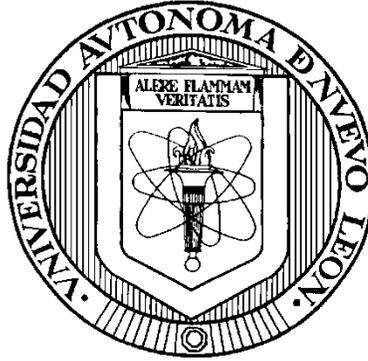


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**

**FACULTAD DE MEDICINA**



**"DISEÑO DE UN SISTEMA DE EXPRESIÓN HETERÓLOGA DE  
PROTEÍNAS RECOMBINANTES DE ENVOLTURA DEL VIRUS DEL  
DENGUE"**

**Por:**

**Q.C.B. Carlos Alberto González Villarreal**

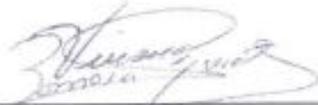
**Como requisito parcial para obtener el título de  
Maestro en Ciencias con Orientación en Biología Molecular e  
Ingeniería Genética**

**Noviembre del 2013**

---

**“Diseño de un sistema de expresión heteróloga de proteínas recombinantes de envoltura del virus del dengue”**

**Aprobación de Tesis:**



---

**Dra. C. Viviana Chantal Zomosa Signoret**  
**Directora de Tesis**



---

**Dr. C. Roman Vidaltamayo Ramirez**  
**Co-Director de Tesis**



---

**Dra. C. Aña Maria Guadalupe Rivas Estilla**  
**Miembro de Tesis**



---

**Dr. med. Gerardo Enrique Muñoz Maldonado**  
**Subdirector de Estudios de Posgrado**

# Agradecimientos

---

Este trabajo, que el tesista se enorgullece en presentar, nunca pudo ser realidad si no fuera por el apoyo sea moral o en especie de numerosas personas o instituciones.

Dedico este espacio para nombrar algunas de estas personas que me ofrecieron su apoyo a lo largo de estos años, sean buenos, malos, placenteros o difíciles, y compartir este logro más en mi vida.

Hago mención inicialmente a CONACyT, cuya beca me otorgó los recursos para centrar mis esfuerzos únicamente en alcanzar este logro.

A mis padres, Arturo y Sonia, que obviando apoyo moral y económico; sin excepción, han sido mi inspiración a seguir creciendo, a no conformarse y ser una persona trabajadora y honrada.

A mis asesores, la Dra. Viviana Zomosa, el Dr. Román Vidal y la Dra. Ana Maria Rivas que me ofrecieron la oportunidad de incluirme en su línea de trabajo, me facilitaron los recursos y sobre todo, me apoyaron a crecer intelectualmente.

A la Dra. Herminia que confió en mí en lograr este logro y me ofreció su apoyo y comprensión en todo momento.

Mis compañeros: Liz, Geo, Mony, Paola, Alex, Mariel, Kame y Erik, que bajo la misma agenda nos entendimos lo suficiente siempre contando el uno al otro.

A mi novia Yessica Sánchez que me dio su cariño y comprensión en todo momento de lo retratado en este trabajo, pese sus propias responsabilidades, me demostró su aprecio y apoyo de manera incondicional a lo largo de este tiempo.

A mis compañeros del laboratorio de Infectología: Angel Merino, Daniel Arellanos, Sonia Lozano y Tanya Salas que entre trabajo, pláticas y momentos amenos fuimos compañeros y amigos que sin duda, complementábamos el mejor espacio.

Al Dr. Ascacio y Dr Velázquez, que con sus consejos y opiniones me ayudaron a explorar otros frentes al trabajo cumpliendo como siempre su función en esta casa de estudios: ser mis maestros.

A Juany, Ariadna y Normita, que siempre estuvieron al pendiente de apoyarnos y a don Lalo que me ofreció su ayuda en todo momento.

## Resumen

**Carlos Alberto González Villarreal**

### **"DISEÑO DE UN MODELO DE EXPRESIÓN HETERÓLOGA DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES DE PROTEÍNAS DE ENVOLTURA DEL VIRUS DEL DENGUE"**

**Nombre:** Q.C.B. Carlos Alberto González Villarreal

**Institución:** Universidad Autónoma de Nuevo León. Facultad de Medicina.

**Fecha de titulación:** Noviembre 2013

**Número de páginas:** 79

**Introducción:** El virus del dengue (DENV) es un virus de la familia Flaviviridae causante de la fiebre del Dengue. Ésta se considera la enfermedad tropical/subtropical más importante con más de 2.5 miles de millones de personas en riesgo y con más de 50 millones de infecciones registradas al año. El DENV posee un genoma de RNA de polaridad positiva de 10.6 kb que codifica una única poliproteína que es escindida en 3 proteínas estructurales y 7 no estructurales. La proteína de envoltura (E) del virus del Dengue es una glucoproteína estructural cuyo peso molecular es de 53 kDa. Siendo una proteína que envuelve el virión, ésta se encuentra en contacto frecuente con el medio circundante, estando en contacto con los anticuerpos del hospedero conteniendo los principales epítomos antigénicos. La estrategia actual para controlar el dengue se enfocan principalmente al tratamiento oportuno y prevención. El tratamiento específico va directamente ligado al diagnóstico oportuno y es actualmente centro de atención de la medicina moderna debido a que los síntomas generales no son diferenciables a etapas tempranas de la enfermedad que al postergarse, puede evolucionar a un cuadro severo que pone la vida del paciente en riesgo. Actualmente la teoría más aceptada para entender el dengue severo es por la Potenciación Mediada por Anticuerpos, la cual establece que la reinfección con un serotipo distinto puede exacerbar la enfermedad. Por todo lo anterior, es importante crear un método de diagnóstico sencillo y económico que sea capaz de identificar serotipo en etapas tempranas de la enfermedad para ofrecer al paciente las medidas necesarias y oportunas.

**Objetivo:** Diseñar y estandarizar un sistema de expresión de proteínas recombinantes de la proteína de envoltura del virus del dengue que conserve sus características inmunogénicas para su potencial utilidad en el diagnóstico.

**Materiales y Métodos:** Se trabajó con la secuencia sintética de proteína E optimizada para su expresión en sistemas heterólogos y mejorar la estabilidad del RNAm además de incluir una cola de poli histidinas para su purificación ulterior. La secuencia se subclonó en vectores de expresión con enzimas de restricción para su expresión en sistemas procariontes realizando ensayos para cada sistema y vector.

**Resultados:** Se obtuvo una secuencia optimizada que permite expresar la proteína E en un vector (pQE-80L-Kan) inducible por IPTG en *Escherichia coli* cepa BLR(DE3) con posibilidad de ser aplicado en las cepas M15 y SG13009. Los ensayos en este sistema muestran una banda en el peso molecular esperado, purificable con resina y/o columna de afinidad a Ni<sup>2+</sup> por medio de la etiqueta de poli histidinas que la proteína recombinante contiene. Esto sugiere que se tiene la expresión satisfactoria de la proteína de envoltura del virus del Dengue.

**Conclusiones:** El presente trabajo es pionero en la expresión de la proteína completa y ha contribuido con la estandarización del protocolo para su expresión. Partiendo de estas conclusiones se buscará por el medio más efectivo escalar la producción proteica y demostrar que retiene sus propiedades antigénicas al ser reconocido por anticuerpos monoclonales (Anti-E) o policlonales (sueros de pacientes con infecciones confirmadas por DENV).

# Índice por capítulo

---

<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>2. ANTECEDENTES</b> .....	<b>2</b>
2.1. CLASIFICACIÓN DE LOS CASOS DE DENGUE .....	4
2.2. ESTRUCTURA VIRAL.....	6
2.3. PROTEÍNA E.....	7
2.4. INMUNOGENICIDAD .....	9
2.4.1. Antígenos/epítomos reconocidos por anticuerpos humanos. ....	9
2.4.2. Potenciación mediada por anticuerpos (ADE).....	10
2.5. ESTRATEGIA .....	11
2.6. DIAGNÓSTICO DE DENV .....	12
2.7. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO.....	14
2.7.1. Aislamiento del virus .....	14
2.7.2. Detección de antígeno .....	15
2.7.3. Detección de RNA viral.....	16
2.7.4. Detección de anticuerpos (IgM e IgG).....	17
2.7.5. Detección de anticuerpos neutralizantes.....	18
2.8. PERSPECTIVA .....	19
2.9. EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES .....	19
2.9.1. Sistemas para producir proteínas recombinantes .....	20
2.9.2. <i>E. coli</i> .....	21
2.9.3. Células de mamífero.....	23
2.10. ANTECEDENTES DIRECTOS.....	24
<b>2.11. JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>26</b>
<b>2.12. OBJETIVO GENERAL</b> .....	<b>27</b>
<b>2.13. OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	<b>28</b>
<b>3. MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	<b>29</b>
3.1. ESTRATEGIA GENERAL.....	29
3.2. MATERIAL .....	30
3.2.1. Material biológico.....	30
3.2.2. Equipo .....	31
3.3. CONSTRUCCIÓN DE LOS VECTORES DE EXPRESIÓN .....	32
3.3.1. Rediseño del gen de envoltura del virus del dengue.....	32
3.3.2. Construcción de los vectores de expresión.....	33
3.3.3. Vector contitutivo pBS-KS.....	34
3.3.4. Vector inducible pBC-SK .....	35
3.3.5. Vector inducible pQE-80L-kan .....	37
3.3.6. Plásmido control pQE-40 .....	38
INDUCCIÓN .....	40

PURIFICACIÓN.....	41
<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>43</b>
4.1. OPTIMIZACIÓN DE LA SECUENCIA DE E PARA SU EXPRESIÓN EN SISTEMAS HETERÓLOGOS. ....	43
4.1.1. Rediseño de la secuencia de la proteína de envoltura del virus del dengue .....	43
4.1.2 CONSTRUCCIÓN DE LOS VECTORES DE EXPRESIÓN.....	49
pBS-KS.....	49
pBC-SK .....	51
pQE-80L-kan .....	53
4.2 EXPRESIÓN DE PROTEÍNA E .....	54
4.2.1 <i>Inducción.</i> .....	54
DH5 $\alpha$ / pBS-KS .....	54
BL21(DE3) / pBC-SK.....	56
BLR(DE3) / pQE-80L-kan .....	59
<b>5. DISCUSIÓN.....</b>	<b>62</b>
<b>6. CONCLUSIONES.....</b>	<b>66</b>
<b>7. ANEXOS .....</b>	<b>67</b>
ANEXO 1 .....	67
<i>Miniprep</i> .....	67
ANEXO 2 .....	70
<i>Células calcio competentes</i> .....	70
ANEXO 3 .....	71
<i>Transformación por choque térmico</i> .....	71
ANEXO 4 .....	72
<i>Subclonación</i> .....	72
<i>Ligación</i> .....	73
ANEXO 5 .....	74
<i>Purificación (buffers de Ni-NTA spin kit)</i> .....	74
<b>8. REFERENCIAS .....</b>	<b>76</b>

# Índice de figuras

---

<b>FIGURA 1. DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA DENV.</b> .....	3
<b>FIGURA 2. INCREMENTO DE CASOS.</b> .....	3
<b>FIGURA 3. CLASIFICACIÓN DE CASOS DE DENGUE SUGERIDA Y NIVELES DE GRAVEDAD.</b> .....	5
<b>FIGURA 4. GENOMA DEL VIRUS DEL DENGUE. MARCO DE LECTURA ÚNICO PARA TRES PROTEÍNAS ESTRUCTURALES Y SIETE NO ESTRUCTURALES.</b> .....	7
<b>FIGURA 5. ESTRUCTURA DEL VIRUS DEL DENGUE</b> .....	8
<b>FIGURA 6 MODELO DE INFECCIÓN CON DENGUE.</b> .....	11
<b>FIGURA 7. DIAGNÓSTICO MOLECULAR.</b> .....	16
<b>FIGURA 8. ANTÍGENOS Y RESPUESTA DE ANTICUERPOS USADOS PARA DIAGNÓSTICO.</b> .....	18
<b>FIGURA 9. ESTRUCTURA DE PUC57.</b> .....	33
<b>FIGURA 10. ESTRUCTURA DE PBS-KS.</b> .....	35
<b>FIGURA 11. ESTRUCTURA DE PBC-SK.</b> .....	36
<b>FIGURA 12. ESTRUCTURA DE PQE-80L-KAN.</b> .....	37
<b>FIGURA 13. ESTRUCTURA DE PQE-40.</b> .....	39
<b>FIGURA 14. CONSTRUCCIÓN PBS-KS.</b> .....	49
<b>FIGURA 15. SELECCIÓN PBS-KS.</b> .....	50
<b>FIGURA 16. CONSTRUCCIÓN PBC-SK.</b> .....	51
<b>FIGURA 17. SELECCIÓN DE PBC-SK.</b> .....	52
<b>FIGURA 18. CONSTRUCCIÓN PQE-80L-KAN.</b> .....	53
<b>FIGURA 19. EXPRESIÓN PBS-KS.</b> .....	55
<b>FIGURA 20. CURVA DE CRECIMIENTO <i>E. COLI</i>.</b> .....	57
<b>FIGURA 21. EXPRESIÓN PBC-SK.</b> .....	58
<b>FIGURA 22. EXPRESIÓN PQE-80L-KAN.</b> .....	59
<b>FIGURA 23. PURIFICACIÓN POR CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD.</b> .....	60

# Índice de tablas

---

<b>Tabla 1.</b> Características de los sistemas de expresión <i>E. coli</i> .....	22
<b>Tabla 2.</b> Algunos problemas de usar <i>E. coli</i> .....	23
<b>Tabla 3.</b> Cepas de <i>E. coli</i> con sus características genotípicas.....	30

# Abreviaturas

---

<b>aa</b>	Aminoácido
<b>ADE</b>	Potenciación Mediada por anticuerpos (Antibody dependant enhancement)
<b>ADN</b>	Acido desoxirribonucleico
<b>ampR</b>	Ampicillin resistance (Resistencia a ampicilina)
<b>°C</b>	Grados centígrados
<b>DHF</b>	Fiebre hemorrágica por dengue (Dengue hemorrhagic fever)
<b>DENV</b>	Virus del dengue (Dengue Virus)
<b>DF</b>	Dengue Fever
<b>DSS</b>	Dengue shock syndrome
<b>ELISA</b>	Enzyme-linked immunosorbent assay (ensayo inmuno absorbente ligado a enzimas)
<b>E (protein)</b>	(proteína) de envoltura (Envelope Protein)
<b>g</b>	Gravedades
<b>Ig</b>	Inmunoglobulina
<b>IPTG</b>	Isopropilitio $\beta$ -D galactósido
<b>Kb</b>	Kilo base
<b>kDa</b>	Kilo Dalton
<b>LB</b>	Luria-Bertani
<b>mA</b>	Miliamperes
<b>min</b>	Minutos
<b>mL</b>	Mililitro
<b>mM</b>	Milimolar
<b>MW</b>	Molecular Weight (Peso molecular)
<b>ng</b>	Nanogramo
<b>nM</b>	Nanomolar
<b>NS</b>	No estructural (no structural)
<b>OD</b>	Densidad óptica
<b>ORI</b>	Origen de replicación
<b>Pb</b>	Pares de bases
<b>prM</b>	(proteína) premembrana
<b>pH</b>	Potencial de hidrógeno
<b>PVDF</b>	Polivinilidenofluoruro
<b>PRNT</b>	Plaque Reduction Neutralizing test
<b>RNA(m)</b>	Acido ribonucleico (mensajero)
<b>RPM</b>	Revoluciones por minuto
<b>SDS</b>	Dodecil Sulfato de Sodio
<b>seg</b>	Segundos
<b>WB</b>	Western Blot
<b><math>\mu</math>g</b>	Microgramo
<b><math>\mu</math>l</b>	Microlitro

# I. INTRODUCCIÓN

---

En recientes años el estudio del virus del dengue (DENV) se ha incrementado debido al aumento en la incidencia y su creciente distribución geográfica convirtiéndose en una enfermedad emergente importante.

Dichos estudios, se centran en la producción de una vacuna efectiva y en mejorar los actuales métodos de diagnóstico.

Entre las proteínas que el virus expresa, la proteína de envoltura (E) es el principal antígeno en el hospedero siendo así, pieza importante de estudio en el área de prevención y diagnóstico.

Debido a la versatilidad de la proteína E en este campo, es importante diseñar un sistema de expresión de proteínas recombinantes de dicha proteína que preserve su actividad inmunogénica para su posterior estudio y uso.

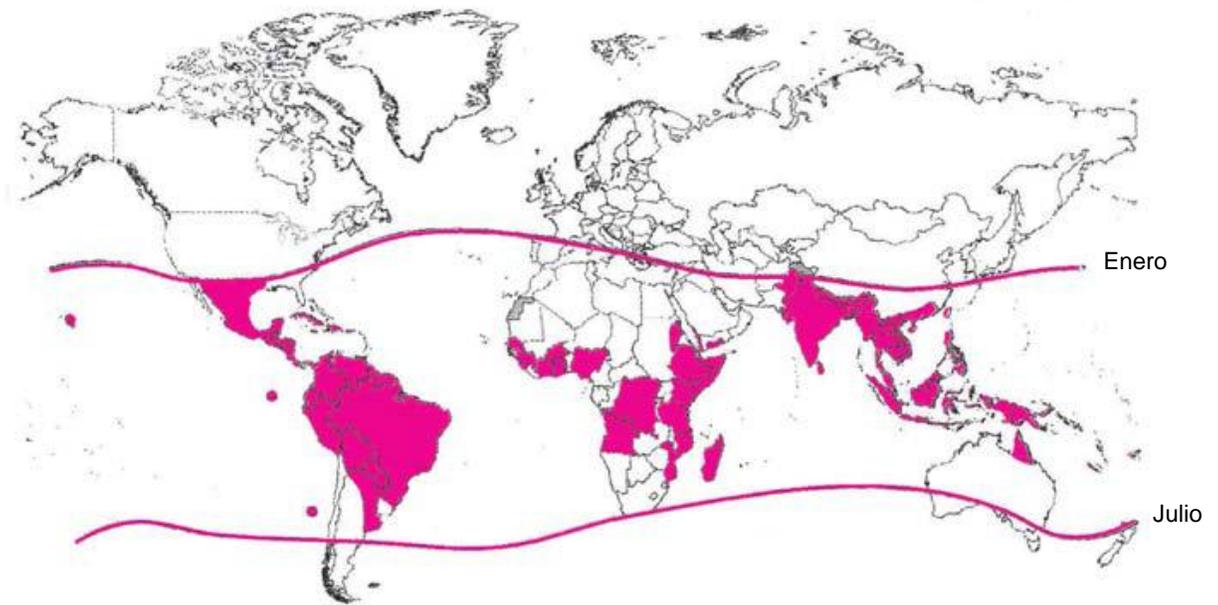
## 2. Antecedentes

---

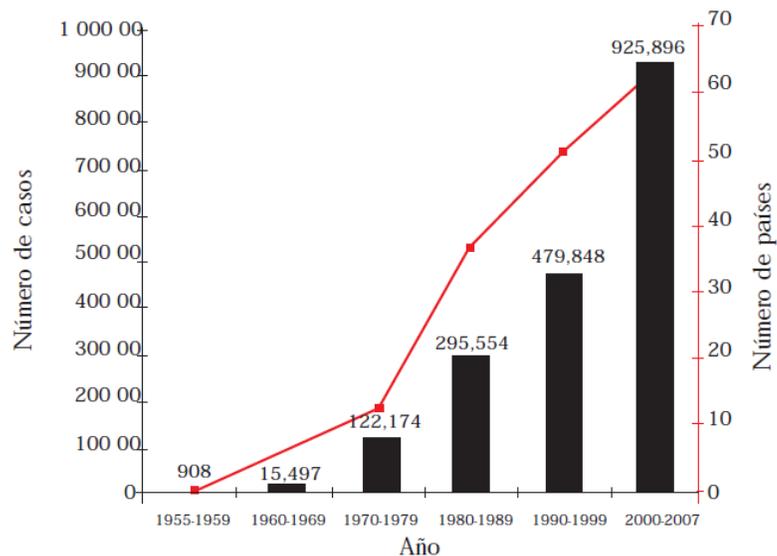
El virus del Dengue (DENV) miembro de la familia flaviviridae, es la principal causa de enfermedades virales transmitidas por mosquito en regiones tropicales y subtropicales en el mundo. Es un arbovirus transmitido por vectores artrópodos de los cuales, los mosquitos *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus* son los principales (Azevedo *et al.* 2011; De Paula & Fonseca 2004).

Se han identificado 4 serotipos del virus del dengue (DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4). Infecciones con DENV pueden pasar asintomáticas o se manifiestan mediante las enfermedades llamadas fiebre del dengue o síndrome de shock por dengue, el cual, es una presentación más severa de la enfermedad que suele poner en peligro al paciente (Lin *et al.* 2012; Lai *et al.* 2008).

Anualmente, ocurre un estimado de 50 millones de infecciones por dengue y, aproximadamente 2,500 millones de personas viven en países con dengue endémico (Laoprasopwattana *et al.* 2007). Figura 1-2.



**Figura 1. Distribución geográfica DENV.** Las líneas de contorno de los isotermos de enero y julio indican los posibles límites geográficos de los hemisferios norte y sur para la supervivencia durante todo el año del mosquito *Aedes aegypti*. Modificado de Dengue Guías para el diagnóstico, tratamiento, prevención y control; OMS, 2009.

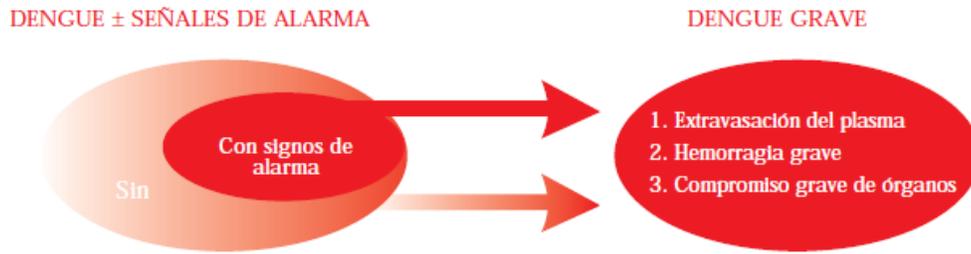


**Figura 2. Incremento de casos.** Número promedio anual de casos de fiebre (FD) y fiebre hemorrágica por dengue (FHD) reportados a la OMS, 1955-2007. Dengue; Guías para el diagnóstico, tratamiento, prevención y control, OMS, 2009.

## 2.1. Clasificación de los casos de dengue

El dengue tiene un amplio espectro de presentaciones clínicas, a menudo con evolución clínica y resultados impredecibles. Aunque la mayoría de los pacientes se recuperan después de un curso clínico benigno y de resolución espontánea, una pequeña proporción progresa hacia una enfermedad grave, caracterizada principalmente por aumento de la permeabilidad vascular, con hemorragia o sin ella (Guidelines for treatment of dengue fever. New Delhi. 1999). La rehidratación intravenosa es el tratamiento de elección y; esta intervención puede reducir la tasa de letalidad a menos de 1% en los casos graves. Resulta difícil determinar cuál grupo de pacientes progresa de la forma no grave a la grave de la enfermedad lo que genera un riesgo sanitario pues el tratamiento apropiado puede evitar que desarrollen condiciones clínicas graves (WHO, Department of Child and Adolescent Health and Development. 2005).

La clasificación según la gravedad tiene un gran potencial para su uso práctico por los médicos tratantes, para decidir dónde y cuan intensivamente se debe observar al paciente, para una notificación de casos más acorde con el sistema de vigilancia epidemiológica nacional e internacional, y como una medida final en los ensayos de vacunas y medicamento contra dengue (Dengue: Guías para el diagnóstico, tratamiento, prevención y control, 2009). Figura 3



**Figura 3. Clasificación de casos de dengue sugerida y niveles de gravedad.** Dengue; Guías para el diagnóstico, tratamiento, prevención y control, OMS, 2009.

El complejo del virus del dengue (DENV) consiste de 4 serotipos distintos y de epítomos que se comparten entre los serotipos. Aún con la reactividad cruzada, los anticuerpos sólo previenen reinfecciones con el mismo serotipo (serotipo homólogo) e individuos son susceptibles a una segunda infección con un serotipo diferente (serotipo heterólogo). Personas que experimentan una segunda infección por dengue con un serotipo nuevo corren un riesgo mucho mayor de desarrollar DHF, lo que sugiere que la inmunidad preexistente puede exacerbar la enfermedad (Sangkawibha N. et. al. 1984).

La potenciación mediada por anticuerpos (ADE. Antibody dependant enhancement) es actualmente la teoría más aceptada que explica el mayor riesgo de padecer dengue grave cuando se cursa con una infección secundaria con un serotipo distinto. (Lai *et al.* 2008).

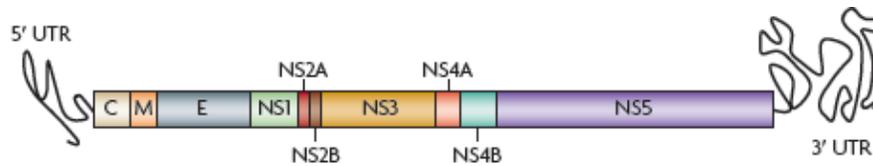
## 2. 2. Estructura viral

El dengue es un virus de RNA de polaridad positiva, y posee un genoma de 10.6 kb con un único marco de lectura abierto que codifica para 3 proteínas estructurales: cápside (C), membrana (M) y envoltura (E) (Ma *et al.* 2004; Modis *et al.* 2005).

Múltiples copias de proteína C (11 kDa) encapsulan el genoma de RNA para formar la nucleocápside viral. La nucleocápside está rodeada por una bicapa lipídica derivada de la célula hospedera en la cual, 180 copias de M y E se anclan. La proteína M es pequeña (aprox. 8 kDa) y, es un fragmento proteolítico de prM (premembrana, 21 kDa), su precursor (Rodenhuis-Zybert *et al.* 2010).

La proteína E es el antígeno primario altamente conservado entre los diferentes serotipos de DENV (Crill *et al.* 2009) y se le atribuyen diversas propiedades biológicas importantes: media la unión a receptores celulares, lleva a la fusión de las membranas celulares y virales durante la entrada viral a la célula, promueve hemaglutinación de eritrocitos y, es el principal blanco de anticuerpos neutralizantes (Guzman *et al.* 2010).

El análisis estructural del virión maduro revela que el virus posee una organización icosaédrica y una nucleocápside esférica. A su vez, expresa 7 proteínas no estructurales: NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5 (Rodenhuis-Zybert *et al.* 2010; Modis *et al.* 2003). Figura 4.

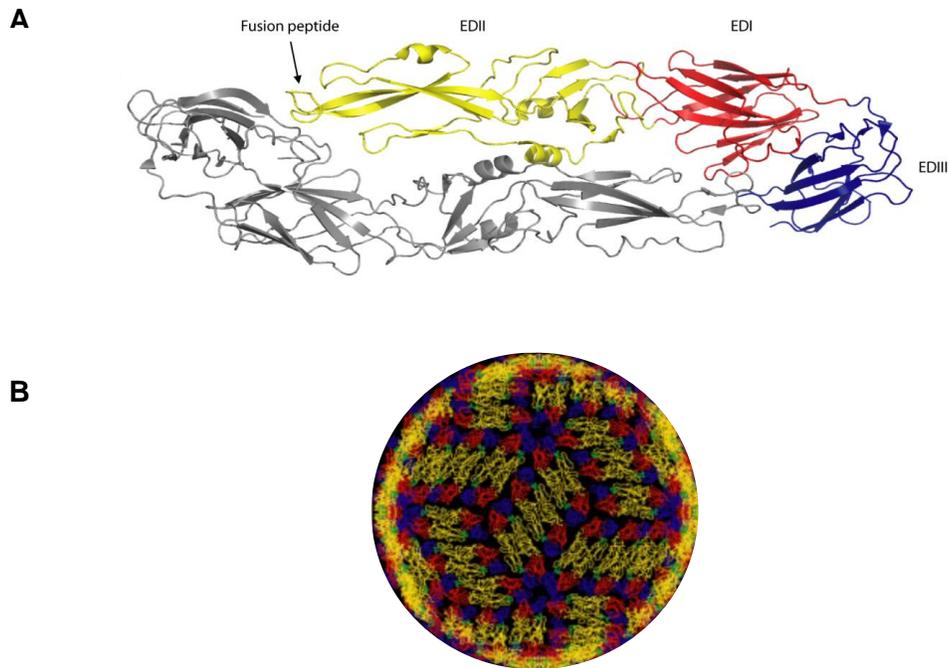


**Figura 4. Genoma del virus del dengue.** Marco de lectura único para tres proteínas estructurales y siete no estructurales. Guzmán *et al.*, 2010.

### 2.3. Proteína E

Las subunidades individuales de la proteína E consisten de 3 dominios barril beta denominados dominios I (EDI), II (EDII) y III (EDIII), con la proteína nativa formando 90 homodímeros, de "cabeza a cola" en la superficie de un virión maduro. El péptido hidrofóbico de fusión viral se encuentra en la punta del dominio II y se encuentra cubierto por el dominio III de una subunidad subyacente (Roehrig, J.T. 2003).

El Dominio III aparenta ser el responsable de la unión de los receptores celulares pues muchas mutaciones que afectan el receptor de unión se localizan en este dominio (Wahala & Silva 2011; Lin *et al.* 2012). La proteína de envoltura presenta 70% de homología entre los 4 serotipos (Midgley *et al.* 2011). Figura 5.



**Figura 5. Estructura de la envoltura del virus del Dengue . A.** Estructura de la proteína de envoltura del virus del dengue. **B.** La proteína E en un virión maduro es un homodímero y cada subunidad tiene 3 dominios siendo dominio I (rojo), II (amarillo) y III (azul).(Wahala & Silva 2011)

Después de ingresar a la célula y dentro de endosomas, la reducción de pH en estos induce un cambio conformacional en la proteína E que lleva a la fusión de la membrana viral con la membrana interna endosomal. Este proceso permitirá liberar el material genético viral al medio intracelular. Una vez desenvuelto se lleva a cabo la traducción y replicación del RNA uniéndose a la membrana del retículo endoplásmico rugoso, en donde nuevos viriones jóvenes se transportan a través del retículo hacia la vía secretoria. En la cisterna trans de Golgi, los viriones maduros se producen después de que la proteína prM se corta por proteasas tipo furina (Lin *et al.* 2012).

## 2.4. Inmunogenicidad

La mayoría de los estudios para entender cómo es que los anticuerpos neutralizan o potencian el DENV se han realizado con anticuerpos monoclonales de ratón. Siendo la proteína E el antígeno principal, se ha identificado actividad neutralizante en los 3 dominios, el dominio con mayor cantidad de epítomos serotipo específicos es el dominio III y existen aproximadamente 180 sitios de reconocimiento de anticuerpo (Wahala & Silva 2011).

### 2.4.1. Antígenos/epítomos reconocidos por anticuerpos humanos.

Después de la infección por DENV las personas desarrollan anticuerpos en suero contra proteínas estructurales así como algunas no estructurales. En la actualidad, muchos estudios están orientados en entender la respuesta inmune contra la proteína E (Valdés *et al.* 2000; Wahala & Silva 2011).

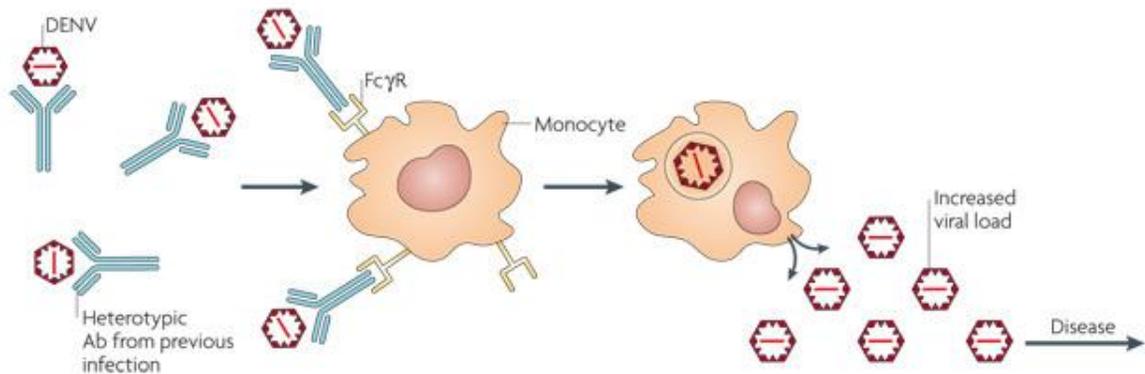
Como se ha mencionado anteriormente, trabajos en ratones sugieren que el dominio III contiene la mayor cantidad de epítomos serotipo específicos, aunque la presencia de anticuerpos anti-dominio III son bajos en suero (Crill *et al.* 2009) y no juegan un papel fundamental en la neutralización de las partículas virales (Wahala & Silva 2011). En un trabajo de Azevedo y colaboradores se comparó la inmunogenicidad del dominio III con la proteína E completa expresada *in vivo* demostrando que el nivel de anticuerpos del dominio III es significativamente menor que E completa, esto por el hecho que dominio I y II por si mismos

presentan epítomos que ayudan a generar una respuesta humoral y por tanto, mayores niveles de anticuerpos neutralizantes (Azevedo *et al.* 2011).

#### *2.4.2. Potenciación mediada por anticuerpos (ADE)*

El genoma del virus del Dengue presenta una variación entre serotipos de un 30-35% en los genomas de los virus, esto subdivide al dengue en 4 serotipos distintos. La infección con un serotipo no confiere protección a otros serotipos, y se observa comúnmente infecciones secuenciales o secundarias. Las complicaciones serias tales como fiebre hemorrágica del dengue (DHF) es más probable que ocurran en una infección secundaria (Dejnirattisai *et al.* 2010).

Los anticuerpos generados contra la infección primaria de DENV podrían no ser suficientemente ávidos para neutralizar el segundo serotipo. En vez de neutralizar, estos anticuerpos de baja avidéz se unen al virus secundario y facilitan la infección de las células que porten el receptor de la región Fc $\gamma$ , tales como macrófagos y monocitos, llevando a la internalización y aumento de la replicación del virus (Goncalvez *et al.* 2007; Midgley *et al.* 2011; Dejnirattisai *et al.* 2010). Figura 6.



**Figura 6. Modelo de ADE de infección con dengue.** El efecto ADE ocurre con anticuerpos preexistentes presentes en el cuerpo de una infección primaria con dengue de un serotipo distinto. Los anticuerpos no pueden neutralizar los virus. Los complejos Ab-virus se unen a receptores Fcγ de monocitos circulantes. Los anticuerpos ayudan infectar a los monocitos más eficientemente llevando al aumento de la replicación viral y por tanto, un mayor riesgo de dengue severo. (Whitehead, S.S. *et al.* Prospects for a dengue virus vaccine. 2008).

## 2.5. Estrategia

Actualmente no hay una vacuna para prevenir la enfermedad o algún fármaco para tratar la infección por dengue, la cual es un problema de salud pública que amenaza cerca de la mitad de la población global (Batra *et al.* 2011).

Se han propuesto muchas estrategias para producir vacunas para controlar la enfermedad, incluyendo métodos clásicos, como virus vivos atenuados o inactivados o subunidades antigénicas así como nuevas generaciones de vacunas, como virus quiméricos o inmunización con DNA (Azevedo *et al.* 2011).

El desarrollo de una vacuna tetravalente se ha convertido en una prioridad mundial pero debido a la compleja patología, la necesidad de inactivar 4 serotipos de manera simultánea, el poco entendimiento del mecanismo involucrado en una

respuesta inmunológica que prevenga de manera eficiente las infecciones por DENV y la falta de inversión, ha prolongado el progreso.

Aún con el progreso actual, candidatos de vacunas y otros flavivirus, se estima una vacuna disponible en aproximadamente 10 años. (Guzman *et al.* 2010; Tang & Ooi 2012)

En este escenario, la disponibilidad de herramientas diagnósticas asume una gran importancia para la administración clínica, estadística, investigación epidemiológica y de brotes, pero debido a las similitudes antigénicas y la tendencia a co-circular en misma zona endémica la necesidad de eliminar el problema de la reactividad cruzada ha aumentado (Azevedo *et al.* 2011).

## **2.6. Diagnóstico de DENV**

El diagnóstico temprano de infecciones por DENV sigue siendo un reto. El dengue se presenta inicialmente como fiebre indiferenciada y se agrava en algunos casos solamente en etapas más tardías de la enfermedad. Esto limita el lapso de una intervención médica apropiada. Las pruebas de laboratorio son útiles pero el estado de viremia corto y la presencia de posibles infecciones secundarias complican la elección e interpretación de la prueba de laboratorio.

El diagnóstico comienza con sospecha clínica seguido por reconocimiento de signos y síntomas. En la fase febril temprana, los pacientes con dengue generalmente presentan inicio repentino de fiebre, acompañado de náusea,

malestares y dolores, desafortunadamente estos no son síntomas únicos para dengue. (Tang & Ooi 2012)

El inicio de un exantema maculopapular, dolor retro-orbital, petequias y/o epistaxis o encías sangrantes, son signos patognomónicos de dengue pero estos aparecen en un estado más tardío cuando la fuga de plasma ocurre (Dengue; Guías para el diagnóstico, tratamiento, prevención y control, OMS, 2009; Tang & Ooi 2012).

Las pruebas de laboratorio son esenciales para el diagnóstico de la infección aguda por DENV para proveer de las condiciones clínicas necesarias, tratamiento adecuado y manejo del paciente de manera oportuna y eficiente.

Las características de la prueba ideal se definen como: (1) Pagable por aquellos en riesgo por la infección; (2) Sensible (pocos falsos negativos), (3) Específico (pocos falsos positivos); (4) Amigable al usuario (requiere poca o ninguna preparación para su uso); (5) Rápida (para proveer tratamiento desde la primera visita); (6) Sin necesidad de equipo especial; (7) Entregado a quien lo necesita (Blacksell 2012).

## 2.7. Diagnóstico de laboratorio

### 2.7.1. Aislamiento del virus

La viremia con dengue puede detectarse de 2 a 3 días antes del inicio de la fiebre y hasta 5 y 4 días después del inicio de la enfermedad para infección primaria y secundaria respectivamente (Vaughn *et al.* 2000), durante este periodo, sangre, suero o plasma pueden usarse para aislamiento.

La inoculación en mosquitos *Aedes aegypty*, *Aedes albopictus* y *Toxorhynchites splendens* ha sido el método más sensible. (Kouri 1996). La inoculación de suero o plasma en cerebro de ratón de 2 a 4 días de edad también se ha empleado para aislar y amplificar DENV (Huang *et al.* 2000). Sin embargo, ninguna es una técnica de rutina por la especialización técnica que exige, así como los requerimientos materiales.

La ampliación viral en líneas celulares se emplea más, generalmente en células C6/36 (la cual se deriva de *A. albopictus*), así como en células Vero, LLC-MK2 o BHK-21. (Jarman *et al.* 2011). Aparte del diagnóstico, el aislamiento viral ofrece la ventaja de proveer el virus aislado, para así ser caracterizado en estudios in vitro subsecuentes.

El aislamiento del virus es altamente específico y teóricamente con un límite de detección de un solo virus, sin embargo en la práctica, la sensibilidad es solo de aproximadamente 40.5% en líneas celulares (Kb *et al.* 2011), además de requerir operadores capacitados y depender de la integridad de la muestra y del breve

periodo de viremia, por tanto, no es usado como rutina en laboratorios de diagnóstico. (Tang & Ooi 2012)

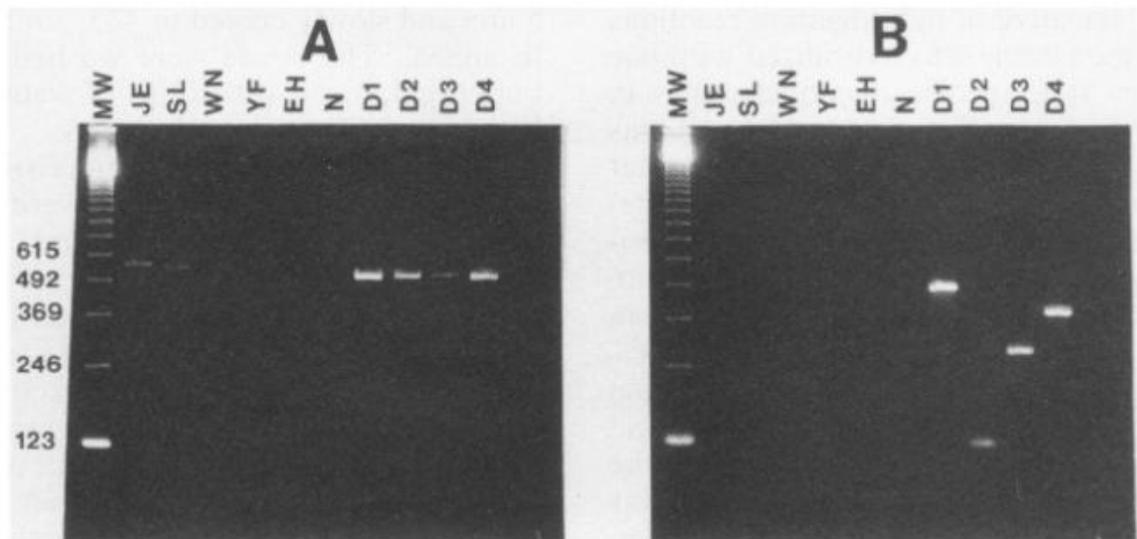
### 2.7.2. Detección de antígeno

La proteína NS1 es una glicoproteína altamente conservada esencial para la viabilidad del virus y es secretada como un hexámero soluble a partir de células infectadas.

Se ha correlacionado el título de NS1 en suero o plasma con la severidad de la enfermedad y puede encontrarse en sangre periférica hasta 9 días después del inicio de la enfermedad (Libraty *et al.* 2002; Young *et al.* 2000). Actualmente existen estuches de ELISA comerciales para la detección de NS1 con sensibilidad de 54.2 a 93.4%, mostrando altas concentraciones en suero en la fase clínica temprana de la enfermedad (Dussart *et al.* 2006; Young *et al.* 2000). Sin embargo, la detección de NS1 es menos sensible en infección secundaria (67.1-77.3%) comparado a infección primaria (94.7-98.3%), probablemente por presencia de anticuerpos anti-NS1 ya existentes que impidan la detección (Kumarasamy *et al.* 2007). Sin embargo, la sensibilidad de las pruebas pueden diferir puesto que la magnitud de secreción de NS1 parece ser cepa dependiente (Watanabe *et al.* 2012).

### 2.7.3. Detección de RNA viral

La detección de RNA de DENV por PCR retro transcriptasa (RT-PCR) extraído de sangre, suero o plasma provee de un método rápido, específico y sensible para la confirmación de infección por dengue. Existen protocolos en RT-PCR y real-time RT-PCR, ya sea usando SYBR® green o sondas. El genoma viral sufre de continuas mutaciones durante la replicación viral con el tiempo, confiriendo adaptabilidad e inespecificidad antigénica, sin embargo los oligonucleótidos reconocen secuencias altamente conservadas en la evolución para evitar falsos negativos (Lanciotti *et al.* 1992). Figura 7.



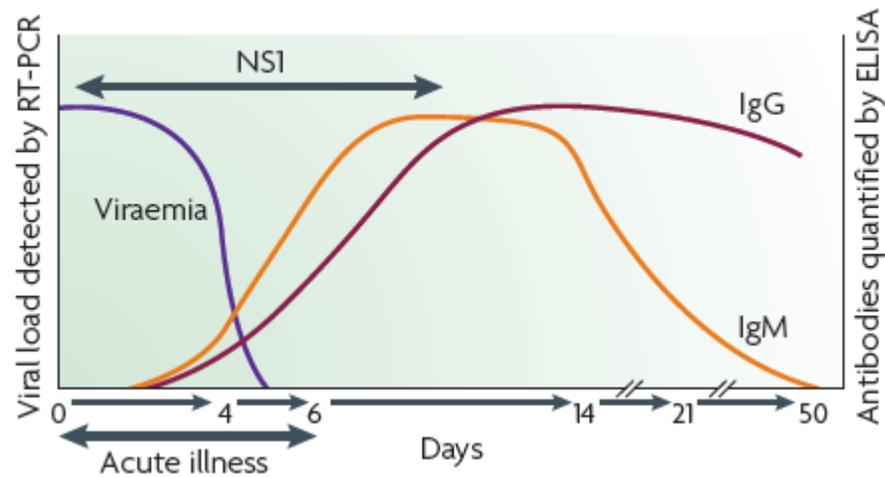
**Figura 7. Diagnóstico molecular.** Análisis en gel de agarosa de producto de RT-PCR. A) amplificación con primers D1 y D2. B) Usando primers específicos para cada serotipo. Se muestra amplificación de virus: JE, encefalitis japonesa, SL. Encefalitis de San Luis, WN. Virus del oeste del Nilo, YF, fiebre amarilla, EH, Edge Hill; N, Encefalitis equina (Lanciotti *et al.* 1992).

#### 2.7.4. Detección de anticuerpos (IgM e IgG)

La detección de anticuerpos antidengue (IgM e IgG) es la prueba de diagnóstico más comúnmente usada a nivel mundial debido a su alta sensibilidad y fácil uso. Estas pruebas capturan o detectan la Ig y pueden detectar ambas inmunoglobulinas juntas o separadas (De Paula & Fonseca 2004). Se analiza el suero del paciente mediante el ensayo de ELISA o tira reactiva (prueba rápida). Mientras que la ELISA provee de gran sensibilidad, la tira es más práctica y rápida (Groen *et al.* 2000).

La respuesta antidengue con IgM puede detectarse desde 3-5 días de inicio de la enfermedad. Niveles de IgM siguen aumentando hasta 2 semanas y pueden persistir por aproximadamente 179 y 139 días después de la infección primaria y secundaria respectivamente (Blacksell 2012; Prince & Matud 2011).

En una infección primaria, IgG sólo puede ser detectada 10 días después del inicio de la enfermedad. Sin embargo, el rápido incremento de los niveles de IgG revela que durante la infección secundaria, incluso desde el cuarto día de infección, puede ser sugestivo de dengue si se aplica una proporción de IgM e IgG (Prince & Matud 2011). Figura 8.



**Figura 8. Antígenos y respuesta de anticuerpos usados para diagnóstico.** (Guzman *et al.* 2010)

### 2.7.5. Detección de anticuerpos neutralizantes

Los anticuerpos neutralizantes inhiben la infección con DENV por tanto proveen de una mayor especificidad en distinguir anticuerpos para DENV así como una reacción cruzada contra otros flavivirus. Los anticuerpos pueden medirse usando la prueba de reducción de placa por neutralización (PRNT. Plaque reduction neutralizing tests), primero desarrollado por Russell y colaboradores basado en el protocolo de Dulbecco. A la fecha, la PRNT se mantiene como el ensayo más ampliamente usado de estudios de inmunidad. Sin embargo, la intensa labor que requiere, tiempo y bajo rendimiento mantienen esta prueba fuera de la rutina con fines de diagnóstico (Tang & Ooi 2012).

## 2.8. Perspectiva

Como se ha mencionado anteriormente, existe evidencia experimental acerca de que la proteína de envoltura es altamente inmunogénica y por tanto induce la producción de anticuerpos. Se conoce que el dominio III de la proteína E contiene la mayor cantidad de epítomos serotipo específicos (Crill *et al.* 2009) pero se ha demostrado que existen epítomos serotipo específico en los 3 dominios (Lin *et al.* 2012) y que la producción de anticuerpos suele ser insuficiente tratándose de únicamente el dominio III (Azevedo *et al.* 2011). Sin embargo, hasta la fecha, los estudios de inmunización se centran en el potencial uso de únicamente el dominio III como inductor de anticuerpos (Tan *et al.* 2010; Azevedo *et al.* 2011; Batra *et al.* 2011). En los ensayos de inmunización o diagnóstico se emplean virus inactivados o proteínas de envoltura recombinantes (Batra *et al.* 2011).

## 2.9. Expresión de proteínas recombinantes

Recientes avances en genómica, proteómica y bioinformática han facilitado el uso de la tecnología del DNA recombinante para evaluar cualquier proteína de interés sin conocimiento previo de la función o localización de la proteína (Young *et al.* 2012). Las proteínas juegan un papel importante en señalización celular, respuesta inmune, adhesión celular y ciclo celular (Demain & Vaishnav 2009). Sin embargo, la insolubilidad proteica, conformación, estabilidad y flexibilidad estructural así como bajo rendimiento de purificación y toxicidad en la célula hospedera son desafíos que aún están presentes (Young *et al.* 2012).

### *2.9.1. Sistemas para producir proteínas recombinantes*

Las proteínas juegan un papel fundamental en señalización, respuesta inmune, adhesión celular, ciclo celular, por mencionar algunas. Estas son comercialmente producidas en industrias con la ayuda de ingeniería genética y protéica. Proteínas nativas y recombinantes benefician sectores de la industria biofarmacéutica, de enzimas y en la agricultura. La primera proteína biofarmacéutica creada fue la insulina en 1922 por Banting y Best y para el 2002 alrededor de 155 fármacos y vacunas se han desarrollado y aprobado. Actualmente, más de 200 péptidos se han aprobado por la FDA. Algunos de estos biofármacos son la insulina humana, la albúmina, hormona de crecimiento humana, factor VIII de la coagulación y muchas más (Demain & Vaishnav 2009).

El primer paso para la producción de proteínas es obtener el DNA deseado clonado: entonces la proteína es producida en un sistema de expresión de elección. Las proteínas pueden expresarse en cultivos de bacterias, levaduras, mohos, mamíferos, plantas o insectos o por plantas o animales transgénicos. La calidad de la proteína, funcionalidad, velocidad de producción y rendimiento son los factores más importantes a considerar cuando se escoge el sistema de expresión correcto para la producción de la proteína recombinante (Demain & Vaishnav 2009).

### 2.9.2. *E. coli*

*E. coli* es de los hospederos más ampliamente usados para producción de proteínas heterólogas (Terpe 2006). Las ventajas incluyen rápido crecimiento, rápida expresión, fácil de cultivar y alto rendimiento (Swartz 2001). Este sistema es excelente para la expresión funcional de proteínas no glucosiladas además de que la genética de *E. coli* es mejor entendida que la mayoría de otros microorganismos junto con la disponibilidad de herramientas genéticas que permite cambiar el genoma con facilidad, tales como, control de promotor o número de copias de plásmido.

Este sistema tiene unas desventajas. La alta densidad celular resulta en toxicidad debido a la formación de acetato y excretado al medio, el cual retrasa el crecimiento (Nakano, K., et. al. 1997) e inhibe formación protéica (Jensen, E.B. & Carlsen, S. 1990). Proteínas que se producen como cuerpos de inclusión son generalmente inactivas, insolubles y requieren replegarse; proteínas con numerosos puentes disulfuro son muy difíciles de expresar (Demain & Vaishnav 2009). Algunos anticuerpos producidos en *E. coli* no reconocen proteínas de mamíferos por la falta de la glucosilación (Jenkins & Curling, 1994). Tabla 1.

<b>Ventajas</b>	<b>Desventajas</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>-Rápida expresión</li> <li>-Alto rendimiento</li> <li>-Fácil de cultivar y modificaciones del genoma</li> <li>-Económico</li> <li>-Producción en masa rápida y de bajo costo</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Proteínas con enlaces disulfuro son difíciles de expresar</li> <li>-Produce proteínas no glucosiladas</li> <li>-Proteínas producidas con endotoxinas</li> <li>-Formación de acetato que lleva a toxicidad celular</li> <li>-Proteínas producidas se expresan como cuerpos de inclusión, son inactivas y requieren replegarse.</li> </ul>

**Tabla 1.** Características de los sistemas de expresión *E. coli*. (Demain & Vaishnav 2009)

Para mejorar el proceso, se han tomado las siguientes medidas: (1) usar diferentes promotores para regular la expresión, (2) usar diferente cepa, (3) coexpresión de chaperonas, (4) bajar temperatura, (5) secreción de proteínas en medio y/o periplasma, (6) reducir el periodo de síntesis, (7) cambiar medio de cultivo, (8) adicionar una proteína de fusión, (9) expresar un fragmento de la proteína, (10) desnaturalización in vitro y replegar (Swartz 2001; Choi & Lee 2004; Mergulhão *et al.* 2005; Wong *et al.* 2008; Maldonado *et al.* 2007). Problemas y soluciones de expresión en *E. coli* mostradas en Tabla 2.

<b>Síntoma</b>	<b>Posible problema</b>	<b>Soluciones</b>
Muerte celular o sin colonias	Proteína tóxica, expresión basal alta	Promotor fuertemente controlado Bajar temperatura Promotor más débil Reducir cantidad de inductor
Proteína insoluble (cuerpos de inclusión)	Demasiada expresión	Atenuar expresión por: promotor más débil, bajar temperatura, bajar concentración de inductor, reducir número de copias del plásmido.
No tiene actividad	Proteína mal plegada, etiqueta de afinidad puede reducir actividad	Minimizar reducción en citoplasma, acumulación en periplasma, atenuar expresión
Sin producir proteína o proteína truncada	Uso de codones por <i>E. coli</i>	Promotores más fuertes, aumentar copias del plásmido, bajar temperatura, promotor firmemente controlado.

**Tabla 2.** Algunos problemas de usar *E. coli* como sistema de expresión y posible solución. Otro hospedero puede también resolver el problema. (Demain & Vaishnav 2009)

### 2.9.3. Células de mamífero

Los sistemas de expresión de mamífero son frecuentemente usados en proteínas que requieren modificaciones postraduccionales de mamífero. Las células de mamífero son particularmente útiles por que las proteínas frecuentemente son producidas con el plegamiento y glucosilación apropiado, por lo tanto, se elimina la necesidad de renaturalizarlas. Las células tienen una productividad de 20-60 pg/célula/día (Datar RV. 1993).

Las células de mamíferos han mostrado ciertas desventajas como sistema de expresión: (1) secreción pobre. (2) procesos caros. Los precios por gramo de proteínas recombinantes fueron (en dólares americanos) \$375 para insulina humana, \$23,000 para tPA, \$35,000 para hormona de crecimiento humana,

\$384,000 para GM-CSF, \$450,000 para G-CSF y \$840,000 para EPO. Todas excepto insulina fueron producidas en cultivos de células de mamífero. (3) Cultivos celulares corren un riesgo potencial de contaminación con virus (Bisbee CA. 1993).

## 2.10. Antecedentes directos

Existen grupos de trabajo que coinciden en la idea de la potencial utilidad de la proteína de envoltura como un intermediario de diagnóstico con alta especificidad.

Batra y colaboradores consideran que el problema tiene un trasfondo mayor al existir reactividad cruzada con otros flavivirus y que pueden co-circular en la misma zona endémica. Los estuches comerciales identifican la infección pero no discrimina todos los flavivirus. Los esfuerzos para eliminar el problema se enfocan en el dominio III pues contiene epítomos serotipo específico y únicamente del complejo DENV por lo que ven necesario construir una quimera que utilice los 4 serotipos de DENV para detectar anticuerpos anti-DENV (Simmons *et al.* 1998). En el estudio, los investigadores expresaron en bacterias *E. coli* BL21 (DE3) las proteínas recombinantes, tanto la quimera con los 4 serotipos así como cada dominio monovalente. Las proteínas actuaron como antígeno en una prueba de ELISA contra anticuerpos de sueros de pacientes que revela una sensibilidad y especificidad comparable entre las proteínas expresadas. (Batra *et al.* 2010; Batra *et al.* 2011).

Amorim y colaboradores expresaron de manera heteróloga la proteína NS1. Aunque la función de esta proteína no está del todo dilucidada, también presenta alta inmunogenicidad, similar a la proteína E, por lo que es de utilidad para diagnóstico (Chaiyaratana *et al.* 2009). La expresión de la proteína NS1 en procariontes resulta inadecuada debido a que es insoluble y la carencia de modificaciones postraduccionales conlleva una estructura secundaria con alteraciones que reduce la inmunogenicidad y antigenicidad (Das *et al.* 2009). En el estudio describen la expresión en una variante de *E. coli* BL21 (DE3), llamada BL21 (DE3) RIL, de la proteína NS1 y procesos posteriores para solubilizar la proteína estable preservando sus características estructurales e inmunogénicas. (Amorim *et al.* 2010).

Azevedo y colaboradores describen la producción de la proteína E *in vitro* (células BHK-21) e *in vivo* (ratones Balb/c), con vacunas de DNA. Compararon la actividad inmunogénica de la proteína E completa con el dominio III. Para el caso de la expresión *in vitro*, las proteínas fueron reconocidas por anticuerpos policlonales así como monoclonales.

La expresión e inmunogenicidad de la proteína E recombinante se evaluó *in vivo* vacunando ratones Balb/c demostrando inducción de anticuerpos neutralizantes, sin embargo, observaron que la vacuna designada a expresar únicamente el dominio III tuvo títulos de anticuerpos significativamente menores en comparación a la vacuna que expresa la proteína completa, esto debido a que el dominio I y II presentan epítomos por si mismos (Azevedo *et al.* 2011).

## 2.11. Justificación

---

La proteína de envoltura (E) del virus del dengue (DENV) es actualmente de gran importancia en la investigación biomédica, debido al papel que presenta en el proceso de infección, sus características antigénicas y por esta razón una proteína con una potencial aplicación en diagnóstico y producción de vacunas.

La proteína E es el principal inductor de anticuerpos, pero grupos de investigación en la actualidad se han enfocado únicamente en la producción del dominio III, éste siendo el dominio con la mayor cantidad de epítomos serotipo específico. Sin embargo, se ha demostrado que la respuesta inmune correspondiente únicamente al dominio III es pobre, comparada con la proteína completa y existen epítomos serotipo específico en todos los dominios.

Los casos de dengue grave suelen asociarse con una reinfección con un DENV de un serotipo distinto y la primera señal de alarma es, en condiciones normales, sintomática al no existir un diagnóstico diferencial rápido, sencillo y barato; cabe mencionar que el cuadro severo de dengue es tratable e incluso prevenible con un diagnóstico oportuno que dirija la intervención médica apropiada.

La tecnología de las proteínas recombinantes es prometedora en el diagnóstico clínico diferencial al ser aplicable en la producción de una proteína de envoltura completa que conserve sus características inmunogénicas y permita diferenciar entre serotipos.

## 2.12. Objetivo general

---

Generar un sistema de expresión heterólogo de proteína recombinante de envoltura de DENV1.

## 2.13. Objetivos específicos

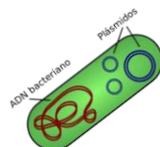
---

1.- Modificar la secuencia nucleotídica nativa de la proteína de envoltura del DENV1 para optimizar su expresión en sistemas de expresión heterólogo y subclonar en un vector de expresión que permita la producción inducible, estable, escalable y reproducible de la proteína en cuestión.

2.- Evaluar la eficiencia de los sistemas de expresión resultantes al reproducir las condiciones óptimas de inducción y evaluar la misma mediante purificación por cromatografía de afinidad.

# 3. Material y métodos

## 3.1. Estrategia general



## 3.2. Material

### 3.2.1. Material biológico

Se emplearon bacterias *Escherichia coli* cepa DH5 $\alpha$  para aumentar número de copias de los plásmidos y como sistema de expresión constitutivo, BL21 (DE3) y BLR(DE3) como sistema de expresión inducible y cepas M15 y SG13009 para el plásmido control. Tabla 3.

<b>Sistemas de expresión</b>	<b>Características</b>
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	Carece de RecA y de LacIQ, lo cual nos da un sistema de expresión constitutivo y estable con vectores con promotor Lac.
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	Carece de proteasas ompT y Lon y expresa LacIQ; expresa T7 RNA polimerasa bajo control del promotor LacUV5 pero muestra fuga basal significativa.
<i>E. coli</i> BLR(DE3)	Deriva de BL21 provee de mayor estabilidad al producto.
<i>E. coli</i> M15	Contiene el plásmido pREP4, que expresa el represor LacIQ y confiere resistencia a kanamicina.
<i>E. coli</i> SG13009	Contiene el plásmido pREP4, que expresa el represor LacIQ y confiere resistencia a kanamicina.

**Tabla 3.** Cepas de *E.coli* con sus características genotípicas.

Los plásmidos empleados en este trabajo fueron pBS-SK, pBC-KS, pQE-80L-kan y pQE-40. Estos se trabajaron tanto para subclonación y caracterización con enzimas de restricción: KpnI, EcoRI, EcoRV, HinDIII, BamHI, PstI (New England Biolabs) según corresponda el vector. Las ligaciones se realizaron mediante Ligasa T4 (Quick ligase kit, New England Biolabs).

Para comprobar la presencia de la proteína por western blot se empleó como anticuerpo primario Anti-His tag de ratón (Santa Cruz Biotechnology) y como

anticuerpo secundario Anti-mouse conjugado con peroxidasa de rábano (Jackson Technology).

Los ensayos en *E. coli* requirieron agar y caldo LB para crecimiento, propagación de plásmido, ligaciones e inducciones. Todos los vectores de expresión procarionte emplearon como inductor IPTG (Invitrogen. USA) y los antibióticos de selección empleados fue carbenicilina, kanamicina y cloranfenicol dependiendo el vector.

.

### 3.2.2. Equipo

El equipo de laboratorio empleado incluye micropipetas automáticas, cámaras de electroforesis para poliacrilamida y agarosa con la fuente de poder (Bio rad), los cultivos líquidos fueron trabajados en baño maría con agitador y medios sólidos en incubadora de 37°C. Los ensayos de Western blot se revelaron mediante luminol (Santa Cruz biotechnology) en transiluminador ChemiDoc® XRS+ (Bio rad). Se empleó autoclave para esterilizar medios de cultivo o materiales; el material se almacenó en refrigerador de 4°C, -20°C y ultra refrigerador de -80°C y se contó con herramientas diversas tales como pipetor, centrifuga refrigerada/microcentrifuga.

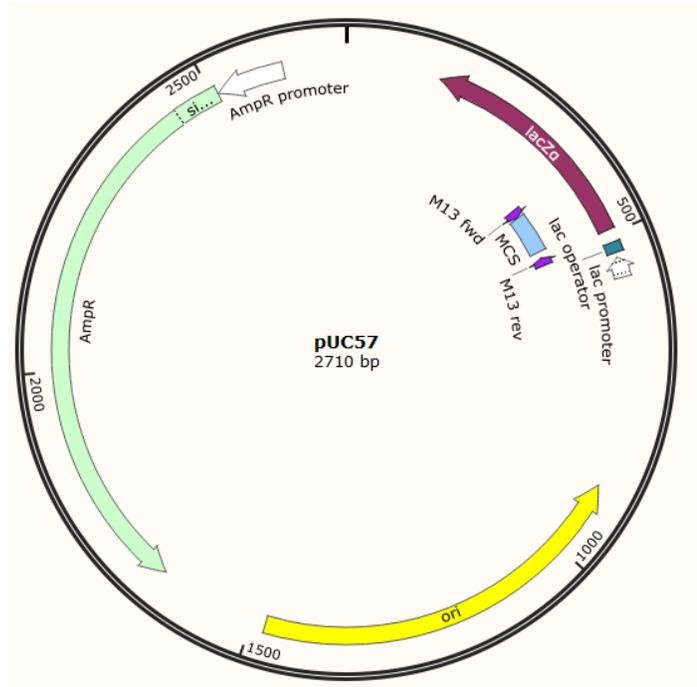
### 3.3. Construcción de los vectores de expresión

#### 3.3.1. Rediseño del gen de envoltura del virus del dengue

La secuencia nucleotídica de la proteína de envoltura del virus del dengue resulta pieza clave en el proyecto. La mayor parte de los esfuerzos para expresar proteínas recombinantes se basan en amplificar secuencias directamente del genoma viral, obtener el cDNA y clonar, sin embargo, los virus del dengue han evolucionado para proliferar en eucariontes, por lo tanto, el sesgo de utilización de codones va hacia ese linaje y esto dificulta su expresión en procariontes. Conociendo esto, la secuencia obtenida del GenBank NC\_001477 para DENV1 y NC\_001478 para DENV2 (NCBI, EUA) se rediseñó in silico.

Partiendo de la secuencia de la proteína E y con el software McVector, primero, se agregaron los sitios de inicio de traducción para procariontes, esto en el extremo 5' con el fin de presentarse en el RNAm y así iniciar la traducción en *E. coli*. Subsecuentemente, se agregó la secuencia de la cola de histidina, requerido para purificarse por su afinidad con el níquel y finalmente se agregaron sitios de restricción para las enzimas KpnI y EcoRV. Mediante el software OptimumGene® Codon optimization analysis (GenScript. Piscataway, New Jersey, Estados Unidos) se optimizó la secuencia para mejorar la estabilidad del RNAm.

La secuencia se sintetizó sobre el vector de clonación pUC57 por el método de fusión de oligonucleótidos (Genscript). Figura 9.



**Figura 9. Estructura de pUC57.** Plásmido de 2.7 kb, en éste trabajo se empleó únicamente para portar el inserto. (imagen de SnapGene Viewer).

### 3.3.2. Construcción de los vectores de expresión.

Para evaluar el sistema más eficiente en que la proteína pudiese ser expresada, se consideraron diversas estrategias, dependientes del vector de expresión empleado. Bajo esta premisa, la secuencia optimizada se subclonó en los plásmidos pBS-SK, pBC-KS y pQE-80L-Kan.

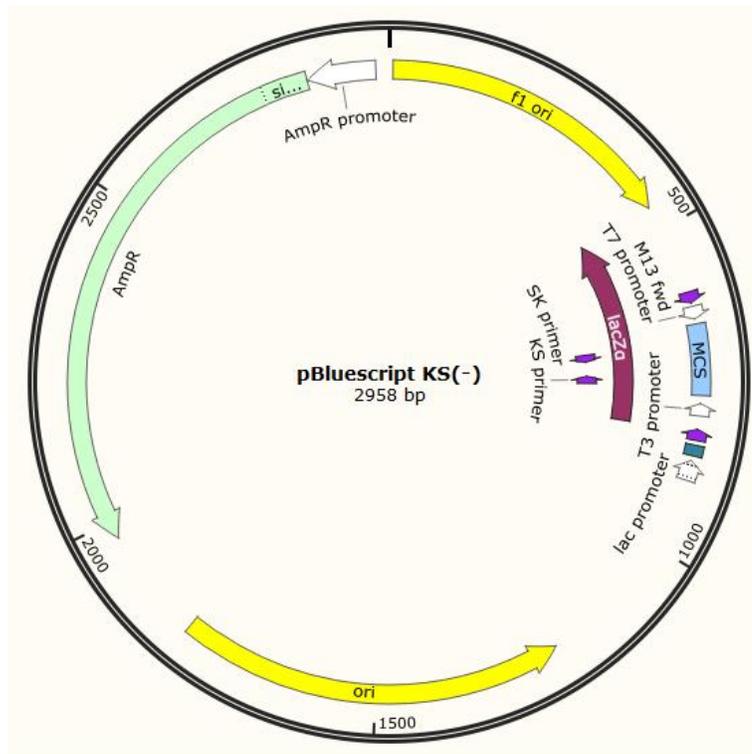
Las cepas BL21(DE3), BLR(DE3), M15 y SG13009 expresan el represor LacIQ, siendo sistemas inducibles, la cepa DH5 $\alpha$  no lo expresa, por lo tanto, produciría la proteína de manera constitutiva. Para todas las bacterias se produjeron células calcio competentes (Anexo 2) y se transformaron mediante el método de choque

térmico, basado en la técnica de Sambrook (Anexo 3). (Sambrook and Russell, Molecular cloning. 2001)

La construcción de cada vector se realiza al obtener la secuencia optimizada del vector de clonación (pUC57) delimitada por diversos y específicos sitios de restricción únicos en la secuencia plasmídica, para cada vector se emplea un par de enzimas de restricción para cortar el sitio 5' y 3', flanqueando la secuencia completa y al mismo tiempo, el vector de expresión vacío se lineariza con las mismas enzimas para así lograr su subsecuente ligación (Anexo 4). Para cada vector, se realizó selección de clonas para ulterior validación por restricción enzimática y secuenciación.

### *3.3.3. Vector constitutivo pBS-KS*

El plásmido pBS-KS (bluescript) posee un sistema multicopia por su origen de replicación pUC, resistencia a la ampicilina para su selección y la orientación KS que se refiere según la proximidad de los sitios de restricción para KpnI y SacI al promotor del operón LacZ, siendo KpnI el más cercano y posteriormente SacI, (el orden del plásmido de clonación pUC57 es KS). Dicho promotor es inducible por IPTG y puede evaluarse la eficiencia de ligación por el ensayo de blanco-azul con X-gal. Este vector se trabajó con la cepa DH5 $\alpha$ , que al carecer del represor LaqIQ expresaría la proteína de manera constitutiva. Figura 10.



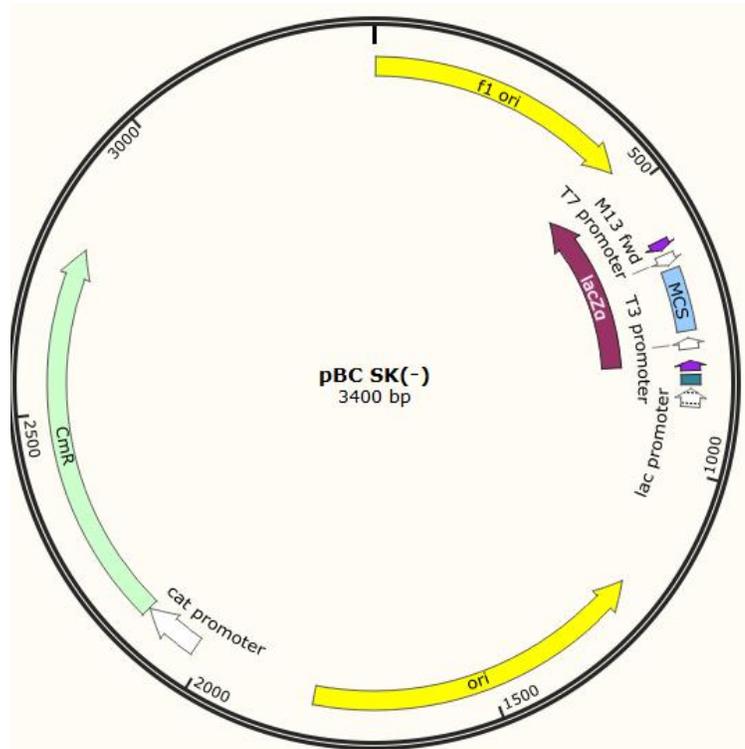
**Figura 10. Estructura de pBS-KS.** El vector contiene la secuencia de LacZ $\alpha$ , el cual puede complementar de manera intracistrónica en la delección a LacZ $\Delta$ M15 presente en algunas bacterias (DH5 $\alpha$ ) como resultado la producción de  $\beta$ -galactosidasa activa, efectivo para el ensayo con Xgal. Contiene la secuencia de la beta-lactamasa (AmpR), origen de replicación multicopia pUC y orientación KS. (figura de SnapGene Viewer)

Las enzimas de restricción empleadas para extraer la secuencia de la proteína E de DENV y linearizar el vector fueron EcoRV y KpnI.

### 3.3.4. Vector inducible pBC-SK

Es un derivado de pBS que confiere resistencia a cloranfenicol, posee un origen de replicación multicopia pUC y la orientación SK que permite la

transcripción mediado por promotor del fago T7 dependiente del represor Lac inducible por IPTG. Figura 11.

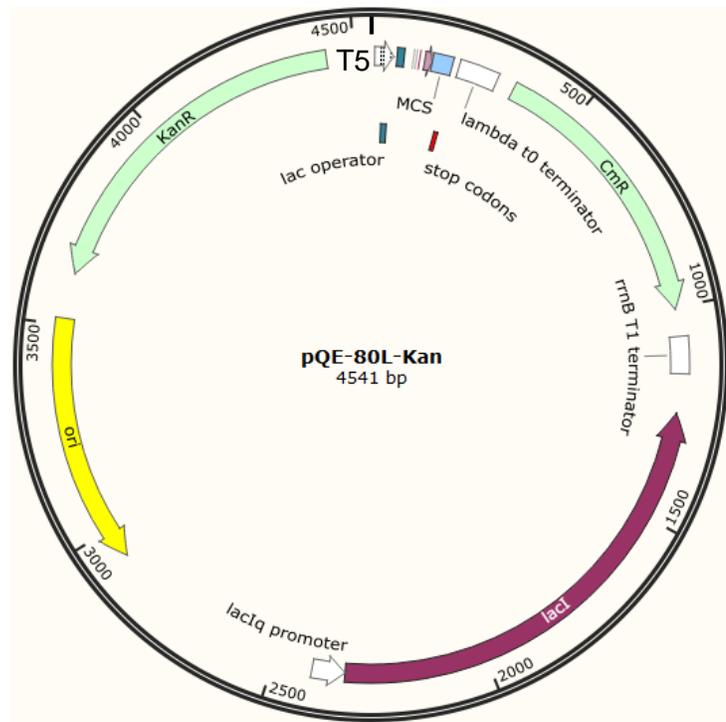


**Figura 11. Estructura de pBC-SK.** Contiene la secuencia de LacZa pero la orientación SK posiciona el inserto en función al promotor del fago T7. Porta la secuencia del cloranfenicol acetiltransferasa (CmR) y origen de replicación pUC (imagen de Snapgene viewer)

Este vector requiere de un sistema de expresión que exprese por sí mismo la RNA T7 polimerasa. Para este trabajo se empleó *E. coli* BL21(DE3), que cumple con esta condición. El par de enzimas empleadas para su manipulación son KpnI y EcoRI.

### 3.3.5. Vector inducible pQE-80L-kan

Vector manufacturado por Qiagen®, actúa con el promotor T5 en función de 2 represores Lac, lo cual estabiliza la producción y evita expresión basal constitutiva o bien, no inducida. esta característica es particularmente útil en proteínas tóxicas; el origen replicación ColE es de copia única controlando y limitando de manera más eficiente la producción protéica. Confiere resistencia a kanamicina para su selección y contiene la secuencia del represor LacI, efectivo en cepas que no la expresen por sí mismas o sea insuficiente para regular la inducción. Figura 12.



**Figura 12. Estructura de pQE-80L-Kan.** Vector en función al promotor del fago T5 por medio de dos operadores Lac. Porta la secuencia del represor LacI y del aminoglicósido fosfotransferasa (KanR). Posee origen de replicación ColE1 de copia única y secuencia de CmR inactiva (Imagen de Snapgene Viewer).

Las cepas de *E. coli* M15 y SG13009 están especialmente diseñadas para ser empleadas con vectores pQE, sin embargo, debido a que contienen el plásmido pREP4 de manera inherente, plásmido que expresa el represor LacI<sub>Q</sub> y a su vez, confiere resistencia a la kanamicina, al igual que pQE-80L-kan. Por lo tanto, este plásmido se trabajó en la cepa BLR(DE3).

Las enzimas EcoRI y BamHI fueron empleadas con este vector.

### 3.3.6. Plásmido control pQE-40

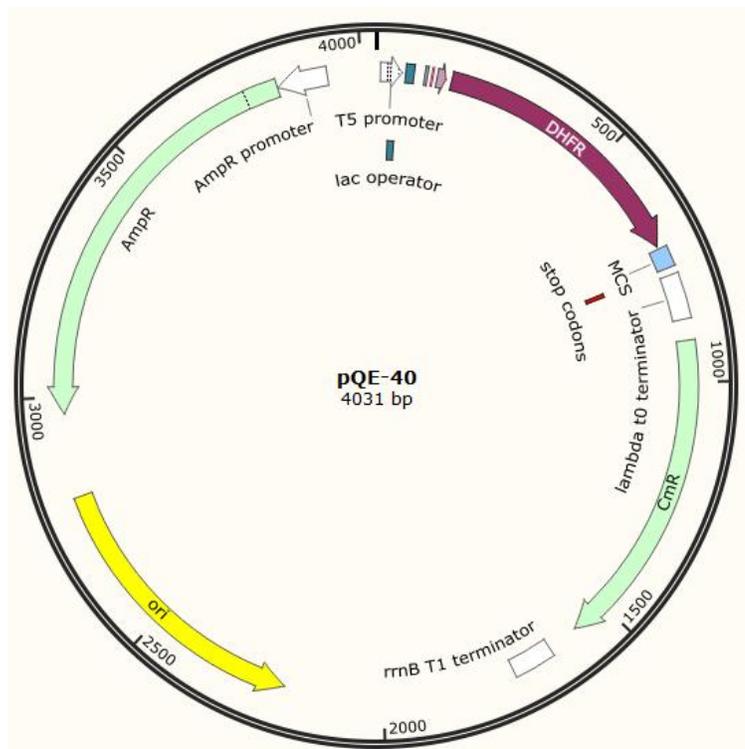
Este plásmido actúa de manera muy similar a pQE-80L-kan, compartiendo el mismo promotor, sin embargo, es un vector multicopia y su función es distinta, la cual se desarrolla de 2 maneras:

1.- Contiene la secuencia de la Dihidrofolato reductasa (DHFR) de *E. coli*, esta proteína de 15-20 kDa se sobreexpresa al inducirse con IPTG actuando como control de inducción.

2.- El sitio de multiclonación (MCS) está directamente río abajo de la secuencia de DHFR permitiendo la construcción y producción de proteínas de fusión, efectivo en proteínas de difícil o lenta expresión explotando la facilidad y eficacia de expresión de DHFR en *E. coli*.

Este trabajo únicamente empleó pQE-40 como control de inducción.

pQE-40 confiere resistencia a la ampicilina, que en contraste a pQE-80L-kan, permite su uso en *E. coli* M15 y SG13009 al proveer de un segundo antibiótico de selección y particularmente efectivo debido a que pQE-40 por sí mismo no expresa el represor LacIQ. Esta característica complementa la eficacia de pQE-40 en ya sea M15 o SG13009 como control de inducción. Figura 13.



**Figura 13. Estructura de pQE-40.** Plásmido con la secuencia de la DHFR inducible por IPTG, actuando como control de inducción positivo; porta la secuencia de la beta lactamasa (AmpR) y origen de replicación multicopia pUC (imagen de Snapgene viewer).

## Inducción

Los ensayos de inducción se realizaron siguiendo el mismo procedimiento en todas las cepas empleada.

(1) La inducción parte de cultivo de una colonia recientemente transformada (Anexo 3) y dejar crecer por 12-18 horas, con antibiótico, en agitación (200 rpm).

(2) Se toman 5 mL del cultivo resultante y se inoculan en 100 mL (o el proporcional según el volumen de medio a inducir) de medio a 37°C con 1% de glucosa y antibiótico.

(3) Las bacterias se indujeron pasada 1 hora agregando IPTG al medio de cultivo teniendo una concentración final de 1 mM (IPTG 1M 1:1000).

(4) En los ensayos se toma una alícuota pre-inducción que sirve como control no inducido.

(5) Después de 4 horas agregado el IPTG, se centrifuga a 6000 rpm por 20 minutos para obtener el precipitado bacteriano y finalmente

(6) se congelan las bacterias a -20°C toda la noche, propiciando ruptura de la pared celular.

Para analizar los resultados de inducción las muestras se corren en un gel de poliacrilamida al 12%, para esto, las muestras se preparan de la siguiente manera: los precipitados se resuspenden en 50 a 100  $\mu$ L de agua destilada, se agrega buffer de Laemmli y se hierven a 95°C por 5 minutos teniendo un tono azul translúcido. (hervir la muestra aparte de ayudar a desnaturalizar las proteínas,

permite la licuefacción de la misma, esto facilita cargar la muestra en el gel debido a su consistencia viscosa).

El gel de poliacrilamida se analiza por Coomassie o por Western Blot.

Los ensayos con Western Blot emplearon anticuerpo primario anti etiqueta de histidinas de ratón 1:1000 (Santa Cruz biotechnology) y anticuerpo secundario anti-ratón conjugado con peroxidasa de rábano (Jackson Technology) 1:5000 en membrana de PVDF (General Electric) y revelado con luminol (Santa Cruz biotechnology) en transiluminador ChemiDoc XRS+ (Bio rad).

## **Purificación**

Se empleó el kit de afinidad Ni-NTA Spin Kit de Qiagen® para aislar la proteína recombinante (consultar Anexo 5 para elaborar los buffers).

Partiendo de la pastilla de bacterias propiamente inducidas (1) resuspender en 500  $\mu$ L de buffer B y agitar con vortex hasta tener una solución translúcida, una vez observado esto, (2) centrifugar 10 minutos a 15000 g y se transfiere el sobrenadante a un tubo limpio, aislando la proteína recombinante soluble de los restos celulares. (3) Se agregan 50  $\mu$ L de la resina Ni-NTA al sobrenadante, este adsorberá las proteínas mediante la etiqueta de histidinas al cual es afín; se debe dejar en agitación leve por 30 minutos (se recomienda en un tubo de 2 mL para evitar la resina se precipite).

Pasado este plazo (4) centrifugar 10 segundos a 15000 g para precipitar la resina y transferir 10  $\mu$ L a un tubo limpio el cual servirá como referencia en el gel de

poliacrilamida, el resto del sobrenadante se descarta; en este paso, se eliminan las proteínas que no se unen a la resina. (5) lavar la resina 2 veces con 250  $\mu$ L de buffer C, se centrifuga a 15000 g por 10 segundos en cada lavado eliminando el sobrenadante, bajo el pH de este buffer, la proteína recombinante es afín a la resina así eliminando impurezas. Finalmente (6) eluir 3 veces con 25  $\mu$ L de buffer E centrifugando 10 segundos a 15000 g entre cada elución extrayendo con cuidado cada sobrenadante y guardarlo para observar en el gel de poliacrilamida.

Los ensayos de purificación se hicieron a la par con un control negativo que consiste del vector (pQE-80L-Kan) vacío, y un control de inducción positivo (pQE-40).

# 4. Resultados

---

## 4.1. Optimización de la secuencia de E para su expresión en sistemas heterólogos.

### 4.1.1. Rediseño de la secuencia de la proteína de envoltura del virus del dengue

La secuencia nucleotídica de la proteína de envoltura del virus del dengue nativa se optimizó mediante el software McVector para permitir la expresión en sistemas eucariontes y procariontes al agregar sitios de unión a ribosoma, se agregó la secuencia de la etiqueta de poli-histidinas y secuencia de reconocimiento de enterocinasa el cual permitirá la proteína ser purificable mediante cromatografía de afinidad con columna de níquel. Las modificaciones en la secuencia nativa que orientaran la expresión y estabilidad a sistemas procarióticos se realizaron mediante el software OptimumGene.

La secuencia resultante en contraste a la secuencia nativa se observa a continuación:

(Envelope DENV1. 1558 pb)

Optimized 20 ATGGGTCATCATCATCATCATCACGACGACGACGACAAAATGCGTTGCGTTGGTATCGGT  
Original 20 ATGGGACACCATCACCACCATCAGATGATGACGATAAAAATGCGGTGCGTGGGAATAGGC

Optimized 80 AATCGCGACTTTGTTGAAGGTCTGAGCGCGCCACCTGGGTTGATGTGGTTCTGGAACAT  
Original 80 AACAGAGACTTCGTGGAAGGACTGTCAGGAGCTACGTGGGTGGATGTGGTACTGGAGCAT

Optimized 140 GGTAGCTGCGTCACCACGATGGCAAAAAGATAAACCGACCCTGGACATCGAACTGCTGAAA  
Original 140 GGAAGTTGCGTCACTACCATGGCAAAAAGACAAACCAACACTGGACATTGAACTCTTGAAG

Optimized 200 ACCGAAGTGACGAACCCGGCCGTTCTGCGTAAACTGTGCATCGAAGCAAAAATTAGCAAT  
 Original 200 ACGGAGGTCACAAACCTGCCGTCTGCGCAAACCTGTGCATTGAAGCTAAAATATCAAA

Optimized 260 ACCACGACCGATTCTCGCTGTCCGACGCAGGGTGAAGCTACCCTGGTTGAAGAACAGAT  
 Original 260 ACCACCACCGATTTCGAGATGTCCAACACAAGGAGAAGCCACGCTGGTGGAAAGACAGGAC

Optimized 320 ACCAACTTTGTTGCCGTCGCACGTTTCGTGGATCGTGGCTGGGGTAATGGCTGTGGTCTG  
 Original 320 ACGAACTTTGTGTGTCGACGAACGTTTCGTGGACAGAGGCTGGGGCAATGGTTGTGGGCTA

Optimized 380 TTTGGCAAAGGTAGTCTGATTACCTGCGCGAAATTCAAATGTGTACGAAACTGGAAGGT  
 Original 380 TTCGAAAAGGTAGCTTAATAACGTGTGCTAAGTTTAAAGTGTGTGACAAAACCTGGAAGGA

Optimized 440 AAAATCGTGCAGTATGAAAACCTGAAAACAGCGTTATTGTCACCGTGCATACGGGCGAT  
 Original 440 AAGATAGTCCAATATGAAAACCTTAAAATATTCAGTGATAGTACCGTACACACTGGAGAC

Optimized 500 CAGCACCAAGTGGGTAATGAAACGACCGAACATGGCAGCAGCGCTACCATCACGCCGCGAG  
 Original 500 CAGCACCAAGTTGGAAATGAGACCACAGAACATGGAACAACCTGCAACCATAACACCTCAA

Optimized 560 GCACCGACGACTGAAATTCAACTGACCGATTATGGCGCCCTGACGCTGGACTGCTCCCCG  
 Original 560 GCTCCACGTCGGAAATACAGCTGACAGACTACGGAGCTCTAACATTGGATTGTTCCACT

Optimized 620 CGTACCGGTCTGGACTTTAACGAAATGTTCTGCTGACGATGAAAAAGAAAAGCTGGCTG  
 Original 620 AGAACAGGGCTAGACTTTAATGAGATGGTGTGTTGACAATGAAAAAAAATCATGGCTC

Optimized 680 GTGCACAAAAGTGGTTCCTGGATCTGCCGCTGCGTGGACCTCGGGTGCATCAACGTCG  
 Original 680 GTCCACAAAACATGGTTTCTAGACTTACCCTGCCTTGGACCTCGGGGGCTTCAACATCC

Optimized 740 CAGGAAACCTGGAATCGCCAAGACCTGCTGTTGACCTTTAAAACGGCGCATGCCAAAAAA  
 Original 740 CAAGAGACTTGAATAGACAAGACTTGTCTGGTACATTTAAGACAGCTCATGCAAAAAAG

Optimized 800 CAGGAAGTCGTGGTTCTGGGCTCACAAGAAAGGTGCAATGCACACCGCACTGACGGGTGCA  
 Original 800 CAGGAAGTAGTCTACTAGGATCACAAGAAGGAGCAATGCACACTGCGTTGACTGGAGCG

Optimized 860 ACCGAAATCCAGACCTCTGGCAGCACCAGATTTTTGCCGGTCATCTGAAATGCCGTCTG  
 Original 860 ACAGAAATCCAAACGCTCTGGAACGACAACAATTTTTGCAGGACACCTGAAATGCAGATTA

Optimized 920 AAAATGGATAAACTGATCCTGAAAAGGCATGAGTATGTTATGTGTACCGGTTCCCTCAA  
 Original 920 AAAATGGATAAACTGATTTTAAAAGGGATGTCATATGTAATGTGCACAGGGTCATTCAA

Optimized 980 CTGGAAAAAGAGTGGCTGAAACGCAGCAGCGCACCGTTCTGGTCCAAGTGAAATACGAA  
 Original 980 TTAGAGAAGGAAGTGGCTGAGACCCAGCATGGAACCTGTTCTAGTGCAGGTTAAATACGAA

Optimized 1040 GGCACCGATGCGCCGTGTAAAATTCCGTTTAGCTCTCAGGACGAAAAAGCGGTGACCCAA  
 Original 1040 GGAACAGATGCACCATGCAAGATCCCCCTCTCGTCCCAAGATGAGAAGGGAGTAACCCAG

Optimized 1100 AACGGTCGTCTGATCACCGTAATCCGATTGTGACGGATAAAGAAAAACCGGTTAACATC  
 Original 1100 AATGGGAGATTGATAACAGCCAACCCCATAGTCACTGACAAAAGAAAAACCGTCAACATT

Optimized 1160 GAAGCGGAACCGCCGTTCCGGTAAAAGCTATATTGTCGTGGGCGCTGGTAAAAAGCGCTG  
 Original 1160 GAAGCGGAGCCACCTTTTGGTGAGAGCTACATTGTGGTAGGAGCAGGTGAAAAAGCTTTG

Optimized 1220 AAACTGTCTTGGTTTAAAAAAGGCAGTTCATTGGTAAAATGTTTCAAGCAACCGCTCGC  
 Original 1220 AAATAAGCTGGTTCAAGAAGGGAAGCAGTATAGGGAAAATGTTTGAAGCAACTGCCCGT

Optimized 1280 GGGCCCCGTCGCATGGCAATCCTGGGCGATACCGCTGGGACTTTGGTTCAATTGGCGGT  
 Original 1280 GGAGCACGAAGGATGGCCATCCTGGGAGACACTGCATGGGACTTCGGTTCTATAGGAGGG

Optimized 1340 GTTTTACCTCGGTGGCAGAACTGATCCACCAGATTTTTGGCACCGCATACGGTGTCTG  
 Original 1340 GTGTTACGCTCTGTGGGAAAACCTGATACACCAGATTTTTGGGACTGCGTATGGAGTTTGG

Optimized 1400 TTTCAGGCGTGTGCTGGACCATGAAAATTGGCATCGGTATTCTGCTGACGTGGCTGGGC  
 Original 1400 TTCAGCGGTGTTTCTTGGACCATGAAGATAGGAATAGGATTCTGCTGCATGGCTAGGA

Optimized 1460 CTGAATAGCCGCTCTACGAGTCTGTCCATGACCTGTATTGCCGTTGGTATGGTGACCCTG  
Original 1460 TTAAACTCAAGGAGCACGTCCCTTTCAATGACGTGTATCGCAGTTGGCATGGTCACACTG

Optimized 1520 TATCTGGGCGTTATGGTTCAAGCCTGATGATGA  
Original 1520 TACCTAGGAGTCATGGTTCAGGCGTGATGATAG

La secuencia nucleotídica optimizada para la proteína E de DENV1 corresponde a 1558 pb y se muestra a continuación:

```
GGTACCAGGAGGTGCCACCATGGGTCATCATCATCATCATCACGACGACGACGACAAAAATGCGTTGCGTTGGTATCGGTAATCGCGACTTT
GTTGAAGGTCTGAGCGGCGCCACCTGGGTTGATGTGGTTCTGGAACATGGTAGCTGCGTCACCACGATGGCAAAAAGATAAACCGACCTGG
ACATCGAACTGCTGAAAACCGAAGTGACGAACCCGGCCGTTCTGCGTAACTGTGCATCGAAGCAAAAATTAGCAATACCACGACCGATTTC
TCGCTGTCCGACGCAGGGTGAAGCTACCCTGGTTGAAGAACAAGATAACCAACTTTGTTTGGCGTCGCACGTTTCGTGGATCGTGGCTGGGGT
AATGGCTGTGGTCTGTTTGGCAAAGGTAGTCTGATTACCTGCGCGAAATTCAAATGTGTACGAAACTGGAAGGTAAAATCGTGCAGTATG
AAAACCTGAAATACAGCGTTATTGTACCCGTGCATACGGGCGATCAGCACCAAGTGGGTAATGAAACGACCGAACATGGCAGACCGCTAC
CATCACGCCGACGGCACCGACGAGTGAATTCAACTGACCGATTATGGCGCCCTGACGCTGGACTGCTCCCCGCGTACCGGTCTGGACTTT
AACGAAATGGTTCTGCTGACGATGAAAAAGAAAAGCTGGCTGGTGACAAAACAGTGGTTCCTGGATCTGCCGCTGCCGTGGACCTCGGGTG
CATCAACGTGCGAGGAAACCTGGAATCGCCAAGACCTGCTGGTGACCTTTAAAACGGCGCATGCCAAAAACAGGAAGTCGTGGTTCTGGG
CTCACAAGAAGGTGCAATGCACACCGCACTGACGGGTGCAACCGAAATCCAGACCTCTGGCACGACCCAGATTTTGGCCGTGATCTGAAA
TGCCGCTGAAAATGGATAAACTGATCCTGAAAGGCATGAGTTATGTTATGTGTACCGGTTCCCTTCAAACCTGAAAAAAGAAGTGGCTGAAA
CGCAGCACGGCACCCGTTCTGGTCCAAGTGAATACGAAGGCCCGATGCGCCGTGTAAAATTCGGTTTAGCTCTCAGGACGAAAAAGGCGT
GACCCAAAACGGTCTGATCACCCTAATCCGATTGTGACGGATAAAGAAAAACCGTTAACATCGAAGCGGAACCGCCGTTCCGGTGAA
AGCTATATTGTCGTGGGCGCTGGTAAAAAGCGCTGAAACTGTCTTGGTTTAAAAAAGGCAGTTCATTTGGTAAAATGTTGGAAGCAACCG
CTCGCGGCGCCCGTCGCATGGCAATCCTGGGCGATACCGCCTGGGACTTTGGTTCAATGCGCGGTGTTTTACCTCGGTGCGCAAACTGAT
CCACCAGATTTTGGCACCGCATAACGGTGTCTGTTCTCAGGCGTGTGCGGACCATGAAAATGGCATCGGTATTTGCTGACGTGGCTG
GGCCTGAATAGCCGCTCTACGAGTCTGTCCATGACCTGTATTGCCGTTGGTATGGTGACCCTGTATCTGGGCGTTATGGTTCAAGCCTGAT
GATGAGATATC
```

En este trabajo, los esfuerzos se centraron en expresar la proteína del DENV serotipo 1, sin embargo, se sintetizó la secuencia del serotipo de DENV2 con el mismo rediseño para trabajos posteriores, del cual también se construyeron los vectores de expresión.

(Envelope DENV2. 1558 pb)

Optimized 20 ATGGGCCATCATCATCATCATCACGACGACGACGATAAAAATGCGTTGTATTGGCATGTCA  
Original 20 ATGGGACACCATCACCCATCACGATGATGACGATAAAAATGCGTTGCATAGGAATGTCA

Optimized 80 **AACCCG**GACTTTGTGGAAGGC**TTAGCGGCGGT**AGCTGGGTT**GATATT**GT**CCTG**GAACAT  
 Original 80 AATAGAGACTTTGTGGAAGGGTTTCAGGAGGAAGCTGGGTTGACATAGTCTTAGAACAT

Optimized 140 **GGCTCTTGC**TT**ACC**ACGAT**GGCT**AAAAACAA**ACCGACCCTGGAC**TTTGA**ACTGAT**C**AAA**  
 Original 140 GGAAGCTGTGTGACGACGATGGCAAAAAACAAACCAACATTGGATTTTGA**ACTGATA**AAA

Optimized 200 **ACCGAAGCA**AAACAG**CCGGCTACGCTGCGTAAATATTGCATTGAAGCGAAACTG**ACCAAC  
 Original 200 ACAGAAGCCAAACAGCCTGCCACCCTAAGGAAGTACTGTATAGAGGCAAAGCTA**ACCAAC**

Optimized 260 **ACCACGACC**GAAT**CACGC**T**GTCGACGCAGGGT**GA**ACCGTCGCTGAATGAAGAACAAGAT**  
 Original 260 ACAACAACAGAATCTCGCTGCCAACACAAGGGGAACCCAGCCTAAATGAAGAGCAGGAC

Optimized 320 AAA**CGTTTCGTT**TGCAAACAC**AGCATGGTGGATCGCGGC**TGGGGTA**ACGGCTGTGGTCTG**  
 Original 320 AAAAGGTT**CGTCTGCAA**ACTCCATGGT**TAGACAGAGGATGGGGAAATGGATGTGGACTA**

Optimized 380 TTT**GGCAAAGCGGTATC**GTGACCT**TGCGCC**ATGTT**CCGTTGTAAGAAA**AACAT**GGAGGGT**  
 Original 380 TTTGGAAAGGGAGGCATTGTGACCTGTGCTATGTT**CAGATGCAAAA**AGAACAT**GGAAGGA**

Optimized 440 AAA**GTGGTTCAGCCG**GAA**AATCTG**GAAT**TATACCATCGTCATTACGCCGCATTCAGGC**GAA  
 Original 440 AAAGTTGTGCAACCAGAAA**ACTTGAATACACCATTGTGATAACACCTCACTCAGGGGAA**

Optimized 500 **GAACACGCCG**TGGGTAAT**GATACCGC**AAACAT**GGTAAAGAAATCAAAATTACGCCGCAG**  
 Original 500 GAGCATGCAGTCGGAAATGACACAGGAAAACATGGCAAGGAAATCAAAATAACACCACAG

Optimized 560 **AGCAGCATTACC**GAAGCAGAA**CTGACGGGCTACGGTACGGTTACGATGGAAT**GTCTCT**CCG**  
 Original 560 AGTTCCATCACAGAAGCAGAATTGACAGGTTATGGCACTGTCA**CAATGGAGTGTCTCTCCA**

Optimized 620 **CGTACCGGCCTGGATTTTAACG**AAAT**GTTCTG**CTG**CAA**ATGGAAAATAAA**CGCTGGCTG**  
 Original 620 AGAACGGGCCTCGACTTCAATGAGATGGTGTGCTGCAGATGGAAAATAAA**GCTTGGCTG**

Optimized 680 **GTCACCGC**CAATGGTTC**CTGGATCTGCCGCTGCCGTGGCTGCCGGGCGCAGACACCCAG**  
 Original 680 GTGCACAGGCAATGGTTCCTAGACCTGCCGTTACCATGGTTGCCCGGAGCGGACACACAA

Optimized 740 **GGTTCAACTGGATT**CAGAAA**GAAACGCTGGT**GAC**CTTTAAAAATCCGCATGCTAAAAA**  
 Original 740 GGGTCAAAT**TGGATACAGAAA**GAGACAT**TGGTCACTTTAAAAATCCCCATGCGAAGAAA**

Optimized 800 CAGGAT**GTCGTG**GTT**CTGGGCTCG**CAAGAA**GGTGCAATGCACACCGGCACTGACCGGTGCA**  
 Original 800 CAGGATGTTGTTGTTTTAGGATCCCAAGAGGGGCCATGCACACAGCACTTACAGGGGCC

Optimized 860 **ACGGAAATTCAGATGAGTTC**CGGCAAT**CTGCTGTTTACCGGTCATCTGAAA**TGCC**GTCTG**  
 Original 860 ACAGAAATCCAAATGTCATCAGGAACTTACTCTTACAGGACATCTCAAGTGCAGGCTG

Optimized 920 **CGCATGGATAAACTGCAACTG**AAAGGCAT**GAGCTAT**TCTAT**GTGTACCGTAAATTCAA**A  
 Original 920 AGAATGGACAAGCTACAGCTCAAAGGAATGTCATACTCTATGTGCACAGGAAAGTTTAA

Optimized 980 **GTCGTAAAGAAATCG**CAGAA**ACCCAGCATGGTACGATCGTGATTCGTGTTCAATACGAA**  
 Original 980 GTTGTGAAGGAAATAGCAGAAACACAACATGGAACAATAGTTATCAGAGTGAATATGAA

Optimized 1040 **GGCGATGGTAGCCCGT**G**TAAAATCCCGTTTGA**AAT**TATGGACCTGGAAAAACGTCACGTT**  
 Original 1040 GGGGACGGCTCTCCATGCAAGATCCCTTTT**GAGATAATGGATTTGGAAAAA**AGACATGTC

Optimized 1100 **CTGGGCCG**CCT**GATCACC**GTCA**ACCCG**ATTGT**GACG**AAAAAGAT**AGTCCGGTCAATATT**

Original 1100 TTAGGTCGCCTGATTACAGTCAACCCAATTGTGACAGAAAAAGATAGCCAGTCAACATA

Optimized 1160 GAAGCCGAA**CCGCCGTTCCGGT**GACT**CC**TATATTATC**ATTGGCGTGGAA**CCGG**GT**CAGCTG  
Original 1160 GAAGCAGAACCTCCATTCCGAGACAGCTACATCATCATAGGAGTAGAGCCGGGACAAC**CTG**

Optimized 1220 **AAACTG**AACTGGTTTT**AAAAA****GGCTCATCG**ATCGGTCAAATG**TTCGAA**ACGACCAT**GC**GT  
Original 1220 AAGCTCAACTGGTTTTAAGAAAGGAAGTTCTATCGGCCAAATGTTT**GAGACA**CAATGAGG

Optimized 1280 **GGTGCTAA**ACGCATGGCGATT**CTGGGCGATA**CCGCATGG**GAC**TTTGGTAGTCT**GGGCGGT**  
Original 1280 GGGGCGAAGAGAATGGCCATTTTAGGTGACACAGCCTGGGATTTTGGATCCTTGGGAGGA

Optimized 1340 GTG**TTACCTCC**ATCGG**CAAAGCCCTGC**ACCAGGTTTTTGGCGCAATTTACGGT**GC**GGCC  
Original 1340 GTGTTTACATCTATAGGAAAGGCTCTCCACCAAGTCTTTGGAGCAATCTATGGAGCTGCC

Optimized 1400 TTC**AGCGGTGTGTCT**TGGACCATGAAAAT**CCTGATTGGCGTTATCATTAC**TG**GATTGGT**  
Original 1400 TTCAGTGGGTTTT**CATGGACTATG**AAAATCCTCATAGGAGTCATTATC**CATGGATAGGA**

Optimized 1460 ATGAAT**AGT**CGCT**CC**ACCTCACTG**TCGGT**G**ACGCTGGT**TCTGGTTGGCATTGTG**ACC**CTG  
Original 1460 ATGAATTCACGCAGCACCTCACTGTCTGTGACACTAGTATGGTGGGAATTGTGACACTG

Optimized 1520 **TACCTGGGCGT**GATGGTT**CAAGCC**TAATAATAA  
Original 1520 TATTTGGGAGTCATGGTGCAGGCCTGATGATAG

La secuencia correspondiente a E de DENV2 optimizada, conteniendo 1558 pb se muestra a continuación:

**GGTACCAGGAGGTGCCACC**ATGGGCCATCATCATCATCATCACGACGACGACGATAAAAATGCGTTGTATTGGCATGTCAAACCGCGACTTT  
GTGGAAGGCGTTAGCGGCGGTAGCTGGGTTGATATTGTCCTGGAACATGGCTCTTGCGTTACCACGATGGCTAAAAACAAACCGACCTGG  
ACTTTGAACTGATCAAAAACCGAAGCAAACAGCCGGCTACGCTGCGTAAATATTGCATTGAAGCGAAACTGACCAACACCACGACCGAATC  
ACGCTGTCCGACGCAGGGTGAACCGTCTGCTGAATGAAGAACAAGATAAACGTTTCGTTTGCAAACACAGCATGGTGGATCGCGGCTGGGGT  
AACGGCTGTGGTCTGTTTGGCAAAGGCGGTATCGTGACCTGCGCCATGTTCCGTTGTAAGAAAAACATGGAGGGTAAAGTGGTTCAGCCGG  
AAAATCTGGAATATAACCATCGTCATTACGCCGATTACAGCGAAGAACACGCCGTGGGTAATGATACCGGCAACATGGTAAAGAAATCAA  
AATTACGCCGACAGAGCAGCATTACCGAAGCAGAAGTACGCGGCTACGGTACGGTTACGATGGAATGCTCTCCGCGTACCGGCTGGATTTT  
AACGAAATGGTTCTGCTGCAAAATGGAAAATAAAGCGTGGCTGGTCCACCGCAATGGTTCCTGGATCTGCCGCTGCCGTGGCTGCCGGCG  
CAGACACCCAGGGTTCAAACCTGGATTCAGAAAGAAACGCTGGTGACCTTTAAAAATCCGCATGCTAAAAACAGGATGTCTGGTCTG  
CTCGCAAGAAGGTGCAATGCACACGGCACTGACCGGTGCAACGGAAATTCAGATGAGTTCGGCAATCTGCTGTTTACCGGTCATCTGAAA  
CCAGCATGGTACGATCGTATTCGTTTCAATACGAAGGCATGGTACCGGTAATTCAGGATCGTAAAGAAATCGCAGAAA  
TCACGTTCTGGGCCCGCTGATCACCGTCAACCCGATTGTGACGAAAAAGATAGTCCGGTCAATATTGAAGCCGAACCGCGCTTCGGTGAC  
TCCTATATTATCATTGGCGTGAACCGGGTCACTGAAACTGAACTGGTTTTAAAAAAGGCTCATCGATCGGTCAAATGTTGAAACGACCA  
TGCGTGGTGCTAAACGCATGGCGATTCTGGGCGATACCGCATGGGACTTTGGTAGTCTGGGCGGTGTGTTACCTCCATCGGCAAAGCCCT  
GCACCAGGTTTTTGGCGCAATTTACGGTGGCGCTTCAGCGGTGTGCTTGGACCATGAAAATCCTGATTGGCGTTATCATTACGTGGATT  
GGTATGAATAGTCGCTCCACCTCACTGTCCGGTACGCTGGTCTGGTTGGCATTGTGACCTGTACCTGGGCGTATGGTTCAAGCCTAAT  
AATAAGATATC

El rediseño de la secuencia respeta la secuencia aminoacídica nativa y adquiere las siguientes características:

1. Expresión y purificación.

- a. Secuencia de Shine-Dalgarno (Sitio de unión a ribosoma en procariontes).
- b. Secuencia de Kozak (sitio de inicio de transcripción en eucariontes).
- c. Etiqueta de histidina (para purificar mediante columna de afinidad).
- d. Secuencia de reconocimiento de enterocinasa (Eliminar etiqueta de la proteína).
- e. Se agregaron sitios de restricción para KpnI y EcoRV (permite corte sin codones desplazados).

2. Mejorar la estabilidad del RNAm confiriendo mayor estabilidad y eficiencia de traducción.

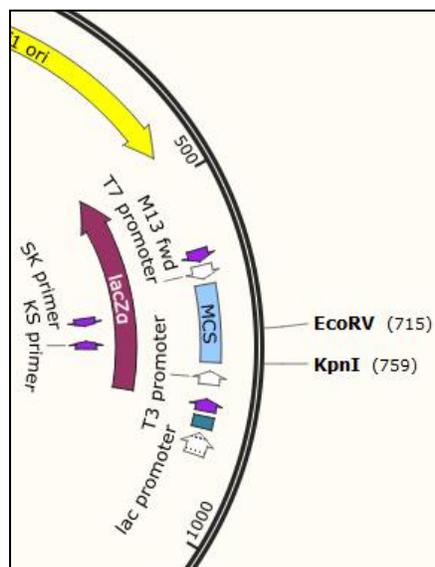
- a. Eliminar secuencias que formen bucles.
- b. Eliminar secuencias reguladoras putativas en Cis.
- c. Mejorar índice de adaptación de codón.
- d. Equilibrar secuencia de codones óptimos.
- e. Reducción de sitios de restricción.
- f. Ajuste de GC.
- g. Se agregaron 3 secuencias STOP.

## 4.1.2 Construcción de los vectores de expresión

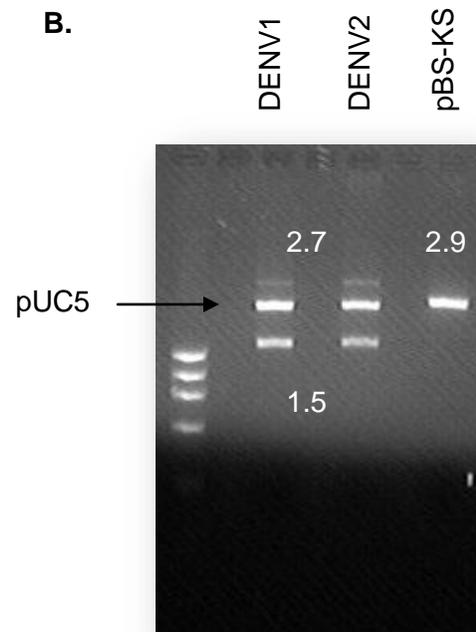
### *pBS-KS*

La construcción de los vectores de expresión se realizó mediante subclonación, el inserto correspondiente a la secuencia nucleotídica de E de DENV se obtiene del vector de clonación pUC57 y tiene un peso de 1.5 kb, para mantener simetría en el vector en el inserto en los sitios de restricción (y de los extremos pegajosos) el vector de expresión pBS-KS(2.9 kb) se lineariza con las mismas enzimas de restricción KpnI y EcoRV. Figura 14.

A.

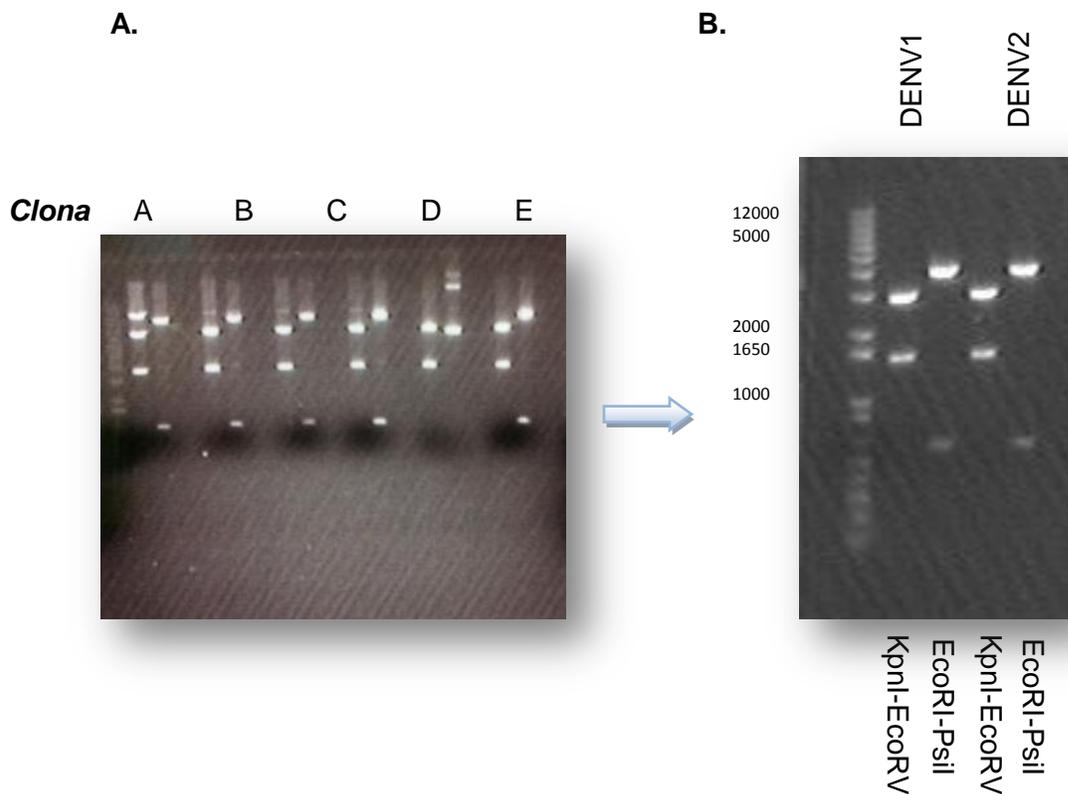


B.



**Figura 14. Construcción pBS-KS.** A. Estructura de pBS-KS mostrando los sitios de restricción. B. Se muestra el producto de digestión del vector de clonación (pUC57) de 2.7 kb, la secuencia de E de DENV1 y DENV2 y el vector de expresión (pBS-KS) linearizado (Gel de agarosa al 0.8%, teñido con bromuro de etidio).

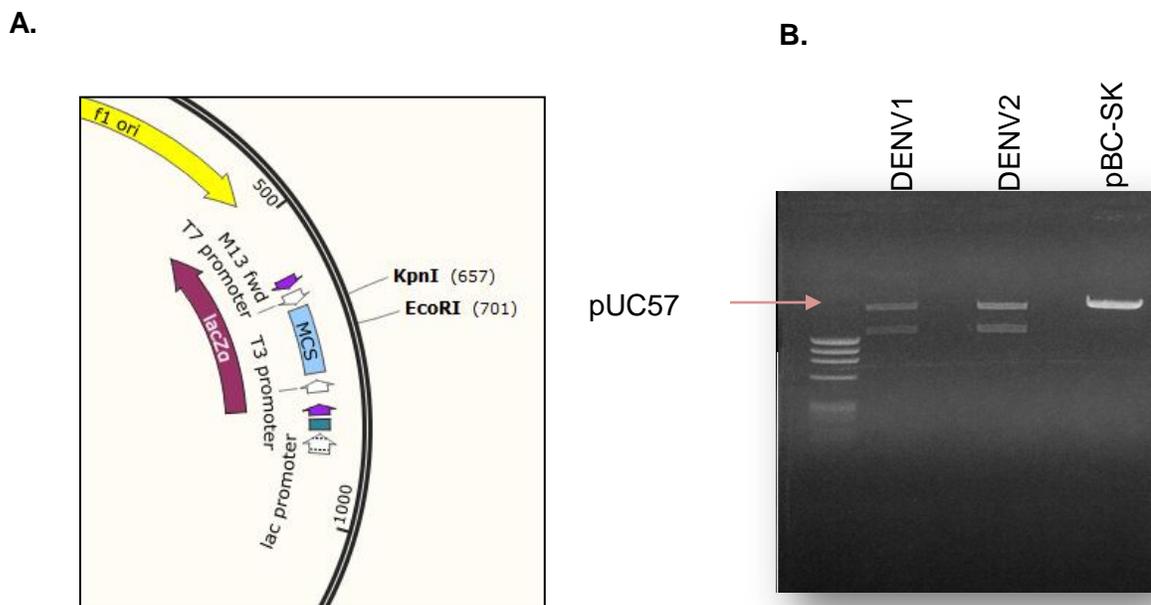
Los ensayos de subclonación se evaluaron al cultivar bacterias DH5 $\alpha$  transformadas con los productos de subclonación en medio agar LB con Xgal. De las colonias (azules) se seleccionaron clonas para su evaluación por digestión enzimática con KpnI-EcoRI (liberando el inserto) mostrando bandas del peso 2.7 kb - 1.5 kb; este resultado comprueba la ligación del inserto al vector y subsecuentemente se analizó con EcoRI y PstI a manera de control, cuyas bandas esperadas y observadas fueron 3.8 kb y 612 pb. Figura 15.



**Figura 15. Selección pBS-KS.** A.- Selección de clonas y evaluación por digestión enzimática. B.- Clonas con patrón de bandas correcto se conserva para ensayos de inducción ulteriores. (Geles de agarosa al 0.8%, teñido con bromuro de etidio).

## pBC-SK

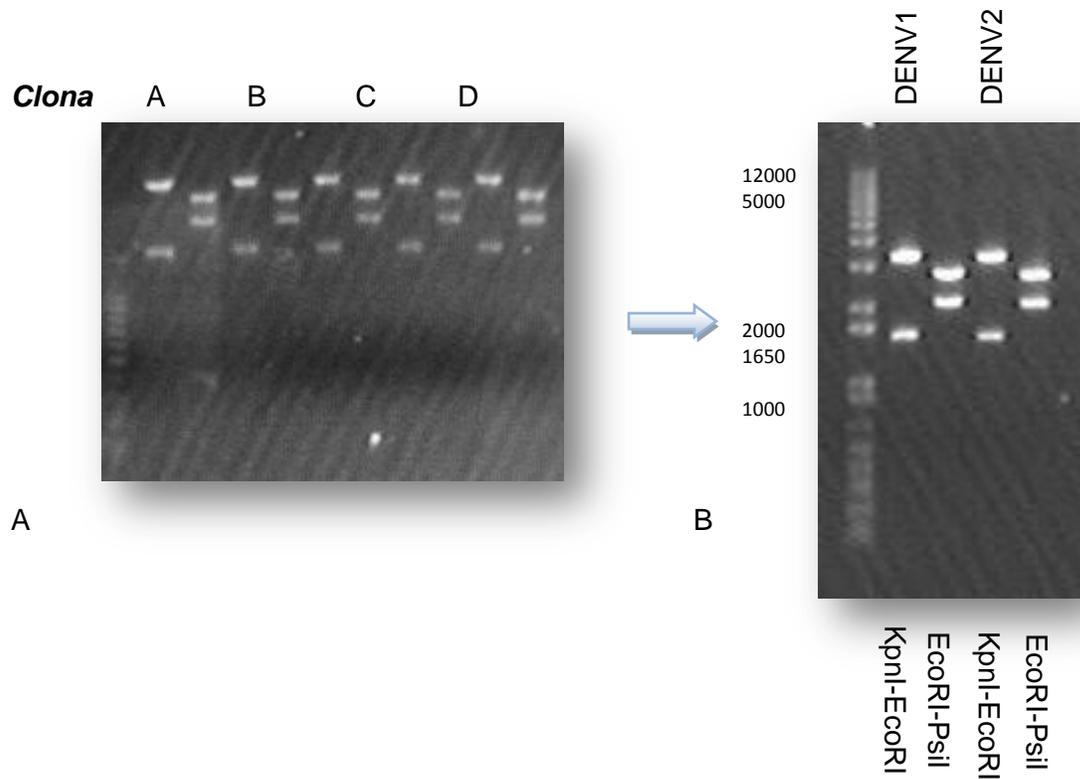
Similar a pBS-KS, se obtuvo el inserto y linearización del vector de expresión con las enzimas KpnI y EcoRI, sin embargo, la orientación SK (contrario a pBS) refiere que el sitio de restricción correspondiente a SacI se encuentra próximo al promotor Lac y el sitio correspondiente a KpnI más alejado de este (pero próximo al promotor del fago T7), permitiendo inducción por este medio. Figura 16.



**Figura 16. Construcción pBC-SK.** A.- Estructura de pBC-SK mostrando los sitios de restricción, siendo KpnI directamente río abajo al promotor T7. B.- Se muestra el producto de digestión del vector de clonación (pUC57) de 2.7 kb, la secuencia de E de DENV1 y DENV2 y el vector de expresión (pBC-SK) linearizado (Gel de agarosa al 0.8%, teñido con bromuro de etidio).

Del producto de subclonación se seleccionaron clonas para su evaluación por digestión enzimática. Las clonas seleccionadas se evaluaron con KpnI y EcoRI (liberando el inserto de 1.5 kb ) y EcoRI y PstI dando un patrón de 2.1 kb y 2.9 kb.

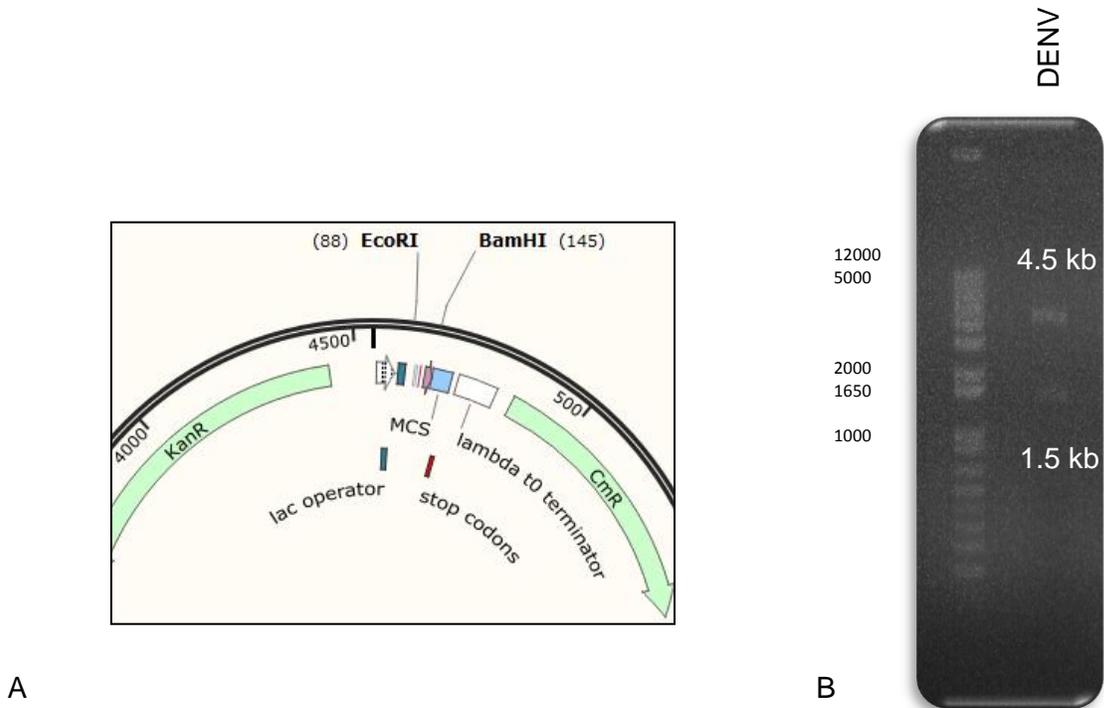
Figura 17.



**Figura 17. Selección de pBC-SK.** A.- Selección de clonas y evaluación por digestión enzimática. B.- Clonas con patrón de bandas correcto se conservan para ensayos de inducción ulteriores. (Geles de agarosa al 0.8%, teñido con bromuro de etidio).

### *pQE-80L-kan*

En el caso del vector pQE-80L-kan se extrajo el inserto y se linearizó con las enzimas BamHI y EcoRI, siguiendo el mismo protocolo de los vectores anteriores. Figura 18.



**Figura 18. Construcción pQE-80L-kan.** A. Estructura y sitios de restricción en el vector pQE-80L-kan. B. producto de digestión con enzimas BamHI y EcoRI del producto de subclonación. Se muestra la banda de 1.5 kb (E) y 4.5 kb (vector).

Las clonas que mostraron el patrón de bandas correcto se seleccionaron y se guardaron para los ensayos de inducción.

## 4.2 Expresión de proteína E

### 4.2.1 Inducción.

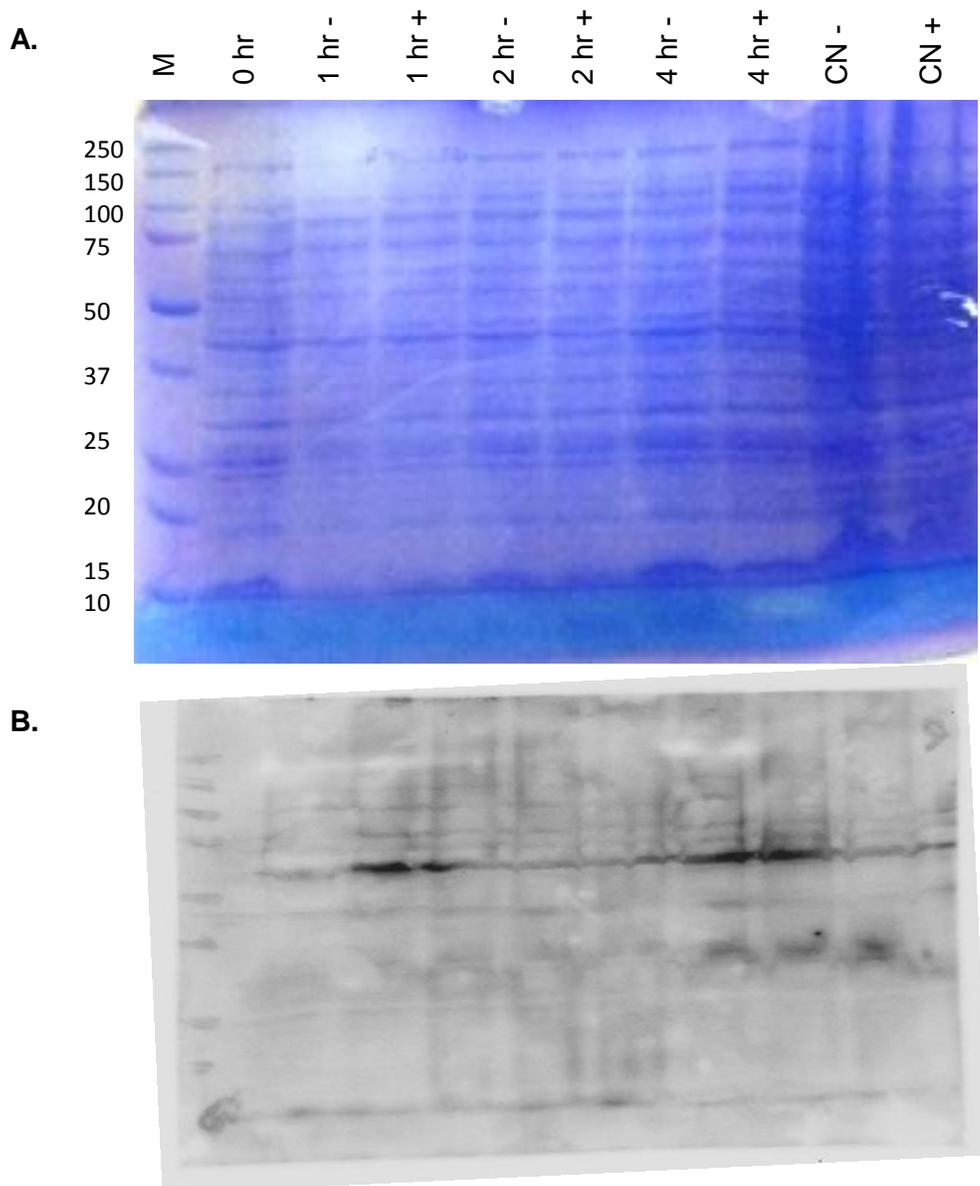
Los ensayos de inducción se evaluaron por vector y cepa de *E. coli* mediante el protocolo mencionado anteriormente considerando características de los mismos.

#### *DH5α / pBS-KS*

La primera estrategia a probar sugiere un sistema de expresión constitutivo con posibilidad de expresión a bajas temperaturas en medios altamente enriquecidos.

Estas condiciones de expresión hipotetizan una robusta expresión sin necesidad de agregar IPTG; la producción de este sistema demanda un sistema y vector de expresión que no produzcan el represor LacI<sub>Q</sub> siendo en este trabajo DH5α y pBS-KS respectivamente.

Las pruebas se realizaron al cultivar en medio LB. A partir de una OD de 0.6 a 600 nm se recolectaron alícuotas del cultivo y se analizaron por SDS-PAGE teñido con Coomassie y por Western Blot. Figura 19.



**Figura 19. Expresión pBS-KS.** A.- Gel de poliacrilamida al 12%. Se muestra producto del ensayo de expresión. prueba con IPTG y sin IPTG. B.- Western Blot, banda visible en controles negativos. Anticuerpo primario: Anticuerpos policlonales en suero de paciente. Anticuerpo secundario: Anti IgG humano. Revelado con luminol.

Siendo un sistema de expresión constitutivo observar sobreexpresión de la proteína es poco factible y por ende, no visible en el gel teñido con Coomassie

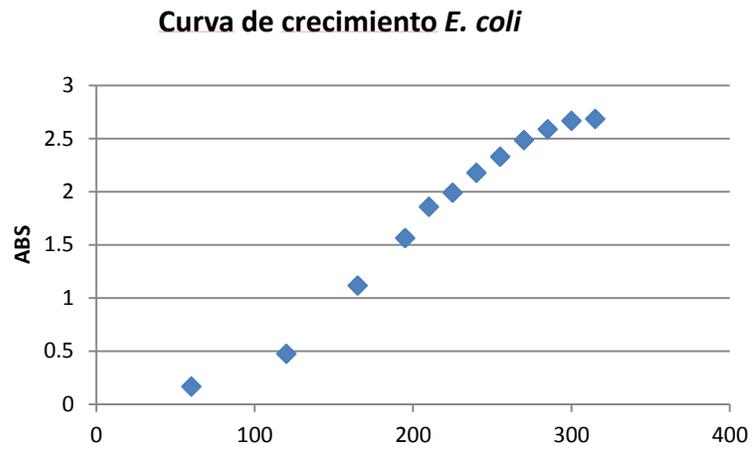
(siendo esta expresión basal). Para detectar producción de la proteína se realizó Western Blot empleando suero de un paciente confirmado con fiebre del dengue como anticuerpo primario; de dicho ensayo muestra una banda de 50-75 kDa que está presente en controles negativos (bacterias sin plásmido), esto se interpreta como una reacción cruzada con una proteína endógena de *E. coli* confirmando reacción cruzada por inespecificidad de los anticuerpos policlonales empleados; este resultado descarta el sistema de expresión DH5 $\alpha$ /pBS-KS como primera opción para el presente proyecto.

#### *BL21(DE3) / pBC-SK*

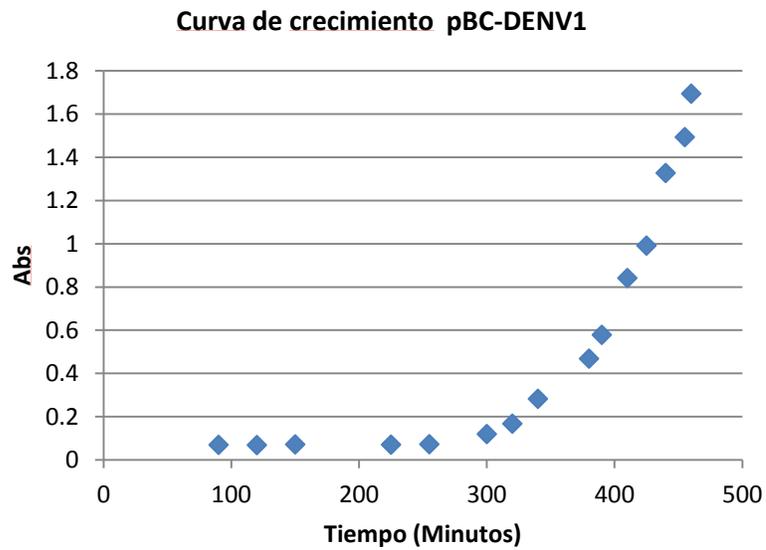
Ensayos con pBC-SK se realizaron al obtener una densidad óptica de 0.6 a 600 nm, la cual establece el inicio de la fase logarítmica y se sobrentiende como el momento idóneo para empezar la inducción.

Bajo este protocolo se agrega IPTG para expresar la proteína recombinante y así siguiendo la premisa de un sistema de expresión inducible, sin embargo, las bacterias transformadas con el constructo pBC-DENV mostraron un crecimiento apreciablemente lento en comparación con bacterias vacías. Figura 20.

A.

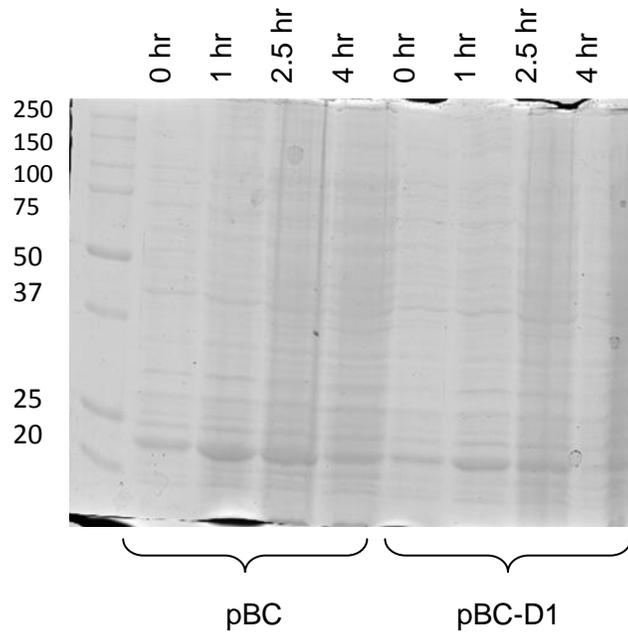


B.



**Figura 20. Curva de crecimiento *E. coli*.** A.- Curva de crecimiento de *E. coli* vacío, muestra se obtiene una DO 0.6. a los 120 minutos. B.- Curva de crecimiento de *E. coli* con pBC-SK-DENV1, se muestra una DO. 0.6 a los 360 minutos.

Teniendo en consideración las características del sistema de expresión, el cual presenta expresión basal considerable de la RNA polimerasa del fago T7, se realiza este ensayo a la par con un vector vacío, esto evitando resultados subjetivos por la posible expresión no inducida (leak expresion). Figura 21.

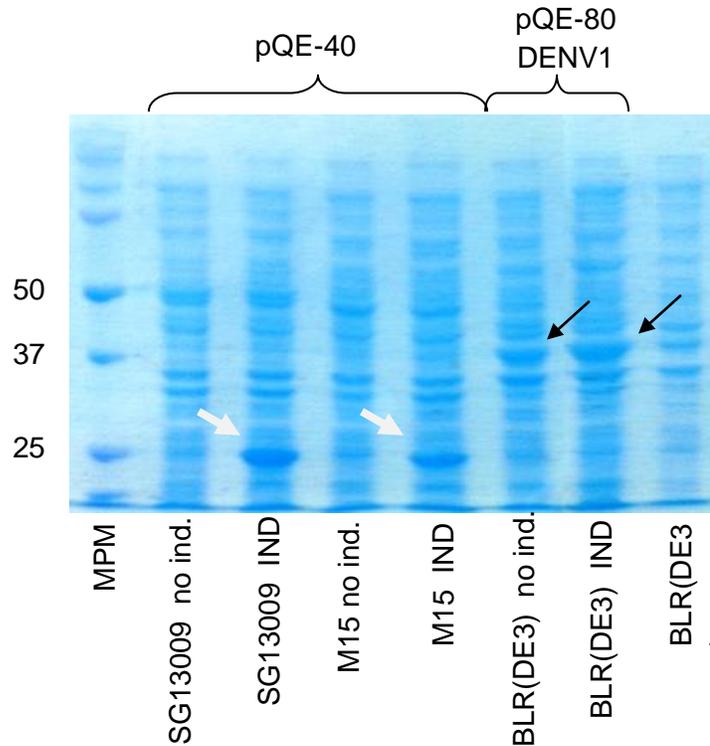


**Figura 21. Expresión pBC-SK.** Inducción de pBC-SK. Carril 1 marcador de peso molecular, carril 2-5 corresponden a vector vacío, carril 6-9 corresponde al sistema de expresión. Poliacrilamida 12%.

los ensayos realizados con este sistema abarcan variación de tiempo de inducción, concentración de IPTG y temperatura; pero se observa bandeo idéntico en bacterias con el vector vacío así como con el vector con la secuencia de envoltura de DENV1; demostrando expresión no detectable en el gel con Coomassie.

## BLR(DE3) / pQE-80L-kan

Ensayos de inducción con pQE-80L-kan se realizaron a la par con el plásmido control pQE-40; en el caso de pQE-40 en las cepas de *E. coli* M15 y SG13009. Figura 22.



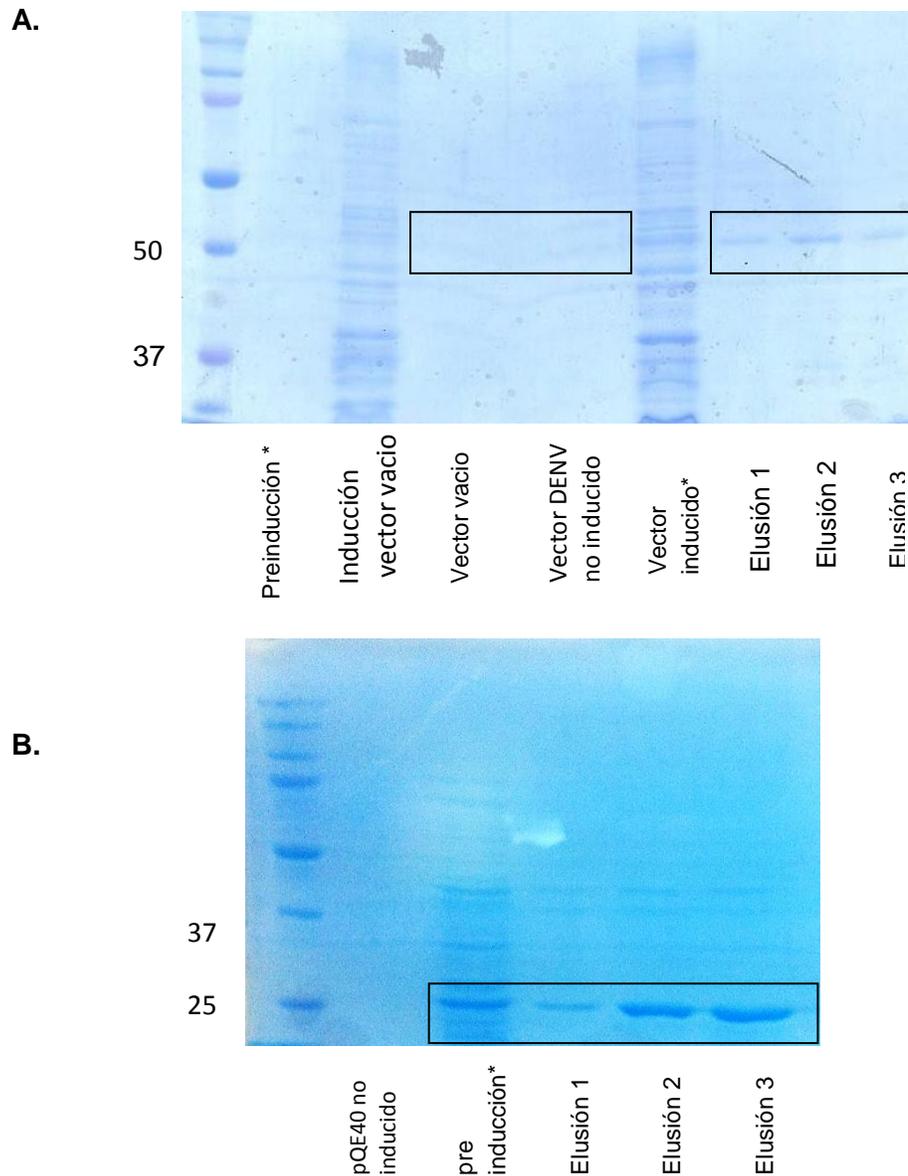
**Figura 22. Expresión pQE-80L-kan.** Resultado de inducción mostrando una banda sobre expresada en el plásmido control en ambas cepas con peso de 20-25 kDa (flechas blancas). En el caso de pQE-80-DENV1 se observa una banda de mayor intensidad de 40-42 kDa (flechas negras).

En el sistema con pQE-40 se observa sobreexpresión de DHFR en el tamaño esperado (20 kDa) confirmando condiciones propicias de expresión.

En caso del vector pQE-80-DENV1 muestra una banda de 40-42 kDa que contrasta del vector vacío así como del sistema con pQE-40. Siendo un sistema de expresión procarionte, falla en realizar algunas modificaciones postraduccionales, tales como la glucosilación la proteína E es una glucoproteína

de 53 kDa mediante expresión en eucariontes, sin embargo, al descartar la glucosilación, el tamaño de la proteína esperado es de 40 kDa aproximadamente.

Para confirmar la expresión de la proteína de envoltura se realiza purificación mediante cromatografía de afinidad. Figura 23.



**Figura 23. Purificación por cromatografía de afinidad.** Resultado de la purificación con kit Ni-NTA spin kit - Qiagen©. A.-DENV1. Se observa en caso del vector con DENV una banda de 40-42 kDa en las 3 eluciones de la resina en contraste al control negativo y sin inducir, el cual no se presenta dicha banda. B.- Control de purificación bacterias M15 con pQE-40 mostrando una banda de 20 kDa en las 3 eluciones. \*Muestra residual de la resina, proteínas que no se unieron a esta.

El resultado de purificación demuestra que la proteína expresada sí contiene la cola de histidinas preestablecida para la proteína de envoltura, la cual es afín a la columna de afinidad. Dicho resultado se respalda al contrastar de ambos controles (pQE-40 y no inducido) así como estar en el peso molecular esperado para un sistema de expresión procarionte. Este ensayo sugiere la expresión de la proteína de envoltura del virus del dengue.

## 5. Discusión

---

Ya que la proteína E de DENV es codificada por el genoma de un virus cuya evolución lo ha orientado a expresión en sistemas eucariontes, se recomienda emplear un sistema de expresión heterólogo de este linaje (células o levaduras). Sin embargo, para los fines de este proyecto, demanda un sistema con mayor rendimiento que en sistemas eucariontes (Amorim *et al.* 2010; Choi & Lee 2004).

En este trabajo se consideró aminorar las diferencias que la evolución ha orientado a la expresión en eucariontes al optimizar la secuencia de la proteína de envoltura del virus del dengue para su expresión en procariontes.

Existen referencias que refieren las proteínas expresadas en sistemas procariontes con su actividad biológica e inmunogénica pese la carencia de las modificaciones postraduccionales de un sistema eucarionte (James Samuelson, 2011, Choi & Lee 2004).

Agregar la etiqueta de histidinas permitió su purificación y para futuros experimentos, la secuencia de reconocimiento de enterocinasa; la cual elimina la secuencia de histidinas no propia de la proteína E, esto para mantener la mayoría de las características nativas de la misma (Young *et al.* 2012).

Referente a los sistemas y vectores empleados, los plásmidos constitutivos en bacterias (pBS-KS) no mostraron resultados efectivos, esto al evaluarse en western blot a la par con bacterias vacías.

Los plásmidos inducibles multicopia (pBC-SK) resultaron ineficientes debido a su lento crecimiento y no mostrar expresión correcta de la proteína de interés.

Está documentado que las bacterias BL21(DE3) poseen una expresión basal significativa de la RNA T7 polimerasa, por tanto, existe expresión basal de la proteína recombinante, esto resulta contraproducente cuando se trata de una proteína tóxica y cuando se trata de una proteína estructural se debe considerar bajo condiciones normales como tóxica (James Samuelson, 2011).

Pese a que el sistema de expresión produce el represor LacI es factible que debido a que se trata de un plásmido multicopia, es incapaz de controlar toda la expresión basal, causando un efecto tóxico en las bacterias, que se refleja como un crecimiento lento (James Samuelson, 2011).

Es posible que las bacterias que logran proliferar (a las 5 o 6 horas) hayan logrado degradar todo el antibiótico en el medio, llevando así a la expulsión del plásmido e incluso, no es recomendable uso de plásmidos pUC (multicopia) para expresar proteínas potencialmente tóxicas debido al estrés que causa en las bacterias. Esto es particularmente importante en sistemas con fuga. (James Samuelson, 2011).

De lo aprendido con los plásmidos pBS y pBC se consideró la utilización del plásmido pQE-80L-kan, que es un plásmido de copia única que coexpresa el

represor LacIQ. Esta represión en Cis asegura que la proporción represor:promotor sea efectiva debido a que la presencia exacta del promotor puede ser paralelamente reprimida por el represor en caso de carecer el inductor. Esta cualidad del vector pQE-80L-Kan es por lo tanto, inexistente en vectores pBC-KS.

Estas características mostraron expresión viable y controlada por inducción con IPTG. Los ensayos mostrados con este sistema de expresión mostraron producción y purificación de la proteína como se observa en el gel de poliacrilamida contrastando de los controles negativo y de inducción.

Pese a que en este trabajo no fue posible realizar la medición del rendimiento de la expresión de la proteína se extiende como perspectiva directa medir y escalar la producción así como evaluarse con anticuerpos monoclonales y policlonales (Anti-Envoltura y sueros de pacientes respectivamente).

La expresión de la DHFR en las cepas M15 y SG13009 es apreciablemente mayor con el plásmido pQE-40. Las cepas M15 y SG13009 contienen el plásmido pREP4 que confiere resistencia a kanamicina y expresan el represor LacIQ, esto las hace una cepa especialmente efectiva para expresar con vectores pQE. Sin embargo, no se empleó con pQE-80L-Kan debido a que comparten el mismo antibiótico de selección (en contraste a pQE-40 que es ampicilina). Esta característica permite crecimiento de las bacterias con o sin pQE-80L-kan dificultando su selección.

Para evaluar la expresión de la proteína de envoltura en M15 y/o SG13009 se propone como perspectiva subclonar la secuencia de E en pQE-40, aprovechando ser un vector multicopia en un sistema altamente controlado. Al ser multicopia asegura una mayor expresión de la proteína recombinante en contraste de pQE-80L-kan que es copia única, el plásmido pREP expresa en trans el represor LacIQ controlando la expresión firmemente evitando expresión no inducida de las proteínas y así reduciendo estrés de las células.

## 6. Conclusiones.

---

1.- Los vectores multicopia constitutivos e inducibles no resultaron eficientes para expresar la proteína de E de DENV.

2.- Los vectores pQE mostraron sobreexpresión detectable y objetiva de la proteína de envoltura sin embargo para los fines del proyecto se requiere escalar la producción proteica.

3.- La proteína E producida por el sistema pQE puede ser purificada por medio de columnas de afinidad de níquel, a las que se une la etiqueta de histidina presente en la proteína recombinante.

4.- Es necesario verificar la identidad antigénica de la proteína E recombinante mediante ensayos con anticuerpos monoclonales y policlonales vs. DENV1.

5.- La producción de la proteína E de DENV1 es teóricamente escalable en un sistema multicopia al subclonar en pQE-40.

# 7. Anexos

---

## Anexo 1

### Miniprep

#### ***Wizard® plus SV minipreps DNA purification System, Promega®.***

- 1.- Centrifugar el cultivo (12 a 18 horas) para obtener la pastilla bacteriana, 10 minutos a máxima velocidad o 13000 rpm.
- 2.- Decantar medio y resuspender el precipitado con 250 µL de Solución de resuspensión celular.
- 3.- Agregar 250 µL de solución de lisis y mezclar por inversión.
- 4.- Agregar 10 µL de proteasa alcalina y mezclar por inversión. Dejar reposar 5 minutos a temperatura ambiente.
- 5.- Agregar 350 µL de solución de neutralización. Mezclar por inversión.
- 6.- Centrifugar 10 minutos a máxima velocidad o 13000 rpm.
- 7.- Insertar columna en tubo de colección (incluido en el estuche). Decantar lisado sin dejar pasar precipitado.
- 8.- Centrifugar 1 minutos a máxima velocidad o 13000 rpm.
- 9.- Eliminar el filtrado y reinsertar columna.

- 10.- Agregar 750  $\mu$ L de solución de lavado y centrifugar 1 minutos a máxima velocidad o 13000 rpm
- 11.- Decantar filtrado, reinsertar y agregar 250  $\mu$ L de solución de lavado.
- 12.- Centrifugar 1 minuto a máxima velocidad o 13000 rpm, eliminar filtrado.
- 13.- Transferir columna a vial de 1.5 mL y agregar 100  $\mu$ L de agua destilada a la columna. Centrifugar 1 minuto a máxima velocidad y eliminar columna.
- 14.- Guardar a -20° C.

***Qiaprep® spin miniprep kit, qiagen®***

- 1.- Levantar colonia de medio sólido con antibiótico de selección e inocular en 2-5 mL de medio con el antibiótico de selección e incubar aproximadamente 8 horas a 37°C en agitación (300 rpm).
- 2.- Diluir medio inicial en 1/500 a 1/1000 en 3 mL de medio selectivo y crecer 37°C por aproximadamente 12-16 horas en agitación.
- 3.- Centrifugar a 6000 g por 15 minutos a 4°C para obtener una pastilla.
- 4.- Resuspender el precipitado en 250  $\mu$ L de buffer P1. (Recordar agregar RNAsa A contenido en el kit).

- 5.- Agregar 250  $\mu$ L de buffer P2, mezclar vigorosamente invirtiendo 4-6 veces e incubar a temperatura ambiente por 5 minutos. (la solución debe ponerse azul si se agregó LyseBlue).
- 6.- Agregar 350  $\mu$ L de buffer N3 y mezclar inmediatamente vigorosamente de 4 a 6 veces.
- 7.- Centrifugar a máxima velocidad 10 minutos (13000 rpm). Obtener sobrenadante conteniendo el DNA.
- 8.- El sobrenadante del paso anterior se debe pasar a una columna decantando o pipeteando.
- 9.- Centrifugar 30-60 segundos y eliminar el filtrado.
- 10.- Lavar la columna agregando 0.5 mL de buffer PB y centrifugar 30-60 segundos, descartar filtrado.
- 11.- Lavar columna agregando 0.75 mL de buffer PE y centrifugar 30-60 segundos.
- 12.- Descartar el filtrado y centrifugar a máxima velocidad por 1 minutos para eliminar el buffer residual.
- 13.- Colocar la columna en un tubo limpio de 1.5 mL y eluir agregando 50  $\mu$ L de buffer EB o agua en el centro de la columna, esperar 1 minuto y centrifugar 1 minuto.
- 14.- Guardar a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

## Anexo 2

### Células calcio competentes

(Protocolo de Xiaowei Li *Et al.* 2010)

- 1.- De un cultivo en placa, tomar una colonia y crecer toda la noche en 2-5 mL de caldo LB.
- 2.- Del cultivo, pasar a una dilución del 1% en caldo LB fresco (150 µL en 15 mL) y dejar en 37°C en agitación por 1.5 - 2 horas.
- 3.- Una vez alcanzada una D.O. de 0.35-0.45 transferir las bacterias a un tubo cónico de 50 mL helado.
- 4.- Centrifugar a 1000 g por 5 minutos a 4°C. Eliminar sobrenadante.
- 5.- Resuspender la pastilla en 10 mL de buffer mejorado (CaCl<sub>2</sub> 0.1 M 15% glicerol, frío) y dejar reposar 5 minutos en hielo. Repetir paso 4. (este paso se realiza 2 veces)
- 6.- Resuspender la pastilla en 3 mL de buffer mejorado helado y alicuotar 100 µL en viales de 1.5 mL. Guardar a -80°C.

## Anexo 3

### Transformación por choque térmico

(Basado en la técnica de Sambrook y Russell)

- 1.- Partiendo de un vial con bacterias calcio competentes (anexo 2). Agregar 10-100 ng de plásmido y dejar reposar en hielo por 15 minutos.
- 2.- Someter los viales a 42°C por 90 segundos. Pasar a hielo pasado este plazo por 2 minutos.
- 3.- Agregar 400 µL de medio LB fresco y dejar en agitación a 37°C por 30-60 minutos con agitación, permitiendo oxigenación.
- 4.- Extender 100 µL de las bacterias en agar LB con antibiótico y dejar crecer toda la noche.

## Anexo 4

### Subclonación

#### *Purificar banda del gel de agarosa.*

Partiendo del DNA plasmídico digerido con las enzimas de restricción correspondientes:

- 1.- Cortar la banda de interés del gel de agarosa (Nota: se recomienda usar buffer TAE; TBE requiere tratamiento de la muestra. consultar manual del escuche).
- 2.- Pasar el fragmento a un vial limpio previamente pesado y agregar 3 veces la solución NaI (incluida en el kit). 100 mg=100  $\mu$ L.
- 3.- Fundir la agarosa calentando a 55°C y agregar 10  $\mu$ L de Glass milk, agitar suavemente por 5-10 minutos a temperatura ambiente.
- 4.- Centrifugar a 16000 g por 15 segundos.
- 5.- Eliminar el sobrenadante y resuspender en 500  $\mu$ L de solución de lavado. Centrifugar a 16000 g por 15 segundos. Repetir lavado.
- 6.- Dejar secar el precipitado. (Nota: no fallar en secar la muestra, el etanol puede interferir en procesos ulteriores, incluido la ligación)
- 7.- Resuspender en 20  $\mu$ L de agua y centrifugar.
- 8.- Pasar el sobrenadante en un vial limpio. Se puede guardar a -20°C.

## Ligación

(Quick ligation kit)

- 1.- Partir de 50 ng de vector linearizado y agregar por lo menos 3 veces esta cantidad de la secuencia a insertar.
- 2.- Llegar a un volumen de 10  $\mu$ L con agua destilada.
- 3.- Agregar 10  $\mu$ L de buffer de ligación 2x (volumen final 20  $\mu$ L) .
- 4.- Agregar 1  $\mu$ L de Ligasa T4 y dejar en temperatura ambiente por 5 minutos.
- 5.- Guardar a -20° C o transformar.

## Anexo 5

### Purificación (buffers de Ni-NTA spin kit)

Los reactivos de los buffers van incluidos en el kit. Los buffers se deben preparar en el momento de usarse, se recomienda ajustar los volúmenes que el ensayo requiera.

#### **Buffer B (1 litro):**

100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>            13.8 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O (PM 137.99 g/mol)

10 mM tris.CL            1.2 g tris base (PM 121.1 g/mol)

8 M urea            480.5 g (PM 60.06 g/mol)

Ajustar pH a 8.0.

#### **Buffer C (1 litro):**

100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>            13.8 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O (PM 137.99 g/mol)

10 mM tris.CL            1.2 g tris base (PM 121.1 g/mol)

8 M urea            480.5 g (PM 60.06 g/mol)

Ajustar pH a 6.3.

**Buffer D (1 litro)**

100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>            13.8 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O (PM 137.99 g/mol)

10 mM tris.CL                1.2 g tris base (PM 121.1 g/mol)

8 M urea                        480.5 g (PM 60.06 g/mol)

Ajustar pH a 5.9.

**Buffer E (1 litro)**

100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>            13.8 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O (PM 137.99 g/mol)

10 mM tris.CL                1.2 g tris base (PM 121.1 g/mol)

8 M urea                        480.5 g (PM 60.06 g/mol)

Ajustar pH a 4.5.

## 8. Referencias

---

- Amorim, J.H. *et al.*, 2010. Refolded dengue virus type 2 NS1 protein expressed in *Escherichia coli* preserves structural and immunological properties of the native protein. *Journal of virological methods*, 167(2), pp.186–92.
- Azevedo, A.S. *et al.*, 2011. DNA vaccines against dengue virus type 2 based on truncate envelope protein or its domain III. *PloS one*, 6(7), p.e20528.
- Batra, G. *et al.*, 2011. Evaluation of envelope domain III-based single chimeric tetravalent antigen and monovalent antigen mixtures for the detection of anti-dengue antibodies in human sera. *BMC infectious diseases*, 11, p.64.
- Batra, G. *et al.*, 2010. Expression, purification and characterization of in vivo biotinylated dengue virus envelope domain III based tetravalent antigen. *Protein expression and purification*, 74(1), pp.99–105.
- Blacksell, S.D., 2012. Commercial dengue rapid diagnostic tests for point-of-care application: recent evaluations and future needs? *Journal of biomedicine & biotechnology*, 2012(1), p.151967.
- Chaiyaratana, W. *et al.*, 2009. Evaluation of dengue nonstructural protein 1 antigen strip for the rapid diagnosis of patients with dengue infection. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 64(1), pp.83–4.
- Choi, J.H. & Lee, S.Y., 2004. Secretory and extracellular production of recombinant proteins using *Escherichia coli*. *Applied microbiology and biotechnology*, 64(5), pp.625–35.
- Crill, W.D. *et al.*, 2009. Humoral immune responses of dengue fever patients using epitope-specific serotype-2 virus-like particle antigens. *PloS one*, 4(4), p.e4991.
- Das, D., Mongkolaungkoon, S. & Suresh, M.R., 2009. Super induction of dengue virus NS1 protein in *E. coli*. *Protein expression and purification*, 66(1), pp.66–72.
- Dejnirattisai, W. *et al.*, 2010. Cross-reacting antibodies enhance dengue virus infection in humans. *Science (New York, N. Y.)*, 328(5979), pp.745–8.
- Demain, A.L. & Vaishnav, P., 2009. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. *Biotechnology advances*, 27(3), pp.297–306.

- Dussart, P. *et al.*, 2006. Evaluation of an enzyme immunoassay for detection of dengue virus NS1 antigen in human serum. *Clinical and vaccine immunology : CVI*, 13(11), pp.1185–9.
- Goncalvez, A.P. *et al.*, 2007. Monoclonal antibody-mediated enhancement of dengue virus infection in vitro and in vivo and strategies for prevention. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(22), pp.9422–7.
- Groen, J. *et al.*, 2000. Evaluation of six immunoassays for detection of dengue virus-specific immunoglobulin M and G antibodies. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*, 7(6), pp.867–71.
- Guzman, M.G. *et al.*, 2010. Dengue: a continuing global threat. *Nature reviews. Microbiology*, 8(12 Suppl), pp.S7–16.
- Huang, K.J. *et al.*, 2000. Manifestation of thrombocytopenia in dengue-2-virus-infected mice. *The Journal of general virology*, 81(Pt 9), pp.2177–82.
- Jarman, R.G. *et al.*, 2011. Factors influencing dengue virus isolation by C6/36 cell culture and mosquito inoculation of nested PCR-positive clinical samples. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 84(2), pp.218–23.
- Kb, C. *et al.*, 2011. A comparative evaluation of dengue diagnostic tests based on single- acute serum samples for laboratory confirmation of acute dengue. , 33(1), pp.13–20.
- Kouri, G., 1996. MINIREVIEW Advances in Dengue Diagnosis. , 3(6), pp.621–627.
- Kumarasamy, V. *et al.*, 2007. Evaluation of a commercial dengue NS1 antigen-capture ELISA for laboratory diagnosis of acute dengue virus infection. *Journal of virological methods*, 140(1-2), pp.75–9.
- Lai, C.-Y. *et al.*, 2008. Antibodies to envelope glycoprotein of dengue virus during the natural course of infection are predominantly cross-reactive and recognize epitopes containing highly conserved residues at the fusion loop of domain II. *Journal of virology*, 82(13), pp.6631–43.
- Lanciotti, R.S. *et al.*, 1992. Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Journal of clinical microbiology*, 30(3), pp.545–51.
- Laoprasopwattana, K. *et al.*, 2007. Antibody-dependent cellular cytotoxicity mediated by plasma obtained before secondary dengue virus infections: potential involvement in early control of viral replication. *The Journal of infectious diseases*, 195(8), pp.1108–16.

- Libraty, D.H. *et al.*, 2002. High circulating levels of the dengue virus nonstructural protein NS1 early in dengue illness correlate with the development of dengue hemorrhagic fever. *The Journal of infectious diseases*, 186(8), pp.1165–8.
- Lin, H.-E. *et al.*, 2012. Analysis of epitopes on dengue virus envelope protein recognized by monoclonal antibodies and polyclonal human sera by a high throughput assay. *PLoS neglected tropical diseases*, 6(1), p.e1447.
- Ma, L. *et al.*, 2004. Solution structure of dengue virus capsid protein reveals another fold. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(10), pp.3414–9.
- Maldonado, L.M.T.P. *et al.*, 2007. Optimization of culture conditions for a synthetic gene expression in *Escherichia coli* using response surface methodology: the case of human interferon beta. *Biomolecular engineering*, 24(2), pp.217–22.
- Mergulhão, F.J.M., Summers, D.K. & Monteiro, G. a, 2005. Recombinant protein secretion in *Escherichia coli*. *Biotechnology advances*, 23(3), pp.177–202.
- Midgley, C.M. *et al.*, 2011. An in-depth analysis of original antigenic sin in dengue virus infection. *Journal of virology*, 85(1), pp.410–21.
- Modis, Y. *et al.*, 2003. A ligand-binding pocket in the dengue virus envelope glycoprotein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(12), pp.6986–91.
- Modis, Y. *et al.*, 2005. Variable Surface Epitopes in the Crystal Structure of Dengue Virus Type 3 Envelope Glycoprotein Variable Surface Epitopes in the Crystal Structure of Dengue Virus Type 3 Envelope Glycoprotein †.
- De Paula, S.O. & Fonseca, B.A.L. Da, 2004. Dengue: a review of the laboratory tests a clinician must know to achieve a correct diagnosis. *The Brazilian journal of infectious diseases : an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases*, 8(6), pp.390–8.
- Prince, H.E. & Matud, J.L., 2011. Estimation of dengue virus IgM persistence using regression analysis. *Clinical and vaccine immunology: CVI*, 18(12), pp.2183–5.
- Rodenhuis-Zybert, I. a, Wilschut, J. & Smit, J.M., 2010. Dengue virus life cycle: viral and host factors modulating infectivity. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 67(16), pp.2773–86.
- Sambrook and Russell, 2001. *Molecular Cloning, a laboratory manual*. Third edition.

- Simmons, M. *et al.*, 1998. Evaluation of recombinant dengue viral envelope B domain protein antigens for the detection of dengue complex-specific antibodies. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 58(2), pp.144–51.
- Swartz, J.R., 2001. Advances in *Escherichia coli* production of therapeutic proteins. *Current opinion in biotechnology*, 12(2), pp.195–201.
- Tan, L.C.M. *et al.*, 2010. Rapid purification of recombinant dengue and West Nile virus envelope Domain III proteins by metal affinity membrane chromatography. *Protein expression and purification*, 74(1), pp.129–37.
- Tang, K.F. & Ooi, E.E., 2012. Diagnosis of dengue: an update. *Expert review of anti-infective therapy*, 10(8), pp.895–907.
- Terpe, K., 2006. Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Applied microbiology and biotechnology*, 72(2), pp.211–22.
- Valdés, K. *et al.*, 2000. Human Dengue antibodies against structural and nonstructural proteins. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*, 7(5), pp.856–7.
- Vaughn, D.W. *et al.*, 2000. Dengue viremia titer, antibody response pattern, and virus serotype correlate with disease severity. *The Journal of infectious diseases*, 181(1), pp.2–9.
- Wahala, W.M.P.B. & Silva, A.M. De, 2011. The human antibody response to dengue virus infection. *Viruses*, 3(12), pp.2374–95.
- Watanabe, S. *et al.*, 2012. The magnitude of dengue virus NS1 protein secretion is strain dependent and does not correlate with severe pathologies in the mouse infection model. *Journal of virology*, 86(10), pp.5508–14.
- Wong, M.S. *et al.*, 2008. Reduction of acetate accumulation in *Escherichia coli* cultures for increased recombinant protein production. *Metabolic engineering*, 10(2), pp.97–108.
- Young, C.L., Britton, Z.T. & Robinson, A.S., 2012. Recombinant protein expression and purification: a comprehensive review of affinity tags and microbial applications. *Biotechnology journal*, 7(5), pp.620–34.
- Young, P.R. *et al.*, 2000. An antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay reveals high levels of the dengue virus protein NS1 in the sera of infected patients. *Journal of clinical microbiology*, 38(3), pp.1053–7.