

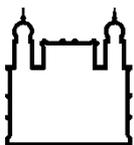
MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado no Programa de Pós-Graduação *Strictu-Sensu* em Biologia Parasitária

**EXPRESSÃO E CARACTERIZAÇÃO DE PROTEÍNA DE ENVELOPE GP140 DO
HIV PELO VÍRUS DA FEBRE AMARELA VACINAL 17D**

IASMIM SILVA DE MELLO

Rio de Janeiro
Abril de 2017



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

IASMIM SILVA DE MELLO

**EXPRESSÃO E CARACTERIZAÇÃO DE PROTEÍNA DE ENVELOPE GP140 DO
HIV PELO VÍRUS DA FEBRE AMARELA VACINAL 17D**

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências

Orientador (es): Prof. Dra Myrna C. Bonaldo

RIO DE JANEIRO

Abril de 2017

Mello, Iasmim Silva de.

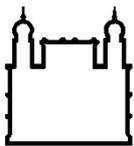
Expressão e caracterização de proteína de envelope gp140 do HIV pelo vírus da Febre Amarela 17D / Iasmim Silva de Mello. - Rio de Janeiro, 2017.
79 f.; il.

Dissertação (Mestrado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, 2017.

Orientadora: Myrna Cristina Bonaldo.

Bibliografia: f. 74-79

1. Vírus vacinal da Febre Amarela. 2. Vírus da imunodeficiência humana.
3. Proteína de envelope gp140. I. Título.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

IASMIM SILVA DE MELLO

**Expressão e caracterização de proteína de envelope gp140 do HIV pelo vírus
da Febre Amarela vacinal 17D**

ORIENTADORA: Prof. Dra. Myrna C Bonaldo

Aprovada em: 27/ 04/ 2017

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Eduardo Volotão de Melo- Presidente

Prof. Dra. Silvia Maria Baeta Cavalcanti

Prof. Dra. Ana Carolina Guimarães Ramos

Prof. Dr. Flávio Alves Lara

Prof. Dra. Claudia Lamarca Vitral

Rio de Janeiro, 27 de abril de 2017

Aos meus pais, Eliane e Wander (*in memoriam*)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer à Deus por ter me dado os fôlego de vida e alegria para prosseguir. Agradecer por em meio à tantos jovens sem esperança no futuro, Ele me deu plena convicção do que faço e amo e me sinto muito grata por isto.

Gostaria de agradecer à minha base, minha família que tanto me apoiou nessa etapa, à minha mãe que sempre batalhou para que eu tivesse a melhor educação possível e ao meu pai que mesmo não estando mais entre nós foi e sempre será essencial na minha formação.

Aos meus avós, Laurinda e Valdeemi, que sempre incentivaram meus estudos e que são os matriarcas da família. Vocês me ensinaram o que é cumplicidade e mesmo diante de um ano tão triste para toda nossa família, ano que perdemos vocês dois em uma semana, sei que estão orgulhosos de mim aonde quer que estejam.

Aos meus amigos Nathália, Andressa, Manuella, Pamella, Luana, Ingrid Michelle Wallace, Filipe, Wagner, Lucas, Flávio e Vinícius que sempre entenderam meus não e sempre torceram por mim. A amizade de todos vocês é essencial pra mim.

À minha família científica, todos do LABMOF: Adalgiza, Alexandre, Clara, Déberli, Elaine, Ieda, Lidiane, Matheus, Mariela, Marta, Nathália, Stephanie. Obrigada por toda ajuda, seja ela científica ou não, risadas e por fazerem do nosso laboratório um ambiente tão prazeroso de se trabalhar.

À minha orientadora, Dra. Myrna Bonaldo por ser uma verdadeira orientadora, por aguçar em mim o senso crítico e por ser uma cientista tão inspiradora, fazendo com que eu tenha a certeza de que meu lugar é na ciência.

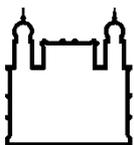
À plataforma tecnológica de sequenciamento (PDTIS).

Aos docentes e funcionários do programa de pós-graduação em Biologia Parasitária e aos membros da banca da defesa desta tese.

Às agências de fomento que permitiram a realização deste trabalho.

“A ciência humana de maneira nenhuma nega a existência de Deus. Quando considero quantas e quão maravilhosas coisas o homem compreende, pesquisa e consegue realizar, então reconheço claramente que o espírito humano é obra de Deus, e a mais notável.”

Galileu Galilei



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

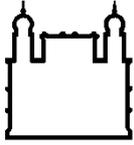
Expressão e caracterização de proteínas de envelope gp140 do HIV pelo vírus da Febre Amarela vacinal 17D

RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO/ Biologia Parasitária

IASMIM SILVA DE MELLO

A vacina contra a febre amarela (FA) é constituída pela partícula infecciosa do vírus FA da cepa 17D e atenuada por meio de diversas passagens em células de tecidos e hospedeiros diferentes. A vacina é altamente eficaz e segura, pois induz a uma resposta robusta e duradoura no hospedeiro e apresenta uma baixa taxa de efeitos adversos em vacinados sendo então considerada uma das vacinas mais bem desenvolvidas propostas até hoje. Somando-se a estas características, a cepa 17D tem sido visto como um vetor promissor para a expressão de proteínas heterólogas. Nosso laboratório utiliza uma estratégia única que consiste na inserção de cassetes heterólogos na região intergênica E/NS1 do genoma viral de FA. O Vírus da imunodeficiência humana do tipo 1 (HIV-1) é um dos vírus responsáveis pela maior pandemia vista até hoje. Diversos esforços têm sido feitos para o controle da doença, porém o tratamento ainda é feito através da terapia antirretroviral (HAART). Entretanto ainda é possível que haja falha na terapia, o que justifica a necessidade do desenvolvimento de uma vacina. Neste trabalho utilizamos a plataforma de inserção de cassetes heterólogos na região intergênica E/NS1 para expressar as proteínas do envelope, gp41, gp120 e, a associação destas, a gp 140 do HIV-1. A clonagem plasmidial inicial para a obtenção de cDNA viral recombinante para a forma nativa ou trimérica da gp140 foi inviável. Entretanto, conseguimos vírus FA recombinantes para gp 120 e gp 41, que apresentaram grande instabilidade genética. Adicionalmente, a detecção de um painel de anticorpos monoclonais específicos para epítomos conformacionais da gp120 detectaram este antígeno em células Vero indicando que a proteína expressa pelo vírus FA adota alguma conformação semelhante à forma nativa. Estes resultados substanciam os estudos de aprimoramento do vetor FA 17D para expressão de antígenos de patógenos humanos visando seu uso para o desenvolvimento de novas vacinas.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Expression and characterization of envelope protein gp140 of HIV by the Yellow Fever virus vaccine 17D

ABSTRACT

MASTER DISSERTATION BIOLOGIA PARASITÁRIA

IASMIM SILVA DE MELLO

The yellow fever (FA) vaccine consists in the infectious particle of the FA virus of strain 17D and attenuated by means of several passages in different tissue cells and hosts. The vaccine is highly effective and safe inducing a robust and long-lasting response in the host and presents a low rate of adverse effects in vaccinates and is considered one of the best developed vaccines ever proposed. In addition to these characteristics, strain 17D has been seen as a promising vector for the expression of heterologous proteins. Our laboratory uses a unique strategy consisting of the insertion of heterologous cassettes in the intergenic E / NS1 region of the viral genome of YF. The human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) is one of the viruses responsible for the largest pandemic seen today. Several efforts have been made to control the disease, but the treatment is still done through antiretroviral therapy (HAART). However, it is still possible that therapy fails, which justifies the need for the development of a vaccine. In this work we used the insertion platform of heterologous cassettes in the intergenic E / NS1 region to express the envelope proteins, gp41, gp120 and, the association thereof, with HIV-1 gp140. Initial plasmid cloning to obtain recombinant viral cDNA for the native or trimeric form of gp140 was not feasible. However, we obtained recombinant FA viruses for gp 120 and gp 41, which showed great genetic instability. In addition, detection of a panel of monoclonal antibodies specific for conformational epitopes of gp120 detected this antigen in Vero cells indicating that the protein expressed by the FA virus adopts some conformation similar to the native form. These results substantiate the enhancement studies of the vector FA 17D for the expression of antigens of human pathogens aiming their use for the development of new vaccines.

ÍNDICE

RESUMO	7
ABSTRACT	8
1 INTRODUÇÃO	16
1.1 A febre amarela e a vacina 17D	16
1.2 Estrutura do genoma e da partícula viral	18
1.2.1 Proteínas estruturais.....	19
1.2.2 Proteínas não estruturais.....	22
1.3 Ciclo replicativo dos flavivírus	23
1.4 Vacinas recombinantes utilizando o vírus FA 17D como vetor	24
1.5 Expressão de proteína de envelope de HIV-1	28
2 JUSTIFICATIVA	33
3 OBJETIVOS	34
3.1 Objetivo Geral	34
Estabelecer uma plataforma vacinal baseada no o vírus da FA 17D para a expressão de proteínas do envelope de HIV-1	34
3.2 Objetivos Específicos	34
4 MATERIAL E MÉTODOS	35
4.1 Células	35
4.2 Clone infeccioso	35
4.2.1 Clonagem molecular.....	38
4.2.2 Obtenção do cDNA molde	39
4.2.3 Regeneração dos vírus recombinantes	40
4.3 Extração de RNA	41
4.4 RT-PCR	41
4.5 Eletroforese de DNA em gel de agarose	42
4.6 Sequenciamento nucleotídico	42
4.7 Produção de estoques virais (2P)	43
4.8 Titulação viral	43
4.9 Infecção de células	45
4.10 Estabilidade genética	45
4.11 Microscopia de fluorescência	46

5 RESULTADOS	48
5.1 Desenho do clone infeccioso para expressão de Env	48
5.2 Construção dos vírus recombinantes	49
5.3 Regeneração viral	52
5.4 Caracterização viral	53
5.4.1 Estabilidade genética.....	54
5.4.2. Detecção de epitopos de Env de HIV-1 por microscopia de fluorescência.....	64
6. DISCUSSÃO	67
7 CONCLUSÕES	71
8 PERSPECTIVAS	72
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1- Organização genômica dos flavivírus e a poliproteína viral.	20
Figura 1.2- Organização da partícula viral de flavivírus.	21
Figura 1.3- Vista frontal do ectodomínio das proteínas E de DENV em relação à partícula viral.	22
Figura 1.4- Ciclo replicativo dos flavivírus.	25
Figura 1.5- Sistema de dois plasmídeos que constituem o clone infeccioso do vírus FA 17D.	27
Figura 1.6- Modelo de expressão de proteínas heterólogas na região intergênica E/NS1.	28
Figura 1.7- Esquemas representativos das plataformas de expressão utilizadas para inserção de antígenos heterólogos entre E/NS1.	29
Figura 1.8- Representação esquemática do genoma proviral do HIV 1 e 2.....	30
Figura 1.9- Partícula viral de HIV-1.	33
Figura 4.1- Placa de 24 poços utilizada na titulação viral.	45
Figura 5.1- Esquema dos vírus recombinantes a serem construídos.	50
Figura 5.2- Fluxograma de todas as etapas existentes na construção dos clones infecciosos.	51
Figura 5.3- Resultados de algumas etapas da construção dos vírus recombinantes.	52
Figura 5.4- Aparecimento de CPE após eletroporação de células Vero com RNA viral dos vírus recombinantes.	54
Figura 5.5- Perfil eletroforético em gel de agarose dos amplicons obtidos de amostras de vírus recombinantes de primeira passagem e segunda passagem.	55
Figura 5.6- Análise da estabilidade genética dos vírus FA recombinantes para fragmentos de <i>env</i>	56
Figura 5.7- Esquema das deleções encontradas nos vírus recombinantes consatruídos.	60
Figura 5.8- Previsão dos domínios transmembranares nas variantes virais obtidas pela passagem seriada em células Vero dos vírus recombinantes construídos.	64
Figura 5.9- Detecção por imunofluorescência indireta de gp120 de <i>env</i> do vírus HIV-1 em células Vero infectadas pelo vírus FA recombinante para gp120.	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1- Reação de ligação no plasmídeo comercial pGEM-T easy e especificações dos reagentes.	37
Tabela 4.2- Condições para eletroporação em bactérias <i>Escherichia coli</i> , da linhagem Sure.	38
Tabela 4.3- Condições de PCR	38
Tabela 4.4- Iniciadores utilizados no sequenciamento.	40
Tabela 4.5- Condições para eletroporação de células Vero.	42
Tabela 4.6- Anticorpos utilizados na microscopia de fluorescência como alvo a gp120.	48
Tabela 5.1- Tabela representativa dos vírus construídos.	53
Tabela 5.2- Anticorpos doados pelo NIH AIDS ReagentProgram utilizados na marcação de imunofluorescência.....	65

LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

%	percentual
µg	micrograma
µL	microlitro
µM	micromolar
Ω	resistência
°C	Grau Celsius ou centígrado
17D	Cepa vacinal do vírus da Febre Amarela
17DD	Vacina de Febre Amarela produzida por Bio-Manguinhos –
∞	Infinito
aids	Síndrome da imunodeficiência adquirida
ATCC	Coleção Americana de Culturas e Depósitos. Do inglês:"American Type Culture Colletion"
C-	Controle negativo
C+	Controle positivo
CD	Cluster of differentiation
CDC	Centro de controle de doenças, do inglês:"Centers for Disease Control"
cDNA	Ácido desoxiribonucléico complementar
CMC	Carboximetilcelulose
CO ₂	Gás carbônico
CPE	Efeito citopático, do inglês: "citopaticeffect"
DENV	Vírus Dengue
DEPC	Dietilpirocarbonato
E	Proteína de envelope
E	Exponencial
EB	Tampão de eluição, do inglês: "Eluition Buffer"
Env	Envelope
<i>et al.</i>	e colaboradores
FA	Febre Amarela
Fiocruz	Fundação Oswaldo Cruz
<i>g</i>	Gravidade
GFP	Proteína verde flourescente de <i>Aequorea Victoria</i> , do inglês: "Green Fluorescent Protein"

gp	Glicoproteína
H1	Haste 1
H2	Haste 2
H ₂ O	Fórmula química da Água
HAART	Terapia antirretroviral do inglês, highlyactive antirretroviral therapy
HIV	Vírus da Imunodeficiência humana tipo 1, do inglês: "Humanimmunodeficient vírus"
IFN	Interferon
IL-1	Interleucinato tipo 1
JEV	Vírus da Encefalite Japonesa, do inglês: "Japanese encephalitis virus "
Kb	Kilobases
kDa	Kilodalton
LB	Luria Bertani
mf	Capacitância
min	Minutos
Mock	Célula não infectada
MOI	Multiplicidade de infecção,do ingles: "Multiplicity of Infection"
NaHCO ₃	Bicarbonato de sódio
NIH	Instituto Nacional de Saúde, do inglês NationalInstitutesofHealth
NS	Não estrutural
NTT	Sítio de <i>N</i> -glicosilação
OGM	Organismos geneticamente modificados
PA	Passagem A
pb	Pares de base
PB	Passagem B
PBS	Tampão fosfatoalcalino, do inglês: "Phosphate Buffer Saline"
PCR	Reação em cadeia da polimerase, do inglês: "Polymerase chain reaction"
pH	Potencial hidrogeniônico
prM	Precursor da proteína de membrana
RE	Retículo endoplasmático
RNA	Ácido ribonucléico

RT-PCR	Transcrição reversa seguida de reação em cadeia pela polimerase
s	Segundos
SIV	Vírus da Imunodeficiência Símia, do inglês: "Simian immunodeficient vírus"
SLEV	Vírus da Encefalite São Luis, do inglês: "Saint Louis virus"
Sure	Células <i>Escherichia coli</i> competentes, do inglês: "Stop Unwanted Rearrangement Events"
TAE	Tampão tris-acetato-EDTA
TBEV	Vírus da encefalite transmitida por carrapato, do inglês: "Tick-bornencephalitis"
TGN	Rede <i>trans</i> - Golgi
TM	Transmembrana
TRLs	Receptores do tipo Toll
U	Unidades internacionais
UTR	Região não traduzida, do inglês: "untranslated region"
v	Voltagem
VFA	Vírus da febre amarela
WHO	World Health Organization
WNV	Vírus do Oeste do Nilo", do inglês: "West Nile Virus"

1 INTRODUÇÃO

1.1 A febre amarela e a vacina 17D

A história antiga da febre amarela (FA) é incerta, devido à inexatidão nas descrições das características clínicas e epidemiológicas. Carter e colaboradores (1931) encontraram o registro mais antigo em um manuscrito maia descrevendo uma epidemia com hematêmese (vômito negro, 'xekik') em Yucatán em 1648, e sugeriram que tanto o vírus quanto o vetor mosquito foram introduzidos na África durante o tráfico de escravos.

Até o século 20, acreditava-se que a febre amarela era um "miasma" transmitido pelo ar, proveniente da sujeira, esgoto e matéria orgânica em decomposição. E a comprovação da hipótese de transmissão por mosquitos, que já havia sido sugerida antes por vários médicos, foi introduzida em 1900 quando Walter Reed e colaboradores realizaram experimentos em voluntários humanos em Cuba demonstrando que o agente era um vírus filtrável transmitido por mosquitos *Aedes aegypti* (Reed, 1911).

O vírus da FA pertence à família *Flaviviridae* e ao gênero *Flavivirus*, sendo o vírus protótipo do mesmo. Esse gênero é formado por aproximadamente 80 vírus, sendo a maioria causadores de doenças transmitida por artrópodes e que provocam sintomas como febre, encefalite e febre hemorrágica (Lindenbach & Rice, 2001). Entre os membros deste gênero, os principais de importância médica são o vírus da dengue (DENV- do inglês: *Dengue vírus*), o vírus da encefalite japonesa (JEV – do inglês *Japanese encephalitis vírus*), o vírus da encefalite transmitida por carrapato (TBEV- do inglês *Tick-born encephalitis vírus*), o vírus do Oeste do Nilo (WNV – do inglês *West Nile vírus*), o vírus da encefalite Saint Louis (SLEV – do inglês *Saint Louis encephalitis vírus*) e o vírus da Febre Amarela (YFV – do inglês *Yellow fever vírus*).

O espectro clínico da FA é muito amplo podendo variar de assintomático ou sintomas inespecíficos como febre alta, calafrios, dor de cabeça, até a forma grave onde podem ocorrer insuficiências hepáticas e renais, icterícia e manifestações hemorrágicas podendo levar ao óbito (Monath, 2001). E a taxa de mortalidade é estimada entre 20 e 60% (Monath & Vasconcelos, 2015).

A FA é uma infecção zoonótica, mantida na natureza por meio de dois ciclos: o urbano, que envolve o mosquito *Aedes aegypti* e o silvestre através de outras espécies de *Aedes* spp, na África e por mosquitos dos gêneros *Haemagogus* e *Sabethes*, no Brasil, que transmitem o vírus para espécies susceptíveis de primatas não humanos e o homem (Monath & Vasconcelos 2015).

Diante da grande dificuldade no controle do mosquito vetor principalmente nas áreas silvestres, a forma mais efetiva de controle da doença é a vacina constituída pela cepa viral FA atenuada 17D, desenvolvida por Max Theiler em 1937 (Theiler & Smith, 1937). A vacina foi feita através de uma atenuação empírica pela passagem de um vírus FA selvagem isolado por Adrian Stokes (Stokes *et al.*, 1928) a partir de um paciente africano chamado Asibi, nome o qual foi atribuído a cepa viral selvagem. A atenuação viral foi realizada em vários tecidos diferentes, incluindo tecidos embrionários de camundongos, de galinha e galinhas desnervadas na tentativa de reduzir o neurotropismo viral. Testes em animais demonstraram que após essas diversas passagens em diferentes sistemas de cultivo, o vírus havia perdido o viscerotropismo, o neurotropismo e a capacidade de se replicar em mosquitos (Lloyd *et al.*, 1936). A partir de passagens independentes do vírus FA cepa 17D foram produzidas as subcepas 17DD e 17D-204 que também são utilizadas na formulação de vacinas.

A vacina é altamente eficaz e tem sido o principal método de controle da doença em regiões endêmicas nos últimos 70 anos. É capaz de induzir resposta duradoura com administração em dose única em cerca de 90% dos vacinados (Monath & Vasconcelos, 2015). É produzida por meio do sistema de lote semente para assegurar sua estabilidade genética e segurança. Cada lote é submetido a testes de neurotropismo e viscerotropismo em primatas não-humanos antes de ser liberado para a população (WHO, 2010 a).

Apesar de sua segurança, casos de eventos adversos graves, neuro- e viscerotrópicos decorrentes da vacinação, incluindo encefalites, síndrome de Guillain-Barré e doenças autoimunes têm sido descritos (Oliveira *et al.*, 2014); porém, esses casos parecem estar associados à fatores genéticos do hospedeiro e não à fatores virais que revertessem a atenuação (Galler *et al.*, 2001).

1.2 Estrutura do genoma e da partícula viral

O genoma dos flavivírus é composto por uma molécula de RNA fita simples de polaridade positiva, codificando uma única fase aberta de leitura, flanqueada por regiões não codificantes 5'-UTR e 3'-UTR (Lindenbacht *et al.*, 2001).

O genoma do vírus FA possui 10.862 nucleotídeos e codifica para uma única poliproteína que contém segmentos hidrofílicos e hidrofóbicos, que quando transmembranares atravessam a membrana do retículo endoplasmático (RE) adquirindo uma topologia particular (Figura 1.1). A poliproteína precursora contém três proteínas estruturais: capsídeo ou C, pré-membrana ou M e envelope ou E, além de sete proteínas não-estruturais (NS): NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5 (Chambers & Monath, 2003).

O processamento da poliproteína viral é feito por uma peptidase sinal (signalase) da célula hospedeira, responsável pela clivagem no lúmen do RE nos sítios entre C-prM, prM-E, E-NS1 e NS4A-NS4B, e furina (clivagem prM/M) e pela protease serínica viral (complexo proteolítico viral), composta pelas proteínas NS2B/NS3, que se autocliva no citoplasma celular e inicia a clivagem de outros sítios voltados para a face citoplasmática, situados entre NS2A-NS2B, NS2B-NS3, NS3-NS4A, NS4A-NS4B e NS4B-NS5 e é responsável pela maturação das proteínas virais (Lindenbacht *et al.*, 2001).

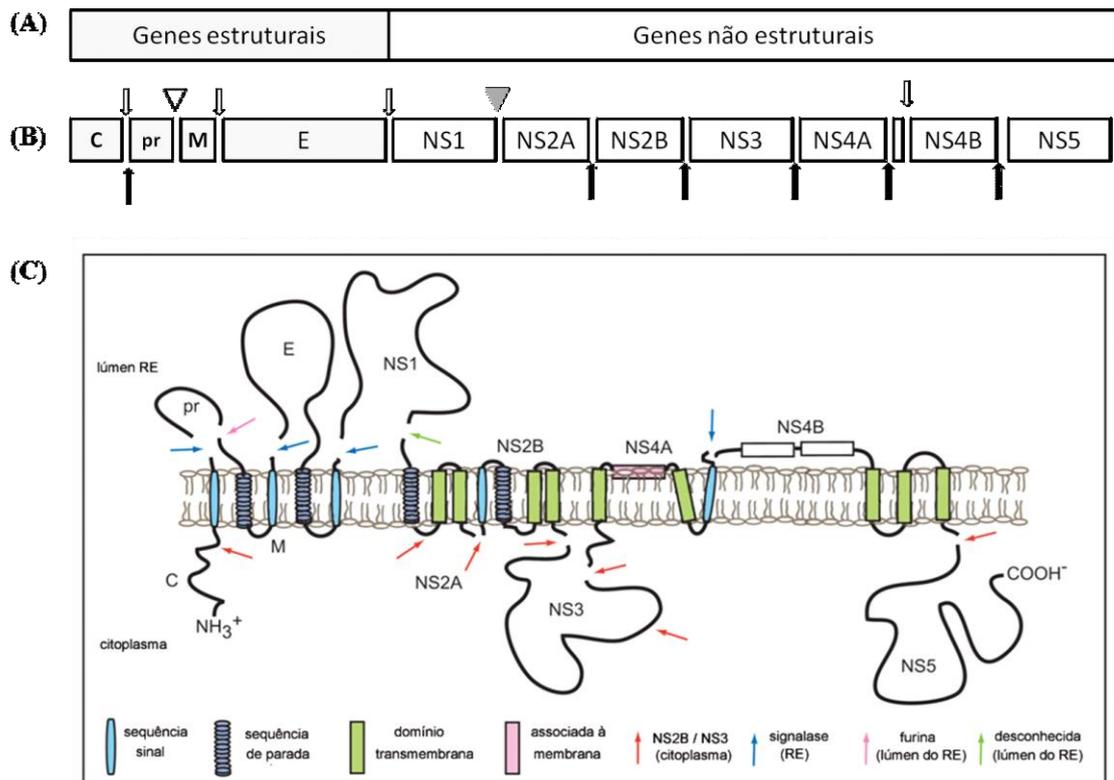


Figura 1.1 Organização genômica dos flavivírus e a poliproteína viral.

(A) O genoma viral é formado por ssRNA⁺ composto por genes que codificam proteínas estruturais na porção 5'-terminal, seguido por genes que codificam proteínas não estruturais. (B) A poliproteína precursora de aproximadamente 3.400 aminoácidos é processada proteoliticamente por proteases virais no citoplasma e por proteases celulares no lúmen do RE. Setas pretas indicam os sítios de clivagem pela proteína NS2B/NS3 na face citoplasmática. As setas claras indicam os sítios de clivagem pela signalase celular no lúmen do RE. O triângulo claro indica o ponto de clivagem pela protease furina e o triângulo escuro representa a clivagem por uma protease celular de origem ainda não elucidada. (C) Topologia de membrana das proteínas estruturais e não estruturais de flavivírus (Adaptado de Perera & Kuhn, 2008).

1.2.1 Proteínas estruturais

A proteína do capsídeo ou C, primeira proteína do N-terminal da poliproteína precursora, é uma proteína de características básicas com aproximadamente 12 kDa, pouco conservada entre os flavivírus e está envolvida com o empacotamento do RNA genômico, formando o nucleocapsídeo viral. Existem evidências de que a clivagem coordenada na junção prM/C é crucial na montagem da partícula viral. Sabe-se que a clivagem da proteína C no lúmen do RE é ineficiente caso não haja uma clivagem prévia desta proteína na porção citoplasmática ancorada à membrana

do RE, além disso, esse processo de clivagem pode estar ligado à morfogênese viral (Lobigs *et al.*, 2010).

A proteína de membrana (prM) é uma proteína glicosilada de 19kDa que se enovela rapidamente no interior do RE e funciona como uma chaperona para auxiliar no enovelamento da proteína E. Ela se associa à proteína E, formando heterodímeros e desempenha a importante função de proteger o peptídeo de fusão da proteína E, impedindo que essa proteína se ligue às membranas celulares quando o vírus ainda é imaturo. Durante a via secretória, a protease celular do tipo furina cliva a proteína prM dando origem aos homodímeros pr e M isolados, rompendo assim o heterodímero prM/E. O fragmento pr permanece associado ao peptídeo de fusão até que a partícula viral seja totalmente liberada da célula. O fragmento M se mantém associado à proteína E, constituindo assim o envelope viral da partícula madura (Figura 1.2) (Yu *et al.*, 2008).

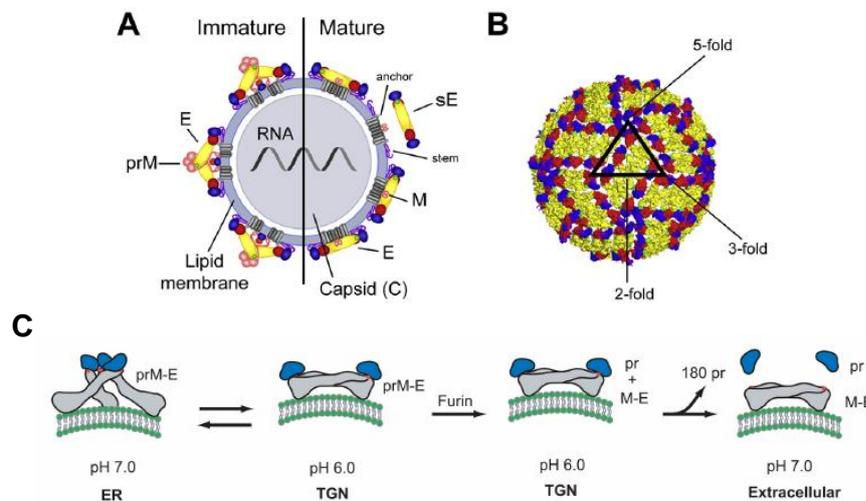


Figura 1.2 Organização da partícula viral de flavivírus

A) Partícula viral imatura (esquerda) e madura (direita). B) Esquema da estrutura cristalográfica do homodímero da proteína E, evidenciando os três domínios: I em vermelho; II em amarelo; III em azul; C) Esquema sobre o rearranjo das proteínas prM e E durante a maturação da partícula viral. O fragmento pr (em azul) protege o peptídeo de fusão (em vermelho) da proteína E (em cinza) até que a partícula viral seja liberada da célula hospedeira (Adaptado de Perera & Kuhn, 2008; Heinz & Stiasny, 2012).

A proteína de envelope E tem aproximadamente 55 kDa e é o principal constituinte do envelope de flavivírus. Nas partículas virais infecciosas, ela encontra-se na forma de homodímeros e em cada monômero apresenta três domínios protéicos definidos que formam uma estrutura com orientação “cabeça-cauda”, que se dispõe paralelamente à superfície do virion. Essa região é denominada ectodomínio da proteína E (Figura 1.3), e permanece conectada à proteína E através da haste-âncora (Rey *et al.*, 1995; Allison *et al.*, 1999). Cada subunidade do ectodomínio consiste em três domínios, ricos em fitas β -pregueadas: domínio I, que contém o N-terminal e é o domínio central da proteína E; domínio II, constitui uma estrutura alongada responsável pela dimerização, que apresenta o peptídeo de fusão em sua extremidade e domínio III, que possui uma estrutura semelhante à imunoglobulina e contém o sítio de ligação a receptores celulares (Mukhopadhyay *et al.* 2005).

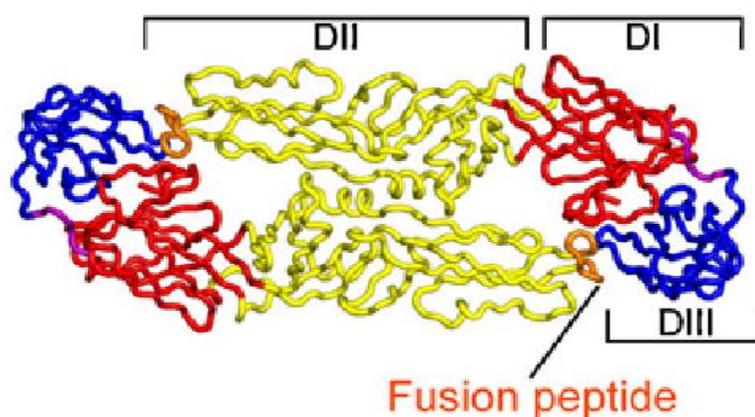


Figura 1.3 Vista frontal do ectodomínio da proteína E do vírus da Dengue (DENV) em relação à partícula viral. Os resíduos de aminoácidos 1-395 estão representados em um monômero, sendo os três domínios evidenciados; domínio I em vermelho; domínio II em amarelo; domínio III em azul; e o peptídeo de fusão em laranja. (Adaptado de Perera & Kuhn, 2008)

A proteína E desempenha um importante papel na entrada do vírus na célula hospedeira, pois é responsável pela ligação a receptores celulares e fusão do envelope viral à membrana (Lindenbach *et al.*, 2007).

As proteínas E e prM possuem no C-terminal uma porção hidrofóbica constituindo duas transmembranas (TM1 e TM2) formadas por α -hélices antiparalelas (Figura 1.1C). Durante a morfogênese viral, tanto a TM1 quanto TM2 ancoram essas proteínas na membrana do RE com seus ectodomínios voltados para fora, desempenhando assim um importante papel na montagem da partícula

viral (Op De Beecket *et al.*, 2004). Sabe-se que além da clivagem da prM, a transição da forma imatura para a forma madura da partícula viral exige mudanças conformacionais na proteína E, dependentes de pH (Bressanelli *et al.*, 2004). Na forma imatura, o envelope apresenta espículas formadas por estruturas triméricas de heterodímeros prM/E. Na forma madura, o heterodímero prM/E é rompido e a proteína E se reorganiza em homodímeros, estabilizados horizontalmente na superfície viral (Figura 1.2A-C). A maturação da partícula viral é um evento essencial para a formação de partículas infecciosas (Zhang *et al.*, 2004; Perera & Kuhn, 2008).

1.2.2 Proteínas não estruturais

A proteína NS1 é uma proteína glicosilada de aproximadamente 46 kDa, é encontrada associada ao RE ou à superfície celular. Ela também pode ser detectada no meio extracelular uma vez que no processamento da poliproteína viral pode ser gerada sem a região âncora transmembrana no lúmen do RE. O seu papel na replicação ainda não foi elucidado, entretanto ela é relevante para o sucesso da replicação (Mackenzie *et al.*, 1996; Muylaert *et al.*, 1997) e para a virulência do vírus (Pletnev *et al.*, 1993). Sabe-se que tanto a NS1 secretada quanto a que associa à membrana são altamente imunogênicas e tanto elas quanto os anticorpos produzidos parecem ter um papel crucial na patogênese (Schlesinger *et al.*, 1977; Henchal *et al.*, 1988; Falgout *et al.*, 1990; Avirutnan *et al.*, 2006).

As proteínas NS2A, NS2B, NS4A e NS4B são pequenas e hidrofóbicas e possuem sequências mais heterogêneas entre os flavivírus. A proteína NS2A é transmembranar encontrada no complexo replicativo, importante na montagem de novas partículas virais (Liu *et al.*, 2003; Leung *et al.*, 2008). Esta proteína tem propriedade de ligação ao RNA e, portanto, tem sido proposto que a mesma desempenharia um papel em conduzir o RNA genômico para o nucleocapsídeo (Murray *et al.*, 2008). A proteína NS2B tem uma região central altamente carregada e conservada flanqueada por segmentos hidrofóbicos (Falgout *et al.*, 2011). Ela exerce função associada à proteína NS3, formando um domínio enzimático serino-protease responsável pelo processamento de todas as proteínas estruturais e não estruturais. Além da função proteolítica, sugere-se que a interação NS2B-NS3 é responsável pela localização da maquinaria de replicação nas membranas celulares (Rice *et al.*, 1996).

A NS3 é uma proteína grande com cerca de 70 kDa e de suma importância na replicação viral. É constituída de dois domínios, um helicase com atividade

fosfatase, que tem como função desenrolar a dupla fita de RNA, e o outro serino-protease que atua no processamento da poliproteína viral, clivando-a nas junções C/C âncora, NS2A/NS2B, NS2B/NS3, NS3/NS4A, NS4A/NS4B, NS4B/NS5, assim como nas regiões internas das proteínas C, NS2A, NS4A e NS3 (Valle *et al.*, 1998; Falgout *et al.*, 1998).

A NS4A apresenta co-localização com as proteínas NS1, NS3 e NS5 sugerindo que a mesma funcione como uma região de ancoragem do complexo replicativo (Lindebacht *et al.*, 2007). Já NS4B faz parte do complexo replicativo interagindo com o domínio helicase da NS3, aumentando sua atividade, pois ajuda na dissociação da NS3 com a fita simples de RNA (Strottmann *et al.*, 2013)

Por fim, a NS5, a maior e mais conservada proteína viral entre os flavivírus, exerce funções de guaniltransferase, metiltransferase e RNA polimerase dependente de RNA. Ela também interage com a NS3 agindo na replicação e maturação viral, na interação com proteínas de transporte vesicular, na evasão da resposta imune e na homeostase celular favorecendo a replicação viral (Le Breton *et al.*, 2011; Morrison *et al.*, 2012).

1.3 Ciclo replicativo dos flavivírus

Os flavivírus ligam-se à superfície da célula hospedeira e penetram através de endocitose mediada por receptores (Figura 1.4). Após essa etapa, a formação do endolisossoma promove acidificação no interior da vesícula, que acarreta mudança conformacional nas proteínas de envelope, reorganização dos homodímeros da proteína E em trímeros e exposição do seu peptídeo de fusão. Estes eventos forçam a aproximação do envelope viral com a membrana endossomal e consequente fusão de ambas bicamadas lipídicas, resultando na liberação do nucleocapsídeo no citoplasma da célula (Bressanelli *et al.*, 2004).

Após a tradução e processamento da poliproteína precursora viral, a proteína C, localizada na face citoplasmática da membrana do RE, associa-se às moléculas nascentes de RNA genômico, formando novos nucleocapsídeos. Após a clivagem do peptídeo sinal da proteína prM no lúmen do RE, esta proteína, associada à proteína E, causa o brotamento do nucleocapsídeo para o interior do RE, formando a partícula viral envelopada imatura. Estas partículas trafegam pela via secretora da célula, onde sofrem modificações como mudanças conformacionais no heterodímero prM/E dependentes do baixo pH das vesículas do *trans*-Golgi, que expõe o sítio de

clivagem por furina da proteína prM e permite a liberação do peptídeo pr, resultando na formação da partícula viral madura, sendo liberada da célula por exocitose (Figura 1.4) (Mukhopadhyay *et al.*, 2005).

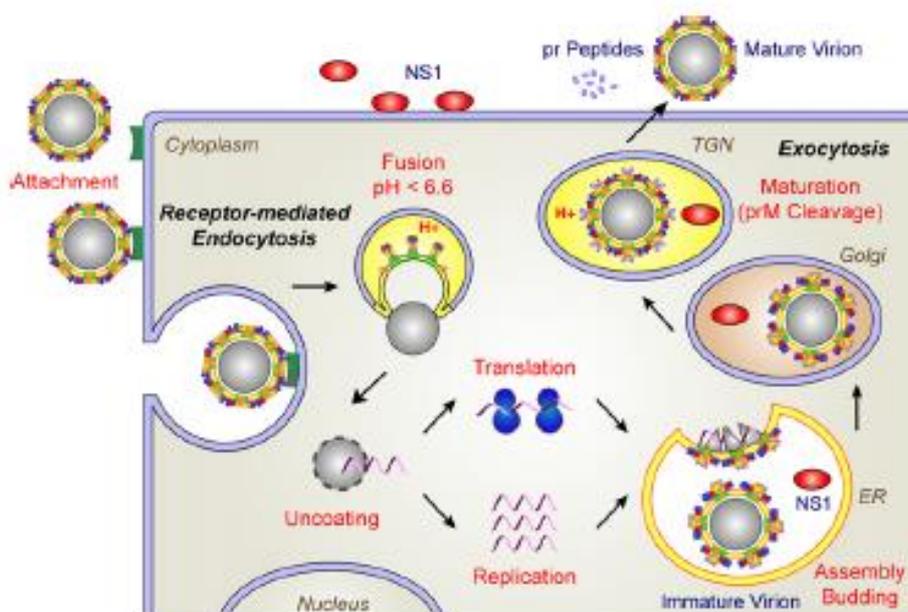


Figura 1.4 Ciclo replicativo dos flavivírus. As partículas virais penetram por endocitose mediada por receptores e, devido à acidificação no endolisossoma, ocorre uma mudança conformacional na proteína E, que leva à fusão do envelope viral com a membrana desta vesícula. O RNA genômico é liberado no citoplasma e traduzido nas proteínas virais. A replicação do RNA genômico gera novas cópias do RNA, que são empacotadas em nucleocapsídeos formados no citoplasma da célula. O nucleocapsídeo brota para o interior do retículo endoplasmático, formando a partícula viral envelopada imatura, que é transportada pela via secretora da célula. Na rede do *trans*-Golgi (TGN) ocorre a clivagem da proteína prM por furina e as modificações necessárias para a formação da partícula viral madura, que é então liberada da célula por exocitose. A proteína não estrutural NS1 é liberada para o meio extracelular em associação à membrana plasmática ou secretada (Heinz & Stiasny, 2012).

1.4 Vacinas recombinantes utilizando o vírus FA 17D como vetor

A vacina contra FA é considerada uma das vacinas mais eficazes e seguras. É capaz de induzir uma resposta duradoura com apenas uma dose em cerca de 90% dos vacinados. Sabe-se que o vírus atenuado consegue infectar e ativar células dendríticas via receptores tipo Toll (TLRs- do inglês *Toll like receptors*), essa ativação leva à produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 e TNF- α . Também é observada a ativação de células T CD4+ e CD8+ citotóxicas (Martins *et al.*, 2007; Miller *et al.*, 2008).

Diante das boas propriedades imunológicas o Vírus FA 17D tem sido cada vez mais considerado como um vetor para expressar e induzir imunidade protetora contra antígenos heterólogos. Esta abordagem é útil, portanto, no desenvolvimento de novas vacinas recombinantes (Monath *et al.*, 2004; Liniger M *et al.*, 2007).

A genética reversa é uma ferramenta altamente utilizada para a regeneração de vírus a partir de seu RNA, ela lança mão, por exemplo, da tecnologia de clones infecciosos onde é gerado cDNA de diferentes vírus de RNA que permite que o genoma seja manipulado de forma a apresentar modificações gênicas, deleções e inserções de novos genes. Esses estudos começaram na década de 80 quando David Baltimore e Vincent Racaniello demonstraram ser possível regenerar um poliovírus, um vírus de genoma de RNA fita única polaridade positiva, a partir do cDNA clonado em plasmídeos bacterianos, sendo transfectado em células susceptíveis e assim regenerado (Racaniello & Baltimore, 1981). Esta tecnologia revolucionou o estudo de vírus de RNA tanto de polaridade positiva quanto negativa, permitindo novas abordagens para pesquisas sobre o ciclo replicativo do vírus, patogênese, determinantes de virulência e desenvolvimento de vacinas recombinantes.

Com isso, esta tecnologia vem sendo explorada desde 1981 e poucos anos depois, em 1989, Rice e colaboradores à aplicaram no estudo de flavivírus, mais especificamente no desenvolvimento de um clone infeccioso do vírus FA 17D-204. Devido à grande instabilidade do cDNA contendo o genoma completo de FA, os mesmos desenvolveram uma tecnologia de clonagem em dois plasmídeos que denominaram: pYF5`3`IV, que contém as extremidades do genoma viral e o pYFM5.2, que contém a região central do genoma viral. Estes quando ligados pelos sítios de restrição apropriados, formam o genoma viral completo. Atualmente em nosso laboratório construímos vírus FA recombinantes utilizando plasmídeos modificados, chamados pG1/2 e pT3, que foram derivados dos pYF5`3`IV e pYFM5.2, respectivamente. Tais modificações tornaram o genoma mais semelhante à cepa 17D (Figura 1.5)(Bonaldo *et al.*, 2000; Galler & Freire, 2001; Jabor, 2001).

Sistema de dois plasmídeos do clone infeccioso de febre amarela

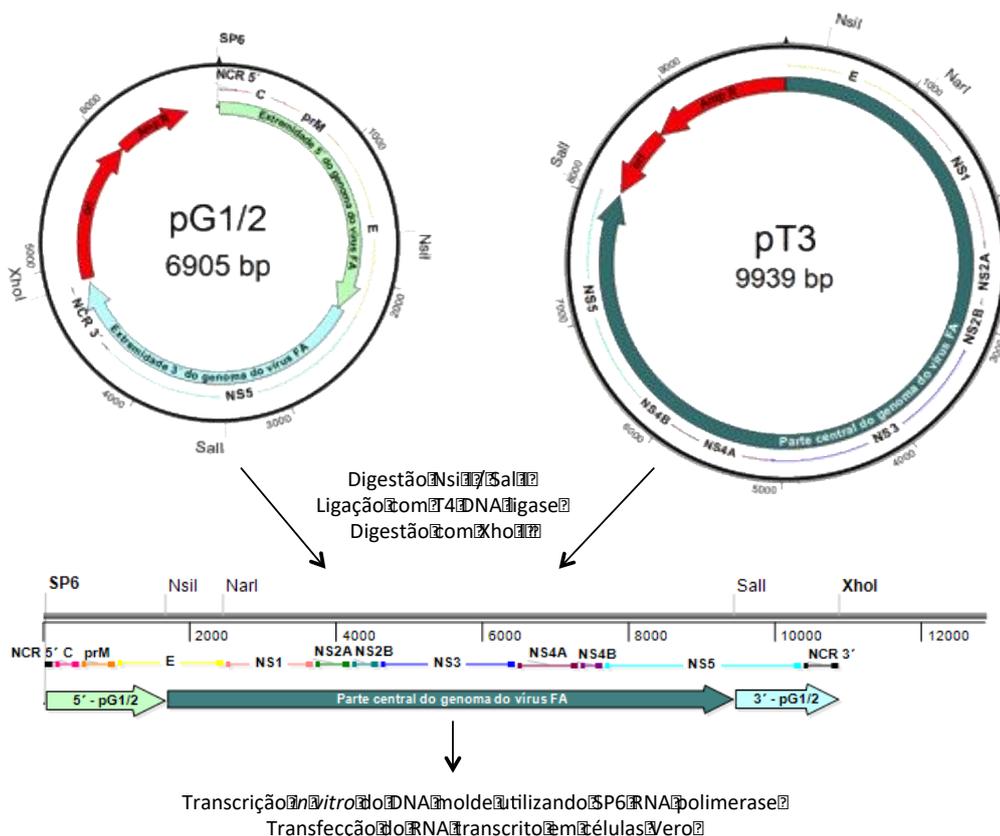


Figura 1.5 Sistema de dois plasmídeos que constituem o clone infeccioso do vírus FA 17D.

O plasmídeo pG1/2 contém as extremidades do genoma viral, enquanto o pT3 contém a parte central do genoma. A digestão destes plasmídeos com duas enzimas de restrição apropriadas (Nsi I e Sal I), seguido de ligação entre os dois plasmídeos, e linearização por clivagem em um só sítio (Xho I), gera o molde de cDNA contendo o genoma completo do vírus FA. Este molde é então transcrito *in vitro* para obtenção do RNA genômico viral, que é transfectado em células Vero, produzindo vírus infecciosos.

Diferentes abordagens para a construção de vacinas recombinantes utilizando o vírus vacinal da FA já foram testadas. Iniciou com a construção de vírus quiméricos em que os genes das proteínas de envelope e prM/M do vírus FA 17D era substituído por genes homólogos de outros flavivírus (Bray & Lai, 1991). Outros avanços aconteceram na pesquisa de vacinas humanas, onde o vírus da FA foi utilizado como vetor de expressão de epítomos ou de sequências de proteínas heterólogas que foram inseridas entre as sequências das proteínas não estruturais (McAllister *et al.*, 2000). Em 2007, nosso laboratório desenvolveu um método de construção de vírus viável com inserção de genes inteiros na região intergênica entre E/NS1 (Bonaldo *et al.*, 2007). Nesse estudo foram construídos vírus quiméricos DENV4-17D e 17D carreando a *Green Fluorescent Protein* (GFP) (Figura 1.6) e os

mesmos foram testados quanto à expressão da proteína, estabilidade genética e imunogenicidade (Bonaldo *et al.*, 2005).

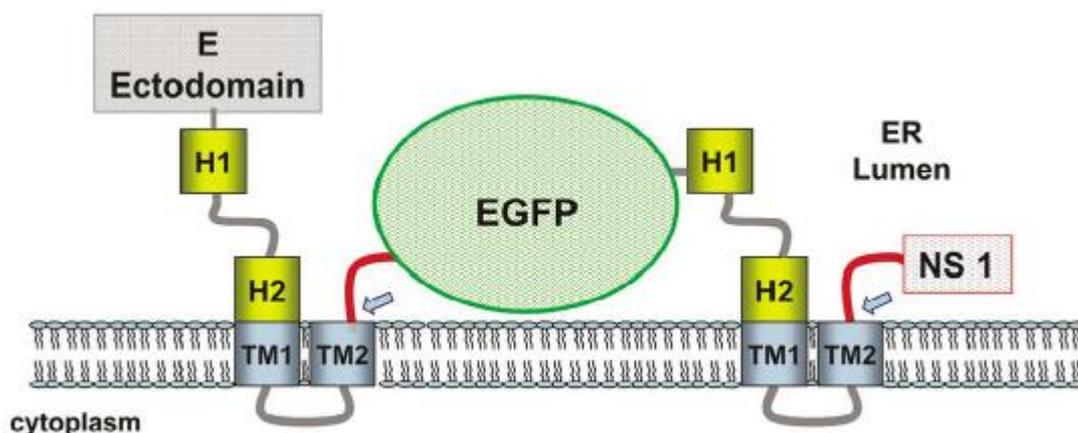


Figura 1.6 Modelo de expressão de proteínas heterólogas na região intergênica E/NS1.

Topologia dos elementos haste-âncora (H1, CS, H2, TM1 e TM2) da proteína E e C-terminal da NS1 duplicados, flanqueando a proteína heteróloga, em relação à membrana do retículo endoplasmático durante a síntese da poliproteína precursora viral. As setas azuis indicam os sítios de clivagem pela peptidase sinal celular no lúmen do retículo endoplasmático (Bonaldo *et al.*, 2007).

Esse tipo de estratégia permite que nesta região sejam inseridos fragmentos de aproximadamente 2kb. Foram construídas duas plataformas denominadas MB1 e MB5 para tal estratégia. Ambas teriam os 9 resíduos de aminoácidos da proteína NS1 do vírus da FA (VFA) encontrados no N-terminal da proteína e a porção haste-âncora, no caso com a sequência da proteína E do vírus Dengue 4, no carboxi-terminal do cassete (Bonaldo *et al.*, 2005). Uma derivação desta metodologia foi a inclusão de: (1) um domínio para a *N*-glicosilação (NTT) da proteína recombinante, compreendido entre o motivo *N*-terminal do cassete com a proteína recombinante e (2) um domínio que promova a retirada das duas porções transmembrana da proteína recombinante (Trindade, 2011; Santana, 2015). Em MB1, este domínio consiste em um motivo de clivagem pela pro-convertase celular furina e em MB5, pelo motivo de desempacotamento do ribossoma, o motivo 2A de picornavirus (Figura 1.7).

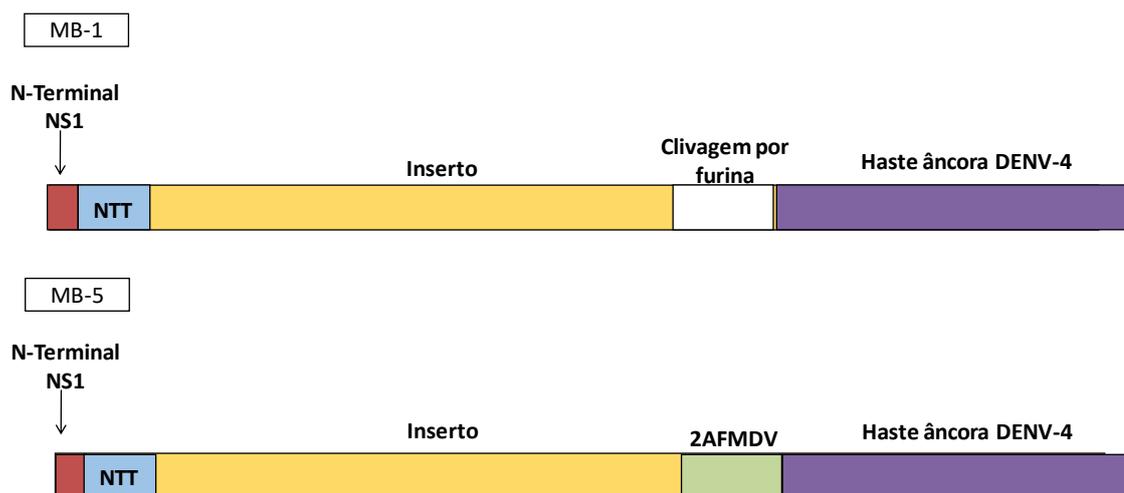


Figura 1.7 Esquemas representativos das plataformas de expressão utilizadas para a inserção de antígenos heterólogos entre as regiões E/NS1. Neles estão representados os principais motivos funcionais das construções MB1 e MB5.

Através dessas construções, diversos epítomos heterólogos já foram expressos tais como parte de proteína de envelope do Vírus da imunodeficiência símia (SIV- do inglês *Simian Immunodeficient Virus*), antígeno de amastigota e proteína p24 de HIV-1, sendo este último em uma plataforma um pouco diferente da utilizada em nosso laboratório (Bonaldo *et al.*, 2010; Nogueira *et al.*, 2011; Martins *et al.*, 2013a; Nogueira *et al.*, 2013a; Santana, 2015; Franco *et al.*, 2010).

1.5 Expressão de proteína de envelope de HIV-1

A Síndrome da imunodeficiência adquirida (aids- do inglês *Acquired Immunodeficient Syndrome*) foi reconhecida pela primeira vez como uma nova doença em 1981, quando um número crescente de homens que faziam sexo com homens sucumbiram às infecções oportunistas e doenças malignas raras (CDC, 1981; Greene *et al.*, 2007). Nesta mesma década, os agentes etiológicos dessa doença, os vírus da imunodeficiência humana dos tipos 1 e 2 (HIV-1 e HIV-2, respectivamente), também foram descritos (Montangnier *et al.*, 1983; Clavel *et al.*, 1986).

O HIV-1 é responsável pela maioria dos casos de aids em todo mundo, enquanto as infecções por HIV-2 concentram-se principalmente na África Ocidental. Ambos pertencem à família *Retroviridae*, gênero *Lentivirus*. Ao contrário da maioria dos organismos que utilizam o DNA como meio de armazenamento da informação genética, os membros da família *Retroviridae* possuem um genoma de RNA que é transcrito em DNA, utilizando a enzima viral transcriptase reversa, que posteriormente é integrado ao genoma do hospedeiro.

O genoma do HIV consiste de duas fitas de RNA com polaridade positiva de aproximadamente 9,7 Kb, composto por nove genes. Dentre esses genes, três estão presentes em todos os retrovírus e, por fazerem parte da estrutura viral, são denominados genes estruturais (*gag*, *pol* e *env*), dois são denominados reguladores (*tat* e *rev*) e quatro, são acessórios (*vif*, *vpr*, *nef* e *vpu* ou *vpx*), cada um deles desempenhando diferentes papéis durante o ciclo replicativo. Ele é delimitado por duas regiões denominadas LTR-3' e LTR-5' (*Long Terminal Repeats*) nas extremidades, as quais são extremamente importantes para a transcrição viral e poliadenilação do provírus, porém não codificam proteínas (Turner *et al.*, 1999). (Figura 1.8)

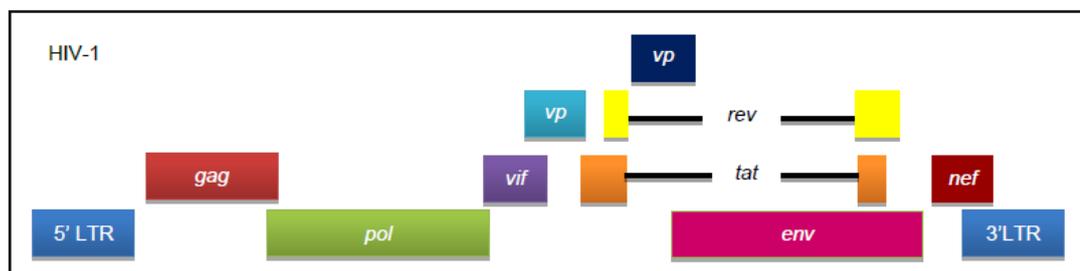


Figura 1.8- Representação esquemática do genoma proviral do HIV dos tipos 1 e 2. Pode-se observar a organização dos nove genes que compõem o genoma, além das sequências LTR nas suas extremidades

Análises filogenéticas do HIV confirmam que o vírus tem correlação com os vírus da imunodeficiência simia (SIVs) de grandes primatas (Huet *et al.*, 1990). A partir destes hospedeiros o vírus parece ter cruzado várias vezes a barreira entre espécies e em pelo menos 12 dessas introduções foi capaz de se tornar transmissível em humanos. Três introduções a partir de SIVs de chimpanzés deram origem aos diferentes grupos do HIV-1, o grupo M (major) que é responsável pelo maior número de casos mundialmente, N (non-M, non-O), O (outlier) e o grupo P, este a partir de SIV de gorila. Da mesma forma, o HIV-2, que apresenta uma distribuição mais restrita ao oeste do continente africano, também é oriundo de pelo

menos 8 eventos zoonóticos distintos (grupos A-H), a partir de SIV da espécie de primata Sooty mangabey (macaco do topete dourado) (Hirsch et al, 1989).

O grupo M, responsável pela pandemia do HIV-1, pode ser subdividido em subtipos que estão distribuídos mundialmente de maneira heterogênea, além das formas recombinantes circulantes (CRFs) e formas recombinantes únicas (URFs). O subtipo C se alastrou por várias regiões do mundo, e hoje é o mais prevalente dos subtipos, contribuindo com 56% do número de casos de aids (Esparza et al, 2000). No Brasil podemos observar a predominância do subtipo-B na maioria das regiões brasileiras, seguido pelo subtipo F1 e o subtipo C, que predomina na região sul (Morgado et al., 1994, 1998; Velasco-De-Castro et al., 2014; Brindero et al., 2003, Soares et al., 2003; Junqueira et al., 2012). Além destes, são observados também inúmeros genomas recombinantes únicos BF (Guimarães et al., 2012) e BC (Santos et al., 2003; Bello et al., 2009) e CRFs BF 39, 40 (Guimarães et al., 2008), CRF 31_BC (Santos et al 2003) e CRF02_AG (Couto-Fernandez et al, 2005; Delatorre et al., 2012)

Mesmo após 30 anos da identificação do HIV, a epidemia da aids continua a superar todas as expectativas em relação a morbidade e mortalidade. Porém, com os conhecimentos acumulados ao longo dos últimos anos sobre o tratamento dos pacientes infectados pelo HIV, observou-se uma melhora na qualidade de vida destes e uma acentuada redução da mortalidade, assim como da sua transmissão devido a administração da terapia antirretroviral (HAART- do inglês, *highly active antirretroviral therapy*). Essa terapia tem como função controlar a replicação viral reduzindo assim a carga viral à níveis indetectáveis (Ministério da Saúde, 2013).

Atualmente mais de 35 milhões de pessoas vivem com HIV e cerca de 25 milhões de mortes já foram associadas à aids até hoje (WHO, 2016a). Isso se deve ao fato do vírus se manter latente em células T CD4+ de memória podendo assim voltar a se replicar em casos de interrupção do tratamento, baixa adesão ou até mesmo aquisição de resistência aos medicamentos (Richman *et al.*, 2009). Diante dessas questões, uma vacina segura e eficaz seria de suma importância para conter esta pandemia.

Tentativas iniciais de vacinas visaram à utilização de subunidades, buscando a indução de anticorpos neutralizantes contra as proteínas de envelope viral, a gp120 e a gp41. A imunização com monômeros destas proteínas é capaz de induzir anticorpos específicos para o vírus, porém estes anticorpos não são capazes de neutralizá-lo, e portanto de proteger contra a infecção. Este princípio foi

demonstrado nos testes clínicos conduzidos pela VaxGen, utilizando a vacina AIDS-VAX, constituída por monômeros da proteína gp120. Apesar de induzir altos níveis de anticorpos anti-gp120, o grupo vacinado não apresentou evidências de proteção e a eficácia da vacina foi considerada nula (Pitisuttithum *et al.*, 2006). Isto ocorre provavelmente porque epítomos conformacionais responsáveis pela indução de anticorpos neutralizantes são formados principalmente pela estrutura trimérica da espícula, e portanto monômeros de gp120 ou gp41 induziriam apenas a produção de anticorpos não neutralizantes (Pantophlet & Burton, 2006).

Algumas alternativas foram desenvolvidas, incluindo geração de pseudotipos de HIV expressando proteínas de envelope heterólogas, ou geração de VLP (do inglês, *viral-like particles*) para estabilizar a estrutura trimérica da espícula viral (Figura 1.9), porém nenhuma, até hoje, obteve sucesso como vacina (Burton *et al.*, 2012).

Pacientes no estágio de infecção crônica pelo HIV, ao longo dos anos, desenvolvem naturalmente anticorpos neutralizantes, que são capazes de reconhecer e neutralizar diferentes variantes virais, denominados anticorpos amplamente neutralizantes (bNAbs – do inglês, *broadly neutralizing antibodies*). Estes anticorpos são capazes de proteger contra a infecção pelo HIV ou suprimir uma infecção estabelecida em modelos animais. A geração desses anticorpos com alta afinidade e polirreatividade para diversas variantes do HIV é um processo longo, que necessita exposição constante do antígeno para indução de repetidos ciclos do processo de maturação de afinidade nas células B específicas, o que justifica a dificuldade em gerar tais anticorpos através da vacinação (Klein *et al.*, 2013).

Diante da dificuldade na geração de bNAbs protetores contra o HIV, algumas estratégias foram criadas para geração de vacinas baseadas em imunidade celular, ou seja estimulação de linfócitos T citotóxicos. Tais vacinas seriam interessantes para reduzir a morbidade da doença e o nível de transmissão viral, porém não seriam suficientes para bloquear a aquisição da infecção (Burton *et al.*, 2012). Esta estratégia foi avaliada em um dos maiores testes clínicos já realizada, o “HIV Vaccine Trial Network (HVTN) 502”, também conhecido como “STEP Trial”, conduzido pela Merck e o NIH. A vacina candidata era composta pelo vetor de Adenovírus 5 recombinante e constituída por uma formulação de 3 versões deste vírus recombinante, expressando os genes *gag*, *pol* e *nef* de HIV clade B. Testes pré-clínicos em macacos rhesus demonstraram que esta vacina era altamente imunogênica e capaz de reduzir a carga viral após o desafio. Porém, infelizmente,

em humanos a vacina não obteve a mesma eficácia. (Steinbrook, 2007).

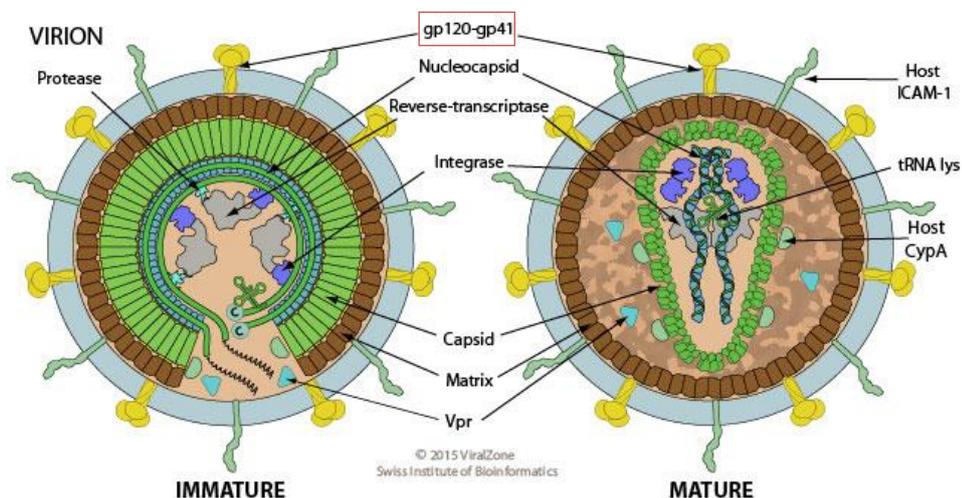


Figura 1.9- Partícula viral de HIV-1.

A esquerda mostra o esquema da partícula imatura e na direita a madura, estão identificados também enzimas importantes que participam do ciclo replicativo além da proteína de envelope que é alvo do presente estudo gp140 que é constituída de um heterodímero formado pela gp41 e gp120, ambas em destaque na figura (vermelho)(Fonte: http://viralzone.expasy.org/all_by_species/7.html acessado em 17/12/2016)).

Com isso, pretendemos utilizar a plataforma do vírus vacinal FA17D para a expressão dos monômeros gp41 e gp120 além do trímero gp140, sem a cauda citoplasmática para testá-los quanto à indução de anticorpos neutralizantes. As sequências foram baseadas pelas descritas em Rogier Sanders e colaboradores, (2013), que tomaram como base a sequência BG505 SOSIP.664 gp140, que introduzem algumas modificações na sequência do trímero para o mesmo ficar estável .

2 JUSTIFICATIVA

O desenvolvimento de uma vacina HIV segura e eficaz é considerado uma das melhores medidas para controle da epidemia global de HIV. Visto que essa doença é responsável por mais de 25 milhões de mortes e a terapia antirretroviral utilizada no seu combate apresenta diversas falhas provenientes da baixa adesão ao tratamento e aquisição de resistência aos medicamentos. A vacina contra a febre amarela apresenta comprovada segurança e eficácia, é composta pelo vírus atenuado da cepa 17D e gera uma robusta e duradoura resposta por parte do hospedeiro. Devido às características anteriormente citadas, à manipulação do genoma e sua grande estabilidade, o vírus vacinal tem sido usado como plataforma de expressão para proteínas heterólogas. Esta dissertação visa a expressão de antígenos lentivirais de HIV-1, especificamente a proteína de envelope pelo vírus vacinal da FA cepa 17D, um dos melhores imunógenos empregados na vacinação humana, até o momento. O conceito de expressão de antígenos de HIV no vírus da FA 17D foi estabelecido originalmente pelo nosso grupo de pesquisa em colaboração com o Dr. David Watkins da Universidade de Miami. Neste trabalho, pretendemos contribuir para o avanço científico no desenvolvimento de vacinas contra o HIV, assim como, para um melhor entendimento da resposta imune contra esta infecção por meio da construção de um vírus FA recombinante para gp140 e da sua avaliação quanto à viabilidade e à capacidade de induzir anticorpos, neutralizantes ou não, contra HIV.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Estabelecer uma plataforma vacinal baseada no o vírus da FA 17D para a expressão de proteínas do envelope de HIV-1.

3.2 Objetivos Específicos

- Desenhar cassete de expressão de *env* de HIV-1 correspondente a gp140 na forma trimérica;
- Expressar a proteína de *env*gp140 pelo vírus FA 17D recombinante;
- Caracterizar a expressão da gp140 recombinante quanto a formação do trímero;
- Caracterizar o vírus FA/gp140 recombinante quanto a proliferação em células Vero e sua estabilidade genética;
- Imunizar camundongos e quantificar a presença de anticorpos para o vírus FA e HIV;
- Avaliar a resposta imune induzida dirigida ao vírus de FA e à proteína gp140 de HIV e também gp120 e gp41 (vírus FA construídos anteriormente) em soros de camundongos imunizados quanto à capacidade de neutralização viral;

4 MATERIAL E MÉTODOS

As etapas de construção e clonagem de genomas virais em *Escherichia coli*, para a obtenção de moldes de cDNA de vírus recombinantes e de obtenção e caracterização dos vírus da FA17D foram desenvolvidas no Laboratório de Biologia Molecular de Flavivírus (LABMOF) na unidade IOC da FIOCRUZ. Este laboratório obteve junto Comissão Técnica Nacional de Biossegurança a licença para trabalhar com Organismos Geneticamente Modificados (OGM) nível 2 (CTNBio – CQB 0105/99).

4.1 Células

Os experimentos *in vitro* foram realizados em cultura de células Vero, uma linhagem celular derivada do epitélio renal de macacos verdes africanos (*Cercopithecusaethiops*), obtidas da ATCC (do inglês, American Type Culture Collection e muito utilizado no estudo de flavivírus.

Estas células foram, em geral, cultivadas em meio de cultura 199, completo contendo sais de Earle's, 5% de NaHCO₃, 40 µg/mL de gentamicina, suplementado com 5% de soro fetal bovino e mantidas em estufa com atmosfera de 5%CO₂ a 37°C. Entretanto, de acordo com cada experimento estarão descritas as condições específicas utilizadas.

4.2 Clone infeccioso

Os vírus recombinantes foram construídos através da tecnologia do clone infeccioso, tecnologia esta, que está bem estabelecida no laboratório. O fragmento referente à proteína de envelope gp140 foi sintetizado (GenScript) e otimizado para a frequência de uso de códons do vírus da FA. Este gene continha sítios de restrição *Xma I* e *BspE I* nas extremidades, de forma que puderam ser inseridos na plataforma de expressão.

Primeiramente, o gene sintético foi submetido à um PCR para a verificação e separação de seus componentes gp41, gp120 e gp140. Os fragmentos foram amplificados por iniciadores específicos descritos na tabela 4.4. Após a amplificação e posterior verificação do tamanho dos fragmentos através de gel de 1% agarose sob

voltagem de aproximadamente 85 volts, foi feita a ligação desses fragmentos no plasmídeo comercial pGEM-T easy. A mesma foi realizada seguindo o protocolo dado pelo Kit (pGEM-T easy Vector Systems- Promega). Nele, é recomendado fazer a ligação na proporção de 3 (inserto): 1 (vetor), onde o vetor está na concentração de 50ng/μl e os cálculos referentes à quantidade de inserto, ou seja, a quantidade de cada fragmento a ser colocado foi feita de acordo com a concentração dos mesmos após a purificação do PCR e o tamanho em kilobases (Kb) destes, ou seja para gp140 foram colocados 50ng, para gp120 37,5 ng e gp41 12,5 ng . Seguem abaixo as especificações para a reação:

Tabela 4.1 Reação de ligação no plasmídeo comercial pGEM-T easy e especificações dos reagentes utilizados

Componentes da reação	Amostra	Controle positivo	Controle negativo
Tampão de ligação 2X	5 μL	5 μL	5 μL
pGEM-T easy Vector	1 μL	1 μL	1 μL
Produto PCR	X μL	-	-
Controle de DNA	-	2 μL	-
T4 DNA ligase	1 μL	1 μL	1 μL
H2O nucleasfree	10 μL	10 μL	10 μL

Após a ligação, para a obtenção do DNA plasmidial, bactérias *Escherichia coli* da linhagem *Sure* foram transformadas por eletroporação com os fragmentos gp41, gp120 e gp140 no plasmídeo pGEM-T easy. Em cada tubo de bactéria foram colocados 2μL de cada plasmídeo e 1 μL do plasmídeo comercial Puc como controle (Puc19 DNA pg/μL, Invitrogen 54357). Essa mistura foi então transferida para cubetas de eletroporação pré-resfriadas e mantidas em gelo até o momento do choque realizado nas condições descritas na tabela 4.2. Após uma hora de incubação em meio Luria Bertani (LB) líquido a 37°C com agitação constante, 100μL de cada suspensão foi plaqueado em meio LB sólido com 1% de ágar, contendo 25μL de ampicilina, e mantidas à 37°C. As colônias transformantes foram transferidas para 5mL de meio LB líquido e crescidas por oito horas à 37°C sob agitação constante.

Tabela 4.2 Condições para a eletroporação em bactérias *Escherichia coli*, da linhagem Sure.

Voltagem (v)	2500
Capacitância (mf)	025
Resistência (Ω)	200
Tamanho da cubeta (mm)	2

Alíquotas de 20 μ L de cada suspensão foram precipitadas por centrifugação 14000rpm por um minuto. Ao precipitado foram adicionados os reagentes de amplificação da GoTaq (Promega), além dos iniciadores específicos M13 FORWARD (CCCAGTCACGACGTTGTAAAACG) e M13 REVERSE (AGCGGATAACAATTTTCACACAGG) desenhados para a amplificação do plasmídeo comercial pGEM-T Easy. As condições da reação e os iniciadores utilizados estão descritos na tabela 4.3. A análise da reação, foi feita através de eletroforese em gel de agarose, como descrito na seção 4.5 e os produtos que amplificaram na altura esperada foram purificados em coluna (“Qiaquick PCR purification kit”, Qiagen) segundo as instruções do fabricante e enviados para a plataforma de sequenciamento do IOC-FIOCRUZ que utiliza o método de Sanger (Sanger *et al.*, 1997) para a produção de sequências nucleotídicas. As sequências foram analisadas através do software SeqMan (DNASTar Lasergene 11).

Tabela 4.3 Condições de PCR.

Temperatura	Tempo	Ciclos
95°C	5 min	1
95°C	40s	
50°C	40s	30
72°C	40s	
72°C	10min	1
4°C		∞

Após isso, os insertos foram quantificados utilizando o kit Qubit (Invitrogen) para posterior digestão com as enzimas de restrição apropriadas.

4.2.1 Clonagem molecular

Os insertos correspondentes às proteínas, bem como o plasmídeo pT3 e seus derivados (Bonaldo *et al.*, 2000; Galler & Freire, 2001; Jabor, 2001), foram digeridos com as enzimas de restrição apropriadas para clivagem *Sma I* / *BspE I*, de acordo com as extremidades dos genes sintéticos. Após a digestão, o plasmídeo pT3 foi submetido à reação de desfosforilação com 2U da enzima *SAP* (Promega) a 37°C por 15 min, em condições estabelecidas pelo fabricante, seguida de inativação da enzima a 65°C por 15 min. As reações de digestão e ligação foram controladas por eletroforese em gel de agarose.

Em seguida, foi realizada a purificação das bandas correspondentes aos insertos utilizando o kit QIAquick Gel Extraction (QIAGEN) em condições estabelecidas pelo fabricante. Os genes sintéticos foram então ligados ao respectivo plasmídeo através da ação da *T4 DNA ligase* (Invitrogen) por incubação *overnight* a 4°C, nas condições estabelecidas pelo fabricante, utilizando-se uma proporção vetor: inserto de 1:5. Os plasmídeos foram então transformados em bactérias *E. coli* eletro-competentes da linhagem *Sure* conforme já descrito acima na seção 3.1. Neste momento, foram utilizados iniciadores que amplificam parte do plasmídeo de expressão utilizado, além de iniciadores específicos para a região do inserto da gp140 devido seu tamanho na etapa do sequenciamento. Seguem na tabela 4.4 relação dos iniciadores utilizados.

Tabela 4.4- Iniciadores utilizados no sequenciamento

(A)

Iniciador	Sequência 5'→3'	T	Posição de ligação no genoma do vírus FA 17DD
RG444(+)	ACGTCTCACTTACCAGTGGCACAA	50°C	2122 - 2145
RG440(-)	AACCATACTGCAGACCATCCCGAA	50°C	2772 - 2795

(B)

Iniciador	Sequência 5'→3'	T
gp140F	ACGTCTCACTTACCAGTGGCACAA	50°C
gp140R	AACCATACTGCAGACCATCCCGAA	50°C

(A) Sequência dos oligonucleotídeos utilizados para a amplificação da plataforma de expressão. (B) Sequência dos oligonucleotídeos utilizados no sequenciamento pelo método de Sanger para a verificação da sequência dos insertos, no caso gp120 e gp140.

Após a análise das sequências, as colônias que apresentavam o plasmídeo contendo o inserto íntegro e na orientação correta foram inoculadas em maior volume de LB líquido (100 a 250 mL) contendo 25 µg/mL de ampicilina para obtenção de massa plasmidial, utilizando-se o *HiSpeed Plasmid Maxi kit* ou *HiSpeed Plasmid Midi kit* (Qiagen). A extração dos plasmídeos foi controlada por eletroforese em gel de agarose e a concentração dos plasmídeos medida através do Kit Qubit (Invitrogen). Uma alíquota de cada clone das bactérias que deram origem ao plasmídeo, utilizado na construção dos vírus recombinantes, foi congelada em solução de 50% de glicerol, para manutenção de um banco de estoque.

4.2.2 Obtenção do cDNA molde

Os plasmídeos pT3 recombinantes, ou o pT3 sem inserto, utilizado como controle, contêm a região central do genoma do vírus FA 17DD. O plasmídeo pG1/2 contém as extremidades do genoma (Bonaldo *et al.*, 2000; Galler & Freire, 2001; Jabor, 2001). Estes plasmídeos foram digeridos pelas enzimas *Nsi I* e *Sal I*

(Promega) com 20 U de cada enzima para 2µg de DNA plasmidial nas condições estabelecidas pelo fabricante das enzimas, como as duas apresentam atividade catalítica ótima na mesma temperatura, essa reação pôde ser feita ao mesmo tempo. Após incubação a 37°C por 2 h, as enzimas foram inativadas por aquecimento a 65°C por 15 min. A digestão foi controlada por eletroforese em gel de agarose.

Os plasmídeos completamente digeridos foram purificados em coluna através do *QIAquick PCR Purification Kit* (Qiagen) e eluídos em 30 µL de EB (Qiagen). As concentrações dos plasmídeos foram medidas através do Kit Qubit (Invitrogen) para cálculo da relação equimolar entre o plasmídeo derivado do pT3 e o pG1/2 para a reação de ligação.

As reações de ligação foram realizadas com 200 ng do pG1/2 e 300 ng do pT3 ou derivado (MB1 e MB5), adicionando-se 1U da enzima *T4 DNA ligase* (Invitrogen) sob as condições estabelecidas pelo fabricante. Após incubação *overnight* a 4°C, a enzima foi inativada por aquecimento a 65°C por 15 min. O produto desta ligação contém o genoma completo do vírus FA 17DD, que serve de molde para a síntese do RNA genômico do vírus. Os DNAs plasmídeos foram então linearizados pela ação da enzima *Xho I* (Promega) sob as condições recomendadas pelo fabricante, durante uma incubação a 37°C por três horas, seguida da inativação por aquecimento a 65°C por 15 min.

O cDNA linearizado foi concentrado adicionando-se 10% de acetato de sódio 3M, seguido de 3 volumes de etanol (Merck; 96-100%), isso foi então incubado por 30 minutos no gelo seco e etanol. Após essa incubação, foi feita uma centrifugação a 14000rpm por 25 min, seguida da adição de 3 volumes de etanol 80%. A centrifugação foi então repetida, o sobrenadante retirado cuidadosamente e o pellet seco a 65°C por dois min e então ressuscitado em 8µL de tampão EB (Qiagen).

O DNA molde concentrado foi utilizado para a reação de transcrição *in vitro*, utilizando-se o *mMESSAGE mMACHINE kit (SP6)* (Ambion) de acordo com as instruções do fabricante. A presença do RNA transcrito foi controlada por eletroforese em gel de agarose.

4.2.3 Regeneração dos vírus recombinantes

A concentração do RNA transcrito foi aferida através do Kit Qubit (Invitrogen) e 2 µg do RNA total foram utilizados para transfecção de células Vero por eletroporação. As células foram tripsinizadas para recolhimento da monocamada e

lavadas com PBS gelado tratado com DEPC previamente à eletroporação. A eletroporação foi realizada no *Gene PulserXcell* (Bio-Rad) sob as condições mostradas na tabela 4.5.

Tabela 4.5- Condições para eletroporação em células Vero

Voltagem (v)	2500
Capacitância (mf)	850
Resistência (Ω)	∞
Tamanho da cubeta (mm)	4

Depois do pulso elétrico, células foram cultivadas em garrafas de 25cm² com densidade de 40.000 células/cm² contendo 12mL de meio 199 completo. Para cada ensaio de regeneração de vírus recombinantes foi realizado o mesmo procedimento para geração do vírus G1/2T3 (sem carrear os insertos de interesse), como controle positivo, e mock (células eletroporadas sem RNA) como controle negativo. As garrafas contendo as células transfectadas foram incubadas a 37°C em estufa de 5% CO₂ e acompanhadas por cerca de 3 a 5 dias até o surgimento de efeito citopático (CPE- do inglês *Cytopathiceffect*). Após o a presença de CPE, o sobrenadante destas culturas de primeira passagem (chamados de 1P) foram coletados e congelados em alíquotas a -80°C. Os vírus gerados foram submetidos a extração de RNA, seguida de RT-PCR e sequenciamento nucleotídico, conforme descritos nas seções seguintes.

4.3 Extração de RNA

O RNA viral foi extraído a partir do sobrenadante de cultura de células infectadas, utilizando-se o *QIAamp Viral RNA Mini Kit* (Qiagen), de acordo com o manual do fabricante. O RNA eluído foi congelado a -80°C em alíquotas para evitar repetidos ciclos de congelamento-descongelamento.

4.4 RT-PCR

Para a detecção e sequenciamento do genoma viral nos sobrenadantes, o RNA viral foi submetido à reação de RT-PCR para a amplificação da região que contém o inserto. O cDNA foi gerado pela enzima Superscript III a partir de 4 μ L do

RNA e utilizando o iniciador reverso RG444 descrito na tabela 4.4 (B), sob as condições dadas pelo fabricante.

Para a reação de PCR, 4 μ L do cDNA foram utilizados para amplificação utilizando-se *GoTaq Green Master Mix* (Promega) e os oligonucleotídeos descritos na tabela 4.4, sob as condições estabelecidas no manual do fabricante. O cDNA gerado foi desnaturado por aquecimento a 95°C por 5 min, seguido de 30 ciclos de desnaturação do DNA a 95°C por 40s, hibridização dos iniciadores a 55°C por também 40s e extensão da fita de DNA a 72°C por 90s. Para extensão final das fitas de DNA a reação foi incubada a 72°C por 10min e mantidas à 4°C ou congeladas até o momento da análise por eletroforese.

4.5 Eletroforese de DNA em gel de agarose

Os fragmentos de DNA foram diluídos em tampão de amostra e aplicados em gel de agarose 0,8% em tampão TAE (1X) (Tris-Acetato-EDTA), submetidos à eletroforese com aproximadamente 85 volts. Para controle dos tamanhos moleculares foram aplicados os marcadores 1 Kb ou 1KbPlus (Invitrogen) para análise de produtos de PCR ou o *lambda Hind III* (Promega) para análise de plasmídeos, paralelamente às amostras. Os géis foram corados em solução 0,5 μ g/mL de brometo de etídio (Bio-Rad), seguido de lavagem com água, e as bandas foram visualizadas e fotografadas através do fotodocumentador Gel-Doc XR (Bio-Rad), utilizando-se o programa *QuantityOne*.

4.6 Sequenciamento nucleotídico

Os cDNAs gerados pelas reações de RT-PCR previamente analisados por eletroforese em gel de agarose foram purificados utilizando-se o kit QIquick PCR purification (QIAGEN).

O sequenciamento foi realizado utilizando-se o Kit BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems). Foram empregados os mesmos oligonucleotídeos descritos para a reação de PCR e, adicionalmente, o RG19 (-) GGGAGTCAACTGAATTTAGGC (complementar à região genômica 2.619 – 2.639 do vírus FA 17DD), que se liga a uma região interna destes fragmentos de PCR. As reações de sequenciamento foram preparadas em placas de 96 poços no LABMOF

e a leitura foi realizada na plataforma multiusuário de sequenciamento de DNA da FIOCRUZ (PDTIS).

As sequências obtidas foram analisadas no programa *SeqMan* (DNASarLasergene 11), alinhando-se estas com as sequências de referência desenhadas previamente.

4.7 Produção de estoques virais (2P)

Monocamadas de células Vero foram preparadas na véspera da infecção em garrafas de 150cm² a 175cm² com densidade de 62.500 células/cm², cultivadas em meio Earle's 199 completo. O sobrenadante da garrafa previamente preparada foi removido e adicionados 5 mL da suspensão viral (3mL dos vírus recombinantes ou G12/T3 e 2mL de meio). As células são incubadas por 1 h a 37°C em estufa de 5% de CO₂ com agitação leve a cada 15 min. Após este período de adsorção viral, a garrafa foi preenchida com meio Earle's 199 completo para volume final de 80mL e incubada a 37°C em estufa de 5% de CO₂ por 48 a 72 h, até o aparecimento de CPE. O sobrenadante foi coletado, centrifugado a 700 x g por 10 min a 4°C para clarificação, aliqüotados e congelados a -80°C.

4.8 Titulação viral

Os vírus foram titulados por contagem em PFU (do inglês, *Plaque Forming Unit*). As alíquotas de suspensões virais foram descongeladas lentamente em gelo e diluídas seriadamente com fator 10 em meio Earle's 199 completo. As diluições 10⁻¹ a 10⁻⁶ foram utilizadas nas titulações conforme a figura 4.1 abaixo:

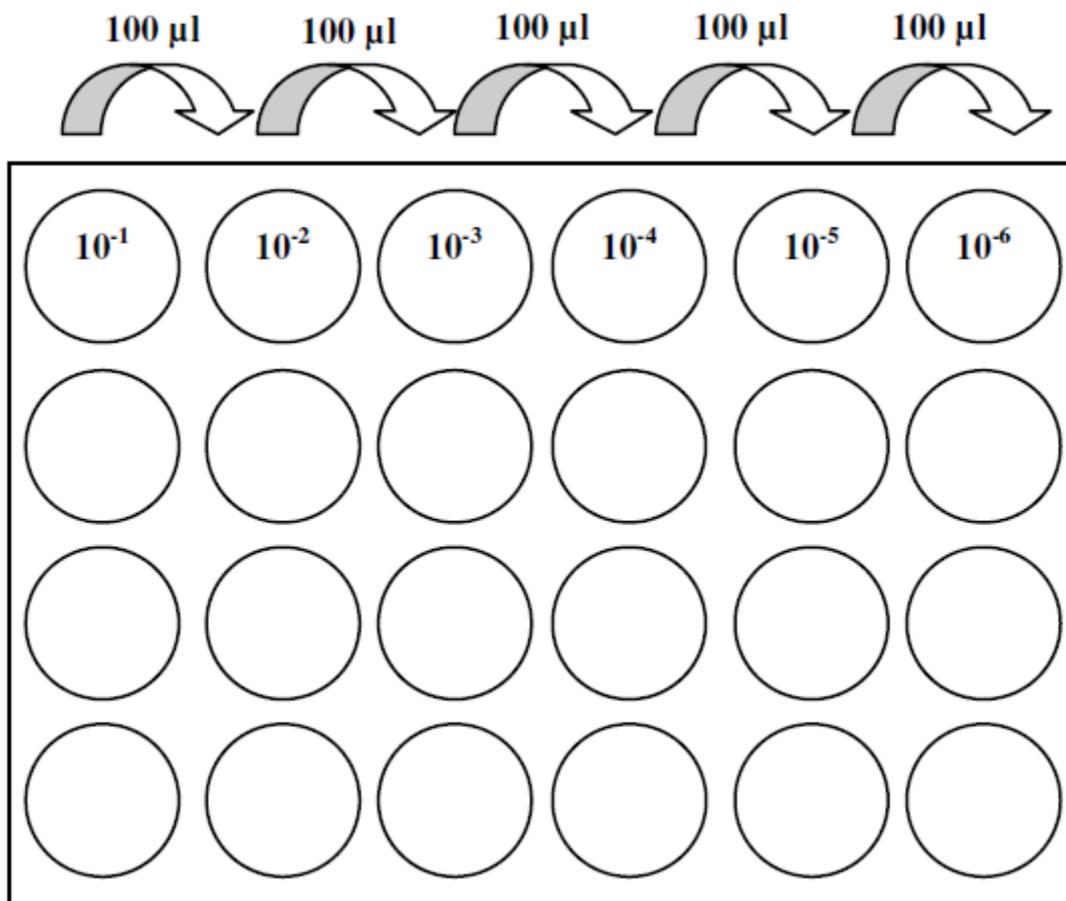


Figura 4.1 Placa de 24 poços usada na titulação viral.

Meio Earle's 199 completo é distribuído em uma placa de 24 poços (900 mL em cada poço). Então 100 ml da suspensão viral é adicionado ao primeiro poço gerando uma diluição 1:10. Em seguida 100 mL dessa suspensão é retirada e adicionada próximo poço, isso é repetido até alcançar a proporção de 1:1.000.000.

Placas de 24 poços com monocamadas de células Vero foram preparadas na concentração de 50.000 células/cm² na véspera dos ensaios e cultivadas em meio Earle's 199 completo. O sobrenadante da cultura foi totalmente retirado com auxílio de bomba de vácuo e 100 µL das diluições virais foram inoculadas em duplicata na placa de 24 poços. As células foram incubadas por 1 h a 37° C em estufa de 5% de CO₂ com agitação leve a cada 15 min. Após o período de adsorção viral, o inoculo foi removido do sobrenadante utilizando-se novamente a bomba de vácuo e a monocamada foi coberta com CMC a 2,4% (Carboximetilcelulose, Sigma) em meio Earle's 199 contendo 5% de NaHCO₃, 40 µg/mL de gentamicina, suplementado com 5% de soro fetal bovino. Após incubação por 7 dias a 37° C em estufa de CO₂, as placas foram fixadas com solução de formaldeído a 10%, lavadas com água e coradas com solução de cristal violeta a 0,4%.

O número de placas de lise de duas diluições foi contado e o título do vírus foi determinado de acordo com a seguinte fórmula:

$$T = M \times ID \times FC, \text{ onde:}$$

T = título expresso em PFU/mL (do inglês, *Plaque Forming Unit*)

M = média do n° de placas de lise contadas em uma determinada diluição;

ID = Inverso do fator de diluição onde as placas de lise foram contadas;

FC = fator de correção do inóculo para mL. Como o inóculo corresponde a 100 µL, que é a décima parte de 1 mL, FC = 10.

O título de cada estoque viral é dado pela média entre três experimentos independentes de titulação, em que o desvio padrão dos títulos expressos em \log_{10} é menor do que 1.

4.9 Infecção de células

Para a realização dos experimentos utilizando células infectadas, monocamadas de células Vero foram preparadas na véspera com densidade de 62.500 células/cm² para garrafas ou placas e de 30.000 células/cm² para lâminas de imunofluorescência, cultivadas em meio 199 completo.

A suspensão viral foi preparada por diluição do estoque 2P viral para MOI de 0,02 através da fórmula:

$$MOI =$$

O sobrenadante da monocamada foi removido e a suspensão viral foi adicionada. Após incubação por 1 h com agitação leve a cada 15 min, as células foram incubadas a 37°C em estufa de 5% de CO₂ durante 72 h que é geralmente o tempo onde se tem o pico de CPE.

4.10 Estabilidade genética

Um dos maiores desafios da utilização de vacinas de vírus recombinantes é a deleção do inserto colocado. Visto isso, é de suma importância a realização da estabilidade genética para a verificação das possíveis deleções e padrões de recombinação que o vírus acaba sofrendo para se tornar mais estável naquela dada situação.

Para isso, os vírus recombinantes construídos foram submetidos a duas séries independentes de passagens (PA e PB) em cultura de células Vero, a partir do estoque viral 2P, com MOI de 0,02. Nas passagens 3, 4 e 5 foram coletados sobrenadantes da cultura para extração de RNA viral e RT-PCR para a amplificação do fragmento contendo a região do inserto. O fragmento de 674pb amplificado do vírus parental, foi usado como controle. Os vírus recombinantes que contêm a proteína gp41 geram uma banda de aproximadamente 1133pb dependendo da construção e o vírus que contém a proteína gp120 gera uma banda de 2079pb.

4.11 Microscopia de fluorescência

Microscopia de fluorescência foi utilizada para avaliar a expressão das proteínas inseridas. Para isso foram utilizados anticorpos doados pelo programa do NIH (NIH AIDS Reagent Program), descritos na tabela 4.6 abaixo que foram testados frente ao vírus gp120-MB1, pois todos os anticorpos são para a proteína de envelope gp120, constituindo a parte que fica exposta do envelope.

Para os experimentos de microscopia de fluorescência, células Vero foram semeadas na véspera em lâminas de vidro de 8 poços (*Lab-Tec™ Chamber Slide System* – Nunc) com densidade de 30.000 células/cm² e infectadas com MOI de 0,02. Após 72 h de infecção, as células foram lavadas com PBS e fixadas com solução de paraformaldeído 4% por incubação a temperatura ambiente por 10 min, seguido de três lavagens com PBS. O tampão foi removido e foram adicionados os anticorpos primários para proteína gp120 de HIV-1, vale ressaltar que cada anticorpo foi testado separadamente, diluído 1:500 em tampão de bloqueio, e incubado por 1 h a temperatura ambiente. Após três lavagens com tampão de bloqueio, foi adicionado o anticorpo secundário *anti-Human IgG Alexa Fluor 488* (Molecular Probes), diluído 1:400 em tampão de bloqueio. O painel de anticorpos testados está descrito na tabela abaixo.

Tabela 4.6 Anticorpos utilizados na microscopia de fluorescência como alvo a gp120.

Anticorpo
2G12
VRC01
VRC03
PG9
PG16
PGT121
PGT126
PGT145
HJ16

5 RESULTADOS

5.1 Desenho do clone infeccioso para expressão de Env

O estudo iniciou-se no desenho do clone infeccioso, onde a sequência da proteína a ser expressa passou por um processo de otimização de códons em relação à frequência de códons usada pelo vírus da Febre Amarela. Este processo foi realizado pela empresa GenScript. Os esquemas dos vírus construídos estão representados abaixo (Figura 5.1). O vírus que expressaria a proteína de envelope completa gp140 não foi viável, pois nunca se conseguiu clones bacterianos carreando gp140 no plasmídeo-vetor bacteriano, apesar disto, se apresenta o esquema do mesmo abaixo.

Foram desenhados cinco cassetes de expressão que puderam gerar vírus FA recombinantes. Dois deles carreavam gp41 em uma forma truncada, isto é apenas o seu ectodomínio. Assim, foram retirados do construto dois domínios do seu carboxi-terminal, que seriam uma alfa-hélice transmembranar e uma cauda citoplasmática de resíduos de aminoácidos. O gene gp41 foi expresso em duas plataformas de expressão do vírus FA, aqui denominadas de MB1 e MB5. Em relação à proteína gp120, esta foi construída na plataforma de expressão MB1.

O cassete de expressão é construído de além das sequências dos genes heterólogos otimizadas pela fusão de motivos funcionais do vírus FA de modo a permitir o correto processamento da poliproteína precursora do vírus recombinante e a correta topologia de membrana de todas as proteínas virais. Estes motivos seriam os 9 resíduos de aminoácidos da proteína NS1 (VFA) encontrados no N-terminal da proteína e a porção haste ancora, no caso com a sequência da proteína E do vírus Dengue 4, no C-terminal do cassete. Além destes motivos, as duas plataformas de expressão possuem (1) um domínio adicional para a *N*-glicosilação da proteína recombinante, compreendido entre o motivo N-terminal do cassete com a proteína recombinante e (2) um domínio que promova a retirada das duas transmembrana da proteína recombinantes. Em MB1, este domínio consiste em um motivo de clivagem pela pro-convertase celular furina e em MB5, pelo motivo de desacoplamento do ribossoma, o motivo 2A de picornavirus.

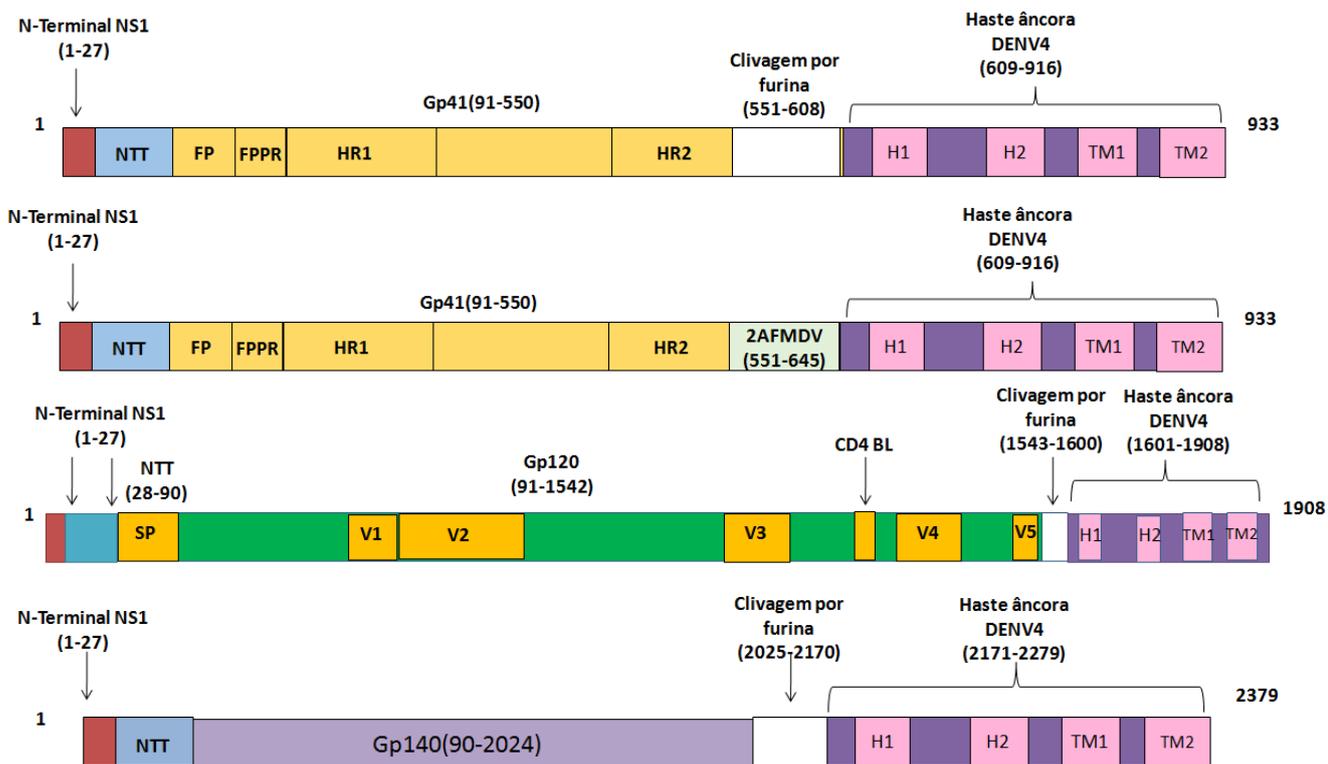


Figura 5.1 Esquema dos vírus recombinantes a serem construídos. Nesta figura pode ser observado o esquema de construção utilizado em cada vírus recombinante. É demonstrado também as plataformas utilizadas, no caso MB1 e MB5 cujas diferenças já foram explicadas na secção da introdução.

5.2 Construção dos vírus recombinantes

A construção dos vírus recombinantes é uma etapa metodologicamente complexa que envolve clonagem bacteriana do transgene, montagem do cDNA viral molde e regeneração viral. Para facilitar o entendimento, na figura 5.2 é mostrado o fluxograma de trabalho.

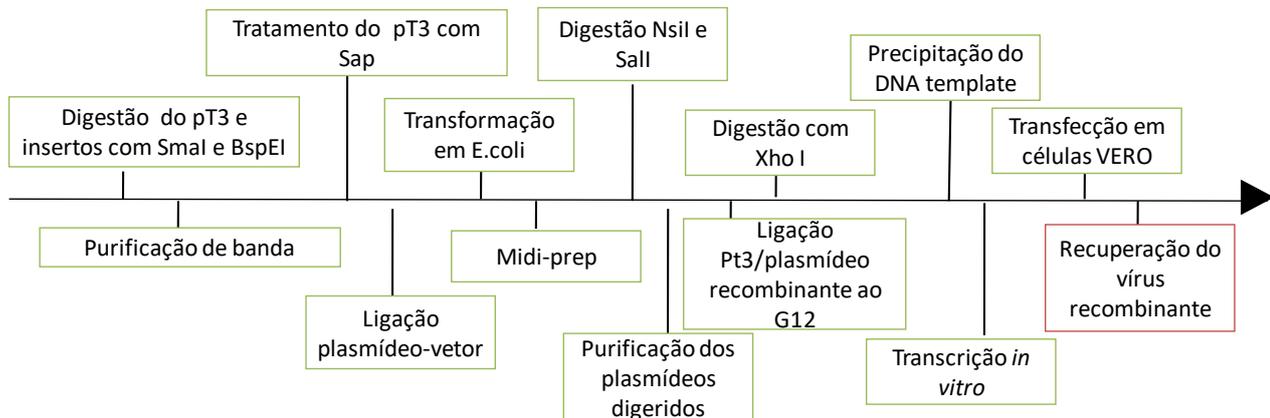
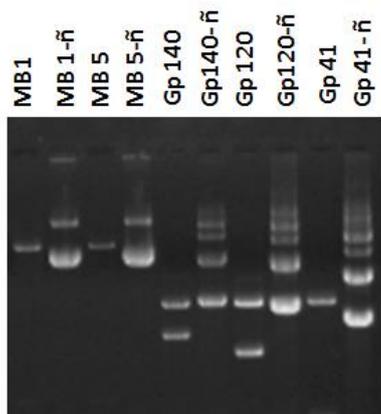


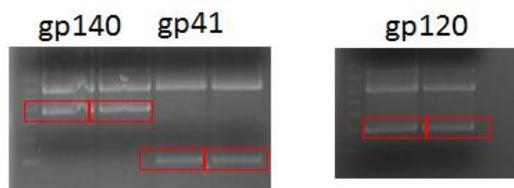
Figura 5.2- Fluxograma de todas as etapas existentes na construção dos vírus recombinantes.

Na figura 5.2 são mostradas algumas das etapas dessa construção, onde três vírus foram recuperados: gp41-MB1, gp41-MB5 e gp120-MB1.

(A) Digestão com SmaI e BspEI



(B) Purificação da banda do gel correspondente ao inserto



(C) Transcrição *in vitro*

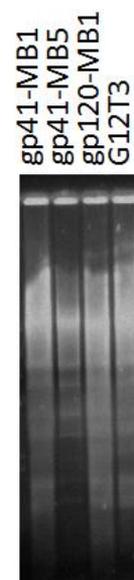


Figura 5.3- Resultados de algumas etapas da construção dos vírus recombinantes. Em (A) pode ser observado o padrão eletroforético em gel de agarose das digestões dos insertos e dos plasmídeos usados como plataformas, no caso, MB1 e MB5 com as enzimas de restrição SmaI e BspEI, os plasmídeos digeridos apresentam duas bandas mostrando assim que a digestão foi eficiente. Em (B) pode ser observado o padrão eletroforético em gel de agarose do tipo preparativo que serviu para o isolamento do fragmento de DNA clivado do de interesse (marcado em vermelho) que era correspondente ao inserto, no caso, aos insertos da gp140, gp120 e gp41. Em (C) pode ser observado o padrão eletroforético em gel de agarose do RNA dos vírus recombinantes e do controle sem inserto G12T3 transcritos *in vitro* que serão utilizados na transfecção em células Vero.

A proposta inicial do estudo era a construção de seis vírus diferentes, mas isto não foi possível. O quinto vírus gp120-MB5 na fase de precipitação do DNA para posterior transcrição e transfecção se mostrou com a concentração indetectável, então as etapas posteriores não foram realizadas. Os dois últimos vírus (gp140-MB1/gp140-MB5) se mostraram inviáveis nas primeiras etapas da construção, isto é, na obtenção de plasmídeos recombinante em *E.coli.* Na tabela 5.1 são descritos alguns parâmetros dos vírus construídos, tais como tamanho do inserto, plataforma utilizada na construção e estabilidade genética da inserção de *env*.

Tabela 5.1-Tabela representativa dos vírus recombinantes construídos

Construto	Plataforma utilizada	Tamanho do Inserto	Fase de execução	Estabilidade genética
gp41-MB1	MB1	459pb	Construído	Instável
gp41-MB5	MB1	459pb	Construído	Instável
gp120-MB1	MB5	1446pb	Construído	Instável
gp140-MB1	MB1	1905pb	Inviável	-

5.3 Regeneração viral

Após a construção dos plasmídeos recombinantes para fragmentos de *env*, a montagem do cDNA molde viral e transcrição *in vitro*, as amostras de RNA sintético viral foram submetidas à transfecção em células Vero com os vírus recombinantes construídos e dois controles negativos, o vírus vacinal 17DD e o G1/2T3 que corresponde ao vírus sem a inserção do cassete heterólogo, após 72 h pós-eletroporação, ocorreu o aparecimento de feito citopático na cultura de células Vero, o que indica atividade viral e consequente obtenção do vírus recombinante. Na figura 5.4 observa-se as diferentes monocamadas de células Vero infectadas e as alterações na morfologia da célula e da monocamada infectada em função do efeito citopático provocado pela infecção viral, dos vírus recombinantes em contraposição a condição *mock* (controle negativo). O CPE foi evidenciado em 72h nos vírus gp41-MB1 e gp120-MB1 e 96h no vírus gp41-MB5 pós-eletroporação. Nota-se que a intensidade de CPE do vírus gp41-MB5 pareceu ser menor do que o vírus similar construído na plataforma MB1.

Aparecimento de efeito citopático após transfecção com RNA viral dos vírus recombinantes

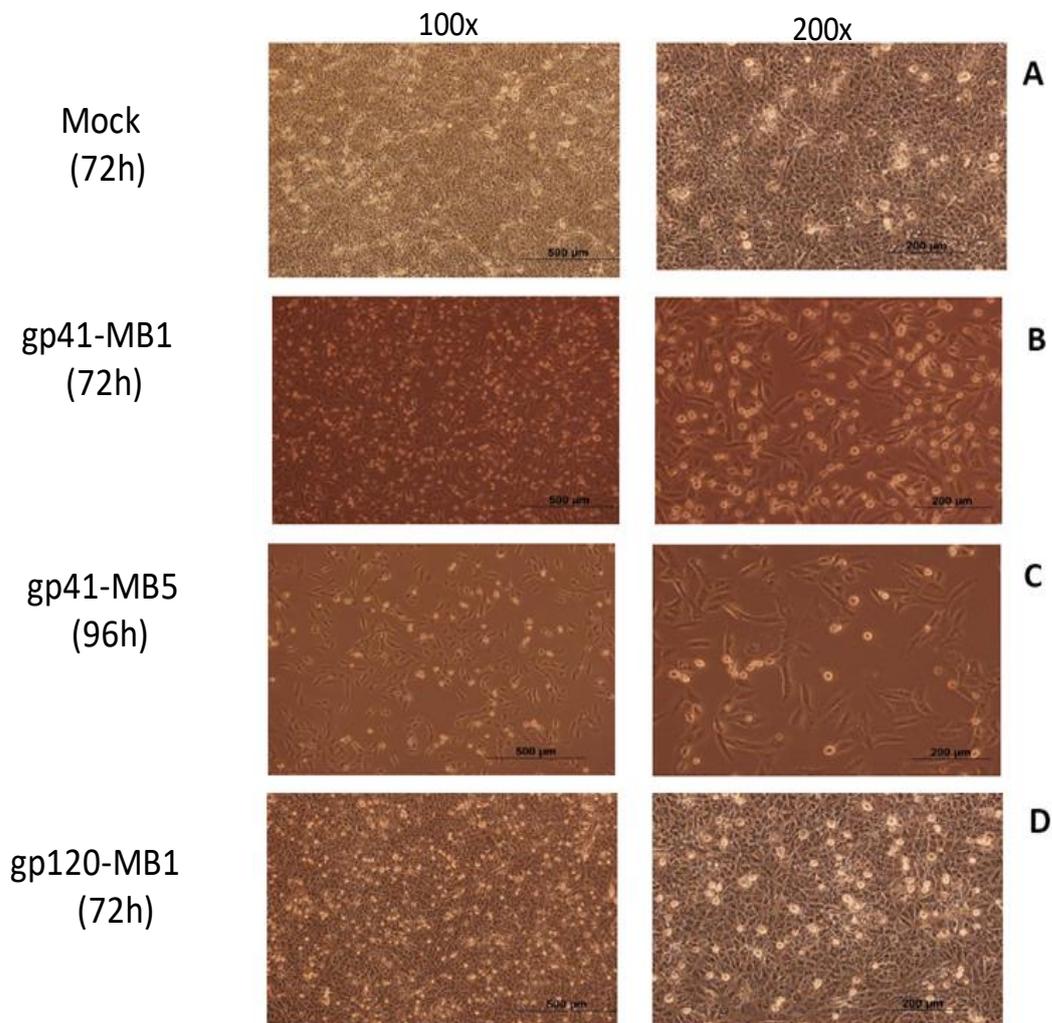


Figura 5.4 Aparecimento de efeito citopático após eletroporação de células Vero com RNA viral dos vírus recombinantes. (A) *mock* que consiste no controle negativo da transfecção e células Vero eletroporadas com os construtos: (B) vírus recombinante gp41-MB1; (B) gp41-MB5; (C) gp120-MB1. Os tempos de incubação nos quais foram documentados o efeito citopático (CPE) causado pela propagação viral são indicados em parênteses no lado esquerda da figura. As fotos foram tiradas em aumento de 100X e 200X.

5.4 Caracterização viral

Após obtenção dos vírus FA recombinantes, as monocamadas foram submetidas à uma extração para a obtenção do RNA viral e detecção deste por RT-PCR (Figura 5.5). Após a verificação da presença do vírus, células Vero foram re-

infectadas com estes vírus para a confecção dos estoques virais de trabalho. Os títulos virais obtidos foram para o vírus gp41-MB1: 1,04E5; gp41-MB1: 4,58E4; gp120-MB1: 8,11E5.

5.4.1 Estabilidade genética

O perfil obtido pelo procedimento de RT-PCR de vírus recombinantes após transfecção das amostras virais de primeira passagem celular ou (1P) de células Vero indicava a presença de bandas menores que a do amplicon contendo o tamanho esperado para o cassete completo (2379pb). Realizamos também a mesma análise para amostras virais dos estoques de trabalho (2P). Na figura 5.5, pode ser observado o padrão eletroforético em gel de agarose do RT-PCR dos vírus na primeira e segunda passagem.

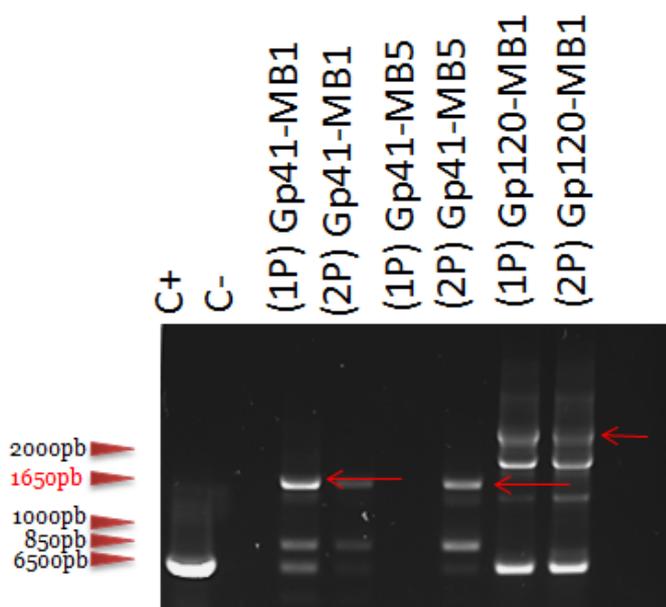


Figura 5.5 Perfil eletroforético em gel de agarose dos amplicons obtidos de amostras dos vírus recombinantes de primeira (1P) e segunda passagem (2P) em células Vero. No primeiro poço pode ser observado o controle positivo (679pb) da reação que consiste na plataforma vazia, ou seja, amplificação das regiões E e NS1 da FA. Segundo poço consiste no controle negativo da reação e do terceiro ao oitavo posso tem- se o padrão encontrado na primeira e segunda passagem dos vírus gp41-MB1, gp41-MB5 e gp120-MB1 respectivamente.

Os vírus gp41-MB1/MB5 originariam amplicons completos de 1133pb (459 cassete + 674pb de sequências flanqueadoras do YFV) e o vírus gp120-MB1 um amplicon completo de 2079pb (1405pb do cassete + 674pb de sequências

flanqueadoras do YFV). No entanto, observa-se que já na passagem 1P é possível se detectar bandas de menor tamanho de 0,8 e 0,6 kb (figura 5.5). Na verdade, isto foi observado para todos os vírus recombinantes obtidos onde ocorre a geração de vários amplicons com tamanhos menores ao esperado para o correspondente contendo o cassete integro. Estes perfis indicavam que os construtos virais eram geneticamente instáveis. Então para melhor esclarecer este ponto procedemos a determinação se a integridade das inserções de fragmentos de *env* seria consideravelmente afetada com infecções seriadas destes vírus até a quinta passagem em células Vero. Na figura 5.6 pode ser observado o resultado do RT-PCR da primeira até a quinta passagem dos vírus construídos.

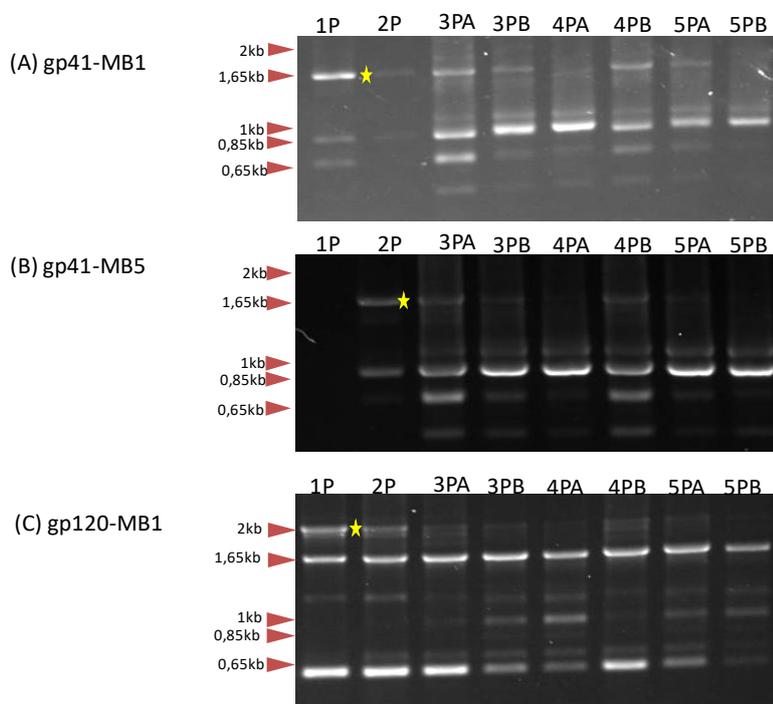


Figura 5.6-Análise da estabilidade genética dos vírus FA recombinantes para fragmentos de *env*. Padrão eletroforético em gel de agarose 1% de amplicons contendo o transgene de duas series de passagens seriadas independentes (série A e B). Foram feitas cinco passagens contínuas em células Vero, denominadas de 1P, 2P, 3P, 4P e 5P. Do lado esquerdo da foto, é indicado o padrão de tamanho em kilobases (Kb) e a estrela amarela representa o tamanho da banda correspondente ao inserto sem deleção.

Em (A), pode ser observado o padrão eletroforético referente aos amplicons do sobrenadante de células Vero infectadas com o vírus gp41-MB1, obtidos de amostras de primeira passagem (1P) à quinta passagem (5P) seriada. Poços 1 e 2

são referentes à 1P e 2P onde é observado um padrão de migração com uma banda majoritária de aproximadamente 1,7kb que corresponde ao vírus íntegro, ou seja, com a inserção inteira. São observadas também bandas minoritárias com, 0,85 kb, que corresponde à um vírus que já sofreu deleção na região contendo o cassete heterólogo e 0,65kb, que corresponderia ao tamanho esperado da região amplificada sem inserção, o que indicaria a perda total do inserto. A partir da terceira passagem, observa-se um padrão de migração com quatro bandas, com as três já descritas nas passagens anteriores e uma banda acima de 1kb.

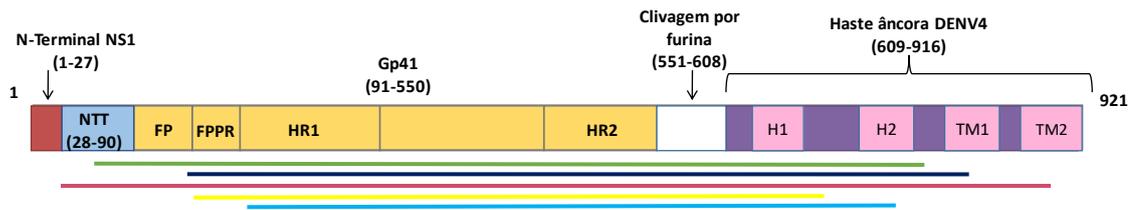
Em (B), pode ser observado o padrão eletroforético referente aos produtos amplificados do sobrenadante de células Vero infectadas com o vírus gp41-MB5, obtidos de amostras de primeira passagem (1P) à quinta passagem (5P) seriada. Os Poços 1 e 2 são referentes à 1P e 2P onde é observado um padrão de migração com uma banda majoritária de aproximadamente 1,7kb que corresponde ao vírus íntegro, ou seja, com a inserção inteira. São observadas também bandas minoritárias com, 0,85kb, que corresponde à um vírus que já sofreu deleção na região contendo o cassete heterólogo e 0,65kb, que corresponderia ao tamanho esperado da região amplificada sem inserção, o que indicaria a perda total do inserto. A partir da terceira passagem, observa-se um padrão de migração com quatro bandas, com as três já descritas nas passagens anteriores e uma banda acima de 1kb. Vale ressaltar que a 1P desse vírus está com as bandas bem fracas, fato que pode ser explicado por uma menor quantidade de vírus nessa passagem e assim a amplificação desta região viral não ter funcionado adequadamente. Da 3P (Figura 5.6, poço 3) em diante, a banda correspondente ao produto amplificado contendo o cassete heterólogo completo fica cada vez mais fraca, em contrapartida, duas bandas com aproximadamente 1kb e 0,9kb se tornam mais representativas (Figura 5.6, poços 4 ao 6).

Já em C, pode ser observado o padrão eletroforético referente aos amplicons do sobrenadante de células Vero infectadas com o vírus gp120-MB1, obtidos de amostras de primeira passagem (1P) à quinta passagem (5P) seriada. Os Poços 1 e 2 são referentes à 1P e 2P onde é observado um padrão de migração com uma banda majoritária de aproximadamente 2kb que corresponde ao vírus íntegro, ou seja, com a inserção inteira. Além disso, bandas minoritárias com tamanho de 1kb, e 0,7kb também são observadas. A partir da 3P (Figura 5.6, poço 3) além das bandas já mencionadas, pode ser detectada uma outra com tamanho de aproximadamente 0,9kb e por fim, nas passagens 4P e 5 (Figura 5.6, poços 5 ao 8) a banda

correspondente ao tamanho de 1,7kb parece se fixar junto com a de 0,7kb correspondente ao cassete vazio.

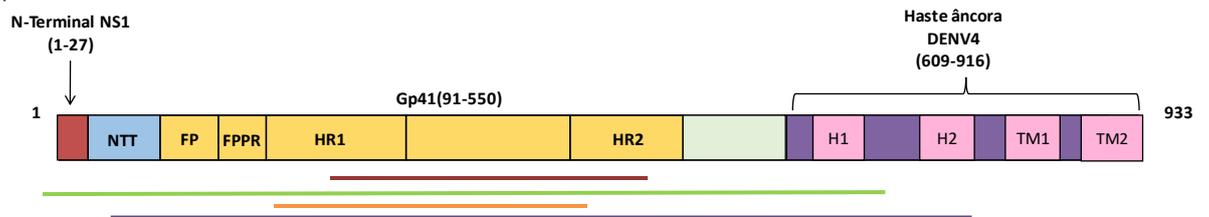
De frente desse perfil heterogêneo de bandas, há uma clara indicação de instabilidade genética em todos os vírus recombinantes construídos, no entanto o vírus gp120-MB1 parece ser mais instável visto o grande número de bandas menores do que a correspondente ao cassete completo, fato que talvez possa ser explicado pelo tamanho do inserto, que é maior do que o correspondente à gp41. Diante disso, foi realizado o sequenciamento das bandas majoritárias nas passagens 2P e 5P para a caracterização dos padrões de deleção encontrados nos vírus construídos, que estão expostos na figura abaixo 5.7.

(A) gp41-MB1



Passagem seriada	Cassete completo	Regiões deletadas	Perda completa
2P	+	Δ 58–765	+
5PA	-	Δ 142-825	+
5PB	-	Δ 28–901, Δ 143–700, Δ 192–758	+

(B) gp 41-MB5



Passagem seriada	Cassete completo	Regiões deletadas	Perda completa
2P	+	Δ 239–484	+
5PA	-	Δ 4-489, Δ 58–786	+
5PB	-	Δ 46–790	+

(C) gp120-MB1

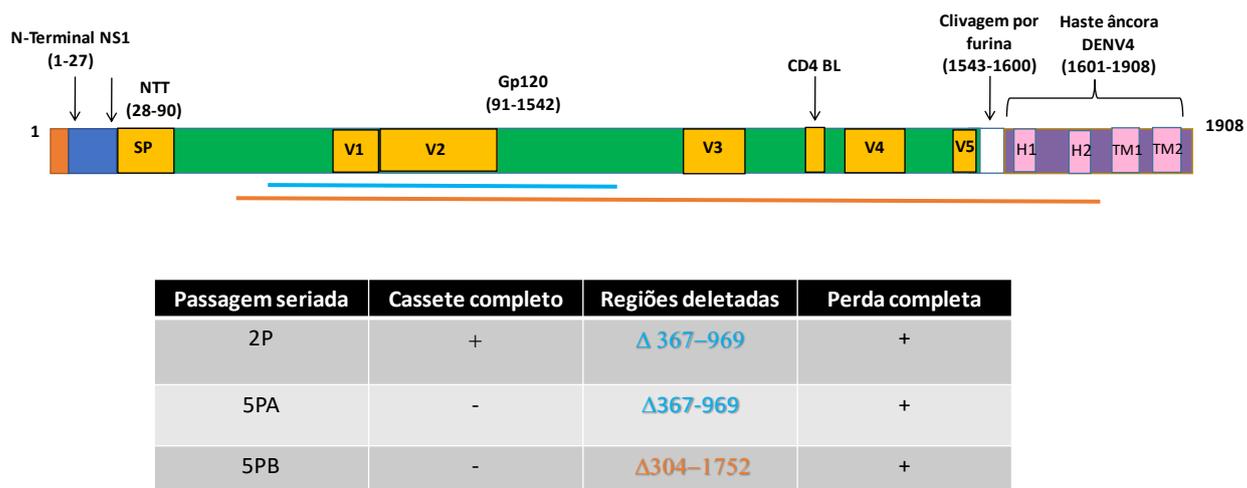


Figura 5.7- Esquemas das deleções encontradas nos vírus recombinantes construídos. Os diferentes mapas dos vírus FA recombinantes construídos encontram-se na parte superior da figura. Nestes, são indicados os principais domínios do cassete de expressão recombinante como as regiões que flanqueiam os genes heterólogos, além disso, estão sinalizados com setas os motivos importantes na construção. As barras coloridas dispostas abaixo do mapa representam as regiões deletadas e a extensão de cada deleção, associada a cada passagem seriada em células Vero, encontra-se descrita na tabela na parte de baixo da figura.

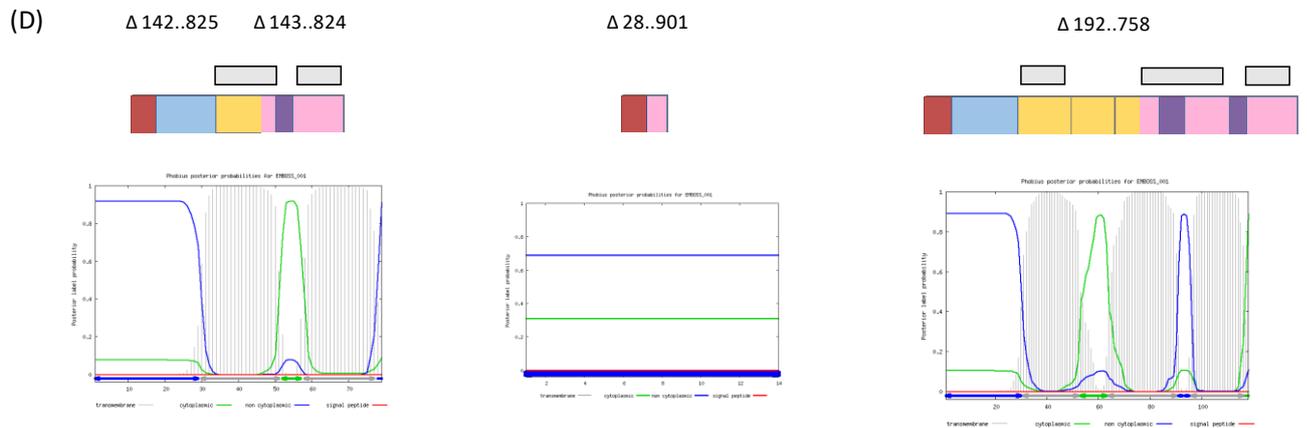
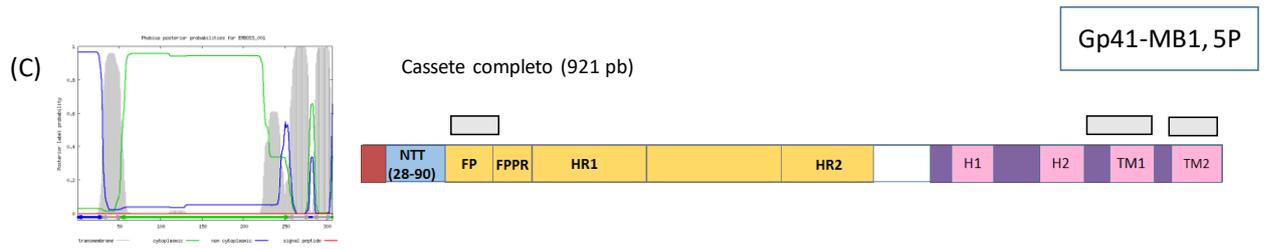
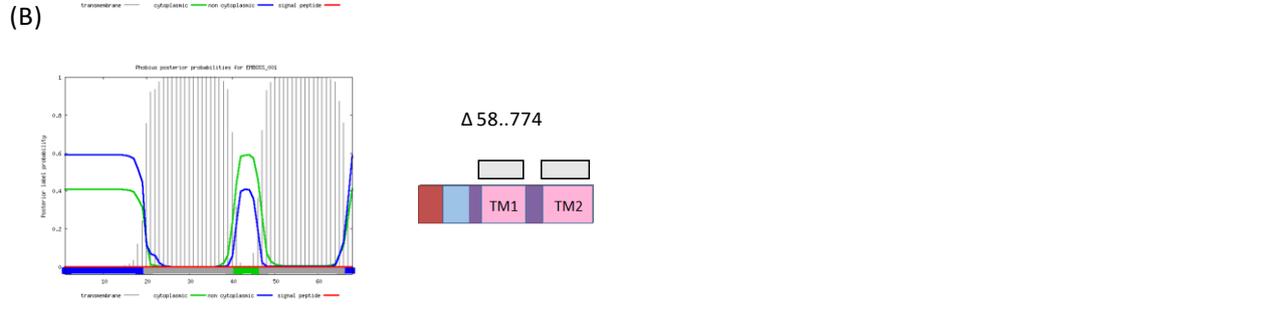
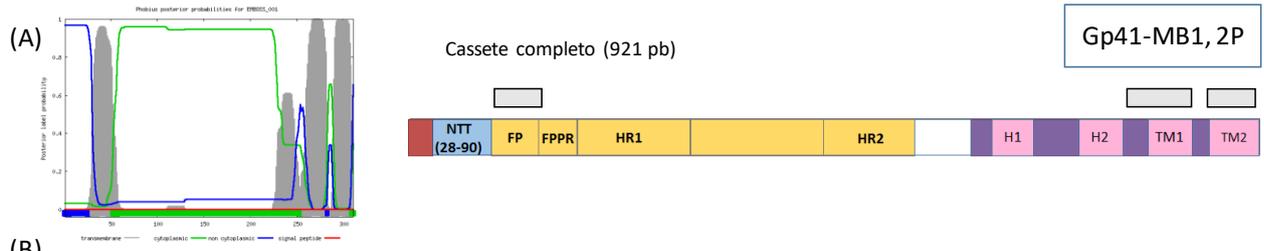
Na tabela representada mostrada na Figura 5.7, observa-se que a população viral apresenta quasiespecies com deleções na segunda passagem (2P). Uma delas apresenta deleção compreendendo os nucleotídeos de 58 ao 774, perdendo assim parte do motivo de *N*-glicosilação que precede a inserção, além de todo o inserto e parte da haste âncora da proteína E de DENV-4. Na passagem 5PA, pode ser observada uma deleção que vai do nucleotídeo 142 ao 825, perdendo assim pouco mais da metade do inserto além de parte da haste âncora de DENV-4. Já na passagem 5PB, observamos uma diversidade maior de deleções, um dos padrões observado é uma deleção que compreende os nucleotídeos de 3 ao 824, que é praticamente igual ao padrão observado na 5PA, uma outra variante compreende os nucleotídeos 28 ao 901, possuindo assim o início da NS1 e a parte final da TM2 da haste âncora de DENV-4 e por fim uma que vai dos nucleotídeos 192 ao 758 perdendo parte do inserto até a região H2 da proteína E de DENV-4.

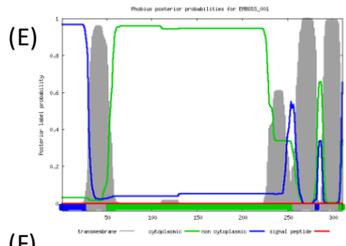
Os perfis de amplicons do vírus gp41-MB5 ao longo das passagens seriadas em células Vero podem ser observados na Figura 5.7(b). Na tabela observa-se que

a população viral apresenta quasiespecies com deleções na segunda passagem (2P), uma delas compreendendo os nucleotídeos de 239 a 484, o que acarreta perda de parte do inserto da gp41. Na passagem 5PA, pode ser observada uma deleção que vai do nucleotídeo 4 ao 489 perdendo assim desde o início do motivo de nove aminoácidos da extremidade da proteína NS1, existente no N-terminal do cassete de expressão heteróloga, até a região HR2 do inserto de gp41. Uma outra possível variante viral carregaria uma deleção compreendendo do nucleotídeo 58 ao 786 do cassete heterólogo. Esta deleção envolveria parte da região do motivo de *N*-glicosilação (motivo NTT) até pouco depois da região fusionada ao gene heterólogo correspondente ao motivo haste (H1) do domínio haste âncora da proteína E de DENV-4, domínios fusionados à extremidade carboxi do cassete de expressão. Já na passagem 5PB só é observado um padrão de deleção que vai do nucleotídeo 46 ao 790 perdendo assim parte da região do motivo de *N*-glicosilação (motivo NTT) até a H2 da haste âncora de DENV-4, que representa a perda total do gene que codifica a gp41.

O vírus FA/ gp120-MB1 apresenta dois padrões de deleção ao longo das passagens seriadas em células Vero. Uma desta, correspondente a deleção englobando os nucleotídeos de 367 a 969 do cassete de expressão heterólogo, parece se fixar, conforme se pode constatar nos amplicons obtidos nas passagens 2P e 5P. Além deste padrão, ocorre um outro que vai do nucleotídeo 304 ao 1752, perdendo assim todo o inserto, além de parte da haste-âncora da proteína E de DENV4.

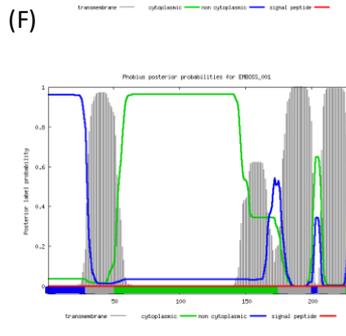
Após essa análise inicial, tentamos elucidar potenciais restrições na construção do cassete heterólogo. Assim, foi estudado como seria a orientação prevista para a proteína recombinante na sua disposição em relação membrana do retículo endoplasmático em função das regiões transmembranares do cassete. Para tal, foi utilizado o programa Phobius (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/pfa/phobius/>), que é uma plataforma *online* onde é possível prever as regiões transmembranas a partir da sequência de aminoácidos de uma dada proteína. Este programa foi escolhido por apresentar menores taxas de erros quanto às predições quando comparado com outros programas. A análise das regiões transmembranas e os mapas referentes às deleções estão demonstrados nas figuras 5.8 (A a J) abaixo.



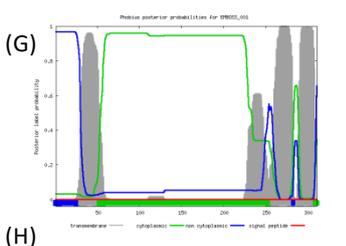
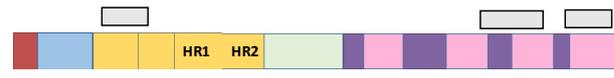


Cassete completo (933 pb)

Gp41-MB5, 2P

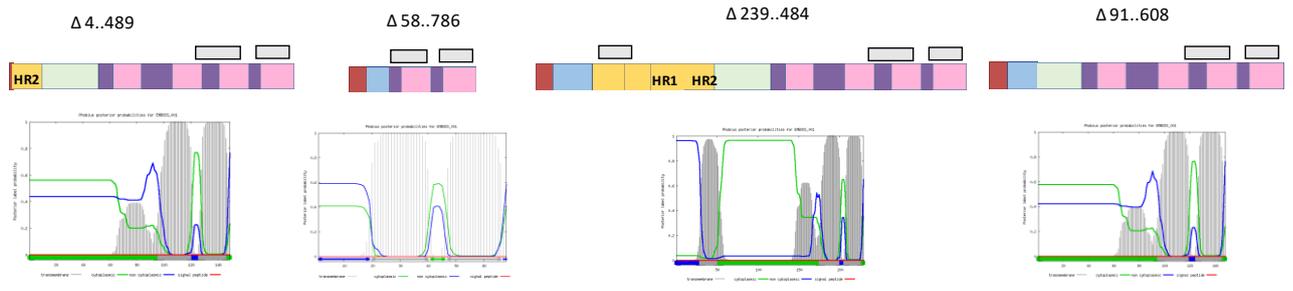
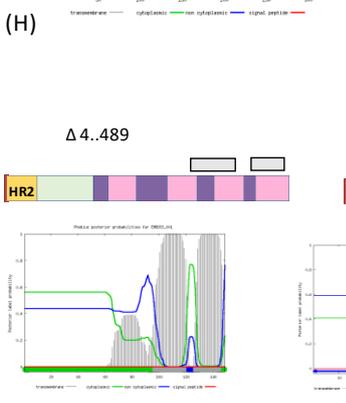


$\Delta 239..484$



Cassete completo (933 pb)

Gp41-MB5, 5P



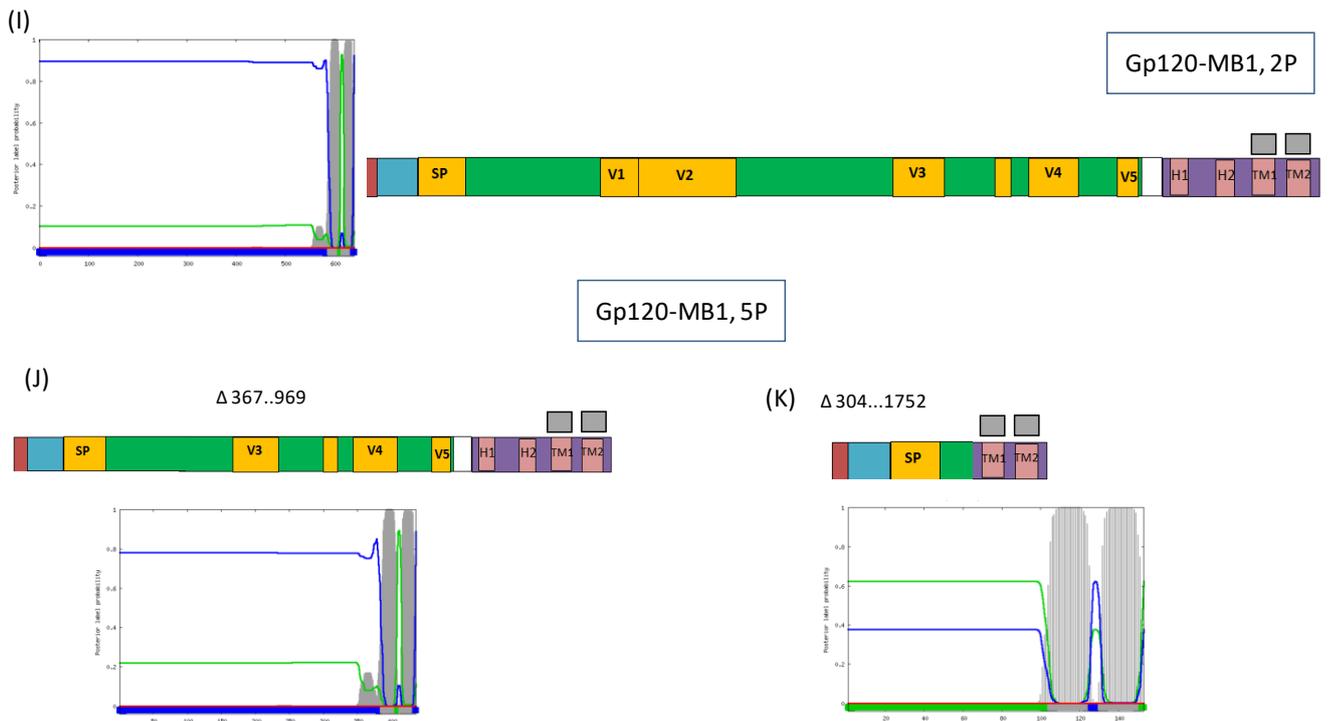


Figura 5.8. Previsão dos domínios transmembranares nas variantes virais obtidas pela passagem seriada em células Vero dos vírus recombinantes construídos. As barras cinzas verticais representam as regiões transmembranares.

Na figura 5.8 as letras referem-se: (A) gp41-MB1 2P, (B) gp41-MB1 2P com deleções, (C) gp41-MB1 5P, (D) gp41-MB1 5P com deleções, (E) gp41-MB5 2P, (F) gp41-MB5 2P com deleções, (G) gp41-MB5 5P, (H) gp41-MB5 5P com deleções, (I) gp120-MB1 2P, (J) gp120-MB1 2P e 5P com deleções. Em cada bloco de passagem seriada é primeiramente mostrado o cassete inteiro e a respectiva predição de domínios transmembranares (domínios TM) e a seguir, a análise destes motivos nas variantes da proteína obtida por deleção parcial do cassete de expressão heteróloga na respectiva passagem.

Diante desse perfil de amplicons que englobam o cassete de expressão heteróloga para fragmentos da proteína *env* de HIV-1, existe uma grande instabilidade nos vírus recombinantes construídos, pois os fragmentos clonados no genoma do vírus FA sofrem deleções extensas.

Apesar destes resultados, decidimos caracterizar a expressão destes fragmentos de Env quanto à detecção por um painel de anticorpos monoclonais específicos para estas proteínas.

Utilizamos um painel de anticorpos cedidos pelo *NIH Reagents Program* (Tabela 5.2). Esses painéis foram então utilizados no ensaio de imunofluorescência para detecção de antígenos de HIV-1 em células Vero infectadas pelo vírus gp120-MB1 visto que todo o painel de anticorpos era contra este monômero constituinte de Env. Nossa principal intenção nesta etapa era não somente detectar a expressão deste antígeno lentiviral pela plataforma FA 17D, mas também a de estabelecer se a proteína recombinante mantinha pelo menos parte de sua estrutura conformacional, dado que parte destes anticorpos reconhecem epítomos conformacionais na proteína *env* nativa.

5.4.2. Detecção de epítomos de Env de HIV-1 por microscopia de fluorescência

Os anticorpos testados frente ao vírus gp120-MB1 estão descritos na tabela 5.2 a seguir:

Tabela 5.2- Anticorpos doados pelo NIH AIDS Reagent Program utilizados na marcação de imunofluorescência.

Nome do anticorpo	Região da ligação
2G12	<i>N</i> -glicanos dos domínios C2, C3, V4, e C4 da gp120.
VRC03	Sítio de ligação do receptor CD4
VRC01	Sítio de ligação CD4
HJ16	Sítio de ligação CD4
PG9	Alças V1-V2, estrutura quaternária
PG16	Loops V2-V3, estrutura quaternária
PGT121	Glicano N332 do loop V3 da gp120
PGT126	Glicano N332 do loop V3 da gp120
PGT145	Alças V1-V2, estrutura quaternária

Os anticorpos descritos acima foram então testados frente ao vírus gp120-MB1 e o controle negativo (*Mock*) para a verificação da expressão da proteína de envelope gp120 (Figura 5.9).

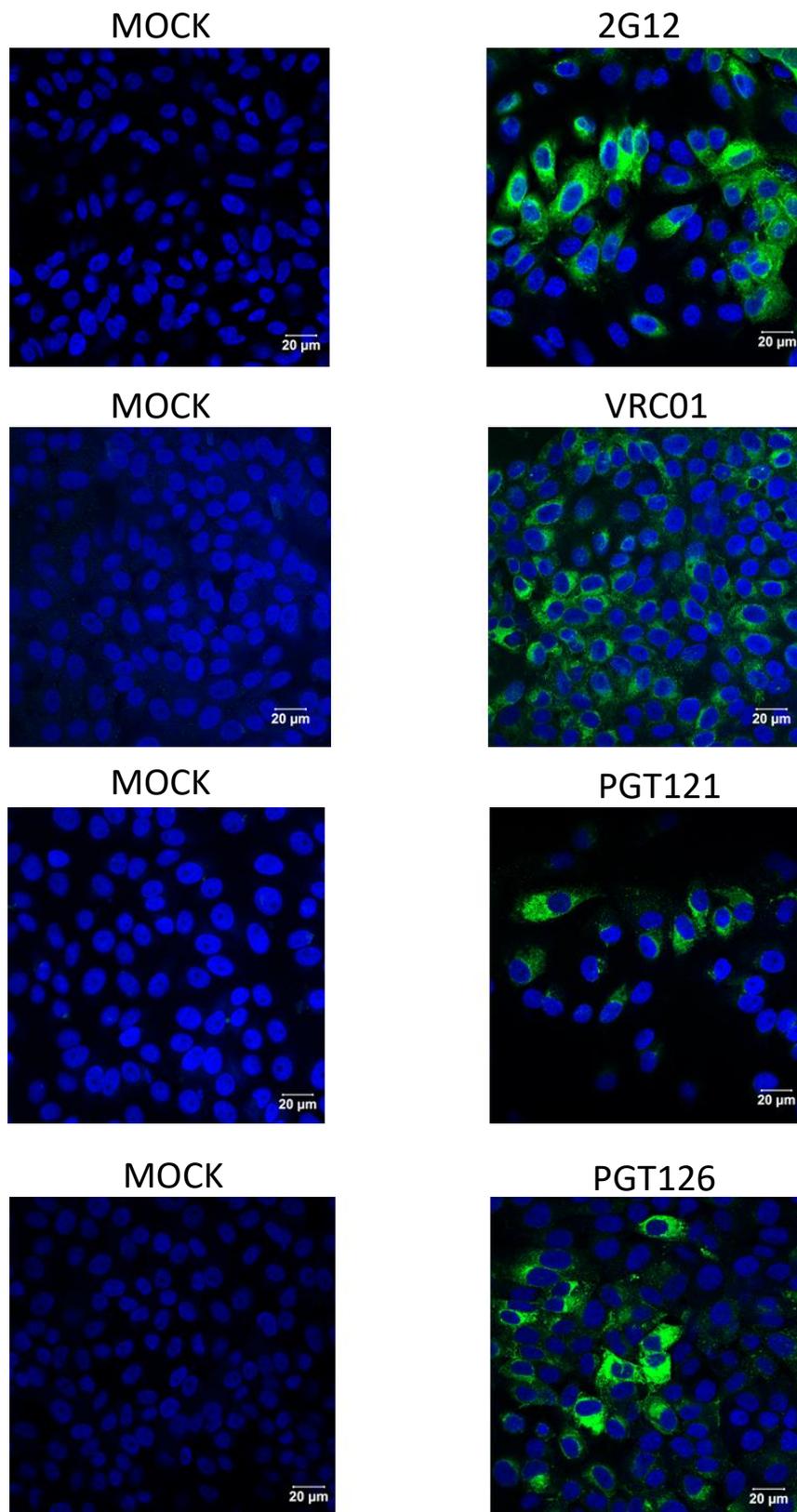


Figura 5.9- Detecção por imunofluorescencia indireta de gp 120 de env do vírus HIV-1 em células Vero infectadas pelo vírus FA recombinante para gp120. Monocamadas de células Vero infectadas por 72h pelo vírus FA/gp120-MB1 foram fixadas e marcadas com anticorpos específicos para gp120. Para revelação, anticorpo secundário conjugado a *Alexa fluor 488*(verde) foi utilizado,

assim como, núcleos das células foram corados com DAPI (em azul). As fotos foram tiradas com aumento de 100X e as barras de escala correspondem a 20µm.

Os anticorpos que conseguiram revelar a expressão de gp 120 nas células infectadas foram: 2G12, VRC01, PGT121 e PGT126. O anticorpo 2G12 como descrito na tabela acima marca os glicanos presentes nas regiões C2, C3, V4, e C4 da gp120. O anticorpo VRC 01 reconhece o sítio de ligação da gp120 do receptor celular CD4 e por fim os anticorpos PGT121 e PGT126, as glicanas da posição da sequência de aminoácidos 332 que se localiza na alça V3 da gp120. O padrão de marcação foi semelhante em todos os anticorpos, mostrando-se espelhado pelo citosol e sugerindo assim a exocitose da proteína do retículo endoplasmático.

Mesmo diante do perfil de instabilidade encontrado nos vírus recombinantes construídos, principalmente em relação ao vírus gp120-MB1, o mesmo mostrou ser capaz de expressar de alguma forma a proteína de envelope gp120 provavelmente com certa estrutura conformacional mantida, visto que todos os anticorpos que foram capazes de detectar este antígeno viral são conformacionais. Tal fato indica que a plataforma mesmo instável se mostrou capaz de expressar um antígeno heterólogo, no caso a proteína gp120 do envelope de HIV-1 de uma maneira conformacional correta.

6. DISCUSSÃO

A vacina contra febre amarela é considerada uma das vacinas mais seguras e eficazes feitas até hoje. A atenuação do vírus vacinal é um fator crucial para sua segurança, pois ele gera uma replicação limitada do vírus nos tecidos alvo, porém capaz de gerar uma resposta imune robusta e de longa duração (Monath *et al.*, 2004). Estas boas qualidades da vacina a tornam um vetor promissor para a expressão de antígenos de outros patógenos, que poderiam dar origem a vacinas recombinantes.

Neste trabalho foram apresentadas três construções de vírus recombinantes de FA17D que expressavam proteínas heterólogas do HIV-1, mais especificamente as do envelope (gp41 e gp120) e devido fato da originalidade do trabalho, o mesmo só pôde ser comparado com um trabalho anteriormente desenvolvido no laboratório em que o alvo de expressão eram proteínas de envelope de SIV. As plataformas de expressão escolhidas foram MB1 e MB5, pois as mesmas já se mostraram eficientes na expressão de antígenos heterólogos de SIV (proteína gp41 e parte da gp120), dados mostrados na Tese da Dra. Noemia Santana, 2015. A estratégia de inserção entre a região intergênica entre E e NS1 de FA17D já vem sendo explorada pelo nosso grupo a alguns anos, e tal sítio tem se mostrado permissivo para a expressão de proteínas inteiras e bastante promissor para a estimulação de resposta imune contra estas proteínas, o que já rendeu duas patentes depositadas no Brasil e no exterior (Bonald & Galler, 2005; Bonald *et al.*, 2012). Já se foi demonstrada a indução de resposta imune celular a proteínas derivadas de patógenos, como ASP-2 derivada de *Trypanosoma cruzi*, e proteínas de SIV mac239 (Bonald *et al.*, 2010; Nogueira *et al.*, 2011; Martinset *et al.*, 2013 a Nogueira *et al.*, 2013 a, Noemia Lima, 2015) e a expressão da proteína p24 de HIV-1 por Franco e colaboradores em 2010.

Apesar da geração de três vírus viáveis: gp41-MB1, gp41-MB5, gp120-MB1; os mesmos se mostraram altamente instáveis, apresentando deleções em parte do cassete de expressão heteróloga já na segunda passagem. O construto que expressaria a proteína gp140, ou seja, o trímero não foi viável na sua clonagem em plasmídeo em *E.coli.*. Este fato que pode ser explicado pela presença de promotores bacterianos crípticos. Deve ser considerado que o vírus HIV-1 em seu ciclo infectivo não utiliza células procariotas e, portanto ao se clonar este tipo de sequência em bactérias, as mesmas podem apresentar promotores bacterianos crípticos ao acaso

que induzem a expressão de proteínas viriais ou de outras proteínas espúrias. Isto é conhecido em flavivírus, onde existe uma dificuldade considerável na obtenção de clones infecciosos virais (Pu *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2011; Pu *et al.*, 2011). Outra explicação possível seria o tamanho do inserto de aproximadamente 2kb, o mesmo é o maior inserto que já foi testado nessa plataforma de expressão (Bonaldo *et al.*, 2014), então seu tamanho poderia influenciar no correto processamento e disposição da poliproteína viral e assim tornando o vírus inviável. Entretanto, as sequências similares de gp120 de SIV expressas pelo vírus FA tiveram uma maior estabilidade que as equivalente de HIV. Seria interessante se estabelecer por programas de predição de promotores bacterianos se há diferença na presença e quantidade de promotores nestes dois fragmentos lentivirais. Assim, a obtenção da expressão da forma trimérica de gp140 em células eucarióticas não foi possível por simplesmente não termos conseguido clonar estas sequências em plasmídeos bacterianos, etapa necessária para obtenção de um cDNA molde. Uma possibilidade que possa resolver esta limitação seria a de introduzir trocas nas sequências nucleotídicas de modo a nocautear os possíveis promotores crípticos. Isto já foi empregado na obtenção de clone infeccioso estável para DEN (Pu *et al.*, 2011).

Além da instabilidade na clonagem de sequências do vírus FA e os codantes para proteínas heterólogas em *E. coli*, existe a restrição de que o gene heterólogo a ser expresso pela plataforma FA vacinal acarrete em um efeito deletério considerável no “fitness” do vírus recombinante pela expressão de proteínas, ou até mesmo pela presença de elementos funcionais no RNA viral, que interfiram no processo de replicação viral na célula hospedeira. Um exemplo disto, o da base molecular da instabilidade dos vírus recombinantes construídos, é o da expressão de sequências contendo o domínio funcional de sítios internos de entrada ribossomal (IRES) que demonstraram trazer instabilidade em um vírus recombinante que expressava fragmentos do antígeno de Gag de SIV. Após a introdução de mutações neste motivo lentiviral, o vírus FA recombinante carregando o motivo nocauteado tornou-se estável até a vigésima passagem seriada em células Vero (Bonaldo *et al.*, 2014). Outro fato que pôde desencadear tal instabilidade nos vírus FA que expressam gp120 e gp41, são propriedades intrínsecas do gene heterólogo. Assim, em um dos vírus obtidos neste trabalho, o que expressa uma forma truncada da gp41, a presença do peptídeo de fusão, motivo que dispara a fusão viral às membranas celulares da célula infectada e está ligada à instabilidade genética deste recombinante. Este é um fragmento hidrofóbico que é naturalmente

protegido em HIV com a associação à gp120. No caso da expressão única da gp 41, não existe qualquer sequência específica que iniba a associação deste domínio à membrana do retículo endoplasmático. Por outro lado, a predição de alfa-hélices transmembranares indica que a proteína recombinante teria três domínios transmembranares. Assim, especulamos que este trecho hidrofóbico com a capacidade de formar domínios transmembranares acarrete na mudança da topologia de membrana da poliproteína viral e portanto, isto implicaria em alterações deletérias no processamento da poliproteína viral. Tais dados podem ser confrontados com os resultados apresentados na Tese de Doutorado da Dra. Noemia Lima, 2015 em que foram construídos vírus recombinantes nas mesmas plataformas que expressavam a proteína gp41 de SIV. Tais vírus mostraram-se instáveis quando comparados com os que foram nocauteados para esse sítio, demonstrando assim a influência do mesmo na estabilidade viral. Um possível desdobramento deste trabalho seria a da introdução de alterações nucleotídicas neste domínio de modo a romper as propriedades fusionais dele. Esta estratégia seria expandida também para a obtenção de gp140.

A tentativa de expressão do trímero (gp140) é de suma importância, pois é contra esta estrutura que são dirigidos os anticorpos com atividade neutralizante sendo assim um fator chave pra imunogenicidade (Reitter *et al.*, 1998; Wei *et al.*, 2003; Pikora, 2004; Walker *et al.*, 2011; Horiya *et al.*, 2014), no entanto a estrutura trimérica da espícula viral é extremamente instável (Moore *et al.*, 2006). Vários estudos têm sido realizados com objetivo de estudar modificações que tornem essa estrutura mais estável, sendo possível a indução de anticorpos neutralizantes (Binley *et al.*, 2000; Sanders *et al.*, 2002; Beddows *et al.*, 2005; Sanders *et al.*, 2013). A geração de vírus rFA17D que expressem estas proteínas com capacidade de trimerização na conformação nativa seria interessante para o desenvolvimento de vacinas para o HIV, ou SIV como modelo. Finalmente, para conseguirmos obter a expressão desta proteína pelo vírus FA, temos que estabilizar esta sequência em plasmídeos bacterianos, que seja pelo nocaute de promotores procariótico crípticos ou pela escolha de plasmídeos que aumentam a estabilidade na bactéria. Um ponto a favor desta abordagem é que a expressão de gp 120 parece manter pelo menos parte dos epitopos conformacionais.

Por outro lado, devemos considerar que a expressão da gp120 completa de HIV-1 foi também instável. O mapeamento das regiões deletadas durante a passagem seria do vírus FA recombinante em células Vero indica que as alças V1 e

V2 são preferencialmente deletadas. O interessante que o fragmento similar de gp120 de SIV que clonamos anteriormente e que apresenta uma maior estabilidade genética foi derivada de um gene sintético no qual removíamos algumas sequências desta proteína, em especial V1 e V2. Este construto da gp 120 de SIV foi baseado na proteína recombinante obtida que foi utilizada para a elucidação de parte da estrutura tridimensional de gp120 (Harrison *et al.*, 2005). Pode ser que estes domínios provoquem instabilidade viral. Assim, seria interessante expressar variantes da gp120 e da gp140, nas quais estas alças não fossem expressas. A principal limitação desta abordagem estaria relacionada à perda de determinantes antigênicos que poderiam ser importantes.

O conjunto de dados obtidos neste trabalho indica que a expressão proteínas heterólogas pelo vírus FA vacinal deve ser precedida por uma análise físico-química e funcional rigorosa a fim de se tentar evitar potenciais restrições ao êxito da estratégia.

Diante dos resultados apresentados os objetivos específicos relacionados à avaliação da resposta frente aos vírus recombinantes em modelo murino não foi cumprido, visto que a resposta seria dada à vírus com insertos diferentes do tamanho correto e assim seria impossível rastrear contra qual epítipo a resposta estaria sendo montada.

7 CONCLUSÕES

- A expressão de antígenos do envelope viral do HIV-1 utilizando a plataforma do vírus vacinal da Febre Amarela que utiliza a região intergênica entre E/NS1 gerou três vírus recombinantes viáveis: gp41-MB1, gp41-MB5 e gp120-MB1;
- Não foi possível obter vírus FA recombinante para gp140 devido ao insucesso da clonagem desta sequência no clone infeccioso do vírus FA. O possível motivo disso pode ser a presença de promotores bacterianos crípticos que impeçam a clonagem do fragmento;
- Os vírus recombinantes construídos foram instáveis, já apresentando deleção parcial do cassete de expressão na segunda passagem seriada;
- Os vírus recombinantes construídos que expressavam a proteína gp41 apresentavam uma região de peptídeo de fusão na sua sequência, tal fato pode ter trago instabilidade para tais vírus, visto que o peptídeo de fusão é uma sequência hidrofóbica que mantém a proteína ancorada à membrana atrapalhando assim a correta topologia de membrana e o processamento normal da poliproteína viral.
- Os anticorpos 2G12, VRC01, PGT121 e PGT126 reconheceram epítomos conformacionais da proteína gp120 expressos pelo vírus recombinante gp120-MB1 mostrando que este vírus apesar de instável, é capaz de manter de certa forma a estrutura conformacional da gp120 na sua forma nativa.

8 PERSPECTIVAS

- Fazer a predição de promotores bacterianos críticos que podem estar relacionados com a inviabilidade de clonagem molecular em plasmídeos bacterianos e assim incorporá-las em novos genes sintéticos, principalmente de gp140;
- Deve-se construir vírus recombinantes que expressem a proteína de envelope gp41 com o sítio do peptídeo de fusão nocauteado visto que tal estratégia estabilizou os vírus com esse mesmo inserto de SIV;
- Deve-se tentar expressar a proteína gp140 em outros vetores plasmidiais, visto que tal construção não foi possível na nossa plataforma de expressão;

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Allison SL, Stiasny K, Stadler K, Mandl CW, Heinz FX. Mapping of functional elements in the stem-anchor region of tick-borne encephalitis virus envelope protein E. *J Virol.* 1999;73(7):5605-12.

Barba-Spaeth G, Longman RS, Albert ML, Rice CM (2005) Live attenuated yellow fever 17D infects human DCs and allows for presentation of endogenous and recombinant T cell epitopes. *The Journal of experimental medicine* 202: 1179-1184

Barre-Sinoussi, F., Chermann, J., Rey, F., Nugeyre, M., Chamaret, S., Gruest, J., Montagnier, L. (1983) Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science*, 220(4599), 868–871.

Beddows S, Schulke N, Kirschner M, Barnes K, Franti M, Michael E, et al. Evaluating the immunogenicity of a disulfide-stabilized, cleaved, trimeric form of the envelope glycoprotein complex of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol.* 2005;79(14):8812-27.

Binley JM, Sanders RW, Clas B, Schuelke N, Master A, Guo Y, et al. A recombinant human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein complex stabilized by an intermolecular disulfide bond between the gp120 and gp41 subunits is an antigenic mimic of the trimeric virion-associated structure. *J Virol.* 2000;74(2):627-43.

Bonaldo M, Galler R, Watkins D, Sacha J, inventors Lentivirus vaccine based on the recombinant viral vaccine against yellow fever 2012

Bonaldo MC, Caufour PS, Freire MS, Galler R. The yellow fever 17D vaccine virus as a vector for the expression of foreign proteins: development of new live flavivirus vaccines. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2000;95 Suppl 1:215-23.

Bonaldo MC, Galler R, inventors; Fundação Oswaldo Cruz, assignee. Method for the Production of Recombinant Virus, DNA Constructs, Recombinant Virus and Vaccine Compositions BRAZIL2005.

Bonaldo MC, Martins MA, Rudersdorf R, Mudd PA, Sacha JB, Piaskowski SM, et al. Recombinant yellow fever vaccine virus 17D expressing simian immunodeficiency virus SIVmac239 gag induces SIV-specific CD8+ T-cell responses in rhesus macaques. *J Virol.* 2010;84(7):3699-706.

Bonaldo MC, Mello SM, Trindade GF, Rangel AA, Duarte AS, Oliveira PJ, et al. Construction and characterization of recombinant flaviviruses bearing insertions between E and NS1 genes. *Virology*. 2007;4:115.

Bonaldo MC, Sequeira PC, Galler R. The yellow fever 17D virus as a platform for new live attenuated vaccines. *Hum Vaccin Immunother.* 2014;10(5):1256-65.

Bressanelli S, Stiasny K, Allison SL, Stura EA, Duquerroy S, Lescar J, et al. Structure of a flavivirus envelope glycoprotein in its low-pH-induced membrane

fusion conformation. *EMBO J.* 2004;23(4):728-38

Brindeiro, RM., Diaz, RS., Sabino, EC., Morgado, MG., Pires, IL., Brigido, L., Dantas, MC., Barrreira, D., Teixeira, TR., Tanuril, A. (2003) Brazilian Network for HIV Drug Resistance Surveillance (HIV-BResNet): a survey of chronically infected individuals. *AIDS.* May 2;17(7):1063-9.

Burton DR, Ahmed R, Barouch DH, Butera ST, Crotty S, Godzik A, et al. A Blueprint for HIV Vaccine Discovery. *Cell Host Microbe.* 2012;12(4):396-407.

Carter HR. Yellow Fever. An Epidemiological and Historical Study of its Place of Origin. Baltimore: Williams and Wilkins; 1931

Centers for Disease Control and Prevention (CDC) (1981) - Morbidity and Mortality Weekly Report.

Chambers T, Monath T. The flaviviruses: structure, replication, and evolution. Amsterdam; London: Elsevier; 2003.

Clavel, F., Guetard, D., Brun-Venizet, F., Rey, M.A., Santos-Ferreira, M.O., Laurent, A.G., DAuget, C., Katlama, C., Rouzioux, C., Champalimaud, J.L., Montagnier, L. (1986) Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. *Science*, 233(4761), 343–346.

Delatorre, EO., Bello, G., Eyer-Silva, WA., Chequer-Fernandez, SL., Morgado, MG., Couto-Fernandez, JC. (2012) Evidence of multiple introductions and autochthonous transmission of the HIV type 1 CRF02_AG clade in Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses*;28(10):1369-72.

Esparza, J., Bhamarapavati, N. (2000) Accelerating the development and future availability of HIV-1 vaccines: why, when, where, and how? *Lancet.* 10;355(9220):2061-6.

Fouts TR, Binley JM, Trkola A, Robinson JE, Moore JP (1997) Neutralization of the human immunodeficiency virus type 1 primary isolate JR-FL by human monoclonal antibodies correlates with antibody binding to the oligomeric form of the envelope glycoprotein complex. *J Virol* 71:2779–2785

Franco D, Li W, Qing F, Stoyanov CT, Moran T, Rice CM, et al. Evaluation of yellow fever virus 17D strain as a new vector for HIV-1 vaccine development. *Vaccine.* 2010;28 (35):5676-85.

Galler R, Freire M, inventors; Fundação Oswaldo Cruz, assignee. Yellow Fever infectious cDNA and plasmids. 2001. Patente US 2001.

Galler R, Pugachev KV, Santos CL, Ocran SW, Jabor AV, Rodrigues SG, et al. Phenotypic and molecular analyses of yellow fever 17DD vaccine viruses associated with serious adverse events in Brazil. *Virology.* 2001;290(2):309-19.

GREENE, W.C. (2007) A history of AIDS: Looking back to see ahead. *Eur J Immunol* 37 (suppl. 1): S94-S102

Hirsch, VM., Olmsted, RA., Murphey-Corb, M., Purcell, RH., Johnson, PR. (1989) An African primate lentivirus (SIVsm) closely related to HIV-2. *Nature* 339, 389-

Horiya S, MacPherson IS, Krauss IJ. Recent strategies targeting HIV glycans in vaccine design. *Nat Chem Biol.* 2014;10(12):990-9.

Huet, T., Cheynier, R., Meyrhans, A., Roelants, G., Wain- Hobson, S. (1990). Genetic organization of a chimpanzee lentivirus related to HIV-1. *Nature*, 345, 356 – 359

Jabor AV. Manipulação genética do vírus amarelo vacinal 17D. Dissertação de mestrado em Virologia e Biologia Celular e Molecular: IOC; 2001.

Junqueira, DM., SE, Almeida., DE Medeiros, RM., Graf, T., Passaes, CP., Bello, G., Morgado, MG., L Guimarães, M.(2012) Temporal dynamics of HIV-1 circulating subtypes in distinct exposure categories in southern Brazil. *Viol J.* 9:306. doi: 10.1186/1743-422X-9-306

Klein F, Mouquet H, Dosenovic P, Scheid JF, Scharf L, Nussenzweig MC. Antibodies in HIV-1 vaccine development and therapy. *Science.* 2013;341(6151):1199-204.

Li D, Aaskov J, Lott WB. Identification of a cryptic prokaryotic promoter within the cDNA encoding the 5' end of dengue virus RNA genome. *PLoSOne.* 2011 Mar 31;6(3):e18197. doi: 10.1371/journal.pone.0018197.

Lima, NS. Estudos biológicos e imunológicos de novas plataformas de expressão de proteínas pelo vírus de febre amarela vacinal 17D. Tese de Doutorado em Biologia Celular:IOC; 2015

Lindenbach BD, Rice CM. Flaviviridae: The Viruses and Their Replication. In Knipe DM, Howley PM, Griffin DE Eds, *Fields Virology*, 4th ed. Lippincott Williams & Wilkins Publishers; 2001.

Liniger M, Zuniga A, Naim HY (2007) Use of viral vectors for the development of vaccines. *Expert reviewofvaccines* 6: 255-266.

Lloyd W, Theiler M, Ricci N. Modification of the virulence of yellow fever virus by cultivation in tissues in vitro. *Trans R SocTropMedHyg.* 1936;29:481–529.

Lobigs M, Lee E, Ng ML, Pavy M, Lobigs P. A flavivirus signal peptide balances the catalytic activity of two proteases and thereby facilitates virus morphogenesis. *Virology.* 2010; 25;401(1):80-9.

MACKENZIE, J. M.; JONES, M. K.; YOUNG, P. R. Immunolocalization of the Dengue

Martins MA, Bonaldo MC, Rudersdorf RA, Piaskowski SM, Rakasz EG, Weisgrau KL, et al. Immunogenicity of seven new recombinant yellow fever viruses 17D expressing fragments of SIVmac239 Gag, Nef, and Vif in Indian rhesus macaques. *PLoS One.* 2013a;8(1):e54434.

Martins RM, Galler R, Freire MS, Camacho LA, de Lourdes SMM, et al. (2007) Yellow fever vaccination: some thoughts on how much is enough [Vaccine 23 (2005) 3908-3914]. *Vaccine* 25: 10-11

Mascola JR, Montefiori DC. The role of antibodies in HIV vaccines. *AnnuRevImmunol*. 2010;28:413-44.

Miller JD, van der Most RG, Akondy RS, Glidewell JT, Albott S, et al. (2008) Human effector and memory CD8+ T cell responses to smallpox and yellow fever vaccines. *Immunity* 28: 710-722.

Ministério da Saúde, Departamento de HIV, Aids e Hepatites virais (2013). *Boletim Epidemiológico - Aids e DST*. Brasília, Distrito Federal

Monath 2001, YellowfeverVaccine

Monath T (2004) Yellow fever vaccine. Philadelphia: WB Saunders.

Monath TP, Vasconcelos PF, Yellowfever. *J ClinVirol*. 2015;64:160-73

Moore PL, Crooks ET, Porter L, Zhu P, Cayan CS, Grise H, et al. Nature of nonfunctional envelope proteins on the surface of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol*. 2006;80(5):2515-28.

Morgado, MG, Sabino, EC., Shpaer, EG., Bongertz, V., Brigido, L., GUIMARAES, MD., Castilho, EA., Galvão-Castro B., Mullins, JI., Hendry, RM., et al. (1994) V3 region polymorphisms in HIV-1 from Brazil: prevalence of subtype B strains divergent from North American/European prototype and detection of subtype F. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 10(5):569-76.

Morgado, MG., Guimarães, ML., Gripp, CB., Costa, CI., Neves I, JR., Veloso, VG., Linhares-Carvalho, MI., Castello-Branco, LR., Bastos, FI., Kuiken, C., Castilho, EA., Galvão-Castro, B., Bongertz, V. (1998) *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol*.18(5):488-94.

Mukhopadhyay S, Kuhn RJ, Rossmann MG. A structural perspective of the flavivirus life cycle. *Nat Rev Microbiol*. 2005;3(1):13-22.

MUYLAERT, I. R.; GALLER, R.; RICE, C. M. American Society for Microbiology Genetic Analysis of the Yellow Fever Virus NS1 Protein: Identification of a Temperature-Sensitive Mutation Which Blocks RNA Accumulation. *JournalofVirology*, p. 291–298 Vol. 71, No.1; 1997.

Nogueira RT, Nogueira AR, Pereira MC, Rodrigues MM, Galler R, Bonaldo MC. Biological and immunological characterization of recombinant Yellow Fever 17D viruses expressing a Trypanosoma cruzi Amastigote Surface Protein-2 CD8+ T cell epitope at two distinct regions of the genome. *Virol J*. 2011;8:127.

Nogueira RT, Nogueira AR, Pereira MC, Rodrigues MM, Neves PC, Galler R, et al. Recombinant yellow fever viruses elicit CD8+ T cell responses and protective immunity against Trypanosoma cruzi. *PLoS One*. 2013;8(3):e59347.

Oliveira AC, Maria Henrique da Mota L, Dos Santos-Neto LL, De Carvalho JF, Caldas IR, Martins Filho OA, et al. Occurrence of Autoimmune Diseases Related to the Vaccine against Yellow Fever. *Autoimmune Dis*. 2014;2014:473170.

Pantophlet R, Burton DR. GP120: target for neutralizing HIV-1 antibodies. *Annu*

Rev Immunol. 2006;24:739-69.

Perera R, Kuhn RJ. Structural proteomics of dengue virus. *Curr Opin Microbiol.* 2008;11(4):369-77.

Pitisuttithum P, Gilbert P, Gurwith M, Heyward W, Martin M, van Griensven F, et al. Randomized, double-blind, placebo-controlled efficacy trial of a bivalent recombinant glycoprotein 120 HIV-1 vaccine among injection drug users in Bangkok, Thailand. *J Infect Dis.* 2006;194(12):1661-71.

Pikora CA. Glycosylation of the ENV spike of primate immunodeficiency viruses and antibody neutralization. *Curr HIV Res.* 2004;2(3):243-54.

Pletnev, A. G.; Bray, M.; Lai, C. J. Chimeric tick-borne encephalitis and dengue type 4 viruses: effects of mutations on neurovirulence in mice. *Journal of Virology*, 67:4956-4963;1993.

Pu SY, Wu RH, Tsai MH, Yang CC, Chang CM, Yueh A. A novel approach to propagate flavivirus infectious cDNA clones in bacteria by introducing tandem repeat sequences upstream of virus genome. *J Gen Virol.* 2014 Jul;95(Pt 7):1493-503. doi: 10.1099/vir.0.064915-0. Epub 2014 Apr 11

Pu SY, Wu RH, Yang CC, Jao TM, Tsai MH, Wang JC, Lin HM, Chao YS, Yueh A. Successful propagation of flavivirus infectious cDNAs by a novel method to reduce the cryptic bacterial promoter activity of virus genomes. *J Virol.* 2011 Mar;85(6):2927-41. doi: 10.1128/JVI.01986-10. Epub 2011 Jan 12.

Racaniello VR, Baltimore D. Molecular cloning of poliovirus cDNA and determination of the complete nucleotide sequence of the viral genome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1981; 78(8):4887-91.

Reitter JN, Means RE, Desrosiers RC. A role for carbohydrates in immune evasion in AIDS. *Nat Med.* 1998;4(6):679-84.

Rey FA, Heinz FX, Mandl C, Kunz C, Harrison SC. The envelope glycoprotein from tick-borne encephalitis virus at 2 Å resolution. *Nature.* 1995;375(6529):291-8.

Rice CM, Grakoui A, Galler R, Chambers TJ. Transcription of infectious yellow fever RNA from full-length cDNA templates produced by in vitro ligation. *New Biol.* 1989;1(3):285-96.

Richman DD, Margolis DM, Delaney M, Greene WC, Hazuda D, Pomerantz RJ. The challenge of finding a cure for HIV infection. *Science.* 2009;323(5919):1304-7.

Sanders RW, Derking R, Cupo A, Julien JP, Yasmeen A, de Val N, et al. A next-generation cleaved, soluble HIV-1 Env trimer, BG505 SOSIP.664 gp140, expresses multiple epitopes for broadly neutralizing but not non-neutralizing antibodies. *PLoS Pathog.* 2013;9(9):e1003618

Sanders RW, Vesanen M, Schuelke N, Master A, Schiffner L, Kalyanaraman R, et al. Stabilization of the soluble, cleaved, trimeric form of the envelope glycoprotein

complex of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol.* 2002;76(17):8875-89.

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Nat AcadSci USA.* 1977; 74(12):5463-67.

Santos, AF., Schrago, CG., Martinez, AM., Mendonza-Sassi, R., Silveira, J., Sousa, TM., Lengruher, RB., Soares, EA., Sprinz, E., Soares, MA.(2003) Epidemiologic and evolutionary trends of HIV-1 CRF31_BC-related strains in southern Brazil. *J Acquir Immune Defic Syndr* ;45(3):328-33.

Soares, MA.(2003) Epidemiologic and evolutionary trends of HIV-1 CRF31_BC-related strains in southern Brazil. *J Acquir Immune Defic Syndr* ;45(3):328-33.

Steinbrook R. One step forward, two steps back--will there ever be an AIDS vaccine? *N Engl J Med.* 2007;357(26):2653-5.

Theiler M, Smith HH. The Effect of Prolonged Cultivation in Vitro Upon the Pathogenicity of Yellow Fever Virus. *J Exp Med.* 1937a;65(6):767-86

Turner, B.G., Summers, M.T. (1999) Structural Biology of HIV. *Journal of Molecular Biology.* 285(1); 1-32.

Virus Nonstructural Glycoprotein NS1 Suggests a Role in Viral RNA Replication. *Virology.*

Velasco-De-Castro, CA., Grinsztein, B., Veloso, VG., Bastos, FI., Pilotto, JH., Fernandes, N., Morgado, MG. (2014) *PLoS One.* 9(1):e87622. doi: 10.1371/journal.pone.0087622. eCollection 2014.

Walker LM, Sok D, Nishimura Y, Donau O, Sadjadpour R, Gautam R, et al. Rapid development of glycan-specific, broad, and potent anti-HIV-1 gp120 neutralizing antibodies in an R5 SIV/HIV chimeric virus infected macaque. *Proc Natl AcadSci U S A.* 2011;108(50):20125-9

Wei X, Decker JM, Wang S, Hui H, Kappes JC, Wu X, et al. Antibody neutralization and escape by HIV-1. *Nature.* 2003;422(6929):307-12.

WHO 2016A

Walter Reed, Medical Corps, US Army, and the Yellow Fever Commission.: Yellow fever. A compilation of various publications. Results of the work of Maj 61st Congress Doc No. 822; Govt Printing Office, Washington DC;1911

Yu IM, Holdaway HA, Chipman PR, Kuhn RJ, Rossmann MG, Chen J. Association of the pr peptides with dengue virus at acidic pH blocks membrane fusion. *J Virol.* 2009;83(23):12101-7.

Zhang Y, Zhang W, Ogata S, Clements D, Strauss JH, Rossmann MG, et al. Conformational changes of the flavivirus E glycoprotein. *Structure.* 2004; 12(9):1607-18.