produção de proteínas terapêuticas eucarióticas.

O desenvolvimento de novos bioprodutos para melhorar a qualidade de vida humana tem crescido a cada dia, e necessita de novas metodologias e plataformas que visem baratear e acelerar o processo de produção de proteínas heterólogas. Aliado a isso, o desenvolvimento de novas tecnologias de modificação genética, aprimoramento de sistemas de expressão são de suma importância para melhorar o processo de produção de proteínas estáveis e ativas (TRIPATHI; SHRIVASTAVA, 2019).

3.2 A LEVEDURA *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* NA GERAÇÃO DE BIOPRODUTOS

Saccharomyces cerevisiae é o organismo eucarioto mais utilizado em pesquisas no mundo inteiro e isso se deve ao fato deste fungo unicelular ter sido explorado pelos

seres humanos ao longo de mais de dez mil anos. Sua importante aplicação na produção de alimentos e bebidas levou pesquisadores a buscarem e analisarem suas características genéticas e fisiológicas com o intuito de produzir produtos melhorados (LITI, 2015). Além disso, essa levedura possibilitou o primeiro sequenciamento de genoma eucarioto, permitindo que uma enorme quantidade de informações sobre seu conteúdo gênico e proteico fossem disponibilizados para a comunidade científica (GOFFEAU *et al.*, 1996). A grande variedade de informações genéticas, bioquímicas e fisiológicas disponíveis para esse microrganismo contribuiu para o estabelecimento de uma gama de técnicas e metodologias capazes de modificar e produzir novos produtos biotecnológicos (SABU; MUFEEFHA; PRAMOD, 2019).

A importância biotecnológica de *S. cerevisiae* é incontestável, e isso se deve a certas características biológicas desta levedura, a qual é considerada um organismo seguro (GRAS “*generally recognized as safe*”), tem um rápido tempo de geração, é facilmente cultivada em meios de cultura baratos e em altas densidades celulares. Por ser um organismo eucarioto, é considerado atraente para a produção de proteínas recombinantes relacionadas a eucariotos superiores, sendo capaz de produzir muitas proteínas humanas estáveis e bem enoveladas (NIELSEN, 2013). Dentre as possibilidades, a construção de linhagens recombinantes desta levedura, através da expressão heteróloga de proteínas, permitiu estudos que vão desde a produção de medicamentos, produção de bioetanol a engenharia de proteínas e anticorpos (STEWART, G.G., 2014, JACOBUS, *et al.*, 2021; PIIRAINEN; SALMINEN; FREY, 2019). Cerca de 20% dos biofármacos são produzidos por *S. cerevisiae*, como por exemplo, insulina, albumina do soro humano, vacinas para hepatite e papillomavirus humano (NIELSEN, 2013; KULAGINA, *et al.*, 2021). Apesar disso, um desafio para produção de proteínas terapêuticas em *S. cerevisiae* é que, comumente, as proteínas produzidas possuem N-glicosilação com alto conteúdo de manoses, o que parece reduzir a meia vida das proteínas recombinantes e sua eficácia como um produto terapêutico (WILDT; GERNGROSS, 2005).

Entretanto, muitos trabalhos têm sido realizados para modificar geneticamente linhagens de *S. cerevisiae* e de outras leveduras como *Pichia pastoris*, para que possam ser capazes de expressar e processar corretamente proteínas terapêuticas humanas com padrões de N-glicosilação necessários para garantir uma boa eficiência de produção (SHENOY *et al.*, 2021; ZHA, 2013). A secreção de proteínas

recombinantes em *S. cerevisiae* já foi utilizada para produzir dezenas de proteínas com aplicação farmacêutica, principalmente por facilitar etapas de purificação da proteína de interesse que é secretada no meio de cultura (HOL *et al.*, 2012). Além disso, a possibilidade de secretar e ancorar proteínas na superfície celular de células de levedura é um método que vem ganhando bastante espaço para produção de proteínas e peptídeos de interesse industrial ou de saúde, com a vantagem de permitir a seleção qualitativa das células produzidas através de citometria (ANDREU; DEL OLMO, 2018) além de dispensar etapas de purificação (LIU *et al.*, 2022; UEDA, 2016).

3.3 SISTEMA DE ANCORAGEM DE PROTEÍNAS NA SUPERFÍCIE DE LEVEDURAS

O sistema *Yeast Surface Display* utilizado para expressão de proteínas heterólogas utilizando sistemas nativos de ancoragem de proteínas em superfícies celulares vem sendo utilizada desde meados dos anos 80 com a vantagem de permitir a triagem de antígenos e anticorpos a partir de bibliotecas complexas (ANDREU; DEL OLMO, 2018). Os primeiros relatos da expressão heteróloga em superfícies iniciaram com o desenvolvimento da tecnologia de fusão de fagos - *phage display* - em 1985, onde o peptídeo de interesse era fusionado à proteína pIII do capsídeo de um fago filamentoso (SMITH, 1985). Desde a década de 1980 o potencial da expressão de peptídeos em superfícies no desenvolvimento de imunorreagentes e o auxílio no mapeamento de epítomos já era relatado (PARMLEY; SMITH, 1989). A fusão de fagos revolucionou o desenvolvimento de anticorpos e permitiu sua comercialização como medicamento. Seus avanços foram tantos que foi concedido metade do Prêmio Nobel de Química em 2018 ao criador da técnica George P. Smith e a Sir Gregory P. Winter, responsável por sua aplicação na engenharia de anticorpos (BARDERAS, R., BENITO-PEÑA, E., 2018).

Contudo, devido à dificuldade de expressar polipeptídeos ancorados nas partículas de fagos, a ancoragem de proteínas utilizando bactérias se mostrou bastante atrativa para vencer tal obstáculo e trazer consigo a possibilidade de seleção das células por meio de fluorescência, através da triagem de células marcadas por fluorescência (*fluorescence-assisted cell sorters* - FACS) (FRANCISCO *et al.*, 1993).

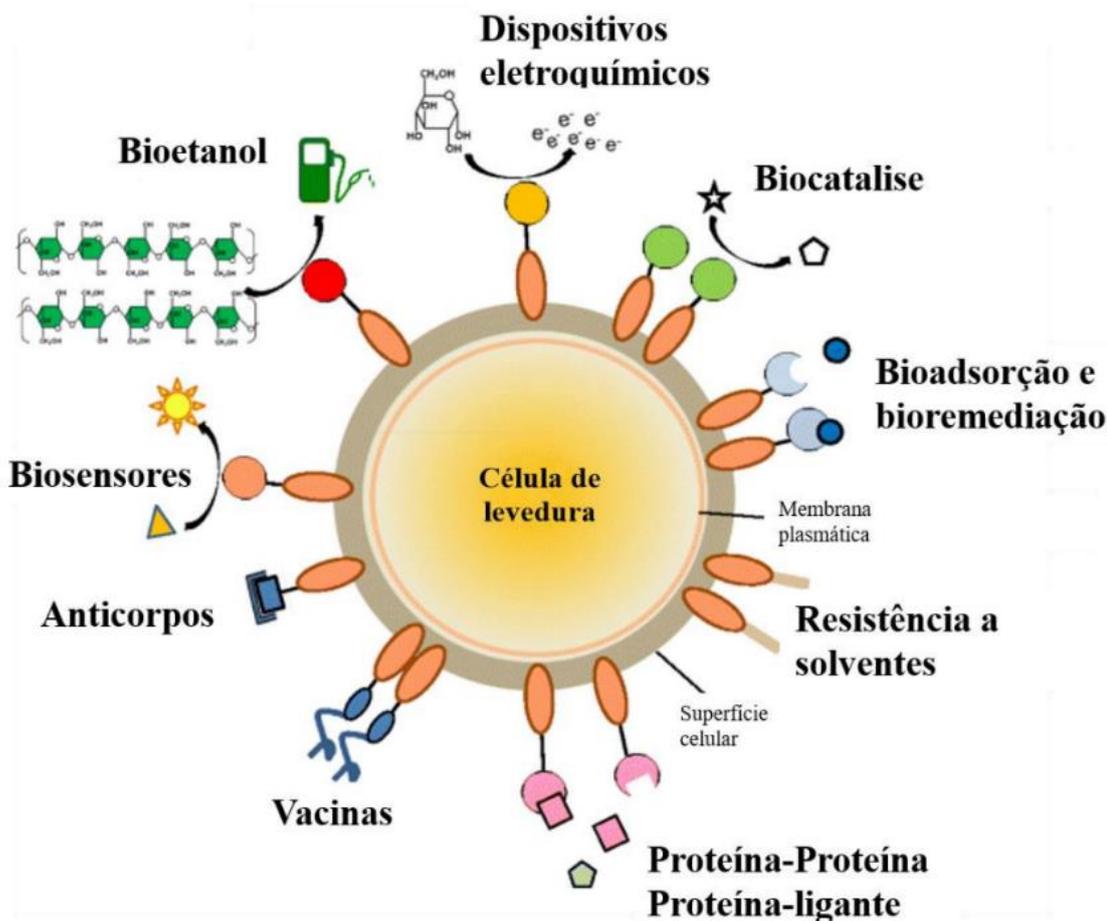
Outro problema a ser solucionado nesta época era a expressão de proteínas mais complexas com modificações pós-traducionais e a utilização de leveduras como

hospedeiro para expressão e ancoragem de proteínas complexas foi iniciado com o trabalho de Maarten P. Schreuder e colaboradores (1993). Com este trabalho pioneiro foi possível expressar uma galactosidase através de sua fusão com uma fração da proteína de adesão celular α -aglutinina, demonstrando que proteínas naturais da levedura podem ser utilizadas para expressar proteínas recombinantes na parede celular de *S. cerevisiae* (SCHREUDER *et al.*, 1993). Com a utilização de células da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, foi possível utilizar um organismo eucarioto seguro para expressão de proteínas eucarióticas.

Além da levedura *S. cerevisiae*, outros tipos de leveduras também foram utilizadas como plataforma de ancoragem e proteínas com o passar dos anos, dentre elas *Pichia pastoris* (SILVA *et al.*, 2020; ANANPHONGMANEE *et al.*, 2021), *Yarrowia lipolytica* (IE; CHENG; DENG, 2019), *Hansenula polymorpha* (KIM *et al.*, 2002; CHEON *et al.*, 2014) e *Kluyveromyces* (ANDREU; DEL OLMO, 2018).

As aplicações do sistema de ancoragem de proteínas em superfície celular são amplamente diversificadas e vão desde o desenvolvimento de possíveis estratégias vacinais mediante a expressão de antígenos recombinantes (BAL *et al.*, 2018; LEI *et al.*, 2020; NGUYEN, *et al.*, 2020; LEI *et al.*, 2021; GAO *et al.*, 2021; CHEN, *et al.*, 2021; LEI *et al.*, 2021; GAO *et al.*, 2021) até a expressão de enzimas celulósicas para a produção de bioetanol (YANG; DANG; LU, 2012; TANG *et al.*, 2018; DONG *et al.*, 2020). A utilização deste sistema também foi demonstrada para triagem e engenharia de proteínas (SHENOY; BARB, 2022), produção de anticorpos (KAJIWARA; AOKI; UEDA, 2020) e biorremediação e biodegradação (DURDIC *et al.*, 2020; DURDIC *et al.*, 2019). Outras aplicações desta plataforma são apresentadas por Andreu e Del Olmo (2018, figura 1).

Figura 1 - Representação das diversas aplicações do sistema de ancoragem de proteínas à superfície celular de *S. cerevisiae*



Fonte: adaptado de Andreu e Del Olmo, 2018

Para garantir a expressão estável da proteína ou peptídeo de interesse, bem como o processamento e enovelamento correto, alguns parâmetros devem ser avaliados para escolha dos componentes ideais para a ancoragem eficiente da proteína alvo. Diferentes parâmetros podem ser definidos e vão desde a escolha dos componentes do sistema, como, a proteína âncora a ser utilizada, sinais de secreção eficientes, promotores gênicos, como também as condições ideais para cultivo das células de levedura que irão auxiliar na correta expressão proteica (TANAKA; KONDO, 2015).

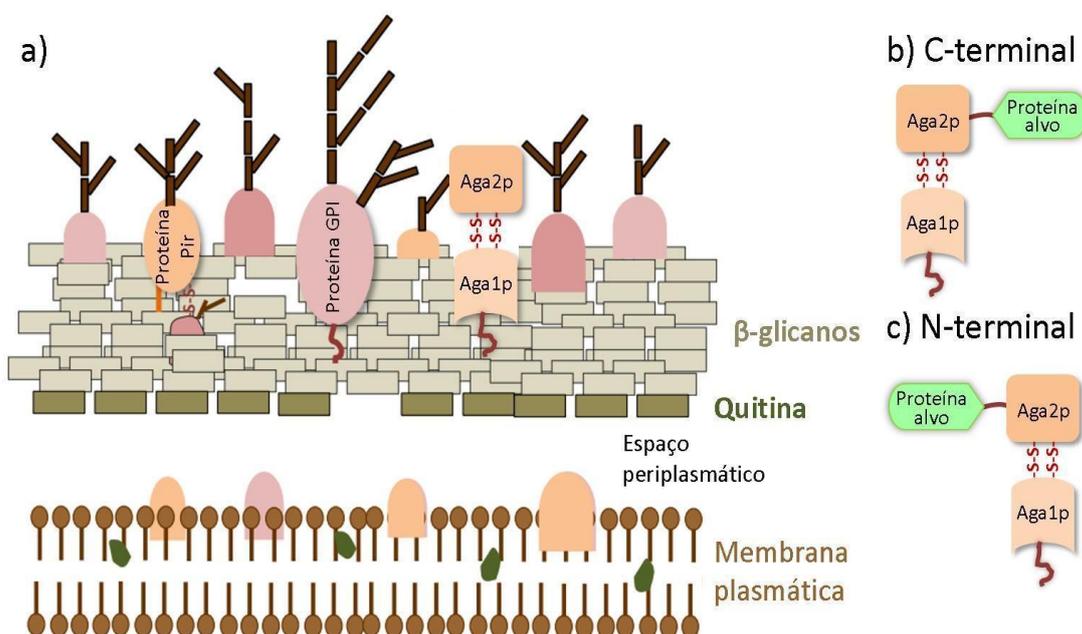
3.3.1 Escolha dos componentes: Proteínas âncora

O *Yeast Surface Display* se baseia na expressão da proteína de interesse fusionada à uma proteína âncora, que geralmente é uma proteína naturalmente

expressa pela levedura. A parede celular de *S. cerevisiae* é organizada em duas camadas, a camada mais interna que é composta por β -1,3/ β -1,6-glucanas e quitina e é responsável pela resistência mecânica da parede celular. A camada mais externa da parede celular de *S. cerevisiae* tem a função de atuar no reconhecimento célula-célula e é composta por proteínas glicosiladas chamadas de manoproteínas, as quais ligam-se a rede de polissacarídeos presentes na parede celular da levedura através de uma estrutura glicolípídica chamada de glicosilfosfatidilinositol (GPI, ANDREU; DE'L OLMO, 2018) como representado na figura 2.

Figura 2 - Representação da estrutura da parede celular de *S. cerevisiae* e principais proteínas utilizadas como âncoras.

a) ilustração das duas camadas presentes da parede celular: a camada interior próxima ao espaço periplasmático composta de folhas de quitina e β -glicanos, e a camada mais externa contendo as manoproteínas: Proteínas ancoradas por GPI, como exemplo específico a proteína aglutinina-A contendo as subunidades Aga2p que está ligada a Aga1p por duas pontes dissulfeto, proteínas Pir ligadas por ligação éster e ligações dissulfeto com as glicanas e glicoproteínas presentes na parede celular. A proteína alvo pode ser expressa fusionada em diferentes pontos de algumas proteínas como aglutinina-A onde a proteína de interesse pode ser ancorada na porção C-terminal (b) e N-terminal (c) da âncora Aga2p.



Fonte: adaptada de Andreu e Del olmo, 2018

A escolha da proteína âncora a ser utilizada é um processo importante que poderá afetar a eficiência de ancoragem da proteína de interesse. A âncora ideal é aquela proteína que consegue expor corretamente a proteína/peptídeo alvo na superfície celular sem interferir em sua acessibilidade, funcionalidade/atividade e

estabilidade (TANAKA; KONDO, 2016; MCMAHON *et al.*, 2018). O tamanho da proteína âncora pode ser uma propriedade interessante para a escolha, visto que proteínas maiores tendem a melhorar a acessibilidade da interação proteína de interesse com seu alvo de aplicação (SATO *et al.*, 2002; MCMAHON *et al.*, 2018; KAJIWARA; AOKI; UEDA, 2020). Foi demonstrado que o uso de uma proteína âncora de 650 aminoácidos de comprimento melhorou a acessibilidade de antígenos à nanocorpos ancorados em superfície celular de *S. cerevisiae* em comparação com a utilização de uma porção da proteína alfa-aglutinina que possui 320 aminoácidos (KAJIWARA; AOKI; UEDA, 2020). No entanto, a utilização de peptídeos espaçadores, como por exemplo o uso do espaçador baseado em uma sequência repetitiva de aminoácidos glicina/serina, pode ajudar a melhorar a acessibilidade a proteínas alvo ancoradas em superfícies (BODER; WITTRUP, 1997; ANDREU; DEL OLMO, 2018).

As principais proteínas utilizadas como âncoras são as proteínas envolvidas na adesão celular (a-aglutinina e α -aglutinina, TANAKA *et al.*, 2012), na floculação (Flo1, SATO *et al.*, 2002) e proteínas estruturais como a SED1 (NOKUMA; HASUNUMA; KONDO, 2014). Além disso, a utilização de proteínas âncoras sintéticas ligadas a parede celular por GPI já foi demonstrada na literatura (KAJIWARA; AOKI; UEDA, 2020).

Vários sistemas desenvolvidos para a ancoragem de proteínas em *S. cerevisiae* utilizam como âncora a glicoproteína nativa a-aglutinina. Diferente das outras proteínas-âncoras a a-aglutinina é formada por duas subunidades, uma delas é responsável por se ligar à parede celular através de GPI (subunidade Aga1p) e a subunidade Aga2p que se liga à Aga1p por duas pontes dissulfeto (CAPPELLARO *et al.*, 1994). É na Aga2p que a proteína de interesse pode ser fusionada, com orientação na região N- ou C-terminal (figura 2b e 2c) desta sub-unidade e essa possibilidade de diferentes posições da proteína heteróloga é uma vantagem da a-aglutinina em relação às outras proteínas-âncoras (ANDREU; DEL OLMO, 2018). A fusão da proteína de interesse a Aga2p já foi utilizada com sucesso para a ancoragem de uma ampla variedade de proteínas heterólogas, como por exemplo, nanocorpos de lisozima, a enzima α -galactosidase e uma hemaglutinina relacionada ao vírus H7N9 (LEI *et al.*, 2020; KAJIWARA; AOKI; UEDA, 2020; DONG *et al.*, 2020).

As características das proteínas âncoras podem determinar se uma proteína alvo seja ancorada eficientemente na superfície celular das leveduras, por exemplo, se a

proteína âncora permiti fusão da proteína de interesse em sua região N ou C terminal. O que pode determinar se uma proteína alvo vai ser expressa na extremidade N ou C terminal de uma proteína âncora é a região responsável pela atividade desta proteína. Uma enzima de interesse onde sua região C-terminal é responsável por sua atividade enzimática não pode ser ancorada em uma proteína-âncora utilizando essa região, pois isso pode afetar sua funcionalidade e mesmo conseguindo níveis suficientes de proteína ancorada ela pode não ser funcionalmente estável (ANDREU; DEL OLMO, 2018).

3.3.2 Escolha dos componentes: Sinal de secreção

Outro elemento importante para o sistema de ancoragem de proteínas é o sinal de secreção utilizado para permitir que a proteína de interesse seja exportada para fora da célula (ANDREU; DEL OLMO, 2018; KAJIWARA; AOKI; UEDA, 2020). Desde seu surgimento como técnica de produção de peptídeos e proteínas recombinantes, o *Yeast Surface Display* (YSD) tem utilizado diferentes peptídeos sinais descritos como eficientes na secreção de proteínas alvo. Em 1997, nas primeiras aplicações da técnica, foram utilizados peptídeos sinais naturais das proteínas de parede celular utilizadas como âncoras, por exemplo, no uso da α -aglutinina é comumente utilizado o peptídeo natural da subunidade Aga2p (BODER; WITTRUP, 1997). Os peptídeos sinais mais utilizados para secreção de proteínas recombinantes é o fator alfa do feromônio do acasalamento (MF α 1SP), seguido do peptídeo sinal da glucoamilase de *Rhizopus oryzae* (GLUASP) (ANDREU; DEL OLMO, 2018; INOKUMA *et al.*, 2016; NIELSEN, 2012). A comparação da ancoragem de nanocorpos com MF α 1SP e GLUASP mostrou que a eficiência de ancoragem é similar em ambos sistemas. Apesar disso, foi demonstrado que MF α 1SP produz uma maior quantidade de nanocorpos funcionais e os autores relacionam esse resultado com o maior número de etapas no processo de clivagem com MF α 1SP em comparação com GLUASP, tal característica permitiria um intervalo de tempo maior no retículo endoplasmático para o enovelamento adequado dos nanocorpos (KAJIWARA; AOKI; UEDA, 2020). Entretanto, o peptídeo sinal da proteína Sed1 de *S. cerevisiae* mostrou eficiência de secreção maior que GLUASP e MF α 1SP na ancoragem e atividade enzimática de três diferentes proteínas de interesse (INOKUMA *et al.*, 2016). Os dados publicados na

literatura levam a considerar a escolha do sinal de secreção um fator chave no processo de ancoragem de peptídeos e proteínas em superfícies celulares.

3.3.3 Escolha dos componentes: Promotores

Finalmente, a escolha da região promotora para controle da expressão gênica é também um fator importante para melhorar a expressão e ancoragem das proteínas alvo. Naturalmente, a expressão dos genes que codificam proteínas de parede celular é relativamente baixa, logo a necessidade de utilizar promotores induzíveis ou constitutivos fortes se faz necessária para aumentar a eficiência de ancoragem da proteína de interesse (ANDREU; DEL OLMO, 2018). O uso de promotores induzíveis traz a vantagem de controlar o momento de expressão de proteínas heterólogas evitando efeitos negativos no crescimento celular (INOKUMA *et al.*, 2016). Promotores constitutivos como GPD, SED1, GAP, TDH3, PGK1 já foram utilizados para ancorar proteínas recombinantes com eficiência em *S. cerevisiae* (INOKUMA; HASUNUMA; KONDO, 2014; ZHANG *et al.*, 2019; KATSURADA *et al.*, 2021). O promotor mais utilizado é o promotor induzível por crescimento em galactose GAL1 (BODER; WITTRUP, 1997). A utilização do promotor constitutivo GAP para produção de nanocorpos demonstrou que ele conseguiu elevar a eficiência de ancoragem destas proteínas em comparação com o uso do promotor GAL1, entretanto, o promotor induzível por galactose foi mais efetivo em produzir nanocorpos funcionalmente estáveis em superfície (INOKUMA *et al.*, 2016).

3.3.4 Avaliação das condições de produção da proteína alvo

Além da escolha dos componentes ideais para alcançar a ancoragem eficiente de peptídeos e proteínas alvo na superfície celular de *S. cerevisiae*, as condições de cultivo celular também podem ser modificadas para aumentar a eficiência de ancoragem e de produção de proteínas funcionais (TANAKA; KONDO, 2015). No geral, as condições de cultura podem ser específicas para a proteína de interesse utilizada, bem como do sistema de ancoragem escolhido. Para sistemas de ancoragem baseado em utilização de promotores induzíveis por galactose, como é o caso da maioria dos trabalhos, algumas considerações são necessárias. Dois fatores importantes para análise são a temperatura que a indução da expressão proteica ocorre e o intervalo de tempo em que as células passam por este processo.

A temperatura em que as células são cultivadas para indução da expressão proteica é um fator chave na eficiência de ancoragem da proteína alvo. Diferentes trabalhos se propuseram a avaliar a temperatura ideal de produção da proteína/peptídeo utilizado para expressão em superfície, e são utilizadas temperaturas entre 20 e 30°C (ANDREU; DEL OLMO, 2013; KAJIWARA; AOKI; UEDA, 2020). Temperaturas menores ajudam no enovelamento das proteínas, reduzem a taxa de crescimento celular e permitem que as proteínas sejam processadas sem limitação de velocidade (CAMARERO, *et al.*, 2012). Estes mesmos autores demonstram como a temperatura de indução a 20°C foi importante para aumentar a produção de uma lacase recombinante em *S. cerevisiae* (CAMARERO, *et al.*, 2012). Além disso, optar por baixas temperaturas para produzir proteínas heterólogas em *E. coli* já foi utilizado para evitar problemas de agregação de proteínas e é empregado para aumentar a quantidade de proteínas corretamente enoveladas (SCHEIN; NOTEBORN, 1988). Kajiwara e colaboradores (2020) demonstraram que induzir a expressão proteica cultivando as células a 25°C teve mais sucesso em aumentar a eficiência de ancoragem da proteína de interesse do que o cultivo a 30°C. Por outro lado, a quantidade de proteínas funcionais era maior quando a expressão proteica era induzida a 30°C, entretanto os autores chamam atenção para características da proteína de interesse. Os resultados variantes na literatura demonstram que a temperatura de indução pode variar a depender da proteína alvo e o seu estabelecimento é uma etapa de suma importância no processo de expressar e ancorar proteínas recombinantes em superfícies celulares.

Outro ponto a ser considerado para alcançar boa eficiência de ancoragem da proteína de interesse é o intervalo de tempo em que a indução da expressão proteica é conduzida. Foi demonstrado que peptídeos ancorados na superfície celular de *S. cerevisiae* podem ser alcançados com eficiência em apenas 8 horas de indução da expressão proteica (ANDREU; DEL OLMO, 2013). Entretanto, outros trabalhos mostram que são necessárias cerca de 72 horas para uma boa eficiência de ancoragem (LEI *et al.*, 2016; LEI *et al.*, 2021). Há também uma flutuação de informações sobre o tempo ideal de indução, mostrando que novamente se faz necessário a avaliação destes parâmetros para cada proteína recombinante a ser produzida.

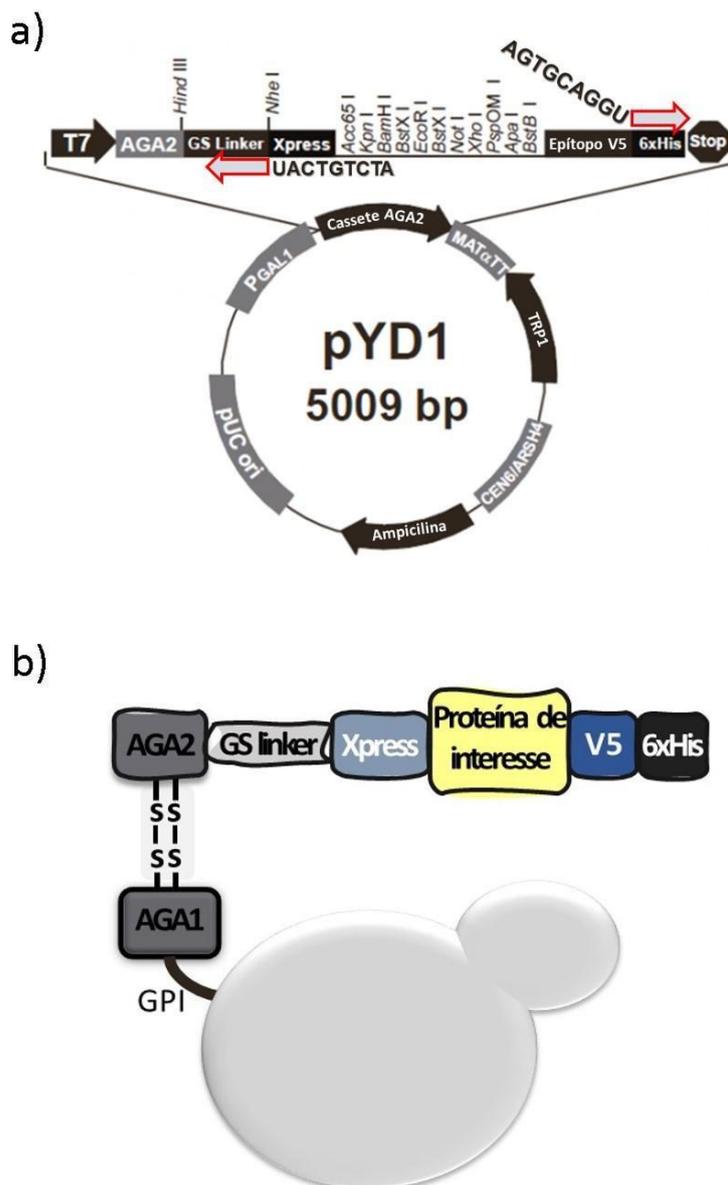
3.3.5 Sistema de ancoragem de proteínas baseado em *S. cerevisiae* EBY100 e vetor pYD1

O sistema de expressão EBY100/pYD1 desenvolvido por Boder e Wittrup (1997) é um dos mais utilizados para a ancoragem de proteínas em *S. cerevisiae*. Seus componentes são o vetor pYD1 (Addgene #73447) e a linhagem hospedeira EBY100 (ATCC MYA-4941DQ). No vetor pYD1, sítios de clonagem posicionados na região 3' do gene AGA2 permitem inserir a sequência codificadora da proteína de interesse de modo que esta seja expressa em fusão com a proteína Aga2p, sob controle do promotor indutível GAL1 (Figura 3). Esse vetor é mantido na linhagem hospedeira EBY100 por supressão de sua auxotrofia para o triptofano. Além disso, na linhagem hospedeira EBY100 foi modificada geneticamente para conter uma segunda cópia do gene AGA1 com expressão controlada pelo promotor PGAL1. Deste modo, a indução da expressão da proteína heteróloga por crescimento em meio de cultura contendo galactose como fonte de carbono, deflagra simultaneamente a expressão da proteína heteróloga e a da proteína Aga1p, requerida para a ancoragem da proteína heteróloga fusionada a Aga2 (BODER; WITTRUP, 1997; figura 3b).

As proteínas ancoradas na parede celular de *S. cerevisiae* podem ser quantificadas utilizando tags de verificação reconhecidas por anticorpos comerciais. O vetor pYD1 permite que a proteína de interesse seja expressa com até três tags para detecção, Xpress, 6xHIS e V5 (Invitrogen, 2002; Figura 3).

Figura 3 - Esquema de representação do vetor pYD1 e da expressão em superfície utilizando esse vetor.

a) mapa do vetor pYD1 com destaque para o cassete AGA2, contendo um espaçador (GS-linker) entre o gene AGA2 (âncora) e a tag Xpress, seguido do sítio de clonagem (MCS – *multiple cloning site*), há a presença ainda de mais duas tags de verificação (V5 e 6xHis) e a finalização da expressão com stop códon. b) Representação da expressão do cassete AGA2, onde a proteína Aga2p se liga à Aga1p por duas pontes dissulfeto, a proteína de interesse ladeada por tags de verificação é fusionada à Aga2p com um espaçador entre elas ((G₄S)₃).



Fonte: Adaptada de *Invitrogen*, 2002

3.4 O PAPEL DO SISTEMA DE ANCORAGEM DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES EM LEVEDURAS NO DESENVOLVIMENTO DE IMUNORREAGENTES E VACINAS

A expressão de proteínas heterólogas ancoradas à superfície celular da levedura *S. cerevisiae* vêm permitindo o desenvolvimento de estratégias vacinais e a produção de imunorreagentes. Um estudo recente mostrou que a expressão de uma proteína antigênica do vírus da Dengue expressa na superfície de *S. cerevisiae* gerou uma resposta imunológica forte *in vivo* e pode ser apresentada como uma estratégia promissora de vacina oral utilizando células de levedura (BAL *et al.*, 2018). Outro estudo promissor demonstrou que uma formulação de levedura expressando uma proteína antigênica de H5N1 foi capaz de proteger camundongos contra um desafio letal deste vírus (LEI *et al.*, 2016). A proteção contra um desafio letal do agente causador da pleuropneumonia suína também foi induzida através da administração oral de células de leveduras recombinantes portando um epítipo neutralizante (KIM *et al.*, 2010). Uma vantagem do sistema de ancoragem de proteínas na superfície celular de *S. cerevisiae* é utilizar as células de levedura exibindo antígenos como estratégia vacinal para administração oral, o que possibilita o desenvolvimento de uma resposta imune humoral e celular em locais sistemáticos e nas mucosas (DE SMET; ALLAIS; CUVELIER, 2014).

Quanto à produção de imunorreagentes, alguns estudos utilizaram o sistema YCD para identificação de antígenos potenciais relacionados ao câncer de mama e testículos (WADLE *et al.*, 2005; WADLE *et al.*, 2006). Outros estudos também utilizaram este sistema para a triagem de anticorpos que podem auxiliar em estudos de engenharia de proteínas e na produção de reagentes para diagnóstico de doenças (KAJIWARA; AOKI; UEDA, 2020; UCHAŃSKI *et al.*, 2019). Só em 2022, foram demonstradas diferentes aplicações bastante relevantes desta plataforma. Usando YSD foram desenvolvidos imunorreagentes capazes de inibir atividade de metaloproteinases, as quais participam do desenvolvimento e progressão de doenças neurodegenerativas e câncer (RAEESZADEH-SARMAZDEH *et al.*, 2022). Um estudo recente, utilizou o sistema de ancoragem de proteínas na superfície de leveduras como plataforma para identificação de mutações no receptor ACE2, mostrando-se uma ferramenta essencial para estudar possíveis variantes existentes e futuras do SARS-CoV-2 (HEINZELMAN; GREENHALGH; ROMERO, 2022). Além disso, foi

demonstrada a ancoragem do receptor ACE2 melhorado *in silico* para utilização como estratégia terapêutica para inibir a entrada do vírus SARS-CoV-2 nas células humanas (GLASGOW et al., 2020). Estes exemplos de aplicação do sistema YSD ilustram seu potencial como ferramenta para o desenvolvimento de imunorreagentes a serem utilizados para conter a propagação de doenças infecciosas e permitir a identificação destes patógenos. Tal abordagem se mostra bastante atraente frente ao surgimento de novas epidemias virais.

3.5 EMERGÊNCIA E REEMERGÊNCIA DE DOENÇAS INFECCIOSAS VIRAIS: UM PROBLEMA MUNDIAL DE SAÚDE PÚBLICA

Recentemente a preocupação com a emergência e reemergências de doenças que possam afetar a segurança da saúde global tem crescido continuamente (ZUMLA; HUI, 2019). A Organização mundial da saúde (OMS) aponta algumas doenças ditas como prioritárias: COVID-19, Febre hemorrágica da Crimeia-Congo, doença do vírus Ebola, doença causada pelo Zika vírus, dentre outras (OMS, 2018-2019). Diante de tal situação, a necessidade de conter e combater a propagação de tais infecções aumenta a busca por mais estudos envolvidos no desenvolvimento de estratégias vacinais e de diagnóstico.

3.5.1 COVID-19: SARS-CoV-2

A COVID-19 causada pelo coronavírus da síndrome respiratória aguda grave 2 (SARS-CoV-2) foi considerada emergência em saúde pública mundial pela OMS em 30 de janeiro de 2020 e caracterizada como pandemia dois meses depois. A situação epidemiológica global, atualizada em 05 de agosto de 2022, relata cerca de 579,1 milhões de casos confirmados e 6.407.556 milhões de mortes em todo o mundo (OMS). A necessidade de conter e combater a propagação desta infecção é uma prioridade mundial de saúde pública. Apesar de já haver diferentes vacinas aprovadas e sendo administradas para a população, o surgimento de novas variantes demonstra a necessidade de mais estudos sobre o vírus SARS-COV-2 e desenvolvimento de estratégias que possam auxiliar a conter a propagação de novos surtos. Além disso, o desenvolvimento de imunorreagentes diagnósticos para COVID-19 que sejam eficientes e de rápida produção podem nos ajudar a estar preparados para possíveis futuros picos de transmissão desta infecção.

As estratégias vacinais e de diagnóstico que vêm sendo estudadas se concentram nas proteínas do Nucleocapsídeo (N) e Spike (S) do SARS-CoV-2, sendo a proteína S o principal alvo de anticorpos neutralizantes e possui um papel crítico na entrada do vírus nas células humanas (DUTTA; MAZUMDAR; GORDY, 2020; FUNG; LIU, 2019; WRAPP *et al.*, 2020; BARNES *et al.*, 2020). Essa entrada inicia-se com a ligação do domínio RBD (domínio de ligação ao receptor) ao receptor da enzima conversora de angiotensina II (ACE2; FUNG; LIU, 2019). Além disso, já foi descrito a utilização de um epítipo da proteína do nucleocapsídeo (N4P5) (AMRUN *et al.*, 2020) que possui homologia com um epítipo importante da proteína N do SARS-CoV, o qual já foi descrito como imunogênica para resposta de células B contra soro de pacientes com SARS (LIU *et al.*, 2006). O epítipo N4P5 foi identificado como um epítipo linear de células B e descrito como imunodominante, altamente específico e sensível na diferenciação de COVID19 de outras infecções por coronavírus (AMRUN *et al.*, 2020). A sua utilização pode permitir o desenvolvimento de imunoenaios capazes de detectar a presença de anticorpos anti-SARS-CoV-2.

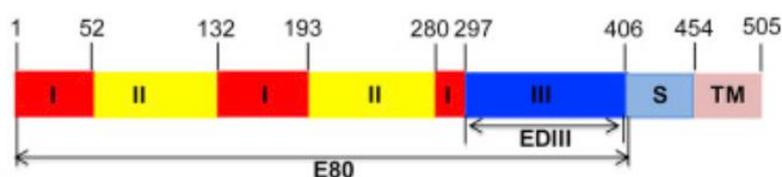
3.5.2 ZIKA VÍRUS

A pandemia de Zika vírus que ocorreu durante 2016-2018 foi associada à relatos sem precedentes de distúrbios neurológicos variando desde a síndrome de Guillain-Barré à microcefalia (BRASIL *et al.*, 2016; BARRETO *et al.*, 2016; MARTINES *et al.*, 2016). Apesar do número de casos relatados terem diminuído desde o pico da pandemia em 2016, ainda há grande preocupação com a possibilidade de novos surtos surgirem (SHARMA *et al.*, 2020). Atualmente, ainda não há uma vacina disponível para proteção contra o Zika vírus e a busca por uma estratégia de vacinação é a chave para proteger a população contra novos surtos da doença (SHARMA *et al.*, 2020).

Uma das principais proteínas utilizadas em estratégias vacinais anti-ZIKV é a proteína do Envelope (Env), a qual possui importante papel no ciclo viral e é considerada um dos principais alvos antigênicos (PARDI *et al.*, 2017; QU *et al.*, 2018; KIM *et al.*, 2018; GOO *et al.*, 2018). Diferentes porções da proteína E vem sendo estudadas quanto ao seu potencial vacinal (QU *et al.*, 2018; QU *et al.*, 2020; YU *et al.*, 2017; ZHANG *et al.*, 2019). O ectodomínio (E80) da proteína do envelope de ZIKV, corresponde a 80% da região N-terminal e refere-se à porção externa desta proteína

(Figura 4). A proteína E80 expressa em células de insetos se mostrou capaz de gerar resposta imunológica em camundongos e os anticorpos específicos gerados (anti-E80) foram capazes de proteger os camundongos contra um desafio letal de ZIKV (QU *et al.*, 2018). Recentemente, Yang e colaboradores (2021) realizaram um estudo comparativo utilizando proteínas como estratégias vacinais em macaco-rhesus, onde foi comparada a utilização do domínio EDIII e do ectodomínio (E80). A imunização com ambas as proteínas induziu a produção de anticorpos neutralizantes, mas apenas E80 foi capaz de protegê-los contra um desafio letal de ZIKV. Além disso, a utilização da porção E80 da proteína do envelope da Dengue teve um grande avanço e se encontram em fase de ensaios clínicos (NCT00707642, NCT00936429 e NCT01477580; YANG, R., 2021). Em comparação com o domínio EDIII, o ectodomínio da proteína do envelope do Zika vírus foi capaz de inibir a infecção por ZIKV no sangue periférico e nos tecidos de macacos rhesus (YANG *et al.*, 2021). Além disso, os mesmos autores demonstraram que os macacos imunizados com E80 desenvolveram uma resposta imunológica com qualidade e durabilidade maior que a EDIII. Por tais motivos, a utilização do ectodomínio do ZIKV pode ser considerada uma estratégia promissora para o desenvolvimento de uma vacina segura e eficaz contra o vírus Zika.

Figura 4 - Representação esquemática da proteína do envelope de Zika vírus evidenciando a porção referente ao ectodomínio (E80)



Fonte: QU *et al.*, 2018

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

4.1.1 Linhagens de microrganismos e meios de cultura

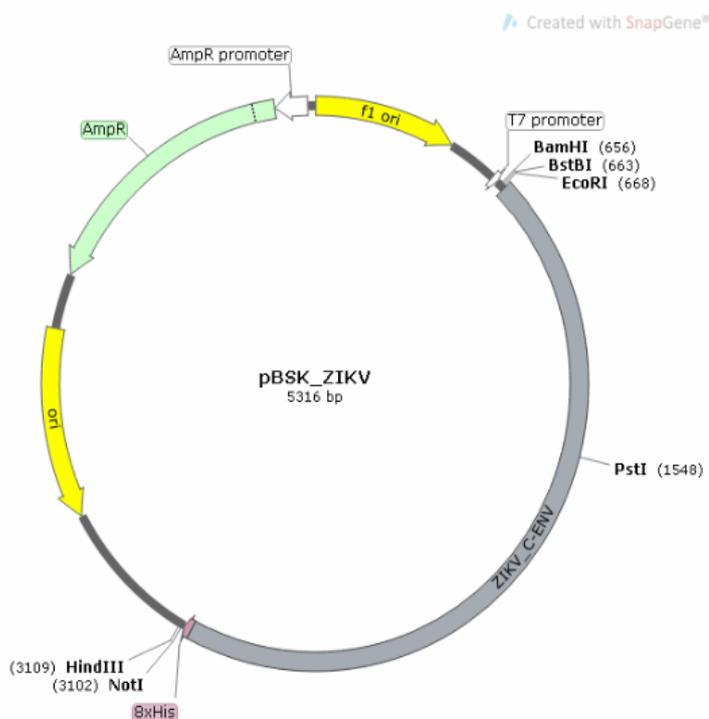
Para obtenção e manutenção dos vetores recombinantes, foi utilizada a linhagem de *Escherichia coli* DH5 α . Para tanto, foi cultivada em meio Luria-Bertani (1% de triptona, 1% de NaCl e 0,5% de extrato de levedura, acrescido de 1,5% de ágar quando necessário), suplementado com 100 μ g/L de ampicilina. Para os ensaios de transformação bacteriana, foram utilizados meio LB suplementado com 20 mM de MgSO $_4$ e meio SOC (2% de triptona, 10 mM de NaCl, 0,5% de extrato de levedura, 2,5 mM de KCl, 20 mM de glicose, com pH ajustado em 7,0 usando KOH 5M). Para expressão e ancoragem das proteínas recombinantes, utilizamos a linhagem *S. cerevisiae* EBY100 (Leu-, Trp-; ATCC MYA-4941). Para os ensaios de transformação de levedura, foi utilizado meio YPD (1% extrato de levedura, 2% glicose e 2% peptona) e, para a seleção dos transformantes, foi utilizado meio mínimo sem acréscimo de triptofano (6,7% de YNB sem aminoácidos, 2% de glicose e 60 μ g/mL de leucina). Quando necessário cultivar a linhagem parental, o meio foi acrescido de 40 μ g/mL de triptofano. Para os ensaios de indução da ancoragem, foi utilizado meio mínimo sem acréscimo de triptofano.

4.1.2 Genes, *primers* e plasmídeos utilizados

A sequência que codifica o ectodomínio da proteína do envelope do Zika vírus foi amplificada a partir do vetor pBSK-ZIKV (cepa ZIKV/H.sapiens/Brazil/PE243/2015, Genbank: KX197192.1; Figura 5) que contém os genes que codificam as proteínas estruturais do Zika vírus otimizadas para expressão em *Pichia pastoris*, permitindo também sua expressão em *S. cerevisiae*. Para tanto, foram utilizados primers que anelam a partir do ATG inicial e no fim da região referente a 80% da sequência 3' do gene do envelope (tabela 1), gerando um amplicon de 1.245 pb (E80-ZIKV), tal como representado na Figura 6.

Figura 5 - Representação do vetor pBSK-ZIKV.

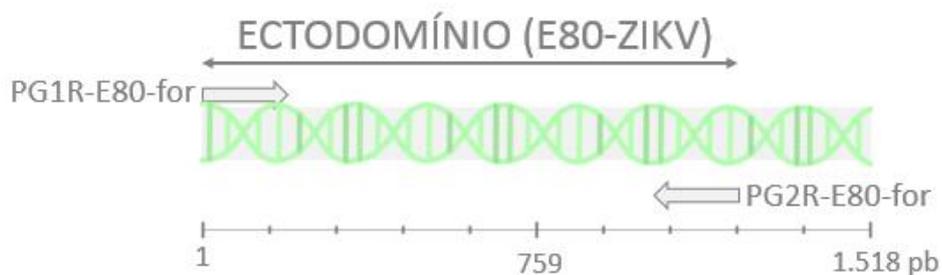
O vetor possui as sequências gênicas que codificam as proteínas do capsídeo, proteína pré-membranar e proteína envelope do Zika vírus, otimizadas para expressão em *Pichia pastoris*.



Fonte: Produzida em SnapGene

Figura 6 - Esquema de amplificação do gene que codifica a proteína do envelope do Zika vírus e seu ectodomínio (E80).

O fragmento de DNA referente à região E80-ZIKV foi amplificado com os primers (PG1R-E80-For) e (PG2R-E80-Rev) representados pelas setas.



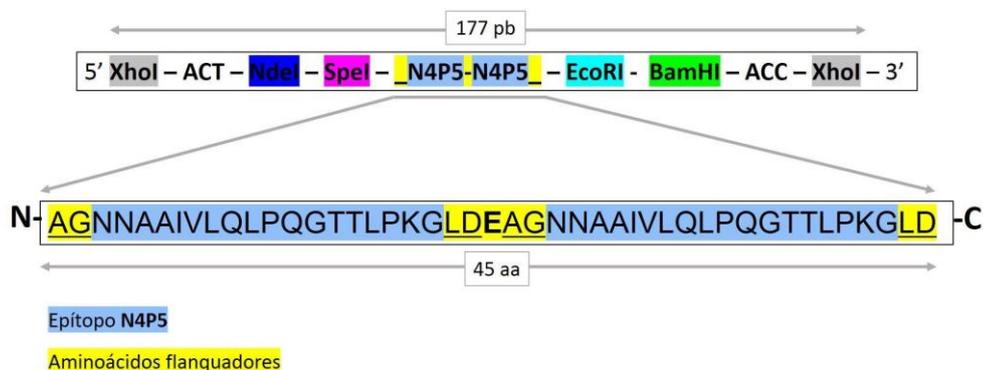
Fonte: A autora, 2022

O epítipo N4P5 refere-se à sequência de aminoácidos compreendendo do resíduo 153 ao 170 (NNAAILVQLPQGTTLPKG, sequência baseada em Genbank: MN908947.3, cepa Wuhan-Hu-1) da proteína nucleocapsídeo do SARS-CoV-2. Para

expressão do epítipo N4P5 em *S. cerevisiae*, realizamos a síntese de DNA do fragmento com uma estratégia que adiciona aminoácidos flanqueadores para melhorar a apresentação do epítipo (MISHRA, 2018). De tal maneira, a sequência a ser sintetizada foi construída baseada numa sequência de aminoácidos contendo duas cópias do N4P5 concatenadas, ladeada por aminoácidos AG (Alanina-Glicina) na região N-terminal e LD (Leucina-Astartato) na região C-terminal do epítipo com um glutamato (E) central separando-as (Figura 7). A sequência nucleotídica foi otimizada para expressão em *S. cerevisiae* e sintetizada (GenScript). Obtivemos a sequência de DNA no vetor pUC57 contendo sítios de restrição para sua obtenção. Para a construção dos vetores pYD1:E80-ZIKV e pYD1:N4P5-SARS, foi utilizado o plasmídeo pYD1 (INVITROGEN 2002; BODER; WITTRUP, 1997) para expressão e ancoragem das proteínas virais, o qual é selecionável através da marca de seleção auxotrófica para o triptofano, gene *trp1*, componente da via de síntese do aminoácido triptofano. Portanto, as células recombinantes são selecionadas em meio seletivo sem triptofano. Os primers utilizados foram sintetizados pela *Exxtend* ou *Thermo Fisher Scientific* e estão descritos na tabela 1.

Figura 7 - Representação da estratégia de síntese do gene codificante do epítipo N4P5 da proteína do nucleocapsídeo do SARS-CoV-2.

Na parte superior é ilustrado a estratégia de síntese utilizada, onde sítios de restrição foram posicionados nas extremidades do epítipo N4P5; ACT e ACC referem-se a códon utilizados para manter o tamanho das extremidades necessários para o *design* de primers que possam amplificar o gene de interesse em todas as sínteses realizadas. Na região inferior da figura é ilustrado duas cópias do epítipo N4P5 (azul) concatenadas pelo uso de aminoácidos espaçadores (amarelo).



Fonte: A autora, 2022

Tabela 1 - Lista de primers utilizados nas construções e verificação das clonagens

Nome	Sequência 5'-3'	T*	Uso
GP2F-pYD1	ATCTGTCAU CATCACCATCACCATTGAG TT	65°C	Amplificação do pYD1 para fusão USER
GP1F-pYD1	AGTGCAGGU CATGCTAGCAGAACCACC ACC		
PG1R-E80-For	ACCTGCACU GCAATCAGGTGCATAGGA GTC	60°C	Amplificação do inserto E80-ZIKV para fusão USER
PG2R-E80-Rev	ATGACAGAU AATGGTGCTGCCACTCCT GTGC		
pYD1 forward** (P1)	AGTAACGTTTGTCTAGTAATTGC	53°C	Verificação de clonagens no pYD1 (P1 e P4)
pYD1 reverse** (P2)	GTCGATTTTGTACATCTACAC		
PG2F_PI- Univ_for (P2)	ACCTGCACU CTCGAGACTCATATGACTA GT	55°C	Amplificação de N4P5-SARS, usados na verificação - 2ª etapa (P2 e P3)
PG2F_PI- Univ_re (P3)	ATGACAAAU CTCGAGGGTGGATCCGAA TTC		

Em negrito está representado as caudas dos primers para clonagem USER com a uracila em vermelho

*Temperatura de anelamento utilizada neste trabalho

** Descrito por Invitrogen (2002)

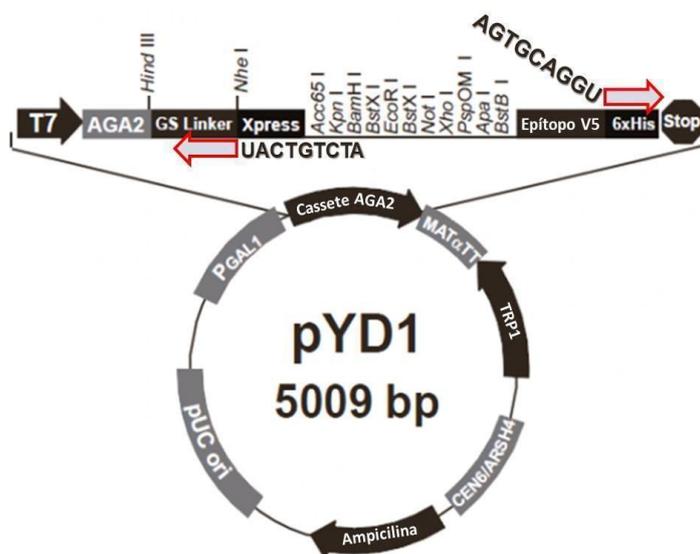
4.2 MÉTODOS

4.2.1 Obtenção do vetor recombinante pYD1:E80-ZIKV

4.2.1.1 Amplificação dos *biobricks* para a clonagem USER

O vetor pYD1 foi amplificado com primers que anelam na região do espaçador GS-linker e da TAG de verificação 6xHIS (Figura 8, Tabela 1), para permitir a inserção do gene de interesse entre estes dois elementos.

Figura 8 - Representação do vetor de expressão e ancoragem pYD1.
As setas representam o anelamento dos primers de amplificação (GP2F-pYD1 e GP1F-pYD1) do vetor pYD1 com extremidades USER contendo uma uracila.



Fonte: Adaptada de Invitrogen, 2002

A temperatura de anelamento dos primers para amplificação do pYD1 foi definida com *Platinum™* Taq DNA polimerase (Invitrogen). Para obtenção do fragmento de DNA referente ao vetor (*biobrick* pYD1), necessário para a clonagem baseada em fusão USER, foi utilizada a Phusion U Hot Start DNA polimerase (Thermo Scientific), que possui tolerância às uracilas presentes nos *primers*. Cerca de 8 ng do vetor pYD1 foi utilizado como molde em uma reação de 50 μ L de volume total, contendo 0,5 μ M de cada primer, 5 U de DNA polimerase, 1,5 mM de MgCl₂ e 400 μ M de cada dNTP. A reação foi incubada em termociclador com desnaturação inicial a 98°C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturação a 98°C por 30 segundos, anelamento dos primers a 65°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 2 minutos e 20 segundos, seguido de extensão final a 72°C por 5 minutos. Para detecção dos resultados, 5 μ L de reação foi aplicado em gel de agarose 0.8% (60 mL) e revelado com 3 μ L do corante de DNA *UniSafe Dye 20.000X* (Uniscience), para confirmar a correta amplificação.

Para a obtenção do *biobrick* E80-ZIKV a partir do vetor pBSK-ZIKV, foi realizada a otimização das condições de amplificação, como anelamento dos primers e quantidade de molde, as quais foram pré-definidas utilizando *Platinum™* Taq DNA polimerase (Invitrogen). Após a otimização das condições, a PCR final do E80-ZIKV foi realizada utilizando a DNA polimerase U-tolerante *Phusion U Hot Start* (Thermo

Scientific). Em uma reação de 50 μ L, foram adicionados 5 ng do extrato plasmidial do pBSK-CprME, 1 U de polimerase, 0,5 μ M de cada primer e 200 μ M de cada dNTP. A configuração de amplificação seguiu as recomendações da bula da enzima, partindo de uma desnaturação inicial a 98°C por 30 segundos, seguido de 35 ciclos de desnaturação a 98°C por 10 segundos, anelamento dos primers a 60°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto e 20 segundos, seguido de extensão final a 72°C por 5 minutos. A correta amplificação dos amplicons foi confirmada como descrito anteriormente.

4.2.1.2 Clonagem de DNA por fusão USER

Antes de prosseguir para a clonagem de DNA, os *biobricks* foram tratados com a enzima *Dnpl*, a qual é capaz de reconhecer e cortar sítios GATC metilados, e devido a essa característica é utilizada para degradar o DNA plasmidial usado como molde na PCR e impedir que este resulte em falsos positivos na clonagem em *E. coli*. A digestão foi realizada adicionando 10 U de enzima *DpnI* (Thermo Scientific) na reação de PCR com incubação a 37°C por 2 horas e inativação enzimática à 80°C por 20 minutos. Em seguida, o *biobrick* referente ao vetor pYD1 foi purificado de gel usando o kit de purificação GeneJET (Thermo Scientific), seguindo as instruções do fabricante. Finalmente, os *biobricks* pYD1 e E80-ZIKV foram quantificados em gel de agarose por densitometria, utilizando uma calibração a partir do marcador de peso molecular *GeneRuler 1 kb DNA Ladder* (Thermo Scientific) através do software GelAnalyzer 19.1 (desenvolvido por Istvan Lazar Jr. e Istvan Lazar, disponível em www.gelalyzer.com).

A metodologia de clonagem USER (BITINAITE et al., 2007) se baseia na fusão de fragmentos obtidos por PCR sem a necessidade de enzimas de restrição e DNA ligase. Nesta técnica, utiliza-se um reagente comercial composto por duas enzimas, uma uracila DNA glicosidase responsável por excisar bases uracila presentes nos primers utilizados, tornando-os sítios abásicos, os quais irão ser quebrados por uma endonuclease. Desta forma, fragmentos de PCR obtidos com primers USER (primers contendo uracila e uma extremidade desenhada para permitir pareamento de bases) são tratados com o reagente USER para tornar as extremidades coesivas. Após etapa de fusão USER, estes fragmentos hibridizados por ligações de hidrogênio entre as

bases são utilizados para transformar células bacterianas, para que estas executem a completa ligação dos fragmentos utilizando uma DNA ligase endógena.

Para realização da fusão USER, foram utilizados 30 ng do *biobrick* pYD1 e 23,12 ng do *biobrick* E80-ZIKV, para uma razão molar de 3:1 entre inserto e vetor. A reação de fusão USER foi realizada em microtubo de 0,2 mL contendo 10 U de enzima USER®, tampão Phusion HF 1X, 30 ng de *biobrick* pYD1 e 23,12 ng de *biobrick* E80-ZIKV, e foi adicionado água de injeção para um volume final de 10 µL. A configuração de incubação foi realizada seguindo as recomendações do manual *EasyClone-MarkerFree* (JESSOP-FABRE *et al.*, 2016), iniciando a 37°C por 25 min, seguido de decréscimo de temperatura para 25, 20 e 15°C por 10 minutos em cada etapa.

A reação completa de fusão USER (10 µL) foi utilizada para transformar 100 µL de células competentes de *E. coli* DH5α preparadas através de um protocolo baseado em Inoue (1990). Após adição do DNA, os tubos contendo células competentes foram incubados em gelo por 30 minutos e em seguida submetidos a choque térmico a 42°C por 30 segundos. Após incubação no gelo por 2 minutos e recuperação em meio SOC à 37°C por 40 minutos, as células foram ressuspensas em solução salina e plaqueadas em meio seletivo LB-ampicilina. Em paralelo, foram incluídos controles de transformação para averiguar a eficiência de transformação do lote de células competentes utilizado, e controle negativo, células que passaram pelo processo de transformação sem adição de DNA.

Após 16 horas de incubação a 37°C, as colônias crescidas foram ressuspensas em 4 µL de água de injeção e utilizadas em ensaios de verificação da correta clonagem por PCR de colônia e repique dos clones positivos em placa LB-ampicilina.

4.2.1.3 Confirmação da clonagem por PCR de colônia

A PCR de verificação da clonagem foi realizada com a utilização dos primers de verificação do vetor pYD1 (tabela 1). Para tanto, foi utilizada a *Platinum*TM Taq DNA polimerase (Invitrogen), em reações de 10 µL de volume final e foram adicionados 0,25 µM de cada primer, 0,2 U de enzima, 0,2 mM de dNTPs e 1,5 mM de MgCl₂. Para fins de confirmação, foram adicionados controles de PCR: para controlar a funcionalidade da reação de PCR foi incluso uma reação contendo uma colônia de *E. coli* DH5α transformada com o vetor pYD1 vazio; para confirmar a reação de PCR foi adicionado uma reação contendo o extrato plasmidial do pYD1 como molde e, por fim,

foi também adicionado um controle negativo sem molde de DNA ou colônia. Para a verificação da PCR, o volume de 5 µL de cada reação foi adicionado no gel de agarose 1,8% e revelado como descrito anteriormente.

4.2.2 Obtenção do vetor recombinante pYD1-N4P5-SARS

4.2.2.1 Construção do vetor recombinante por clonagem convencional

Para clonagem convencional, o vetor de expressão pYD1 e o vetor pUC57:N4P5-SARS foram digeridos com a enzima *Xho*I. Numa reação com volume total de 50 µL foram inseridos 2,5 µg de DNA plasmidial, 10 U de enzima *Xho*I (New England Biolabs) e 5 µL de tampão NEB 2.1 e as reações de digestão foram incubadas à 37°C por 2 horas. Para confirmação dos resultados, 10 µL de cada reação foi aplicado em gel de agarose 1% e 2% para o pYD1 e pUC57:N4P5-SARS, respectivamente. Em seguida, a fim de prevenir religação do vetor pYD1, devido a digestão apenas com uma enzima de restrição, este foi tratado com 1U de enzima fosfatase alcalina (CIAP, Thermo scientific) por incubação a 37°C durante 5 minutos, seguida de inativação enzimática a 65°C por 15 minutos. Antes de prosseguir a etapa de ligação dos fragmentos, estes foram extraídos de gel, purificados usando o kit de extração de DNA GeneJET (Thermo scientific) e quantificados em gel de eletroforese como descrito anteriormente. Finalmente, numa reação de 10 µL contendo 50 ng de vetor pYD1, foi adicionado o inserto N4P5-SARS numa proporção molar de 3:1 (5,12 ng), 0,5 µL de T4 DNA ligase (Takara Bio) e 1 µL de tampão T4 DNA ligase 10X. A ligação foi incubada por 16 horas à 16°C.

A reação completa de ligação foi utilizada para transformar 100 µL de células competentes de *E. coli* DH5α como descrito previamente.

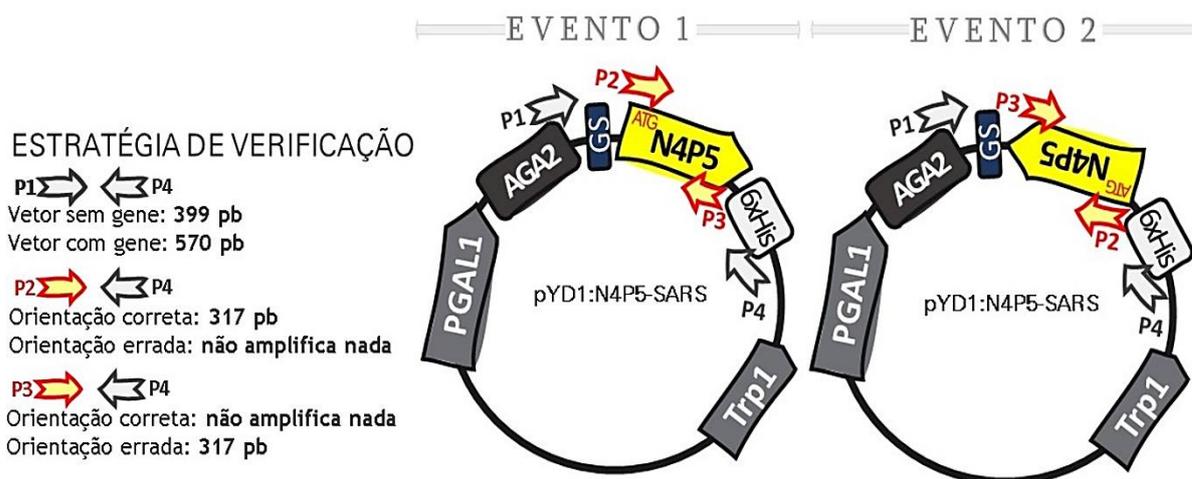
4.2.2.2 Confirmação da construção do vetor recombinante pYD1:N4P5-SARS

As colônias foram utilizadas em ensaios de PCR para verificação da correta orientação de clonagem do gene de interesse N4P5, utilizando os *primers* listados na tabela 1. Três combinações diferentes de primers foram utilizados, a citar: pYD1-forward com pYD1-reverse; pYD1-forward com PG2F_PI-Univ_rev; e PG2F_PI-Univ_rev com pYD1-reverse (Figura 9) Para tanto, foi utilizada a *Platinum*TM Taq DNA polimerase (Invitrogen), em reações de 10 µL final, foram adicionados 0,25 µM de

cada primer, 0,2 U de enzima, 0,2 mM de dNTPs e 1,5 mM de MgCl₂. Para fins de confirmação, foram adicionados controles de PCR como já descrito anteriormente. Para verificação da PCR, 5 µL de cada reação foi adicionado no gel de agarose 1,8%. Colônias positivas nesta verificação foram cultivadas em meio LB-ampicilina para extração do DNA plasmidial por lise alcalina, em seguida, o DNA plasmidial foi analisado em gel de agarose 1% e quantificado por densitometria.

Figura 9 - Representação da verificação da correta orientação do inserto N4P5-ZIKV no vetor pYD1.

Na clonagem convencional de N4P5-ZIKV no plasmídeo pYD1 via restrição com a enzima *Xho*I, apenas os primers de verificação P1 + P4 não são capazes de verificar a correta construção. Isso ocorre pois há dois eventos de ligação acontecendo: 1. O gene entra no vetor na orientação correta e é capaz de ser verificado com os primers P2 + P4, por exemplo, amplificando um fragmento positivo de 317 pb. Evento 2: o gene entra invertido e portanto não será capaz de expressar corretamente o gene de interesse, a utilização dos primers P2 + P4 neste caso não funciona visto que eles anelam na mesma direção.



Fonte: A autora, 2022

Os clones com orientação correta do inserto N4P5-SARS prosseguiram para etapa de sequenciamento de DNA (Plataforma de sequenciamento da UFPE), para confirmação final da obtenção do vetor recombinante.

4.2.3 Transformação de levedura

Os plasmídeos recombinantes pYD1:E80-ZIKV e pYD1:NEP5-SARS confirmados por sequenciamento de DNA e quantificados, prosseguiram para etapa de transformação de levedura. Para o preparo e transformação de células da levedura *S. cerevisiae* EBY100, foi empregado o protocolo de transformação química por

acetato de lítio (GIETZ, R.D.; WOODS, R.A., 2002). Durante a transformação de levedura, além das reações contendo 100 ng dos vetores recombinantes, foram adicionados controles de viabilidade celular, controle positivo contendo 100 ng do vetor pYD1 vazio e controle negativo, sem adição de DNA. Em cada uma destas reações de transformação, 1×10^8 células de EBY100 foram tratadas com solução de transformação (100 ng do DNA de interesse, 33% de polietilenoglicol 3350, 100 mM de acetato de lítio e 100 ng de DNA carreador) e incubadas à 42°C por 45 minutos. Após centrifugação, as células foram ressuspensas em 100 μ L de solução salina, plaqueadas em seio mínimo YNB-CAA-glicose suplementado com leucina 60 μ g/mL (sem adição de triptofano) e incubadas a 30°C. Após 3 dias de crescimento, as células transformantes foram repicadas para análises.

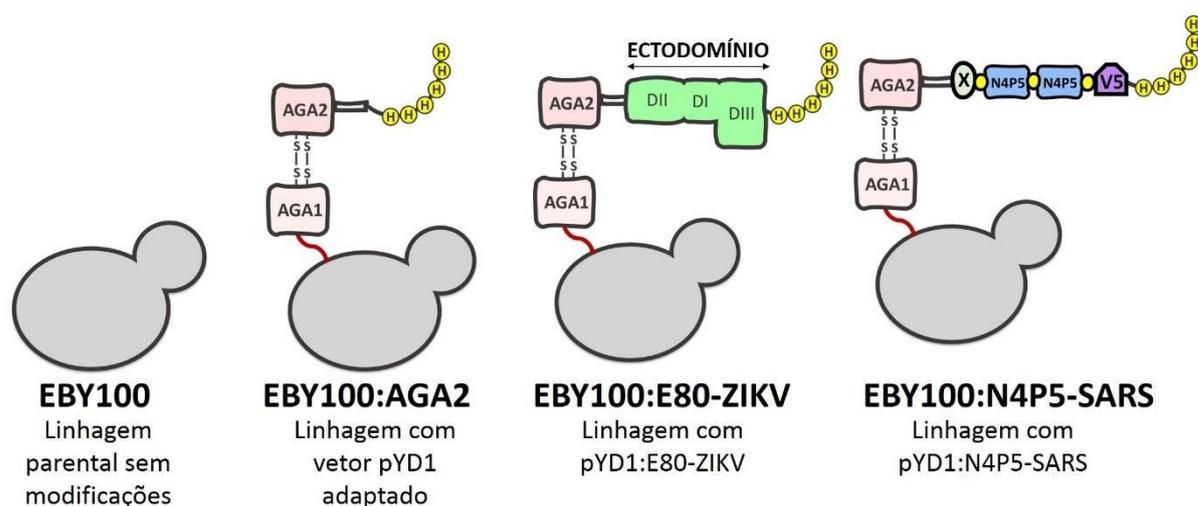
Para verificação da transformação, foi realizada PCR de colônia de levedura, utilizando os primers de verificação do vetor pYD1, seguindo as mesmas condições descritas anteriormente. Antes de serem usadas como molde na PCR, uma pequena alíquota de cada colônia transformante foi adicionada em 15 μ L de NaOH 20 mM e incubada por 15 minutos a 96°C para lise celular. Controles de PCR, como o controle negativo sem DNA para analisar possíveis contaminantes, controle positivo com extrato de pYD1 foram acrescentados. Além disso, as linhagens EBY100:pYD1 (vetor vazio) e EBY100:AGA2 (linhagem contendo o vetor pYD1 apenas com âncora AGA2 e cauda de poli-histidina, sem outras tags de verificação) foram adicionadas para confirmação das células que serão utilizadas nos ensaios de análise de ancoragem das proteínas. Para análise do resultado, 5 μ L de cada reação de PCR foi verificado por eletroforese em gel de agarose 1,8%.

4.2.4 Ensaio de avaliação das condições ideais de indução da expressão das proteínas E80-ZIKV e N4P5-SARS

O grupo de linhagens utilizado foi composto pelas linhagens de interesse EBY100:E80-ZIKV e EBY100:N4P5-SARS e pelos controles do ensaio: controle negativo (EBY100, linhagem parental) e controle positivo (EBY100:AGA2, linhagem contendo o vetor sem proteína de interesse). Para obtenção de biomassa celular, foi iniciado um pré-inóculo com 10 mL de meio mínimo (glicose, com suplementação de triptofano para a linhagem parental auxotrófica) em *Erlenmeyers* de 125 mL, o qual foi incubado por 16 horas a 30°C (150 rpm). No segundo dia de experimento, as células

foram re-inoculadas para uma DO inicial de 0,3 (medida em 600 nm, espectrofotometro *GeneQuant® GE Healthcare*) em 30 mL de meio mínimo (glicose) em *Erlenmeyers* de 250 mL incubados por 16 horas a 30°C (150 rpm), até uma DO entre 3 e 5. Para iniciar a indução, as células foram lavadas duas vezes com água destilada estéril e inoculadas em 60 mL de meio mínimo (galactose, usando *Erlenmeyers* de 500 mL) numa concentração de 1×10^7 células por mL (equivalente a DO600 igual a 1) e incubados na incubadora shaker a 150 rpm. O ensaio de avaliação da ancoragem foi simultaneamente realizado a 20 e 30°C, utilizando o grupo de quatro linhagens de levedura em duas incubadoras distintas. Para analisar os diferentes tempos de indução, amostras de 10 mL de cada um dos dois grupos foram retiradas após 24, 48 e 72 horas de indução. Em cada um dos pontos de amostragem, a concentração celular foi medida em DO600 e o volume referente a $6,2 \times 10^7$ células foi concentrado em 300 μ L e aplicado em triplicata (100 μ L por poço) em placas de 96 poços (Corning) para os ensaios de análise da ancoragem de proteínas por *Yeast-ELISA*. A figura 10 representa a apresentação das proteínas em superfície das linhagens utilizadas neste trabalho.

Figura 10 - Representação do resultado esperado após indução da expressão proteica e ancoragem das proteínas em superfície das linhagens utilizadas neste trabalho.



Fonte: A autora, 2022

4.2.5 Avaliação da ancoragem de proteínas por Ensaio de *Yeast-ELISA* direto

Após cada ponto de amostragem, 100 μL de solução contendo 2×10^7 células de cada tratamento foi adicionado em triplicata na placa de 96 poços (Corning) e, em paralelo, foi realizado um controle negativo apenas com tampão PBS/BSA (a ser usado como branco). As placas foram incubadas por 16h a 20°C (150 rpm) para adsorção das leveduras. No dia seguinte, após descartar o conteúdo e secar a placa por inversão em papel toalha, foram realizadas três lavagens com 100 μL de tampão PBST 1X (Tampão PBS 1X pH 7,4 contendo NaCl 137 mM, KH_2PO_4 2 mM, NaH_2PO_4 10 mM, KCl 2,7 mM, 0,05% de Tween 20). Em seguida, foram adicionados 100 μL de PBST 1X contendo 5% de albumina de soro bovino (BSA, Sigma Aldrich), necessário para bloquear regiões que não contém levedura adsorvida, evitando a ligação inespecífica do anticorpo à parede dos poços. A placa foi incubada novamente a 20°C por 2 horas e em seguida lavada três vezes com 100 μL de PBST 1X. Após a etapa de bloqueio, foram adicionados 50 μL de PBST 1X contendo 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de anticorpo anti-6xHIS-tag conjugado com peroxidase (HRP, Rockland), e incubado a temperatura ambiente por 1 hora. Após três lavagens com 100 μL de PBST 1X, foram adicionados 50 μL do substrato 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB, Sigma Aldrich) e a reação enzimática foi realizada à temperatura ambiente por 30 minutos no escuro. Posteriormente, foi realizada a adição de 100 μL de HCL 1N, com o intuito de parar a reação enzimática da peroxidase. Finalmente, foi feita a leitura da placa de ELISA à 450 nm utilizando o espectrofotômetro leitor de placas xMarck™ (Bio-Rad).

4.2.6 Avaliação da imunorreatividade por *Yeast-ELISA* indireto

Para avaliar a imunorreatividade da linhagem EBY100:E80-ZIKV, os controles EBY100 e EBY100:AGA2 foram utilizados em ensaios *Yeast-ELISA* indireto. Para tanto, 100 μL de células contendo 1×10^8 foi aplicado em duplicata em poços de uma placa de 96 poços, a adsorção das células foi realizada por incubação da placa a 20°C por 16 horas sob agitação (150 rpm). No dia seguinte, a placa foi lavada três vezes utilizando PBST 1X e a etapa de bloqueio foi realizada como anteriormente. Após lavagem, foi adicionado 50 μL de PBST (contendo 5% de BSA) com anticorpo primário (1:500, 1:1000 e 1:5000 de anti-envelope Zika vírus Genetex: GTX634155, ou 1:40.000 de anti-his tag Thermo scientific). A placa foi incubada por 2 horas à temperatura ambiente. A marcação com anticorpo secundário foi iniciada após lavar

a placa três vezes com PBST. Posteriormente, 50 µL de PBST (5% BSA) contendo anticorpo anti-mouse IgG conjugado com peroxidase (1:50.000, Thermo scientific) foi aplicado nos poços, seguido de incubação a temperatura ambiente por uma hora. Após a lavagem, foi realizada incubação com substrato TMB e a reação foi parada com HCL 1N como descrito anteriormente. A leitura da placa foi realizada a 450 nm utilizando o espectrofotômetro leitor de placas xMarck™ (Bio-Rad).

4.2.7 Recuperação das proteínas ancoradas

Para recuperação das proteínas recombinantes ancoradas na superfície celular de *S. cerevisiae*, 2×10^8 células, após etapa de indução, foram incubadas em 500 µL PBS 1X contendo 2 mM de Ditioneitol (DTT, UCHAŃSKI *et al.*, 2019) à temperatura ambiente por 30 minutos. As soluções foram centrifugadas por 3 minutos a 4.000g e 100 µL do sobrenadante recuperado foi aplicado em placa de ELISA na diluição de 1:10 ou sem diluição. O experimento foi realizado em duplicata seguindo as etapas do ELISA indireto descrito anteriormente.

4.2.8 Citometria de fluxo e microscopia de imunofluorescência

O experimento de citometria de fluxo foi baseado no protocolo de Liu e colaboradores (2022), descrito brevemente a seguir. 1×10^8 células em 300 µL de PBS-BSA (PBS contendo 1% de BSA) foi centrifugado a 2500g por 3 minutos (4°C) e incubado com 10 µg/mL de anticorpo primário (foi utilizado 2 g/mL para o ensaio de citometria com EBY100:N4P5 e microscopia de imunofluorescência para todas as linhagens). Em seguida, os tubos foram incubados por 30 minutos a temperatura ambiente e então incubados em gelo por mais 30 minutos. Após três lavagens com 300 µL de PBS-BSA gelado, as células foram ressuspensas em PBS-BSA contendo anticorpo anti-mouse-FITC (1:100 ou 1:1000, Thermo scientific). Os tubos foram incubados no gelo por 1 hora no escuro. Após a lavagem, os microtubos contendo pellet celular foram incubados no gelo até a leitura. Para a leitura, as células foram ressuspensas em 500 µL de PBS-BSA. Uma amostra de levedura sem marcação foi utilizada como controle do ensaio. Além da linhagem de interesse, também foram utilizadas as linhagens controle EBY100 e EBY100:AGA2. As marcações com anticorpo específico para a tag de poli-histidina, ou células marcadas apenas com anticorpo secundário foram utilizadas em paralelo para fins de comparação. As

amostras foram lidas no Citômetro BD Accuri C6 plus e os resultados adquiridos foram analisados utilizando a ferramenta FlowJo (versão 10.8.1). Para microscopia de imunofluorescência 30 μ L das células marcadas foram aplicados em lâmina para leitura (40X) no microscópio de fluorescência Leica DMLB. As imagens foram capturadas com a câmera COHU CCD acoplada ao microscópio e analisadas pelo software Leica Las-AF.

4.2.9 Análise estatística

Os dados obtidos nos ensaios de *Yeast*-ELISA e ELISA indireto foram analisados através da ferramenta GraphPAD Prisma versão 8.0.1 (GraphPad Software, La Jolla California USA), possibilitando a obtenção dos gráficos para análise dos resultados. Os valores de absorbância obtidos para as leveduras analisadas foram subtraídos pelo valor médio obtido nos poços utilizados como controle negativo (apenas PBS/BSA). Para determinar a significância estatística entre as linhagens, foi utilizado o teste-t de Student não pareado. Os dados foram considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$.

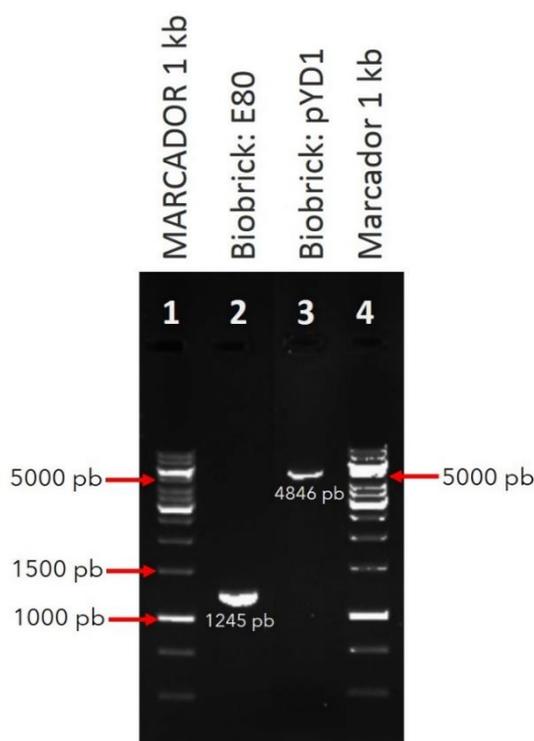
5 RESULTADO

5.1 OBTENÇÃO DO VETOR RECOMBINANTE PYD1:E80-ZIKV

Os fragmentos de DNA referente ao vetor pYD1 e a sequência gênica referente ao ectodomínio da proteína do envelope (E80) do Zika vírus foram amplificadas com sucesso e a obtenção destes fragmentos é ilustrada na figura 11. Devido a perda do fragmento referente à Tag Xpress, multiple-cloning-site (MCS) e o epitopo V5, o vetor pYD1 amplificado o tamanho de 4.846 pb. Após otimização das condições padrões de amplificação utilizando *Phusion U HotStart DNA polymerase*, foi possível obter uma amplificação do vetor suficiente para prosseguir para a etapa de clonagem do inserto E80-ZIKV neste vetor, após uma etapa de purificação a partir de gel de agarose (Figura 11, poço 3).

Figura 11 - Obtenção dos fragmentos de DNA (*Biobricks*) para obtenção dos vetores recombinantes via clonagem USER.

Poços 1 e 4 contém o marcador de DNA Gene Ruler 1 kb (Thermo Scientific), poço 2 contém *biobrick* referente ao ectodomínio (cerca de 1.2 kb) da proteína de envelope do Zika vírus e o poço 3 contém o *biobrick* referente ao vetor de expressão e ancoragem pYD1 (cerca de 4.8 kb).

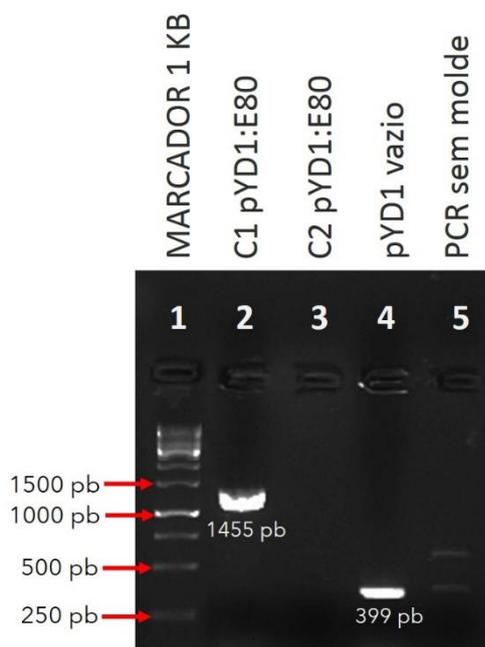


Fonte: A autora, 2022.

Com os dois *biobricks* disponíveis, foi possível prosseguir ao passo de tratamento destes fragmentos de DNA com a enzima *DpnI*, passo muito importante para degradar o molde plasmidial presente nas reações de amplificação que podem gerar falsos positivos se estiverem presentes na transformação bacteriana (BITINAITE *et al.*, 2007). A reação de fusão USER foi realizada obedecendo a razão molar 3:1 (inserto:vetor) e utilizada para transformar as células competentes de *E. coli* DH5alfa para obtenção dos plasmídeos recombinantes. Após a transformação, apenas duas colônias transformantes foram obtidas, as quais foram repicadas e testadas quanto à presença do inserto E80. Após PCR de colônia com primers de verificação de clonagem no vetor pYD1, foi possível confirmar que a colônia transformante C1 possuía o inserto E80 (Figura 12).

Figura 12 - PCR de colônia de bactéria para confirmação da obtenção do vetor recombinante pYD1:E80.

O poço 1 contém o marcador de DNA *Gene Ruler 1 kb DNA ladder* (Thermo Scientific), poço 2 e 3 contém as PCR's de colônia da colônia 1 e 2, respectivamente. Por fim, uma colônia controle referente ao vetor pYD1 sem modificação (vazio) foi usada com controle para verificação do tamanho esperado (poço 4).



Fonte: A autora, 2022

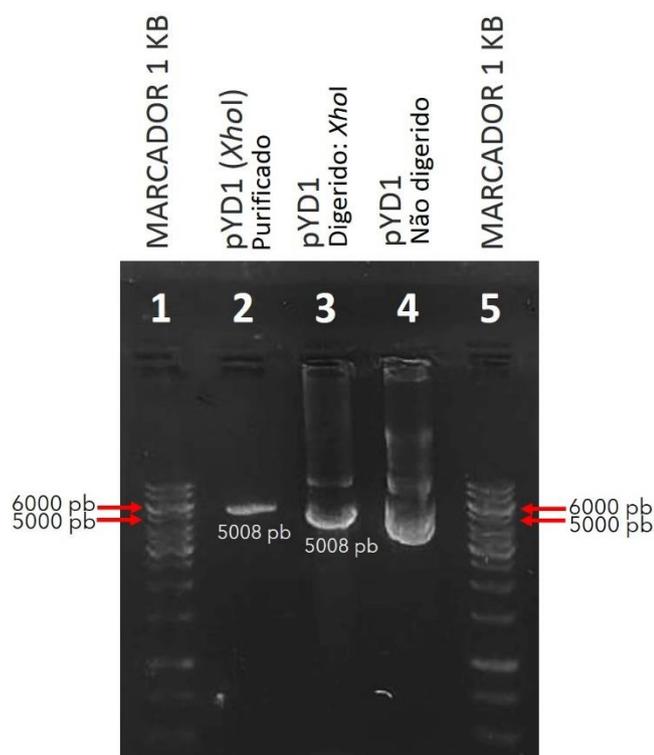
5.2 OBTENÇÃO DO VETOR RECOMBINANTE pYD1:N4P5-SARS

A obtenção do vetor recombinante pYD1:N4P5-SARS foi realizada por clonagem convencional utilizando a enzima de restrição *XhoI* e posterior ligação com DNA ligase.

O vetor pYD1 possui um sítio *Xho*I (968-972) em sua sequência nucleotídica que permite a linearização deste vetor gerando um fragmento de 5008 pb. Para evitar a re-linearização do pYD1 proveniente da digestão com uma única enzima de restrição, foi realizada desfosforilação das regiões 5' com fosfatase alcalina antes de prosseguir para a etapa ligação de DNA. Como visto na figura 13, foi obtida uma digestão parcial do vetor pYD1 (figura 13, poço 3) com grande quantidade de massa da banda referente ao tamanho ~5kb. Após purificação deste fragmento de DNA, é observada uma banda única na altura de ~5 kb, referente ao vetor pYD1 linearizado (figura 13, poço 2). Esta eletroforese foi utilizada para quantificação densitométrica do fragmento de DNA, obtendo-se 25,8 ng/ μ L de vetor linearizado.

Figura 13 - Eletroforese de DNA para análise da obtenção do vetor pYD1 digerido com a enzima de restrição *Xho*I.

No poço 2 foi aplicado vetor pYD1 digerido e purificado, gerando cerca de 26 ng/ μ L; Poço 3 demonstra a linearização do vetor pYD1, banda de 5008 pb; No poço 4 foi aplicado vetor pYD1 não digerido para comparação da digestão; Os poços 1 e 5 contêm 250 ng do *Gene Ruler 1kb DNA ladder* inserido como marcador de DNA.



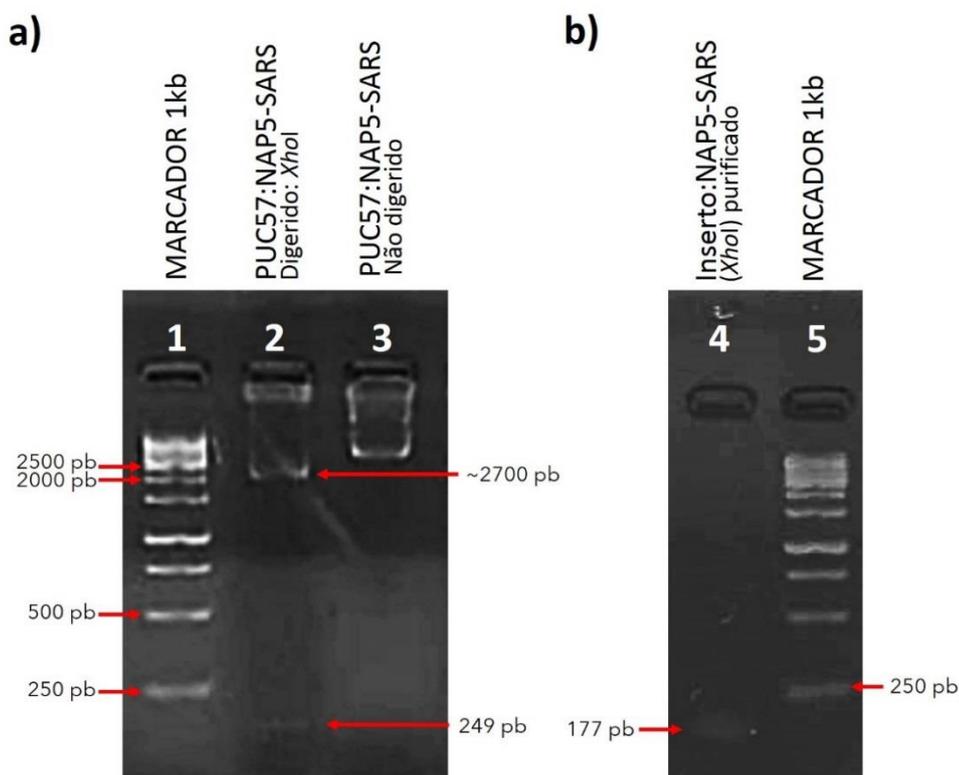
Fonte: A autora, 2022

Para obtenção da sequência nucleotídica que codifica o epítipo N4P5 da proteína nucleocapsídeo do SARS-CoV-2, sua sequência codificante foi otimizada

para expressão em *S. cerevisiae*, sintetizada e clonada em vetor pUC57. Nossa estratégia de síntese inclui a geração de um fragmento contendo o epítipo N4P5-SARS ladeado com sítios de restrição e isso possibilitou que prosseguíssemos para clonagem convencional deste fragmento no vetor pYD1 (Figura 14a). A digestão total do vetor pUC57-N4P5 para liberação do fragmento linear N4P5-SARS (177 pb) é observada na eletroforese representada na figura 14 e presença do *backbone* do vetor (2.7 kb) confirmam este resultado. Após purificação deste inserto, foi observado uma banda na altura esperada que rendeu cerca de 3,2 ng/uL de inserto linear puro. A reação de ligação de DNA usando uma enzima ligase foi obtida utilizando o vetor e inserto digerido e purificados, esta foi utilizada para obtenção de células de *E. coli* DH5 α recombinantes.

Figura 14 - Eletroforese de DNA apresentando os resultados da digestão com a enzima *Xho*I do vetor pUC57:N4P5-SARS e obtenção do N4P5-SARS.

O painel B mostra a digestão do vetor pUC57:N4P5-SARS e liberação do fragmento de 177 pb e a banda referente ao restante do vetor pUC57 com cerca de 2.7 kb (poço 2) e o vetor não digerido foi inserido para comparação (poço 3), 250 ng do *Gene Ruler 1kb DNA ladder* foi inserido como marcador de DNA (poço 1).



Fonte: A autora, 2022

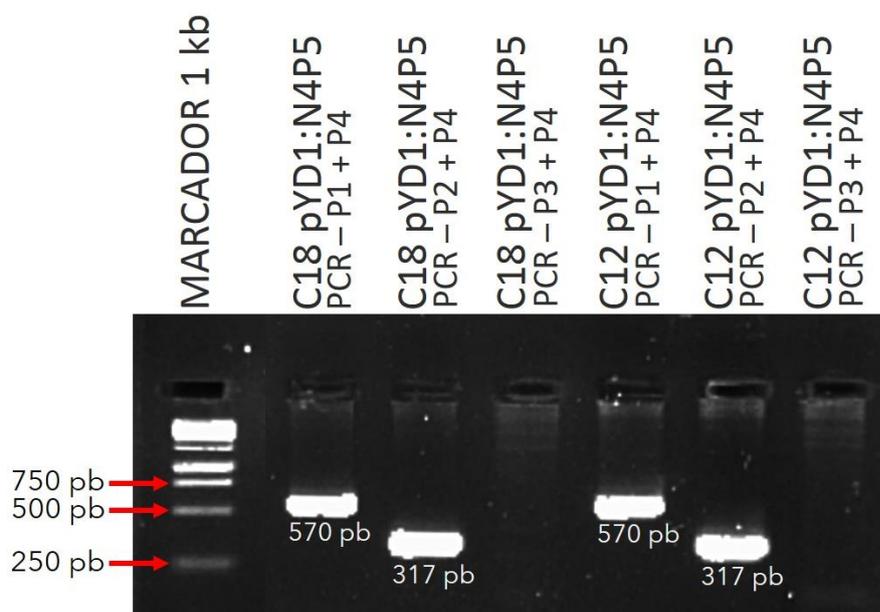
Com a transformação de células de *E. coli* DH5 α com a reação de ligação foram obtidas 84 unidades formadoras de colônias (UFCs), a eficiência de transformação do lote de células quimiocompetentes utilizado foi de $2,5 \times 10^7$ (cerca de 250 UFCs observadas). A alta eficiência das células competentes utilizadas pode ter sido determinante para o alto número de colônias observados na transformação (INOUE, 1990), além de ser imprescindível para obtenção de um bom número de clones, visto que poderíamos ter um misto de clones contendo o inserto de interesse com orientação correta ou incorreta. Devido a estratégia de clonagem convencional ser baseada na digestão com apenas uma enzima (*Xho*I), existe a possibilidade do inserto de interesse ser ligado ao vetor com a orientação invertida da sequência codificante. Para a confirmação da correta orientação do inserto N4P5-SARS, realizamos duas etapas de confirmação dos clones. Na primeira etapa de confirmação, a PCR de verificação da clonagem foi realizada com a utilização dos primers de verificação do vetor pYD1 (pYD1-forward e pYD1-reverse: P1 + P4).

Dentre os transformantes obtidos, 12 foram analisados quanto à presença do inserto de interesse. A amplificação do vetor pYD1 sem a presença de inserto é de 399 pb e o tamanho esperado vetores contendo o epítipo N4P5-SARS é de 570 pb, como apresentado na figura 15, apenas dois (C7 e C11) dos doze transformantes analisados foram positivos, resultando em uma eficiência de obtenção de clones corretos de 17% para esta amostragem realizada.

Como visto na figura 16, além dos clones apresentarem novamente a banda de 570 pb referente a presença do inserto (banda 570 pb, figura 16, poço 2 e 5), eles também se mostram positivos quanto a orientação correta do N4P5-SARS usando a combinação de primers P2 com P4 (banda de 317 pb, figura 16, poço 3 e 6), e nenhuma banda é vista usando primers que demonstrariam a incorreta orientação do epítipo (figura 16, poço 4 e 7). O clone C7 pYD1:N4P5-SARS foi também confirmado por sequenciamento de DNA e foi utilizado nas etapas seguintes.

Figura 16 - Eletroforese de DNA apresentando os resultados da segunda etapa de verificação dos clones pYD1:N4P5-SARS.

Os clones C7 e C11 inserto foram testados contra três combinações de primers. Nos poços 2 e 5, foram utilizados os primers P1 e P4 que confirmam a presença do inserto no vetor recombinante (banda de 570 pb); Poços 3 e 6, demonstram que os dois clones testados possuem o inserto na orientação correta (banda de 317 pb); Poços 4 e 7 possuem PCR com os primers P3 e P4, não apresentam banda de inserto com orientação incorreta; 250 ng do *Gene Ruler 1kb DNA ladder* foi inserido como marcador de DNA (poço 1). Os clones C7 (destacado em verde) prosseguiu para etapas seguintes.



Fonte: A autora, 2022

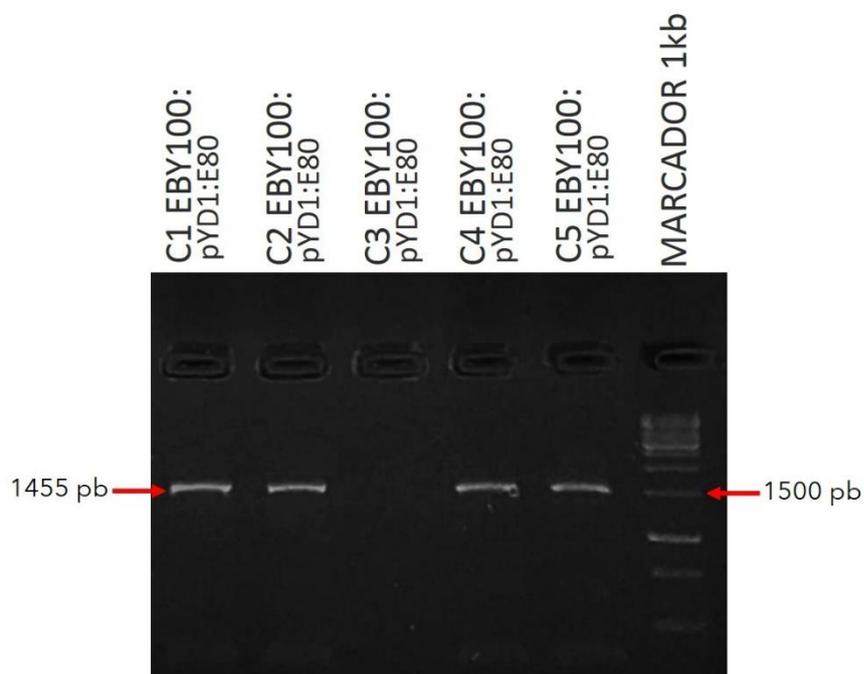
5.3 OBTENÇÃO DAS LEVEDURAS RECOMBINANTES

A transformação química de *S. cerevisiae* EBY100 com os vetores recombinantes pYD1:E80-ZIKV e pYD1:N4P5-SARS resultou em cerca de 100 e 250 transformantes, respectivamente. Para verificar a presença do vetor nas células de leveduras, analisamos 5 transformantes de cada condição por PCR de colônia de levedura utilizando os primers de verificação do vetor pYD1 (pYD1-forward e pYD1-

reverso, tabela 1). Para células transformadas com o vetor expressando o ectodomínio da proteína do envelope do Zika vírus ou com o epítipo N4P5 da proteína nucleocapsídeo do SARS-CoV-2, obtivemos 4 clones positivos, observando respectivamente as bandas positivas de 1500 e 570 pb (80% de clones contendo o vetor recombinante, figura 17 e 18).

Figura 17 - Eletroforese de DNA ilustrando os resultados da PCR de confirmação da presença do vetor recombinante pYD1:E80 em células de *S. cerevisiae* EBY100.

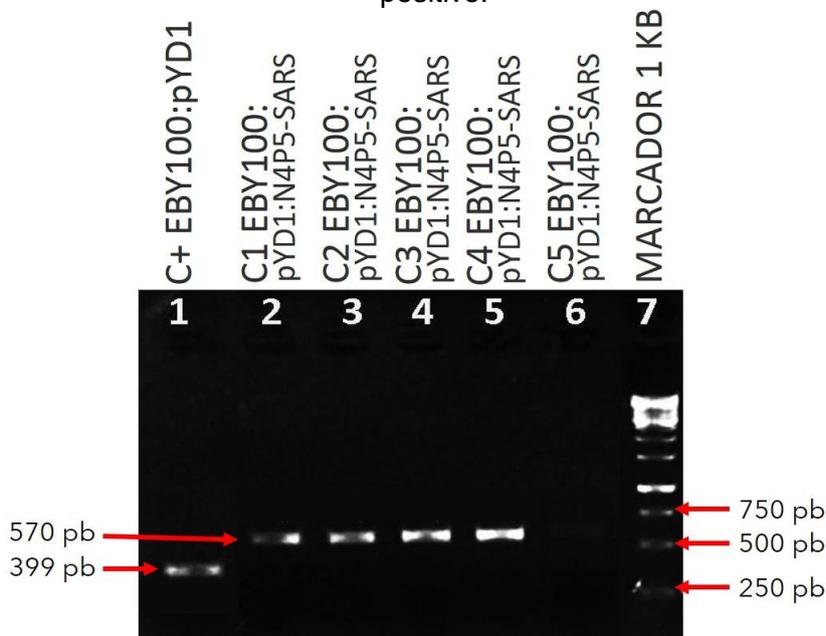
Poços 1 a 5 contém PCR usando os primers de verificação pYD1-forward e pYD1-reverse com as cinco colônias transformantes testadas, onde espera-se observar a amplificação de uma banda de 1500 pb, poço 6 contém 250 ng do marcador de DNA *Gene Ruler 1 kb DNA ladder*.



Fonte: A autora, 2022

Figura 18 - Eletroforese de DNA ilustrando os resultados da PCR de confirmação da presença do vetor recombinante pYD1:N4P5-SARS em células de *S. cerevisiae* EBY100.

Poço 1 contém PCR na linhagem EBY100 contendo o vetor pYD1 sem gene como controle positivo.



Fonte: A autora, 2022

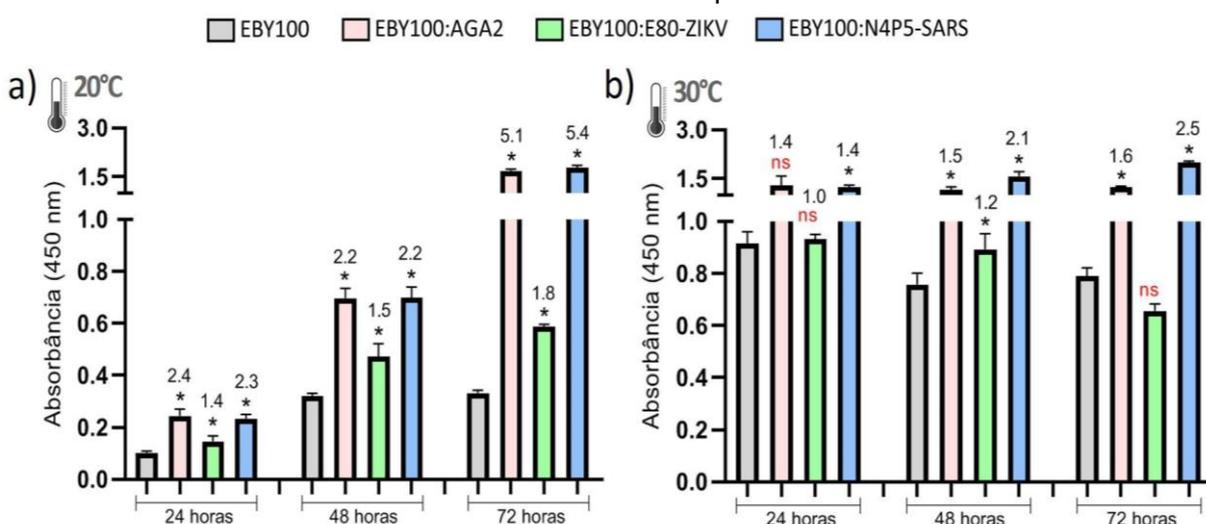
5.4 YEAST-ELISA: AVALIAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE INDUÇÃO DA EXPRESSÃO E ANCORAGEM DAS PROTEÍNAS VIRAIS

O ensaio de avaliação das condições de cultivo das linhagens *S. cerevisiae* EBY100:E80-ZIKV e *S. cerevisiae* EBY100:N4P5-SARS foi idealizado para comparar duas temperaturas de cultivo, 20 e 30°C, durante a etapa de indução da expressão das proteínas virais em meio contendo galactose como fonte de carbono. Os resultados foram analisados por Yeast-ELISA utilizando a marcação direta com anticorpo anti-6Xhis (conjugado com peroxidase) em três experimentos diferentes com cerca de 2×10^7 células por ensaio. Cada experimento de Yeast-ELISA foi realizado com amostras retiradas após 24, 48 e 72 horas de indução da expressão proteica. Como visualizado na figura 19, foram também analisadas as linhagens EBY100 (linhagem parental) e EBY100:AGA2 (linhagem contendo o vetor vazio, portanto expressa em superfície apenas a âncora a-aglutinina com a tag 6xHis) como controles negativo e positivo, respectivamente. Os resultados obtidos com a linhagem parental EBY100 (absLC) foram utilizados como um valor de comparação para determinar se as linhagens modificadas geneticamente (absLR) realmente estão

expressando a proteína de interesse ($razão = absLR - absLC$). Por exemplo, a absorbância observada em EBY100:AGA2, EBY100:E80-ZIKV e EBY100:N4P5-SARS precisam ser estatisticamente diferentes da linhagem parental. Para tanto, nós plotamos dados referentes a razão entre as absorbâncias observadas nas linhagens recombinantes em relação a linhagem parental (figura 19, valores acima das barras, *** mostram os dados estatisticamente significativos: $p < 0,05$).

Figura 19 - Yeast-ELISA direto para avaliação das condições de expressão e ancoragem das proteínas E80-ZIKV e N4P5-SARS na superfície celular de *S. cerevisiae*.

a) indução da expressão proteica a 20°C ; b) indução da expressão proteica a 30°C; Os valores em cada barra correspondem a razão de aumento da absorbância em relação ao respectivo controle negativo (linhagem parental EBY100); * mostram os dados estatisticamente significativos: $p < 0,05$; ns (não significativo) são os dados onde: $p > 0,05$. Ensaio realizado em triplicata.



Fonte: A autora, 2022

Nossos resultados demonstram que, após 24 horas de indução a 20°C, as leveduras analisadas são capazes de expressar e ancorar em sua superfície as proteínas E80-ZIKV e N4P5-SARS (1,4 e 2,3 vezes em relação a EBY100). Com o passar do tempo de indução a razão de expressão das proteínas recombinantes é aumentada, até alcançar 1,8 e 5,4 vezes de diferença (após 72 horas) para E80-ZIKV e N4P5-SARS, respectivamente. Nossos resultados demonstram um aumento significativo da absorbância em todo os ensaios realizados com células cultivadas a 30°C, incluindo a linhagem controle negativo. Para a linhagem *S. cerevisiae* EBY100:E80-ZIKV, a indução à 30°C parece não ser eficaz, visto que a razão de

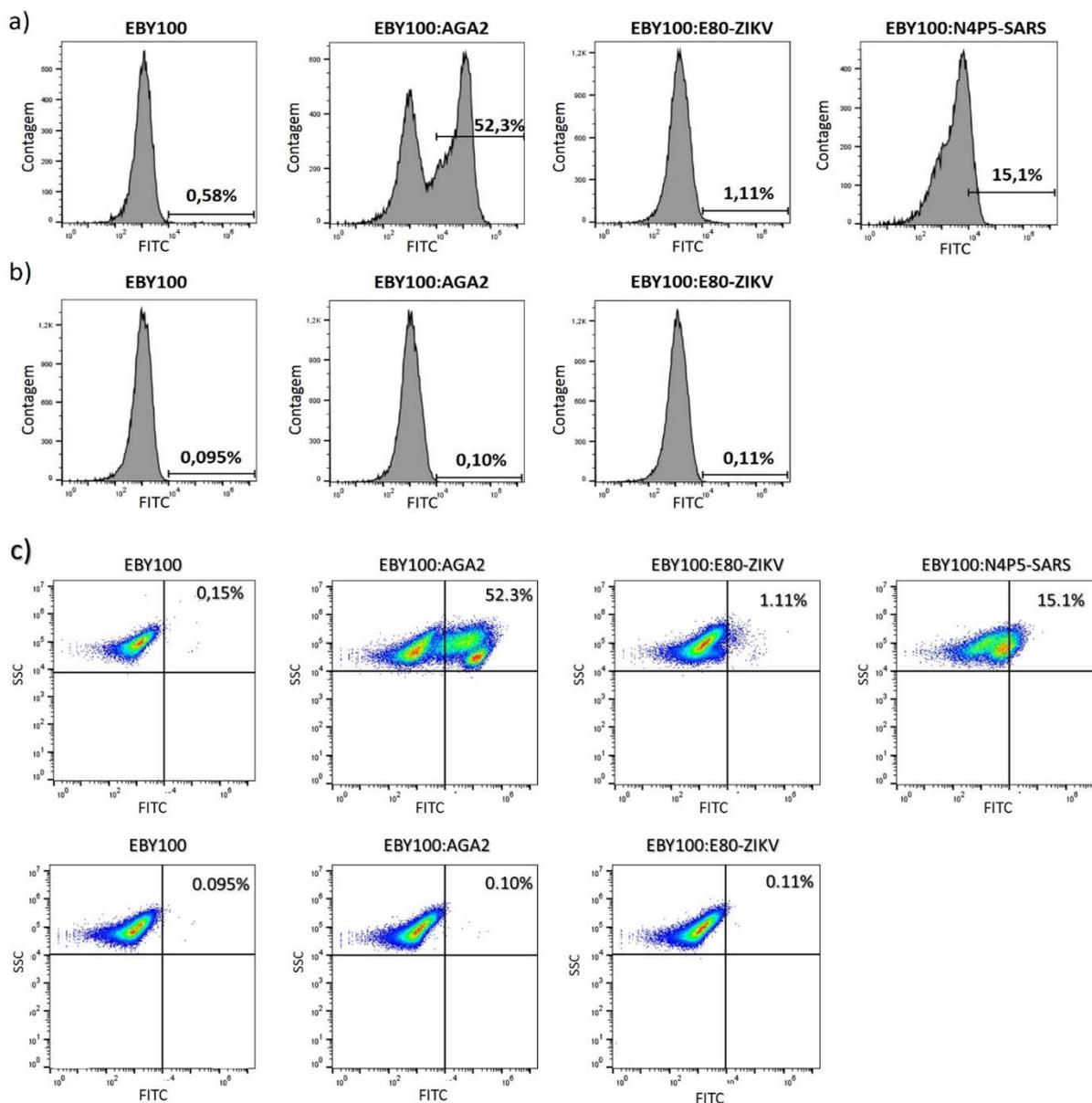
expressão proteica não é significativa e tende a diminuir no decorrer do experimento. Por outro lado, a melhora na ancoragem através do tempo de indução é também observada para as células que expressam o peptídeo do nucleocapsídeo do SARS-COV-2 induzidas à 30°C, apesar disso, o valor da razão é duas vezes menor com as células cultivadas por 72 horas a 20°C. Nossos dados sugerem que dentre as condições avaliadas, a que demonstra o melhor sinal de ancoragem é a indução da expressão proteica realizada a 20°C por 72 horas.

5.5 AVALIAÇÃO DA ANCORAGEM DAS PROTEÍNAS VIRAIS

Para obtenção de resultados qualitativos e quantitativos da população de células de levedura, foram executados ensaios de citometria de fluxo e microscopia de imunofluorescência utilizando as linhagens EBY100, EBY100:AGA2, EBY100:E80-ZIKV e EBY100:N4P5-SARS. As células foram marcadas com anticorpo anti-HIS (1:100) e anti-mouse-IgG-FITC (1:100), a linhagem EBY100:N4P5-SARS foi exposta a uma concentração menor de anticorpo em um ensaio distinto (anti-HIS 1:500, anti-mouse-IgG-FITC 1:1000). Além disso, células marcadas apenas com anticorpo secundário foram analisadas para determinar a ligação inespecífica deste anticorpo às linhagens em questão. Como visto na figura 20, é possível confirmar a ancoragem da proteína AGA2 (EBY100:AGA2) a qual possui fusionada a ela apenas a tag 6x-HIS, a qual apresenta 52,5% da população analisada positivas para marcação contra a tag 6x-HIS (Figura 20a). Por outro lado, a linhagem controle negativo EBY100, apresenta apenas 0,58% das células marcadas como positivas, indicando o *background* da marcação anti-HIS com anti-mouse-IgG-FITC (Figura 20a). A linhagem EBY100:E80 demonstra um percentual positivo muito baixo (1,1%), demonstrando que uma porção muito pequena da população total analisada está expressando a proteína E80-ZIKV. Por outro lado, a linhagem EBY100:N4P5-SARS apresentou um percentual de células positivas mais elevado (15,1%, Figura 20a). Os resultados obtidos com as células marcadas apenas com anti-mouse-IgG-FITC mostram uma percentagem baixa para as linhagens analisadas (Figura 20b, EBY100 0,095%; EBY100:AGA2: 0,10; EBY100:E80-ZIKV:0,11%).

Figura 20 - Citometria de fluxo das linhagens de levedura.

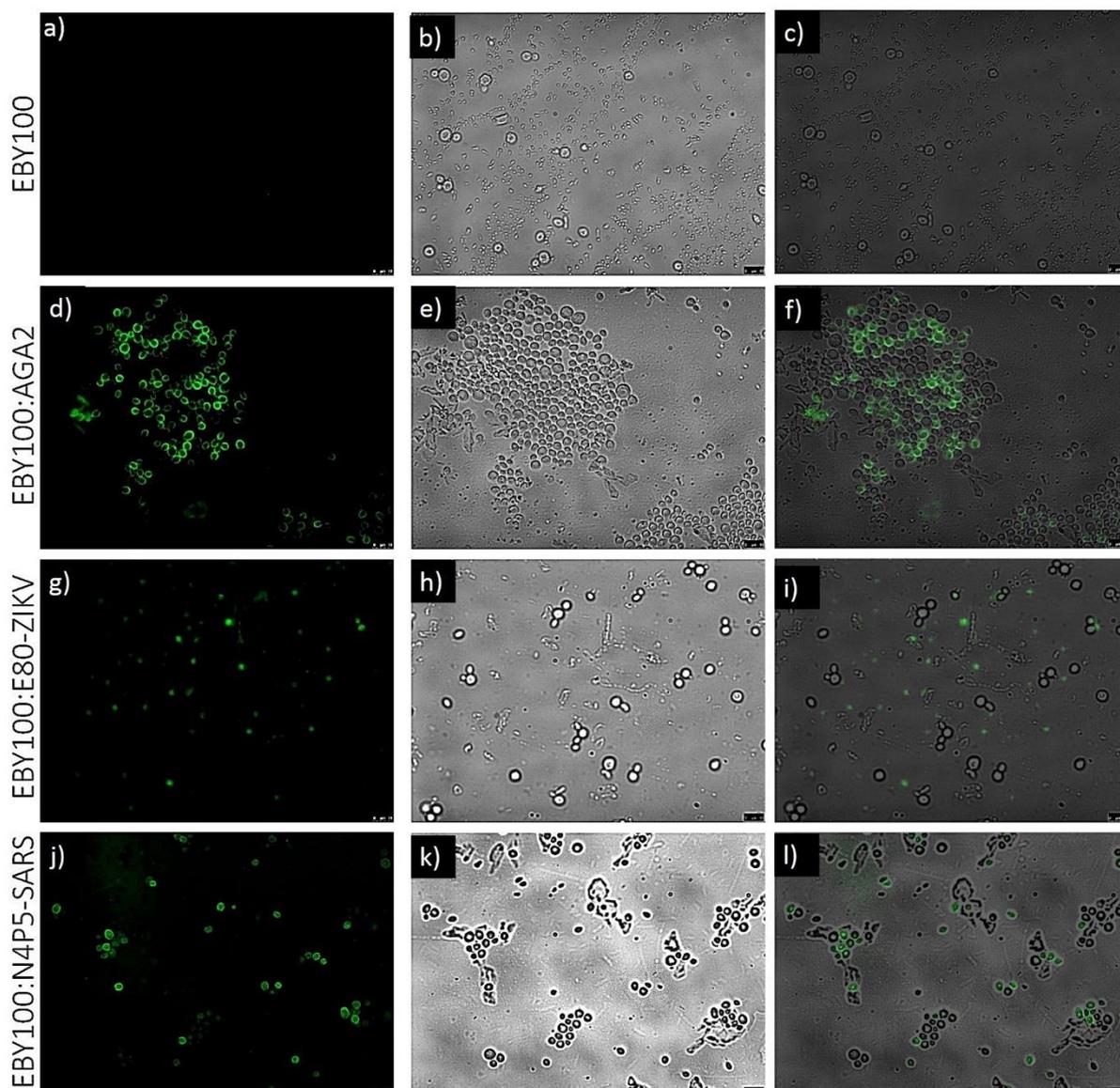
a) As células de levedura analisadas por marcação indireta com anti-HIS (1:100) e anti-mouse-IgG-FITC (1:100); b) células de levedura marcadas apenas com anticorpo secundário. C) representação das populações de células. A população de levedura foi definida quanto ao seu tamanho e granulosidade, e as imagens apresentam os resultados obtidos com 20.000 eventos desta população. A região positiva (seta dupla) foi definida a partir de células sem marcação de anticorpos.



Fonte: A autora, 2022

Para microscopia de imunofluorescência, as células foram visualizadas no aumento de 40x em luz branca (Figura 21b,d,f,h) e no filtro para o fluoróforo FITC, o qual está conjugado ao anticorpo secundário (anti-mouse-IgG-FITC). Como esperado, a linhagem EBY100 não apresentou células marcadas (Figura 21a,b).

Figura 21 - Microscopia de imunofluorescência das linhagens de levedura.
 As linhagens EBY100 (parental), EBY100:AGA2 (controle positivo), EBY100:E80-ZIKV e EBY100:N4P5-SARS foram analisadas por microscopia de imunofluorescência utilizando marcação indireta com anti-HIS e anti-mouse-IgG-FITC. As imagens foram obtidas com aumento de 40X e analisadas na ferramenta Leica Las-AF. As células foram fotografadas utilizando luz branca (b,e,h,k) e em filtro fluorescente (a,d,g,j), a sobreposição das imagens foi obtida com uma ferramenta de edição de imagens (c,f,i,l).



Fonte: A autora, 2022

As linhagens EBY100:AGA2 e EBY100:N4P5-SARS apresentam células marcadas quando visualizadas em filtro fluorescente, demonstrando novamente a ancoragem das proteínas. Porém, para a linhagem EBY100:E80-ZIKV, não foi possível detectar células com fluorescência nos campos analisados, resultado este

que corrobora com o já observado no experimento anterior onde foi verificado um baixíssimo percentual de células expressando a proteína E80-ZIKV.

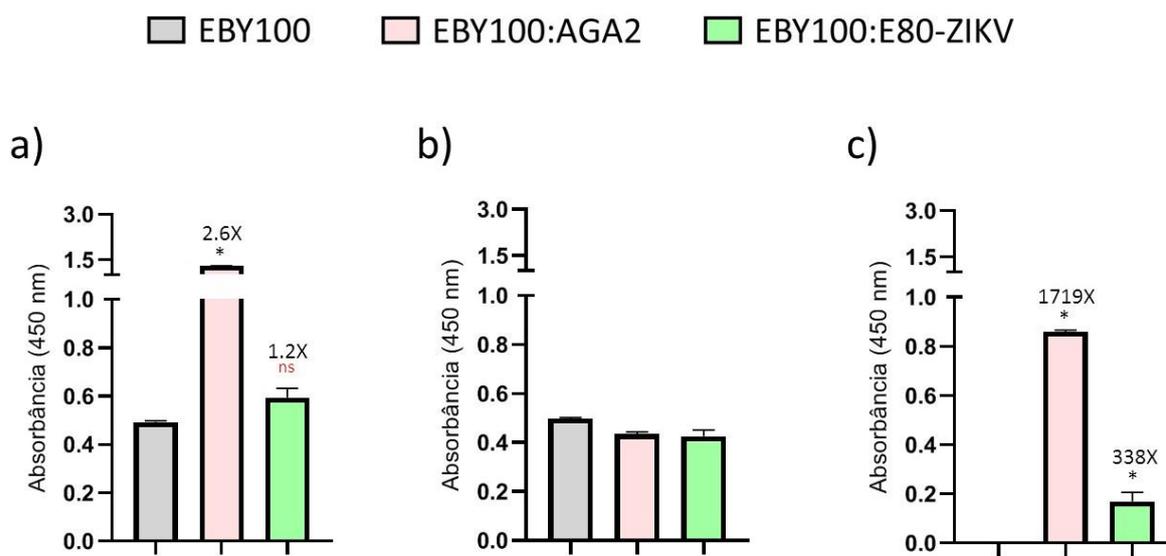
5.6 AVALIAÇÃO DA IMUNORREATIVIDADE DA PROTEÍNA E80-ZIKV POR YEAST-ELISA

Para determinar a funcionalidade da proteína E80-ZIKV ancorada na superfície celular de *S. cerevisiae* EBY100, realizamos um ensaio preliminar de avaliação da imunorreatividade através de dois ensaios realizados em paralelo utilizando *Yeast-ELISA* indireto. Para tanto, foram utilizadas as linhagens EBY100:E80-ZIKV, a linhagem parental EBY100 (controle negativo) e a linhagem EBY100:AGA2, a qual é controle positivo para marcação com anti-HIS e controle negativo para marcação com anticorpo específico anti-envelope ZIKV. Primeiramente, para determinar se o novo lote de células produzidas continha a proteína E80-ZIKV devidamente ancorada, as células foram preliminarmente avaliadas em ensaios *Yeast-ELISA* indireto utilizando anticorpo dirigido a tag 6xHIS. (Figura 22).

Neste ensaio, para avaliar a ligação inespecífica do anticorpo anti-mouse IgG às células das linhagens utilizadas, foi realizado um ensaio controle contendo cada uma das linhagens utilizadas expostas apenas ao anti-mouse IgG (HRP, anticorpo secundário), resultando em consideráveis valores de absorvâncias. Desta forma, para estes ensaios de *Yeast-ELISA* utilizando marcação indireta, os dados brutos (DB) de absorvância obtidos no *Yeast-ELISA* com anti-HIS ou anti-envelope (Figura 22a e 23a) foram tratados através da subtração dos valores de absorvância observados em cada linhagem resultante da ligação inespecífica (LI) do anticorpo secundário à linhagem respectiva (Figura 22b e 23b) ($Ancoragem = DB - LI$). Por exemplo, foi observada uma absorvância de 0,594 (450 nm) para a linhagem EBY100:E80-ZIKV marcada com anti-HIS e anti-mouse-IgG-HRP (Figura 22a), entretanto, quando esta mesma amostra de células é marcada apenas com anticorpo secundário observamos uma absorvância de 0,425 (Figura 22b). Logo, o valor referente ao sinal do anticorpo anti-HIS (0,169) é o resultado da subtração entre o valor obtido com a dupla marcação e o valor obtido apenas com anticorpo secundário ($0,594 - 0,425 = 0,169$) (Figura 22c). Desta forma, é possível confirmar a correta ancoragem da proteína E80-ZIKV, a qual apresenta uma razão (338X) estatisticamente significativa em relação ao sinal observado na linhagem parental EBY100 (Figura 22c).

Figura 22 - Yeast-ELISA indireto para avaliar a ancoragem da proteína E80-ZIKV na superfície celular de *S. cerevisiae* EBY100 pela detecção da tag 6xHIS.

- a) Células marcadas com anti-HIS e anti-mouse-IgG-HRP. B) células marcadas apenas com anti-mouse-IgG-HRP. C) Dados tratados através da subtração do sinal inespecífico do anticorpo secundário observado no gráfico b. Os valores indicados acima das barras correspondem a razão de aumento da absorbância em relação ao controle (linhagem parental EBY100); os asteriscos (*) mostram os dados estatisticamente significativos: $p < 0,05$. "ns" mostra os valores que não foram estatisticamente significativos: $p \geq 0,05$. Ensaio realizado em duplicata.

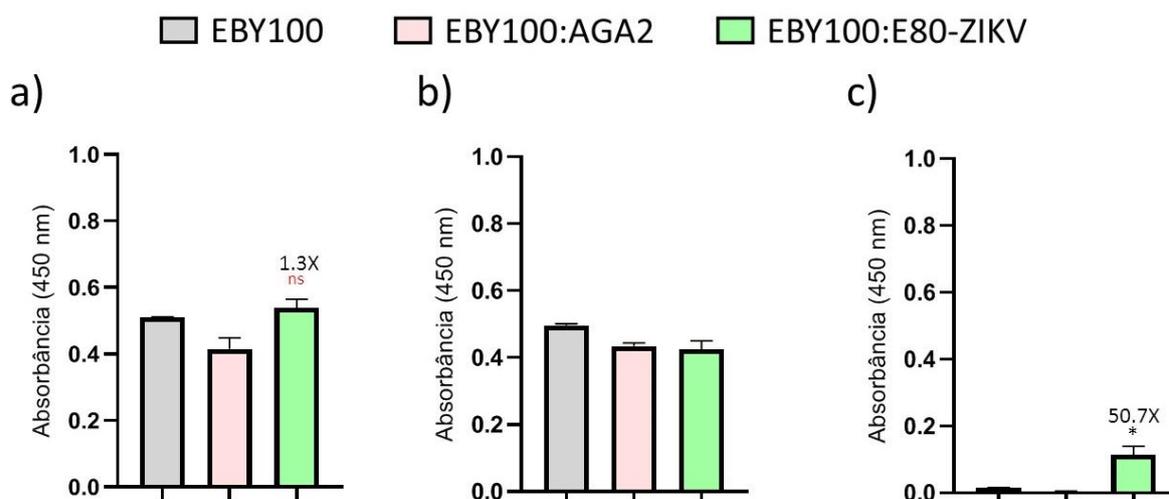


Fonte: A autora, 2022

Finalmente, um segundo ensaio foi realizado para confirmar a imunorreatividade da proteína ancorada na linhagem EBY100:E80-ZIKV utilizando um anticorpo comercial capaz de reconhecer a região central da proteína do envelope do Zika vírus. Para esta análise, as linhagens EBY100 (parental) e EBY100:AGA2 (linhagem com vetor sem proteína de interesse) foram utilizadas como controles negativo. Os dados brutos destes ensaios (Figura 23a) foram tratados como anteriormente descrito para subtrair a ligação inespecífica do anticorpo secundário (Figura 23b) às células de levedura. Como observado no gráfico c da figura 23, a detecção da proteína E80 (linhagem EBY100:E80) através do reconhecimento pelo anticorpo anti-envelope resulta numa absorbância de 0,114, o qual possui uma razão de 7.6 e 50.7 vezes em relação aos controles negativos EBY100 e EBY100:AGA2, respectivamente. Os resultados obtidos foram estatisticamente significativos ($p < 0,05$) e confirmam que a proteína E80-ZIKV ancorada na superfície celular de *S. cerevisiae* EBY100 é capaz de ser reconhecida por anticorpos específicos anti-envelope, demonstrando sua funcionalidade.

Figura 23 - Yeast-ELISA indireto para avaliar a imunorreatividade da proteína E80-ZIKV ancorada na superfície celular de *S. cerevisiae* EBY100 utilizando anticorpo anti-ENV.

A) células marcadas com anti-envelope (1:1.000) e anti-mouse-IgG-HRP (1:50.000). B) células marcadas apenas com anticorpo secundário anti-mouse IgG (1:50.000) para avaliação do sinal inespecífico do anticorpo secundário. C) Dados tratado através da subtração dos valores de cada linhagem no gráfico à pelo valor específico da linhagem obtido com marcação apenas com anticorpo secundário (gráfico b). Os valores indicados nas setas duplas correspondem a razão de aumento da absorbância em relação ao controle (linhagem parental EBY100 ou linhagem contendo apenas vetor vazio EBY100:AGA2); os asterísticos (*) mostram os dados estatisticamente significativos: $p < 0,05$. "ns" mostra os valores que não foram estatisticamente significativos: $p \geq 0,05$. Ensaios realizados em duplicata.



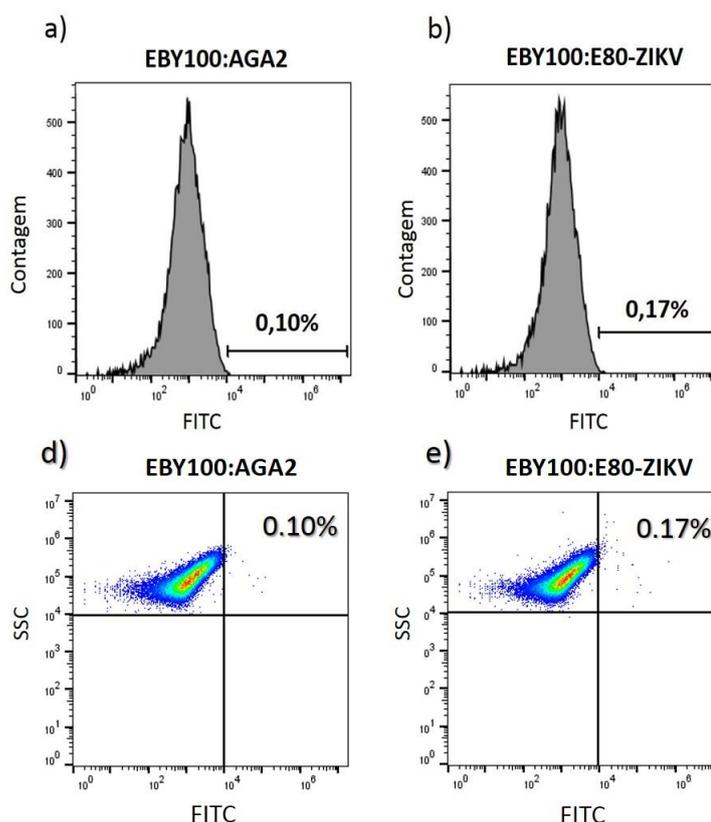
Fonte: A autora, 2022

5.7 AVALIAÇÃO DA IMUNORREATIVIDADE DA PROTEÍNA E80-ZIKV POR CITOMETRIA DE FLUXO E MICROSCOPIA DE IMUNOFLUORESCÊNCIA

Ensaios de citometria de fluxo e microscopia de imunofluorescência foram também realizados utilizando marcação das células com anticorpo anti-envelope do Zika vírus. Para isto, foram utilizadas as linhagens EBY100:AGA2 (controle negativo) e a linhagem EBY100:E80-ZIKV. Os resultados obtidos através da análise das células em citômetro de fluxo, demonstram novamente a baixa expressão da proteína E80-ZIKV na população de células avaliadas (Figura 24). Os resultados obtidos com anti-envelope e anti-mouse-IgG-FITC mostram que 0,10% e 0,17% das células analisadas foram positivas para FITC nas linhagens EBY100:AGA2 e EBY100:E80-ZIKV, respectivamente (Figura 24). Juntamente com os dados de Yeast-ELISA, nossos resultados com citometria de fluxo demonstram a baixa expressão do ectodomínio da proteína do envelope do ZIKV pela linhagem *S. cerevisiae* EBY100:E80-ZIKV.

Figura 24 - Segundo ensaio de citometria de fluxo para avaliação da imunorreatividade da proteína E80-ZIKV em *S. cerevisiae*.

a) a linhagem EBY100:AGA2 (vetor vazio) foi utilizada como controle negativo. b) a linhagem EBY100:E80-ZIKV foi utilizada para demonstrar a imunorreatividade da proteína E80 ancorada em sua superfície. c,d) representação das populações de células. As células de levedura foram analisadas por marcação indireta com anti-envelope (1:500) e anti-mouse-IgG-FITC (1:1000). A população de levedura foi definida quanto ao seu tamanho e granulosidade, e as imagens apresentam os resultados obtidos com 20.000 eventos desta população. A região positiva (seta dupla) foi definida a partir de células sem marcação de anticorpos.



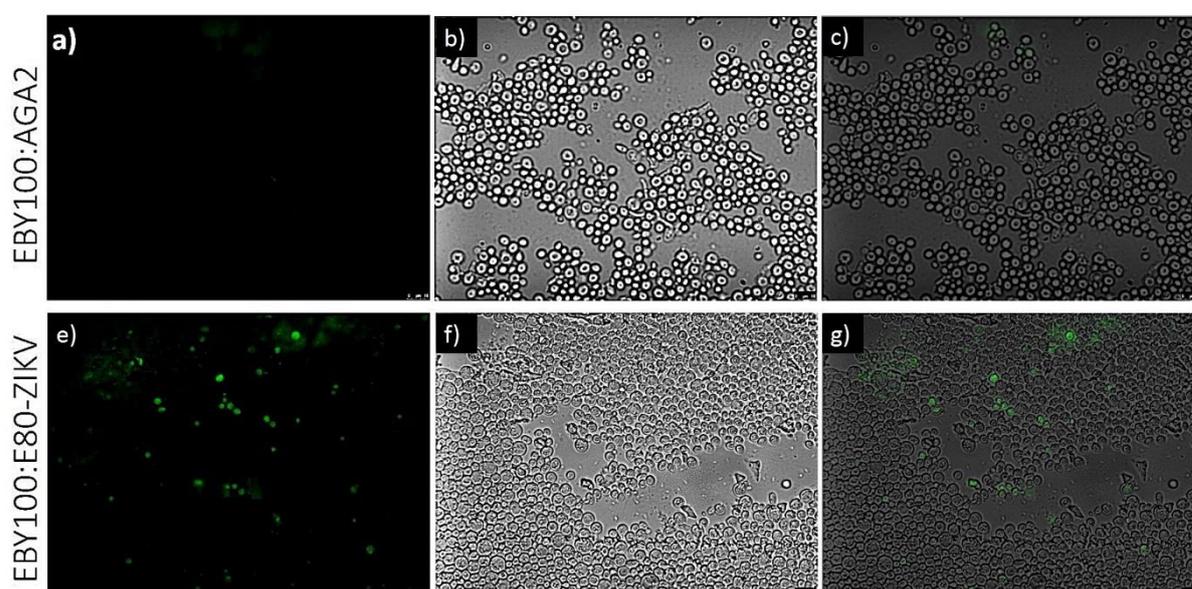
Fonte: A autora, 2022

Na microscopia, as células de EBY100:AGA2 não apresentam fluorescência assim como esperado para esta linhagem. Por outro lado, é possível ver um grupo de células positivas quando a linhagem EBY100:E80-ZIKV é visualizada em filtro fluorescente. Apesar disto, quando comparamos a quantidade de células fluorescentes (Figura 25c) com as células vistas na luz branca (Figura 25d) a representação desta população positiva é claramente muito baixa. Com isto, os dados de citometria de fluxo e microscopia de imunofluorescência são condizentes com os dados observados no *Yeast*-ELISA, ou seja, conseguimos confirmar a imunorreatividade da proteína E80-ZIKV. Entretanto, em todos os experimentos

realizados o sinal observado é muito baixo, mostrando que a E80-ZIKV está sendo ancorada na superfície de *S. cerevisiae* em níveis baixos de expressão.

Figura 25 - Microscopia de imunofluorescência para avaliar a imunorreatividade da proteína E80-ZIKV ancorada em superfície celular de *S. cerevisiae*.

As linhagens EBY100:AGA2 usada como controle negativo e EBY100:E80-ZIKV foram analisadas por marcação indireta com anti-envelope (1:500) e anti-mouse-IgG-FITC (1:1000). As imagens foram obtidas com aumento de 40X e analisadas na ferramenta Leica Las-AF. As células foram fotografadas utilizando luz branca (b,f) e em filtro fluorescente (a,e). A sobreposição das imagens foi obtida utilizando uma ferramenta de edição de imagens (c,g).



Fonte: A autora, 2022

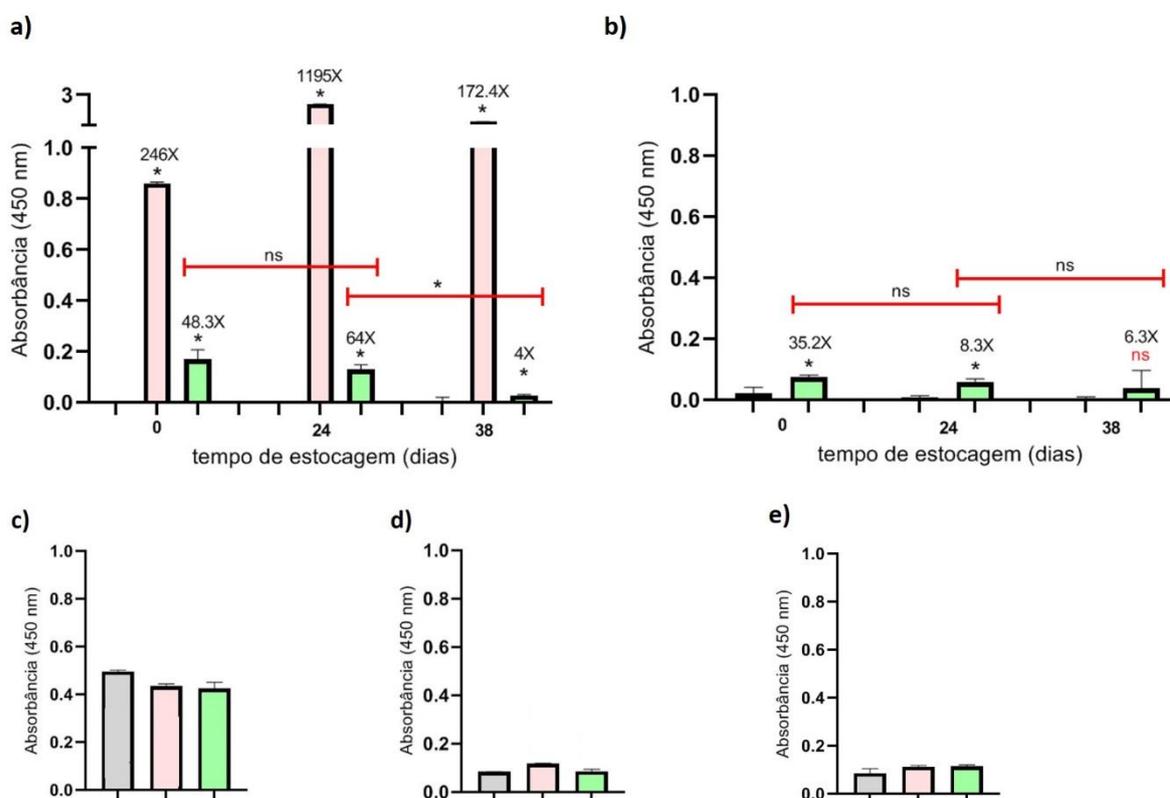
5.8 AVALIAÇÃO DA IMUNORREATIVIDADE DAS LEVEDURAS ESTOCADAS

Para analisar a estabilidade das proteínas ancoradas na superfície celular das leveduras, células das linhagens EBY100, EBY100:AGA2 e EBY100:E80-ZIKV foram estocadas por refrigeração (2-8°C) durante 38 dias. Foram realizados três ensaios de Yeast-ELISA com as células em questão, primeiramente utilizando o lote de células logo após a etapa de indução (células frescas) e após 24 e 38 dias de estocagem em geladeira (tampão PBS). As células foram marcadas indiretamente com anti-HIS e anti-mouse-IgG-HRP (Figura 26), onde os resultados obtidos demonstram a comparação entre o sinal de ancoragem (absorbância) da linhagem em questão em relação à linhagem controle EBY100. Após 24 dias de estocagem, a detecção de

EBY100:E80-ZIKV foi mantida quando comparada com o sinal visto com células frescas (Figura 26a).

Figura 26 - Yeast-ELISA indireto para avaliar a ancoragem e imunorreatividade da proteína E80-ZIKV após estocagem das células de levedura.

a) Ensaio utilizando a marcação com anticorpo anti-6xHIS e anti-mouse-IgG com dados tratados (subtração do sinal inespecífico do anti-IgG observado no gráfico c). B) Resultados obtidos com anti-envelope para células recém induzidas (tempo 0) e células estocadas por 24 e 38 dias, os dados visualizados são tratados com os valores vistos no gráfico d. C,D e E) detecção do sinal inespecífico do anticorpo secundário obtido para as diferentes linhagens utilizadas após 0, 24 e 38 dias de estocagem, respectivamente. Os valores indicados nas setas duplas correspondem a razão observada na linhagem respectiva em relação ao controle (linhagem parental EBY100 ou linhagem contendo apenas vetor vazio EBY100:AGA2); os asteriscos (*) mostram os dados estatisticamente significativos: $p < 0,05$. "ns" mostra os valores que não foram estatisticamente significativos: $p \geq 0,05$.



Fonte: A autora, 2022

Além disso, um sinal positivo é observado quando as células são marcadas com anti-envelope, demonstrando que a imunorreatividade se manteve após 24 dias de estocagem (Figura 26b). Após 38 dias de estocagem, o sinal de ancoragem EBY100:E80-ZIKV tem uma queda (Figura 26a) mas mantém uma razão alta entre esta linhagem e o controle (4X, $p < 0,05$). Desta maneira, foi possível confirmar e

funcionalidade da proteína E80-ZIKV mesmo após 24 dias de estocagem. Em relação a imunorreatividade de E80-ZIKV após 38 dias de estocagem, não foi observado diminuição da absorvância quando comparada com o sinal de 24 dias, porém a razão entre EBY100:E80-ZIKV e EBY100:AGA2 é diminuída ($p > 0,05$). Nossos resultados mostram que mesmo com a baixa expressão e ancoragem da proteína E80-ZIKV ainda é possível demonstrar sua ancoragem mesmo após 38 dias de estocagem, porém seu sinal de imunorreatividade é observado apenas após 24 dias.

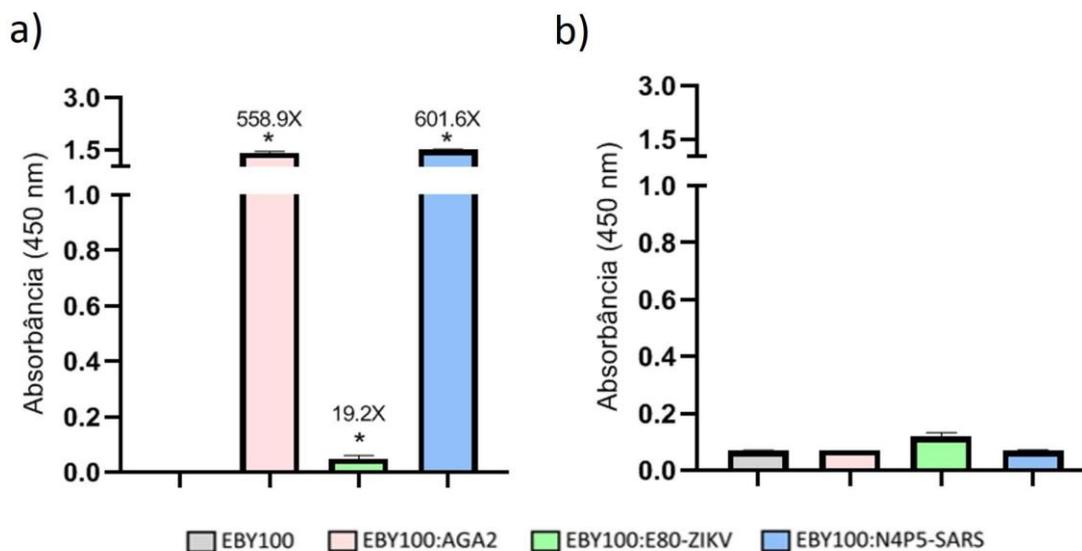
5.9 RECUPERAÇÃO DAS PROTEÍNAS ANCORADAS

O sistema de ancoragem de proteínas utilizando a âncora a-aglutinina permite que as proteínas ancoradas sejam recuperadas da superfície celular por tratamento com um agente redutor capaz de quebrar as pontes de dissulfeto que ligam Aga1p à Aga2p. Para demonstrar a recuperação das proteínas E80-ZIKV e N4P5-SARS da superfície celular das leveduras produzidas aqui, executamos um experimento onde 2×10^8 células de levedura induzidas foram tratadas com DTT. O sobrenadante recuperado deste tratamento foi utilizado como antígeno no ELISA com marcação indireta utilizando anti-HIS e anti-mouse-IgG-HRP. Para o controle negativo, foi utilizado o sobrenadante do tratamento de células EBY100. Utilizando as proteínas recuperadas, foi possível obter sinal de ancoragem no ELISA para todas as linhagens analisadas (Figura 27). As proteínas AGA2-6xHIS e N4P5-SARS apresentaram altíssimas razões (proteína:controle), enquanto a proteína E80-ZIKV novamente apresenta sinal e razão mais baixos.

Figura 27 - ELISA com as proteínas recuperadas da superfície celular.

As proteínas solúveis foram adsorvidas em placa de ELISA e marcadas com anti-HIS e anti-mouse-IgG-HRP, o ensaio com marcação apenas com anticorpo secundário foi incluído. a)

ELISA utilizando as proteínas solúveis como antígeno. b) proteínas solúveis expostas apenas ao anticorpo secundário. Os valores indicados nas barras correspondem à razão observada na linhagem respectiva em relação ao controle (EBY100 tratada com DTT). Os asteriscos (*) mostram os dados estatisticamente significativos: $p < 0,05$.



Fonte: A autora, 2022

6 DISCUSSÃO

Neste trabalho utilizamos o sistema EBY100/pYD1 baseado na ancoragem de proteínas na superfície celular de *S. cerevisiae*. Nesse sistema, o promotor indutível PGAL1 controla a expressão dos genes de interesse (que codificam as proteínas E80-ZIKV e N4P5-SARS) que foram fusionados ao gene AGA2, presente no vetor de expressão e responsável por codificar a sub-unidade Aga2p da proteína de parede celular α -aglutinina (INVITROGEN, 2002; BODER, WITTRUP, 1997). A segunda subunidade da proteína α -aglutinina (Aga1p) é a porção que se liga à parede celular das células de levedura através do motivo GPI, e na linhagem EBY100 de *S. cerevisiae* está sob controle também do promotor PGAL1 (ANDREU, DEL OLMO, 2018; BODER, WITTRUP, 1997). Assim, o cultivo das células de levedura em meio contendo galactose induz a expressão das nossas proteínas de interesse ancoradas a α -aglutinina. O peptídeo sinal de secreção utilizado nesse sistema é o peptídeo natural da proteína Aga2p, e para detectar a correta ancoragem dessas proteínas utilizamos um anticorpo comercial capaz de detectar a tag de verificação poli-histidina (6xHIS).

Para estabelecer uma boa produção das proteínas virais utilizadas neste estudo, analisamos a indução da expressão das proteínas E80-ZIKV e N4P5-SARS à 20°C e 30°C e verificamos qual o intervalo de tempo necessário para alcançar a maior eficiência de ancoragem destas proteínas, avaliando os resultados após 24, 48 e 72 horas de cultivo.

Os ensaios foram realizados pelo método ELISA usando as leveduras com proteínas ancoradas como antígeno (*Yeast-ELISA*) contra um anticorpo anti-HIS. A temperatura de indução é um fator importante na otimização da expressão de proteínas recombinantes em leveduras (CAMARERO, *et al.*, 2012). As temperaturas aqui avaliadas são comumente utilizadas na literatura para expressão e ancoragem de proteínas em leveduras (INVITROGEN, 2002; ANDREU; DEL OLMO, 2013). Apesar disso, o efeito da temperatura de indução na expressão das proteínas heterólogas podem ser específicos para a proteína em questão (HONG, *et al.*, 2002). Assumimos que as proteínas ectodomínio do Zika vírus e epítipo N4P5 da proteína nucleocapsídeo do vírus SARS-CoV-2 poderiam ter temperatura de indução ideal diferentes, devido a diferenças intrínsecas destas proteínas, principalmente em

relação aos seus tamanhos. A proteína E80-ZIKV possui 409 resíduos de aminoácidos (QU *et al.*, 2018) e necessita de modificações pós-traducionais como a N-glicosilação (MOSSENTA *et al.*, 2017), demonstrando ser mais complexa que a proteína baseada no epítipo N4P5-SARS, desenhada para conter duas cópias concatenadas resultando em apenas 45 aminoácidos (AMRUN *et al.*, 2020).

Nossos resultados mostram que só foi possível expressar E80-ZIKV à 20°C (Figura 19), demonstrando que diminuir a temperatura de indução pode ser favorável para expressão e processamento de proteínas grandes. Estes resultados se correlacionam com os resultados publicados na literatura sobre a influência positiva de temperaturas baixas na melhora do enovelamento de proteínas recombinantes, devido principalmente a redução da taxa de crescimento celular (CAMARERO, *et al.*, 2012). A temperatura de 20°C também favoreceu a maior expressão de N4P5-SARS, resultando num aumento de 2 vezes quando a temperatura de indução é diminuída de 30 para 20°C após 72 horas de cultivo (Figura 19). No geral, a indução a 20°C favoreceu a ancoragem de todas as proteínas analisadas (Aga2p sem proteína de interesse, Aga2p com E80-ZIKV e Aga2p com N4P5-SARS).

O segundo parâmetro analisado foi o intervalo de tempo que as células de leveduras recombinantes permaneceram submetidas a condição de indução da expressão e ancoragem das proteínas virais. Para determinar o intervalo de tempo ideal para este processo, foram analisados três pontos diferentes de cada experimento realizado nas diferentes temperaturas de indução e analisados por *Yeast-ELISA* (24, 48 e 72 horas). Nossos resultados mostram que N4P5-SARS pode ser detectada com 24 horas de indução, mas a ancoragem é aumentada consideravelmente após 72 horas. A proteína E80-ZIKV é capaz de ser detectada com 24 horas de indução (apenas com 20°C), porém a ancoragem observada é ainda muito baixa, sendo a melhor condição observada a 72 horas de indução (razão de 1.8 vezes em comparação com a linhagem parental). Por outro lado, quando induzida a 30°C o aumento do tempo de indução parece diminuir a ancoragem desta proteína. Dados da literatura demonstram que quantidades significativas de proteínas heterólogas podem ser obtidas com cerca de 6 a 8 horas de indução, entretanto, esse resultado foi alcançado com peptídeos de apenas 5-9 resíduos de aminoácidos (ANDREU; DEL OLMO, 2013). Condizente com nossos achados, a expressão e ancoragem de uma hemaglutinina do H4N1 (568 aminoácidos) e uma fusão de duas proteínas (400

aminoácidos) do vírus da síndrome da mancha branca na superfície de *S. cerevisiae* EBY100 foram observadas com 72 horas de indução em galactose a 20°C (LEI *et al.*, 2016; LEI *et al.*, 2021a; LEI *et al.*, 2021b). Apesar disto, a eficiência de produção da proteína do envelope do ZIKV parece ser dependente de temperatura. Kim e colaboradores (2021) demonstraram que a proteína envelope secretada por células de mamíferos tem sua produção aumentada quando a temperatura é reduzida de 37°C para 28°C, demonstrando que, assim como em nossos resultados, reduzir a temperatura da condição de indução pode melhorar a produção da proteína em questão. Por outro lado, a condição mais próxima (30°C) poderia ser responsável por aumentar a produção de proteínas funcionais.

Uma vez identificada a condição de 20°C por 72h como sendo a melhor condição de indução da expressão das proteínas e sua ancoragem em superfície celular, analisamos a ancoragem das proteínas virais através de citometria de fluxo. Utilizando o sistema EBY10/pYD1 é esperado que a população expressando a proteína em superfície seja entre 50-70% (INVITROGEN, 2002). Quando utilizamos o vetor pYD1 modificado para conter apenas a tag 6xHIS (Linhagem EBY100:AGA2, perdendo as tags Xpress e V5), nosso resultado foi de 52,8% de células contendo a proteína AGA2-6xHIS ancorada na superfície celular (Figura 20). Entretanto, quando utilizamos as linhagens recombinantes EBY100:E80-ZIKV e EBY100:N4P5-SARS nossos dados demonstram apenas 1,11% e 15,1%, respectivamente (Figura 20). Alguns trabalhos publicados também demonstram níveis de ancoragem abaixo do esperado utilizando a-aglutinina como âncora. Por exemplo, um trabalho recente (Yang *et al.*, 2019) demonstrou a ancoragem de uma enzima de 422 aminoácidos com uma população positiva de 38,91%. Este mesmo trabalho demonstra que após fusionar a proteína de interesse na porção Aga1p (ao invés de Aga2p) a porcentagem de células positivas quase dobrou (74,77%). Ryckaert e colaboradores (2008) em trabalho demonstrando a expressão de diferentes lectinas na superfície celular de EBY100 detectaram populações positivas variantes entre 31-58%, a população decaiu consideravelmente quando utilizado um anticorpo específico para a atividade das lectinas (0,2-15,3%). Por outro lado, há achados na literatura com níveis altos de expressão, um exemplo disto foi a expressão de uma hidrofobina (HFB1, 97aa) fusionada ao N-terminal de Aga2p onde foi possível observar uma população positiva de 68,8% (ANDREU *et al.*, 2021). Ademais, a expressão de dois antígenos virais fusionados relacionados ao

vírus da síndrome da mancha branca (400 aa) foi detectada numa população de 63,4% utilizando o mesmo sistema pYD1/EBY100 (LEI *et al.*, 2021b). Ainda, uma população de 92,2% foi positiva para a ancoragem de cinco peptídeos concatenados utilizados como proposta de tratamento para a doença de Alzheimer (LIU *et al.*, 2020). Desta forma, a ancoragem de proteínas e peptídeos parece ter resultados variantes a depender de características intrínsecas da proteína de interesse como também de outras propriedades do sistema de ancoragem. Além da citometria de fluxo, nós também avaliamos a ancoragem das proteínas E80-ZIKV e N4P5-SARS através de microscopia de imunofluorescência, os quais foram capazes de fornecer dados de que as linhagens EBY100:AGA2 e EBY100:N4P5-SARS aqui construídas foram capazes de ancorar as proteínas de interesse em sua superfície, utilizando marcação específica para a tag 6xHIS.

A verificação da funcionalidade da proteína de interesse é uma etapa de suma importância para demonstrar a aplicação do sistema de ancoragem de proteínas em superfície celular. Em outras palavras, além de demonstrar que a proteína de interesse está ancorada em superfície com uso de anticorpos que reconhecem tags de verificação presentes na construção, é importante a utilização de ensaios que determinem que a proteína de interesse ancorada é capaz de exercer sua função. A avaliação da funcionalidade de antígenos virais ancorados na superfície celular de *S. cerevisiae* pode ser demonstrada de diferentes maneiras, por exemplo, desde a ensaios *in vivo* quando a aplicação destas linhagens visa o desenvolvimento de estratégias vacinais, até a utilização de ensaios *in vitro* utilizando anticorpos comerciais capazes de reconhecer a proteína de interesse. Aqui, avaliamos a funcionalidade da proteína E80-ZIKV ancorada na superfície celular de *S. cerevisiae* EBY100 através do uso de anticorpo específico para a proteína do envelope do Zika vírus através de citometria de fluxo, microscopia de imunofluorescência e Yeast-ELISA. Nossos resultados, apresentam baixíssimos sinais positivos quanto a detecção de E80-ZIKV em todos os três tipos de ensaios realizados. O que é consistente com os resultados obtidos quando utilizado anticorpos anti-HIS. Desta forma, a linhagem *S. cerevisiae* EBY100:E80-ZIKV parece ter dificuldades para ancorar a proteína E80-ZIKV em sua superfície celular. Como citado anteriormente, isso pode ser resultado da estrutura desta proteína, a qual é uma proteína grande e que necessita de processos pós-traducionais que podem afetar sua produção pela

célula de levedura. Trabalhos na literatura demonstraram que a produção da proteína do envelope ZIKV e seu ectodomínio pode ser drasticamente reduzida quando sua glicosilação é afetada (MOSSENTA et al., 2017, KIM et al., 2021). Assim, a dificuldade em expressar uma proteína grande como E80, que necessita de glicosilação para permitir sua produção eficiente pode estar impactando a correta produção e consequentemente a ancoragem desta proteína na superfície celular de EBY100. Vale ressaltar que em nossas análises para obtenção da condição ideal de ancoragem das proteínas virais, utilizamos um anticorpo dirigido a detecção da tag de verificação 6xHIS presente na porção N-terminal das proteínas virais, o que nos confirma que as proteínas E80-ZIKV e N4P5-SARS foram ancoradas na superfície celular de *S. cerevisiae*. Entretanto, apesar de temperaturas na faixa de 20-25°C serem descritas como potencializadores da ancoragem de proteínas heterólogas em leveduras, outros autores observaram que um número maior de proteínas funcionais foi obtido com temperatura de indução de 30°C (KAJIRARA, AOKI, UEDA, 2020). Logo, é possível que outra condição de indução da expressão proteica pudesse melhorar os sinais de produção de E80-ZIKV e N4P5-SARS funcionais.

Apesar de nossos resultados indicarem baixos níveis de ancoragem da proteína E80-ZIKV, estes níveis se mantêm durante a estocagem da levedura EBY100:E80-ZIKV por até 38 dias. Neste sentido, resultados positivos são encontrados em trabalhos já publicados. Por exemplo, em 2018 pesquisadores demonstraram a estabilidade de proteínas ancoradas na superfície celular de *S. cerevisiae* por até um ano quando estocadas por refrigeração (2-8°C, KUMAR, 2018). Recentemente, o mesmo grupo de pesquisa apresentou dados de leveduras liofilizadas estocadas por até um ano e meio, nas quais as proteínas não perderam sua funcionalidade (KUMAR; KHARBIKAR, 2021). Por outro lado, nossos dados indicam que a imunorreatividade de E80-ZIKV obtida *Yeast-ELISA* não é mais detectada após 38 dias, o que provavelmente se deve ao fato de os níveis de ancoragem desta proteína já estarem muito baixos.

Juntamente com níveis baixos de detecção das proteínas de interesse, nos deparamos com outros desafios ao utilizar a metodologia de *Yeast-ELISA*. Nossos dados demonstram a utilização do *Yeast-ELISA* para detecção de anticorpos utilizando como antígeno leveduras recombinantes expressando proteínas virais em sua superfície. Esta estratégia pode ter grande potencial para diagnóstico de doenças,

por exemplo, através da detecção de anticorpos em soro de pacientes. Apesar de bastante atrativa, essa metodologia apresenta alguns desafios: nos dados apresentados aqui é possível verificar que o anticorpo secundário utilizado no ELISA indireto parece apresentar uma ligação inespecífica, a qual é variante entre as linhagens testadas. Problemas com ligação cruzada e inespecífica de anticorpos IgG já são descritos na literatura (JIGAN et al., 2017). Além disso, alguns trabalhos com o sistema *yeast surface display* utilizam controles de experimentos onde as células são marcadas apenas com anticorpo secundário (ANDREU; DEL-OLMO, 2017; LIU et al., 2022). Nossos dados obtidos através de *Yeast-ELISA* indireto consideraram o sinal inespecífico (ruído) provindo da ligação do anticorpo anti-mouse-IgG-HRP, o qual foi utilizado como branco. Entretanto, este ruído parece ser consideravelmente alto e dependente da linhagem utilizada. Uma alternativa para diminuir o ruído de ligação do anticorpo secundário, e ainda aproveitar a vantagem do sistema YSD para evitar etapas de purificação das proteínas antigênicas, seria a utilização das proteínas ancoradas à superfície recuperadas em solução sobrenadante. Para tanto, foi empregado uma etapa simples de recuperação baseada na incubação das células em uma solução de DTT capaz de reduzir as ligações dissulfeto que ligam Aga2p à Aga1p (UCHAŃSKI et al., 2019), liberando na solução sobrenadante a proteína de interesse fusionada à Aga2p. Aqui demonstramos a utilização destas proteínas recuperadas em experimentos de ELISA, nos quais obtivemos resultados quanto a sua detecção parecidos com aqueles utilizando a levedura inteira como antígeno. Estes resultados são bastante animadores pois nos permitem uma estratégia alternativa para diminuir a ligação inespecífica dos anticorpos secundários ao antígeno utilizado (célula inteira), podendo resultar em melhor sinal nos ensaios ELISA, com ruído de ligação inespecífica bastante menor. Além disso, considerando uma aplicação deste ensaio para detecção de anticorpos em soro humano, estes dados são bastante animadores, visto que em experimentos realizados por nosso grupo (dados não mostrados) para detecção de anticorpos em soro humano utilizando levedura inteira como antígeno (*Yeast-ELISA*) observamos alta reatividade dos soros à célula de levedura, nos levando a obter resultados com alto sinal-ruído. Desta forma, a obtenção de altos níveis de detecção da proteína N4P5-SARS (recuperada da parede celular de levedura) utilizando um anticorpo anti-HIS (Figura 27) evidencia seu potencial uso em futuros ensaios para detecção de anticorpos anti-SARS-CoV-2 em soro humano. Vale

ressaltar que o epítopo N4P5 possui grande aplicação na detecção de IgG (anti-SARS-COV-2) e é descrito como indicador de gravidade da doença COVID-19 (AMRUN *et al.*, 2020).

Aqui descrevemos a aplicabilidade do sistema de ancoragem de proteínas virais na superfície celular da levedura *S. cerevisiae*, a otimização das condições de indução e ancoragem de duas proteínas relacionadas a vírus responsáveis por epidemia e pandemia recentes. As proteínas virais utilizadas neste trabalho já possuem relatos publicados sobre seu potencial no desenvolvimento de estratégias vacinais e de diagnóstico do Zika vírus e SARS-CoV-2, respectivamente. Além disso, apresentamos dados sobre a imunorreatividade do ectodomínio da proteína do envelope do Zika vírus ancorado na superfície celular de *S. cerevisiae*. Demonstramos que mesmo em baixos níveis esta proteína é capaz de ser detectada por anticorpos específicos mesmo após 24 dias de estocagem. Além disso, demonstramos a recuperação em única etapa da proteína N4P5-SARS da superfície celular da levedura, e sua utilização em experimentos de ELISA. Este método pode gerar uma alternativa rápida e barata para produção de insumos para imunoenaios que se baseiam no uso de proteínas antigênicas purificadas. Juntos, nossos achados auxiliam no desenvolvimento de linhagens recombinantes que podem ser utilizadas como imunorreagentes capazes de serem aplicados em estudos para desenvolvimento de estratégias vacinais anti-ZIKV e anti-SARS-CoV-2, e na sua utilização como ferramentas de diagnósticos para rastrear e evitar a propagação destas infecções virais.

7 CONCLUSÕES

Aqui demonstramos a obtenção de duas linhagens recombinantes de *S. cerevisiae* ancorando em sua superfície celular duas proteínas virais relacionadas ao Zika vírus e SARS-CoV-2. A plataforma de ancoragem de proteínas aqui utilizada, possibilitou a detecção da proteína E80-ZIKV (ectodomínio da proteína do envelope do Zika vírus) e N4P5-SARS (epítipo da proteína do nucleocapsídeo do SARS-CoV-2) em ensaios (*Yeast*-ELISA, microscopia de fluorescência e citometria de fluxo) utilizando anticorpo específico para tag 6xHIS. Demonstramos ainda a imunorreatividade da proteína E80-ZIKV utilizando um anticorpo comercial, a qual após 24 dias de estocagem das leveduras ainda demonstrou reatividade ao anticorpo. Apesar disto, nossos dados demonstram baixos níveis de produção desta proteína, indicando que são necessárias etapas adicionais de otimização de sua produção para aumentar a eficiência de ancoragem. Por outro lado, a recuperação das proteínas virais ancoradas da superfície celular numa etapa simples de incubação em reagente redutor permitiu a liberação destas proteínas e sua utilização como antígeno em experimentos de ELISA. Este achado indica que as proteínas recuperadas podem gerar uma alternativa barata e eficaz para ser utilizada em futuros imunoenaios, como é o caso da detecção de anticorpos em amostras de soros. Desta forma, o presente trabalho demonstra a aplicação do sistema de ancoragem em levedura na produção de proteínas virais relacionadas a doenças infecciosas com grande impacto mundial e que necessitam de maior atenção quanto ao desenvolvimento de estratégias para a produção de imunorreagentes visando a contenção da disseminação viral.

REFERENCIAS

- ALTENBUCHNER, J; MATTERS, R. *Escherichia coli*. In G. Gellissen (Ed.), Production of recombinant proteins: novel microbial and eukaryotic expression systems. **Germany: John Wiley & Sons.**, 7-43, 2004.
- ANANPHONGMANEE, V., *et al.* Shrimp protected from a virus by feed containing yeast with a surface-displayed viral binding protein. **Journal of Biotechnology**, 342, 45-53, 2021.
- ANDREU, C., *et al.* Surface display of HFBI and DewA hydrophobins on *Saccharomyces cerevisiae* modifies tolerance to several adverse conditions and biocatalytic performance. **Applied genetics and molecular biotechnology**, 105, 1505-1518, 2021.
- ANDREU, C.; DEL OLMO, M.L. Yeast arming systems: pros and cons of different protein anchors and other elements required for display. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 102 (6), 2543-2561, 2018.
- ANDREU, C.; DEL-OLMO, M. Development of a new Yeast surface display system based on Spi1 as an anchor protein. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 101, 287-299, 2017.
- BAESHEN, N. A., *et al.* Cell factories for insulin production. **Microbial Cell Factories**, 13, 141, 2014.
- BAL, J., *et al.* Evaluation of cell-surface displayed synthetic consensus dengue EDIII cells as a potent oral vaccine candidate. **Microbial Cell Factories**, 17 (1), 146, 2018.
- BARDERAS, R.; BENITO-PEÑA, E. The 2018 Nobel Prize in Chemistry: phage display of peptides and antibodies. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, 411 (12), 2475–2479, (2019).
- BARRETO, M.L. *et al.* Zika virus and microcephaly in Brazil: a scientific agenda. **Lancet**, 387 (10022), 919-921, 2016.
- BERNER, V. K.; SURA, M. E.; HUNTER, K. Conjugation of protein antigen to microparticulate beta-glucan from *Saccharomyces cerevisiae*: a new adjuvant for intradermal and oral immunizations. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 80 (6), 1053-1061, 2008.
- BERTANI, G. Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, 62 (3), 293-300, 1951.
- BITINAITE, J., *et al.* USER friendly DNA engineering and cloning method by uracil excision. **Nucleic Acids Research**, 35 (6): 1992-2002, 2007.

BODER, E.T.; WITTRUP, K.D. *Yeast Surface Display* for screening combinatorial polypeptide libraries. **Nature Biotechnology**, 15 (6), 553-557, 1997.

BOWEN, J., *et al.* Screening of Yeast Display Libraries of Enzymatically Treated Peptides to Discover Macrocyclic Peptide Ligands. **International Journal of molecular sciences**, 22 (4), 1634, 2021.

BRASIL, P. *et al.* Zika virus outbreak in Rio de Janeiro, Brazil: Clinical characterization, epidemiological and virological aspects. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, 10 (1), e0004636, 2016.

CAMARERO, S., *et al.* Engineering platforms for directed evolution of Laccase from *Pycnoporus cinnabarinus*. **Applied and Environmental Microbiology**, 78, 1370-1384, 2012.

Cappellaro, C., *et al.* Mating type-specific cell-cell Recognition of *Saccharomyces cerevisiae*: cell wall attachment and active sites of a- and alpha-agglutinin. **The EMBO Journal**, 13 (1), 4737-4744, 1994.

CHEN, C., *et al.* Porcine Immunoglobulin Fc Fused P30/P54 Protein of African Swine Fever Virus Displaying on Surface of *S. cerevisiae* Elicit Strong Antibody Production in Swine. **Virologica Sinica**, 36, 207-219, 2021.

CHEON, S. A. Characterization of putative glycosylphosphatidylinositol-anchoring motifs for surface display in the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*. **Biotechnology Letters**, 36 (10), 2085-2094, 2014.

CHERF, G. M.; COCHRAN, J.R. Applications of *Yeast Surface Display* for Protein Engineering. **Methods in Molecular Biology**, 1319, 155-175, 2015.

D. LIU, *et al.* Yeast-Based A β 1-15 Vaccine Elicits Strong Immunogenicity and Attenuates Neuropathology and Cognitive Deficits in Alzheimer's Disease Transgenic Mice. **Vaccines (Basel)**, 8 (3), 351, 2020.

DE SMET R., ALLAIS L., CUVELIER C. A. Recent advances in oral vaccine development: yeast-derived β -glucan particles. **Human Vaccines and Immunotherapeutics**. 10 (5), 1309–1318, 2014.

DONG, M., *et al.* Optimization of production conditions of rice α -galactosidase II displayed on yeast cell surface. **Protein Expression and Purification**, 171 (105611), 2020.

DURDIC, K. I. Saturation mutagenesis to improve the degradation of azo dyes by versatile peroxidase and application in form of VP-coated yeast cell walls. **Enzyme Microbial Technology**, 136, 109509, 2020.

DURDIC, K. L. Flow cytometry-based system for screening of lignin peroxidase mutants with higher oxidative stability. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 129 (9), 664-671, 2019.

FRANCISCO, J. A., *et al.* Production and fluorescence-activated cell sorting of *Escherichia coli* expressing a functional antibody fragment on the external surface. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 2 (2), 97-102, 1993.

GAO, T., *et al.* Immune response induced by oral administration with a *Saccharomyces cerevisiae*-based SARS-CoV-2 vaccine in mice. **Microbial Cell Factories**, 20 (95), 2021.

GLASGOW, A., *et al.* Engineered ACE2 receptor traps potently neutralize SARS-CoV-2. **BioRxiv**, 2020.07.31.231746, 2020.

GOO, L., *et al.* The Zika virus envelope protein glycan loop regulates virion antigenicity. **Virology**. 515 (1), 191-202, 2018.

GUPTA, S. K., *et al.* Effectual Bioprocess Development for Protein Production. **Applied Microbiology and Bioengineering**, 203-227, 2019.

GUPTA, V., *et al.* Production of Recombinant Pharmaceutical Proteins. **Basic and Applied Aspects of Biotechnology**, 77-101, 2016.

HAN, L., *et al.* Oral administration of *Saccharomyces cerevisiae* displaying VP28-VP24 confers protection against white spot syndrome virus in shrimp. **Virus Research**, 302, 195467, 2021.

HEINZELMAN, R.; GREENHALGH, J. C.; ROMERO, F. A. Identification of ACE2 mutations that modulate SARS-CoV-2 binding across multiple mammalian species. **BioRxiv**, 2021.03.16.435705, 2022.

HONG, F., *et al.* Fermentation strategies for improved heterologous expression of laccase in *Pichia pastoris*. **Biotechnology and Bioengineering**, 79 (4), 438-449, 2002.

HOU, J., *et al.* Metabolic engineering of recombinant protein secretion by *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Yeast Research**, 12, 491-510, 2012.

INOKUMA, K., *et al.* Enhanced cell-surface display and secretory production of cellulolytic enzymes with *Saccharomyces cerevisiae* Sed1 signal peptide. **Biotechnology and Bioengineering**, 113 (11), 2358–2366, 2016.

INOUE, H.; NOJIMA, H.; OKAYAMA, H. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. **Gene**, 96 (1), 23-28, 1990.

INVITROGEN. pYD1 yeast display vector kit - user manual 2002. Disponível em: <https://www.yumpu.com/en/document/view/49535338/pYD1-yeast-display-vector-kit>. Acessado em: 30/08/2020.

ITO, H., *et al.* Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. **Journal of Bacteriology**, 153 (1), 163-168, 1983.

JESSOP-FABRE, M.M., *et al.* EasyClone-MarkerFree: A vector toolkit for marker-less integration of genes into *Saccharomyces cerevisiae* via CRISPR-Cas9. **Biotechnology Journal**, 11 (8), 1110-1117, 2016.

JIANG, X., *et al.* Non-Specific Binding and Cross-Reaction of ELISA: A Case Study of Porcine Hemoglobin Detection. **Foods**, 10 (8), 1708, 2021.

KAJIWARA, K.; AOKI, W.; UEDA, M. Evaluation of the *Yeast Surface Display* system for screening of functional nanobodies. **AMB Express**, 10 (51), 2020.

KATSURADA, K., *et al.* Constitutive cell surface expression of ZZ domain for the easy preparation of yeast-based immunosorbents. **The Journal of General and Applied Microbiology**, 67, 265-268, 2021.

KHAN, S., *et al.* Role of Recombinant DNA Technology to Improve Life. **International Journal of Genomics**, 2016: 2405954, 2016.

KIM, C.Y., *et al.* Optimization of Zika virus envelope protein production for ELISA and correlation of antibody titers with virus neutralization in Mexican patients from an arbovirus endemic region. **Virology Journal**, 15 (1), 193, 2018.

Kim, J.M., *et al.* Surface-displayed expression of a neutralizing epitope of ApxIIA exotoxin in *Saccharomyces cerevisiae* and oral administration of it for protective immune responses against challenge by *Actinobacillus pleuropneumoniae*. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, 74 (7), 1362-1367, 2010.

KIM, S-Y., *et al.* A cell surface display system using novel GPI-anchored proteins in *Hansenula polymorpha*. **Yeast**, 19 (13), 1153-1163, 2002.

KIM, Y.C., *et al.* Temperature-dependent secretion of Zika virus envelope and non-structural protein 1 in mammalian cells for clinical applications. **Journal of Virological Methods**, 294, 114175, 2021.

LEI, H., *et al.* High immune efficacy against different avian influenza H5N1 viruses due to oral administration of a *Saccharomyces cerevisiae*-based vaccine in chickens. **Scientific Reports**, 11 (8977), 2021.

LEI, H., *et al.* Oral administration of *Saccharomyces cerevisiae* displaying VP28-VP24 confers protection against white spot syndrome virus in shrimp. **Virus research**, 302, 198467, 2021.

LEI, H., *et al.* Yeast display platform technology to prepare oral vaccine against lethal H7N9 virus challenge in mice. **Microbial Cell Factories**, 19 (53), 2020.

LEI, H., *et al.* Yeast surface-displayed H5N1 avian influenza vaccines. **Journal of Immunology Research**, 4131324, 2016.

LIE, D.; CHENG, H.; DENG, Z. One step production of isomalto-oligosaccharides by engineered *Yarrowia lipolytica* yeast co-displayed β -amylase and α -transglucosidase. **Chinese Journal of Biotechnology**, 35 (1), 121-132, 2019.

Lista da OMS de doenças prioritárias. Revisão anual de 2018-2019. Disponível em: <https://www.who.int/blueprint/priority-diseases/en/>. Acessado em: 30 de agosto de 2020.

LITI, G. The Natural History of Model Organisms: The fascinating and secret wild life of the budding yeast *S. cerevisiae*. **Ecology, Genetics and Genomics**, 4, e05835, 2015.

LIU, R., *et al.* RIPPA: Identification of MHC-II binding peptides from antigen using a yeast display-based approach. **Current Protocols**, 2, e350.

MARTINES, R.B., *et al.* Notes from the field: Evidence of Zika virus infection in brain and placental tissues from two congenitally infected newborns and two fetal losses - Brazil, 2015. **Morbidity and Mortality Weekly Reports**, 65 (6), 159-160, 2016.

MCCMAHON, C., *et al.* Yeast Surface Display platform for rapid discovery of conformationally selective nanobodies. **Nature Structural and Molecular Biology**, 25, 289–296, 2018.

MOSSSENTA, M., *et al.* Role of N-glycosylation on Zika virus E protein secretion, viral assembly and infectivity. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 2017.

MOSSSENTA, M., *et al.* Role of N-glycosylation on Zika virus E protein secretion, viral assembly and infectivity. **Biochemical and Biophysical Research Communication**, 492 (4), 579-586; 2017.

NANDY, S. K.; SRIVASTAVA, R. K. A review on sustainable yeast biotechnological processes and applications. **Microbiological Research**, 207, 83-90, 2018.

NGUYEN, T. P. A., *et al.* Application of Yeast Surface Display system in expression of recombinant pediocin PA-1 in *Saccharomyces cerevisiae*. **Folia Microbiologica**, 65, 955–961, 2020.

NIELSEN, J. Production of biopharmaceutical proteins by yeast: Advances through metabolic engineering. **Bioengineered**, 4 (4), 207-211, 2013.

NOKUMA, K.; HASUNUMA, T.; KONDO, A. Efficient yeast cell-surface display of exo- and endo-cellulase using the SED1 anchoring region and its original promoter. **Biotechnology for Biofuels and Bioproducts**, 7 (1), 8, 2014.

OH, E. J., *et al.* Multiplex Evolution of Antibody Fragments Utilizing a Yeast Surface Display Platform. **ACS synthetic biology**, 9 (8), 2197-2202, 2020.

PARDI, N. *et al.* Zika virus protection by a single low dose nucleoside modified mRNA vaccination. **Nature**. 543 (7644), 248-251, 2017.

PARMLEY, S. F.; SMITH, G. P. Filamentous Fusion Phage Cloning Vectors for the Study of Epitopes and Design of Vaccines. In M. Z. Atassi (Ed.), *Immunobiology of Proteins and Peptides V: Vaccines Mechanisms, Design, and Applications* (pp. 215–218). **Springer US**. (1989).

QU, P., *et al.* A new class of broadly neutralizing antibodies that target the glycan loop of Zika virus envelope protein. **Cell Discovery**, 6, 5, 2020.

QU, P., *et al.* Insect cell-produced recombinant protein subunit vaccines protect against Zika virus infection. **Antiviral Research**, 154, 97-103, 2018.

R. LIU, *et al.* RIPPA: Identification of MHC-II Binding Peptides from Antigen Using a Yeast Display-Based Approach. **Current protocols**, 2 (1), e350, 2022.

RAEESZADEH-SARMAZDEH, M., *et al.* Engineering of tissue inhibitor of metalloproteinases TIMP-1 for fine discrimination between closely-related stromelysins MMP-3 and MMP-10. **Journal of Biological Chemistry**, 28, 101654, 2022.

SABU, C., *et al.* Yeast-inspired drug delivery: biotechnology meets bioengineering and synthetic biology. **Expert Opinion on Drug Delivery**, 16 (1), 27-41, 2019.

SATO, N., *et al.* Long anchor using Flo1 protein enhances reactivity of cell surface-displayed glucoamylase to polymer substrates. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 60 (1), 469–474, 2002.

SCHEIN, C.H., NOTEBORN, M.H.M. Formation of soluble recombinant proteins in *Escherichia coli* is favored by lower growth temperature. **Biotechnology**, 6, 291 - 294, 1988.

SCHREUDER, M. P., *et al.* Targeting of a heterologous protein to the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, 9, 399–409, 1993.

SHARMA, V., *et al.* Zika virus: an emerging challenge to public health worldwide. **Canadian Journal of Microbiology**, 66 (2), 87-98, 2020.

SHENOY, A., *et al.* Expression and Display of Glycoengineered Antibodies and Antibody Fragments with an Engineered Yeast Strain. **Antibodies**, 10 (4), 38, 2021.

SHENOY, A.; BARB, A. W. Recent Advances Toward Engineering Glycoproteins Using Modified Yeast Display Platforms. **Methods in Molecular Biology**, 2370, 185-205, 2022.

SHIBASAKI, S.; UEDA, M. Oral Vaccine Development by Molecular Display Methods Using Microbial Cells. **Methods in Molecular Biology**, 497–509, 2016.

- SILVA, A. J. D., *et al.* *Pichia pastoris* displaying ZIKV protein epitopes from the Envelope and NS1 induce in vitro immune activation. **Vaccine**, 39 (18), 2545-2554, 2021.
- SMITH, G. P. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. **Science**, 228 (4705), 1315–1317, (1985).
- STEWART, G. G. *Saccharomyces: Saccharomyces cerevisiae*. In Encyclopedia of Food Microbiology: Second Edition (Second Edition, Vol. 3). **Elsevier**, 2014.
- STIER, H., EBBESKOTTE, V., GRUENWALD, J. Immune-modulatory effects of dietary Yeast Beta-1,3/1,6-D-glucan. **Nutrition Journal**, 13 (38), 2014.
- SWIECH, K.; PICANÇO-CASTRO, V.; COVAS, D. T. Human cells: New platform for recombinant therapeutic protein production. **Protein Expression and Purification**, 84 (1), 147-153, 2012.
- T. UCHAŃSKI, *et al.* An improved Yeast surface display platform for the screening of nanobody immune libraries. **Science reports**, 9, 382, 2019.
- TANAKA, T., *et al.* Recent developments in yeast cell surface display toward extended applications in biotechnology. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 5 (1), 577–591, 2012.
- TANAKA, T.; KONDO, A. Cell-surface display of enzymes by the yeast *Saccharomyces cerevisiae* for synthetic biology. **FEMS Yeast Research**, 15, 1-9, 2015.
- TANG, H., *et al.* Efficient yeast surface-display of novel complex synthetic cellulosomes. **Microbial Cell Factories**, 17, 122, 2018.
- TEIXEIRA, A. Z. R., *et al.* Drug-like antibodies with high affinity, diversity and developability directly from next-generation antibody libraries. **MAbs**, 13 (1):1980942, 2021.
- TRIPATHI, N. K.; SHRIVACTAVA, A. Recent Developments in Bioprocessing of Recombinant Proteins: Expression Hosts and Process Development. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, 7: 240, 2019.
- UCHAŃSKI, T., *et al.* An improved Yeast Surface Display platform for the screening of nanobody immune libraries. **Scientific Reports**, 9, 382, 2019.
- WADLE, A., *et al.* Serological identification of breast cancer-related antigens from a *Saccharomyces cerevisiae* surface display library. **International Journal of Cancer**, 117 (1), 104-113, 2005.
- WADLE, A., *et al.* Serological immune response to cancer testis antigens in patients with pancreatic cancer. **International Journal of Cancer**, 119 (1), 117-125, 2006.

WILDT, S.; GERNGROSS, T. U. The humanization of N-glycosylation pathways in yeast. **Nature Reviews Microbiology**, 3 (2), 119–128, 2005.

YANG, J.; DANG, H.; LU, J.R. Improving genetic immobilization of a cellulase on yeast cell surface for bioethanol production using cellulose. **Journal of Basic Microbiology**, 53 (4), 381-389, 2012.

YANG, R., *et al.* Two immunogenic recombinant protein vaccine candidates showed disparate protective efficacy against Zika virus infection in rhesus macaques. **Vaccine**, 39 (6), 915–925, 2021.

YANG, R., *et al.* Two immunogenic recombinant protein vaccine candidates showed disparate protective efficacy against Zika virus infection in rhesus macaques. **Vaccine**, 39 (6), 915-925, 2021.

YANG, X., *et al.* Development of novel surface display platforms for anchoring heterologous proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbial Cell Factories**, 18 (85), 2019.

YU, L., *et al.* Delineating antibody recognition against Zika virus during natural infection. **JCI Insight**, 2 (12), e93042, 2017.

ZHA, D. Glycoengineered *Pichia*-based expression of monoclonal antibodies. **Methods in Molecular Biology**, 988, 31-43, 2013.

ZHANG, W., *et al.* Yeast-produced subunit protein vaccine elicits broadly neutralizing antibodies that protect mice against Zika virus lethal infection. **Antiviral Research**, 170, 104578, 2019.

ZHANG, Y., *et al.* Efficient Display of *Aspergillus niger* β -glucosidase on *Saccharomyces cerevisiae* cell wall for aroma enhancement in wine. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 67, 5169-5176, 2019.

ZUMLA, A.; HUI, D.S.C. Emerging and Reemerging Infectious Diseases: Global Overview. **Infectious Disease Clinics of North America**, 33 (4), 13-19, 2019.