

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS AGGEU MAGALHÃES
Curso de Mestrado em Saúde Pública

Fábia da Silva Pereira Cruz

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO
DE VACINAS DE DNA CONTRA O
VÍRUS DA FEBRE AMARELA**

RECIFE
2011

FÁBIA DA SILVA PEREIRA CRUZ

DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE VACINAS DE DNA CONTRA O
VÍRUS DA FEBRE AMARELA

Dissertação apresentada no Curso de
Mestrado em Saúde Pública do Centro
de Pesquisas Aggeu Magalhães,
Fundação Oswaldo Cruz para a
obtenção de Mestre em Ciências.

Orientador: Dr. Rafael Dhalia

Recife
2011

Catálogo na fonte: Biblioteca do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

C957d Cruz, Fábida da Silva Pereira.

Desenvolvimento e avaliação de vacinas de DNA contra o vírus da febre amarela/ Fábida da Silva Pereira Cruz. — Recife: F. S. P. Cruz, 2011.

76 p.: il.

Dissertação (Mestrado Acadêmico em Saúde Pública) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz.

Orientador: Rafael Dhalia.

1. Febre Amarela. 2. Vacinas. 3. Otimização. I. Dhalia, Rafael.
II. Título.

CDU 616.93

FÁBIA DA SILVA PEREIRA CRUZ

DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE VACINAS DE DNA CONTRA O
VÍRUS DA FEBRE AMARELA

Dissertação apresentada no Curso de
Mestrado em Saúde Pública do Centro
de Pesquisas Aggeu Magalhães,
Fundação Oswaldo Cruz para a
obtenção de Mestre em Ciências.

Aprovado em:

BANCA EXAMINADORA:

DR. RAFAEL DHALIA (Orientador)
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães - CPqAM
Departamento de Virologia

DRA. MARIA HELENA NEVES LOBO SILVA FILHA (1º Titular)
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhaes - CPqAM
Departamento de Entomologia

DR. CHRISTIAN ROBSON DE SOUZA REIS (2º Titular)
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhaes - CPqAM
Departamento de Microbiologia

DRA. RITA DE CÁSSIA DE CARVALHO MAIA (1º Suplente)
Universidade federal Rural de Pernambuco - UFRPE
Departameto de Virologia

DR. ERNESTO TORRES DE AZEVEDO MARQUES JÚNIOR (2º Suplente)
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães - CPqAM
Departamento de Virologia

A Natanael e Clara

AGRADECIMENTOS

A Deus por tudo o que eu sou e por Sua presença constante em minha vida;

Ao meu orientador, Dr. Rafael Dhalia, por sua paciência, disponibilidade e confiança;

Ao LaViTE, por tornar possível a realização do meu projeto;

Aos meus colegas de bancada Renato, Isabelle, Gabriel e Klécia por suas inestimáveis ajudas nas horas que eu mais precisava, e não somente por isto, mas pela amizade construída ao longo dos anos. Eles foram mais que colegas de trabalho, com eles eu me sentia em família.

Às minhas queridas amigas Georgia e Andréa Melo. Existem amigos que são mais chegados que irmãos. É este o sentimento que tenho por vocês. Esta amizade jamais será esquecida;

A todos os que fazem parte do LaViTE, não citarei nomes pois tenho medo de esquecer alguns e cometer alguma injustiça;

Aos meus pais por terem acreditado que eu podia fazer mais;

Ao meu marido pela paciência, compreensão e amor e a minha filha Clara, que me faz querer sempre fazer tudo de uma maneira melhor.

RESUMO

A Febre Amarela (FA) constitui um grave problema de saúde pública mundial, principalmente nos países tropicais (embora este cenário venha sendo modificado pois o clima continua sendo afetado pelo aquecimento global). Apesar da eficiência comprovada da vacina convencional atenuada (17DD), existem registros de casos adversos graves pós-vacinação, incluindo o registro de óbitos. Adicionalmente a vacina 17DD não é recomendada para infantes, mulheres grávidas, pessoas com imunodeficiência e aquelas que apresentam alguma alergia aos componentes do ovo. Considerando todos estes fatores, faz-se necessário o desenvolvimento de estratégias de vacinação ainda mais seguras contra a FA, como por exemplo vacinas de DNA. As vacinas genéticas podem ser mais facilmente manipuladas e dosadas, não necessitam de baixas temperaturas para o acondicionamento/distribuição e não são capazes desencadear efeitos adversos graves por não se tratarem de agentes infecciosos. Neste trabalho, nós descrevemos o desenvolvimento e avaliação da expressão de antígenos codificados por vacinas de DNA contra o Vírus da Febre Amarela (VFA). O genoma do VFA codifica três genes para proteínas estruturais (Capsídeo, Membrana e Envelope - E) e sete genes que codificam proteínas não-estruturais. Considerando que a proteína E é reconhecida como a principal proteína da superfície viral, e principal alvo para a indução da produção de anticorpos neutralizantes, nossas formulações vacinais foram baseadas neste antígeno. O antígeno vacinal foi otimizado para a expressão em células eucarióticas e subclonado em um vetor eucariótico de expressão, gerando a construção p/YFE_{OPT}. Uma segunda construção foi ainda obtida, pL/YFE_{OPT}, que codifica o antígeno vacinal fusionado à região C-terminal da Proteína de Associação à Membrana Lisossomal humana – hLAMP (visando desviar a apresentação antigênica para a via do Complexo Maior de Histocompatibilidade de classe II – MHCII). Estas construções foram utilizadas para transfectar células eucarióticas e a expressão, dos antígenos codificados, foi avaliada através de ensaios de imunofluorescência e western-blot. A próxima etapa deste trabalho será a avaliação do efeito de proteção da vacina de DNA pL/YFE_{OPT} em modelos primatas não-humanos. De acordo com os resultados obtidos, pretendemos avançar para ensaios clínicos em humanos.

Palavras Chaves: Febre Amarela; Vacina; Otimização.

CRUZ, Fábila da Silva Pereira. **Development and evaluation of DNA vaccines against Yellow Fever virus**. 2011. Dissertation (Master degree of Public Health) - Aggeu Magalhães Research Center. Oswaldo Cruz Foundation, 2011.

ABSTRACT

Yellow Fever (YF) continues to be a worldwide problem although mostly restricted to tropical areas (but this scenario may change as the climate continues to be affected by global warming). Despite the high degree of efficiency of the live-attenuated YF vaccine (17DD), there are reports of severe adverse reactions as consequence of vaccination including rare but fatal reactions cases. Additionally, available YF vaccines are not recommended for infants, pregnant women, immunodeficient subjects, and those with allergy to the egg components. Considering all factors, alternative YF vaccine strategies such as a DNA-based vaccine have been considered. DNA vaccines can be easily manipulated and dosed, do not require a cold-chain for store/distribution and eliminate the infectious nature of live/attenuated agents. Here, we reported the development and evaluation expression of antigens encoded by a DNA-based vaccine against YF virus. The YF virus genome code three genes for structural proteins (Capsid, Membrane, and Envelope-E) and seven genes that codify for non-structural proteins. Considering that the Envelope protein (E) is recognized as the major virus surface protein, and the main target for neutralizing antibodies, our YF DNA vaccine formulation was based on this antigen. The antigen was optimized for expression in eukaryotic cells and cloned into a eukaryotic expression vector generating the p/YFE_{OPT} construct. A second construct was obtained, pL/YFE_{OPT}, that encode the antigen fused to C-terminal region of human lysosome-associated membrane protein - h-LAMP (to deviate the antigen presentation to pathway of major histocompatibility complex class II – MHCII). This constructs were used to transfect eukaryotic cells and the expression, of coded antigen, was evaluated through immunofluorescence and western-blot assays. This results were considered extremely hopeful and the next step of this work will be the evaluation of pL/YFE_{OPT} DNA vaccine protection effects in no-human primate models. According the results obtained we will intend to advance in human trials.

Keywords: Yellow Fever; Vaccine; Optimization.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Distribuição geográfica da Febre Amarela.	16
Figura 2	Principais mosquitos vetores da Febre Amarela urbana e silvestre	16
Figura 3	Esquema representativo do vírus da Febre Amarela	22
Figura 4	Esquema da organização do genoma do vírus da Febre Amarela.	22
Figura 5	Representação do ciclo de replicação do vírus da Febre Amarela	24
Quadro 1	Qualidade das vacinas de DNA	27
Figura 6	Apresentação antigênica, para a via MHC II, mediada pela Proteína de Associação à Membrana Lisossomal – LAMP	29
Figura 7	Esquema representativo da construção gênica	36
Figura 8	Otimização de codon usage para o aminoácido cisteína, visando melhorar a eficiência de expressão da proteína Cap-pM/M-Env em células eucarióticas humanas	37
Figura 9	Estruturas secundárias e distribuição do conteúdo GC da sequência Cap-pM/M-Env	38
Figura 10	Sítios críticos de splicing da sequência de DNA que codifica Cap-pM/M-Env	39
Figura 11	Sítios internos de restrição da sequência de DNA que codifica Cap-pM/M-Env	39

Figura 12	Esquema de subclonagem da sequência otimizada Cap-pM/M-Env no vetor p43.2, sem fusão com LAMP	40
Figura 13	Esquema de subclonagem da sequência otimizada Cap-pM/M-Env no vetor p43.2, fusionadas à LAMP	41
Figura 14	Análise da expressão da construção vacinal de Cap-pM/M-Env em células humanas, por western-blot	42
Figura 15	Análise da expressão das construções vacinais Cap-pM/M-Env em células eucarióticas através de microscopia de imunofluorescência	43

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APC	Antigen Present Cell- Célula Apresentadora de Antígeno
C	Proteína do capsídeo
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNA	Deoxyribonucleic acid- Ácido desoxirribonucléico
E	Proteína do envelope
ECL	Enhanced Chemiluminescency- Reação de Quimioluminescência
E. coli	Escherichia coli
FA	Febre amarela
FAS	Febre amarela silvestre
FAU	Febre amarela urbana
HEK-293	Human Embryonic Kidney 293 Cells- Células Humanas Embrionárias de Rins 293
HIV	Human Immunodeficiency Virus- Vírus da Imunodeficiência Humana
IFN	Interferon
kDa	Quilodalton
LAMP	Lisosomal Associated Membrane Protein- Proteína de Associação à Membrana Lisossomal
LB	Luria Bertani
M	Molar
µg	Micrograma
µL	Microlitro
MHCI	Major Histocompatibility Complex Class I- Complexo Maior de Histocompatibilidade de classe I
MHCII	Major Histocompatibility Complex Class II- Complexo Maior de Histocompatibilidade de classe II
mL	Mililitro

nm	Nanômetro
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	Phosphate Buffered Saline- Tampão Salina Fosfato
PCR	Polimerase Chain Reaction- Reação em Cadeia da Polimerase
PFU	Plaque Forming Unit- Unidade Formadora de Placa
prM/E	Proteína pré-Membrana/Envelope
RER	Reticulo Endoplasmático Rugoso
RNA	Ribonucleic Acid- Ácido Ribonucléico
TNF	Fator de Necrose Tumoral
UTR	Untranslation Region- Regiões Não-Traduzíveis
VFA	Vírus da Febre Amarela
VHF	Viral Hemorrhagic Fever- Febre Hemorrágica Viral

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 Uma Breve História sobre a descoberta e isolamento do vírus da Febre Amarela	14
1.2 Epidemiologia da Febre Amarela	15
1.3 Apresentações clínicas, patologia, diagnóstico e tratamento da infecção por VFA	17
1.3.1 Apresentações clínicas	17
1.3.2 Patologia	18
1.3.3 Diagnóstico	19
1.3.3.1 Diagnóstico clínico	19
1.3.3.2 Diagnóstico laboratorial	20
1.3.4 Tratamento	20
1.4 O Vírus da Febre Amarela	21
1.5 Vacinação contra VFA.	24
1.6 Nova estratégia de vacinação	26
1.6.1 Vacinas de DNA	26
1.6.2 Desenvolvimento de vacinas de DNA contra flavívirus	27
2 OBJETIVOS	30
2.1 Objetivo geral	30
2.2 Objetivos específicos	30
3 MATERIAS E MÉTODOS	31
3.1 Construção dos genes sintéticos otimizados	31
3.1.1 Otimização e síntese da seqüência Cap-pM/M-Env para expressão em células eucarióticas	31
3.1.2 Obtenção do antígeno vacinal otimizado	32
3.1.3 Preparação do DNA plasmidial	32
3.1.4 Subclonagem dos genes otimizados no vetor p43.2 LAMP/Gag	33
3.2 Cultivo, infecção e transfecção de células eucarióticas	34
3.3 Análise da expressão de p/YFE_{OPT} e pL/YFE_{OPT} através das técnicas de microscopia de fluorescência e confocal	34
3.4 Análise da expressão de p/YFE_{OPT} e pL/YFE_{OPT} por western-blot	35

4 RESULTADOS	36
4.1 Construção do gene sintético	36
4.1.1 Otimização para expressão em células eucarióticas	36
4.2 Construção dos vetores de expressão	40
4.3 Análise da expressão das construções vacinais Cap-pM/M-Env em células eucarióticas através de western-blot	41
4.4 Análise da expressão das construções vacinais Cap-pM/M-Env em células eucarióticas através de microscopia de imumofluorescência	43
5 DISCUSSÃO	44
6 CONCLUSÃO	50
REFERÊNCIA	51
ANEXOS A- OPTIMIZATION REPORT	59

1 INTRODUÇÃO

1.1 Uma Breve História sobre a descoberta e isolamento do vírus da Febre Amarela

O VFA originou-se na África e foi trazido para o ocidente durante a era do comércio da escravidão, com a primeira epidemia registrada em 1648 em Yucatan – México (BARRETT, 2007; BARRETT; HIGGS, 2007; BRYANT; HOLMES; BARRET, 2007; GOULD; SOLOMON, 2008; GUBLER, 2004; STAPLES; MONATH, 2008). Em mais de 200 anos subseqüentes, surtos da doença ocorreram amplamente em regiões tropicais do continente americano, cidades costeiras da América do Norte e Europa. Durante o século 19, foi reconhecido que a FA não era transmitida de pessoa para pessoa, ou seja, contagiosa, mas, teorias erradas atribuíam a doença aos miasmas. Em 1881, Carlos Finlay fez um significativo avanço, quando sugeriu que mosquitos *Culex cubensis* (hoje conhecidos como *Aedes aegypti*) eram os responsáveis pela disseminação da doença. Apesar de várias tentativas, ele não foi capaz de provar sua teoria, porém, esta serviu de base para as pesquisas de Walter Reed (MONATH, 2008; PULENDRAN, 2009; STAPLES; TOLLE, 2009).

No final do século 19, os Estados Unidos invadiram Cuba durante guerra contra Espanha. Para cada soldado morto em batalha, 13 morreram de FA. O médico das forças armadas George Stenberg enviou Walter Reed, Aristides Agramonte, James Carroll e Jesse Lazear para Cuba com o intuito de investigar a causa da FA. Trabalhos de Reed provaram que mosquitos *Aedes aegypti* eram agentes primários no modo de transmissão da doença e que FA era causada por um agente encontrado no sangue de pessoas infectadas. Os trabalhos de Reed fizeram com que o General William Gorgas instituísse uma campanha em Havana contra o mosquito vetor, eliminando a doença em 1902. Ele realizou a mesma campanha 4 anos mais tarde no Panamá, o que permitiu que o canal fosse completado (STAPLES; MONATH, 2008).

Em 1918, a Fundação Rockefeller formou a comissão FA tendo como foco a sua erradicação através da eliminação do *Aedes aegypti*. As atividades foram inicialmente bem sucedidas contra a FA urbana, porém o objetivo de erradicação foi dissipado com a descoberta que a FA era uma zoonose, a qual era mantida por mosquitos e primatas na floresta Amazônica. Mais de um quarto de século depois das observações de Reed, é que o vírus causador da doença foi isolado (STAPLES; MONATH, 2008).

1.2 Epidemiologia da Febre Amarela

A Febre Amarela - FA é uma doença infecciosa, não-contagiosa, que se mantém endêmica nas florestas tropicais da América e da África causando periodicamente surtos isolados e/ou epidemias (Figura 1). Esta doença é causada pelo vírus da Febre Amarela - VFA, arbovírus pertencente a família *Flaviviridae*, que é transmitido ao homem por insetos hematófagos principalmente do gênero *Aedes* (Figura 2). Sob o ponto de vista epidemiológico a FA divide-se em duas formas, Febre Amarela Silvestre - FAS e Febre Amarela Urbana - FAU, que diferem entre si tanto quanto à natureza dos insetos transmissores e hospedeiros vertebrados, como também quanto ao local de ocorrência. Enquanto a FAS é transmitida por insetos do gênero *Haemagogus*, entre diversas espécies de macacos, a FAU é transmitida por insetos do gênero *Aedes* entre humanos (MONATH; GIESBERG; FIERROS, 1998; VASCONCELOS, 2003)

Nas áreas silvestres, os mosquitos dos gêneros *Haemagogus* (*H. janthinomys* e *H. albomaculatus*) e *Sabethes* são os mais importantes vetores de VFA na América Latina. No Brasil, a espécie *H. janthinomys* é a que mais se destaca quanto a manutenção do VFA. Estes mosquitos têm hábitos diurnos e vivem nas copas das árvores, onde habitam os hospedeiros definitivos do vírus, descendo esporadicamente ao solo na presença do homem. Esta atividade é ainda estimulada pelo crescente processo de desmatamento e pelo constante processo de expansão das regiões tropicais, como consequência do aquecimento global. Apesar do *H. janthinomys* ser mais constantemente associado a FAS, a atividade do *H. albomaculatus* pode ser considerada potencialmente mais perigosa pois o mesmo apresenta uma maior autonomia de voo podendo chegar ao domicílio ou peridomicílio para picar o homem (VASCONCELOS, 2003). O monitoramento das populações de *H. albomaculatus* é de extrema relevância para evitar a reintrodução da FAU que apesar de ter sido erradicada da América, por volta de 1954, continua dizimando milhares de vidas no continente africano. Na África os vetores transmissores de VFA são do gênero *Aedes* principalmente das espécies *Ae. Africanus* e *Ae. aegypti*, respectivos transmissores da FAS e FAU no continente (MONATH, 2001; VASCONCELOS, 2003).

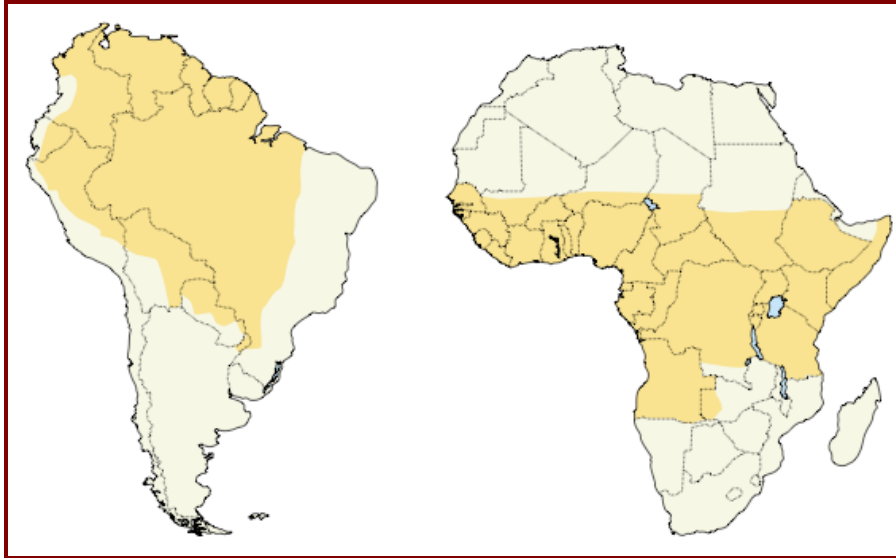


Figura 1. Distribuição geográfica da Febre Amarela.

Fonte: Barrett (2007)

Nota: O mapa indica as regiões onde a Febre Amarela é endêmica (áreas em laranja), afetando alguns países na América do Sul e vários países do continente Africano.

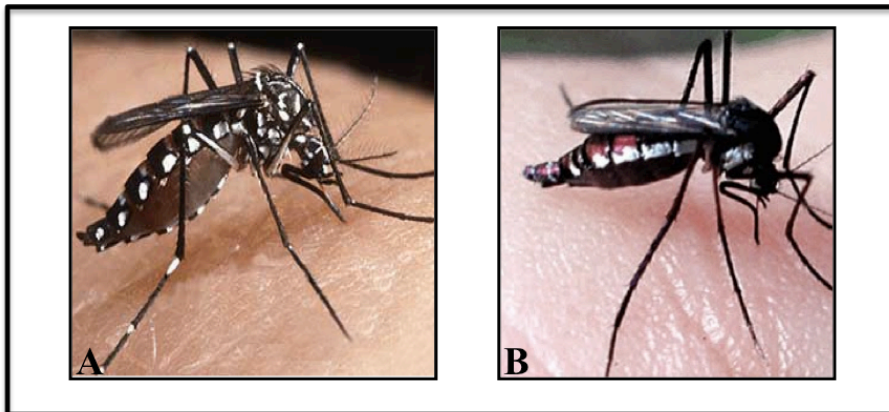


Figura 2. Principais mosquitos vetores da Febre Amarela urbana e silvestre.

Fonte: (A) Conasems; (B) Dr Nicholas Dégallier (2001).

Nota: (A) Mosquito do gênero *Aedes*, transmissor da Febre Amarela urbana na África; (B) Mosquito do gênero *Haemagogus*, transmissor da Febre Amarela silvestre no Brasil.

1.3 Apresentações clínicas, patologia, diagnóstico e tratamento da infecção por VFA

1.3.1 Apresentações clínicas

Descrita como a Febre Hemorrágica Viral (VHF) original, a forma grave de FA é uma sepse pansistêmica viral caracterizada por: viremia; febre; prostração; injúrias hepática, renal e do miocárdio; hemorragia; choque. A FA no homem pode variar de uma infecção inaparente, nos quais os sintomas regridem rapidamente, a uma doença invariavelmente grave e fulminante. O VFA é introduzido subcutaneamente no hospedeiro, através da saliva de um mosquito infectado, e após um período de incubação de 3 a 6 dias os sintomas surgem de uma forma abrupta. Nos casos mais brandos de FA os sintomas tipicamente não são específicos, manifestados na forma de febre e dor de cabeça. Nestes casos, os pacientes recuperam-se em poucos dias e não apresentam seqüelas (BARNETT, 2007; GARDNER; RYMAN, 2010;).

Nos casos mais graves de FA os pacientes apresentam febre, calafrios, mal-estar, dor de cabeça, dores nas costas, mialgia, náusea, vertigem e, com freqüência, o sinal de Faget, que caracteriza-se pela elevação da temperatura e bradicardia. Durante este período, chamado de período de infecção, os títulos de viremia são altos o suficiente para que haja a transmissão via mosquitos. Este período é geralmente seguido por um período de remissão, caracterizado pela rápida diminuição da febre, e dos outros sintomas em 24 horas, e pela redução brusca da carga viral na circulação sanguínea. Neste ponto, muitas infecções por FA regridem sem mais sintomas (BARNETT, 2007; GARDNER; RYMAN, 2010;).

Em aproximadamente 20% dos pacientes, a doença reaparece em uma forma mais grave, o chamado período de intoxicação, com febre alta, vômito, dor epigástrica, prostração e desidratação. Coagulopatias induzidas pelo fígado produzem manifestações hemorrágicas como petéquias, equimoses, epistaxe e o característico vômito negro (hematêmese e hemorragia gastrointestinal). A FA é distinguida das outras VHF's pela característica de severidade do dano ao fígado e pelo aparecimento de icterícia. Além disso, o dano ao rim lidera a extrema albuminúria e falência renal aguda. Anticorpos podem ser detectados neste estágio, enquanto que a viremia em geral é ausente. Manifestações tardias do sistema nervoso central, como confusão e coma precedem a morte, a qual ocorre de 7 a 10 após surgimento dos sintomas (GARDNER; RYMAN, 2010).

1.3.2 Patologia

Os conhecimentos sobre a patologia da febre amarela baseiam-se em estudos experimentais em macacos, bem como nas alterações morfológicas observadas em casos humanos fatais. Pouco se conhece sobre as alterações histopatológicas das formas leves e moderadas, embora se saiba que elas são as mais frequentes. Após a inoculação pelo mosquito, o vírus aloja-se nos gânglios linfáticos regionais, onde se multiplica silenciosamente durante 3 a 6 dias, após os quais ocorre viremia e localização no fígado, rins, coração, sistema nervoso central, pâncreas, baço e demais órgãos linfóides. A intensa multiplicação do vírus, nos órgãos atingidos, produz necrose seletiva das células de origem epitelial com escassa reação inflamatória. As lesões tissulares são mais proeminentes no fígado e nos rins, com destruição de grande quantidade de células parenquimatosas (VASCONCELOS, 2003).

As disfunções orgânicas são causadas diretamente pelo vírus amarílico ou são decorrentes de reações secundárias desta agressão. Nos casos fatais a agressão ao organismo é de caráter universal, havendo comprometimento simultâneo, em maior ou menor grau, de praticamente todos os órgãos. A hemorragia e a congestão vascular intensa são as alterações mais constantes (VASCONCELOS, 2003).

O fígado mostra-se, em geral, pouco aumentado de volume, sendo bastante raro o aspecto de atrofia aguda. Nele encontram-se as alterações histopatológicas características da doença: a necrose médio-zonal dos lóbulos hepáticos; esteatose e degeneração eosinofílica dos hepatócitos, que resulta na formação dos corpúsculos de Councilman; localização citoplasmática dos corpúsculos intranucleares de Margarino Torres. Estes corpúsculos consistem em material amorfo, protéico e desprovido de partículas virais. Na verdade, denotam a lesão hepatocítica sob a forma de “apoptose”. Os corpúsculos de Councilman são típicos da febre amarela, mas não patognomônicos, pois também podem ser encontrados na hepatite viral, queimaduras graves, infecções por *Plasmodium falciparum*, mononucleose infecciosa, doença de Kyasanur e outras febres hemorrágicas (MONATH, 2008; VASCONCELOS, 2003).

Os rins apresentam necrose tubular aguda, provavelmente mais devido à reduzida perfusão do que da injúria viral direta. Degeneração focal de células musculares podem estar presentes no coração. Baço e linfonodos apresentam necrose na área das células B. O cérebro apresenta edema e hemorragia petequial, mas a invasão viral e encefalites são eventos muito raros. A hemorragia resulta principalmente da diminuição da síntese dos fatores de

coagulação pelo fígado e conseqüente coagulação intravascular disseminada (GARDNER; RYMAN, 2010; MONATH, 2008)

A taxa de letalidade global em decorrência de infecção por VFA varia entre 5% a 10%, embora entre os casos graves (que evoluem para síndromes ictero-hemorrágica e hepatorenal) esta taxa possa chegar a até 50% (VASCONCELOS, 2003).

Os pacientes mais acometidos são geralmente indivíduos jovens, do sexo masculino, realizando atividades agropecuárias e de extração de madeira, bem como ecoturistas que fazem trilhas nas matas sem vacinação prévia. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS) mais de 200.000 casos de infecção por FA, incluindo 30.000 mortes, ocorrem anualmente em todo o mundo (sendo 90% dos casos disseminados na África). No Brasil, de 2008 a 2009 foram notificados 274 casos humanos suspeitos de febre amarela silvestre (FAS), com 51 casos (18,6%) confirmados. Destes, 21 evoluíram para o óbito e a taxa de letalidade foi de 41% (21/51). A mediana de idade foi de 31 anos, com intervalo de oito dias para o mais jovem, e de 73 anos o caso com maior idade. O sexo masculino foi predominante, com 72% (37/51) (BRASIL, 2009).

1.3.3 Diagnóstico

1.3.3.1 Diagnóstico clínico

A FA pode ser mais suspeita em pacientes de áreas endêmicas (ou que viajaram recentemente para áreas endêmicas) que apresentem febre repentina, relativa bradicardia e sinais de icterícia. Hemograma, sumário de urina, provas de função hepática, coagulograma, cultura viral do sangue e testes sorológicos devem ser realizados. Leucopenia com relativa neutropenia, trombocitopenia, tempo de coagulação prolongado e aumento do tempo de protrombina são comuns. Os níveis de bilirrubina e das aminotransferases podem estar elevados. Albuminúria ocorre em 90% dos casos. O diagnóstico clínico da FA, particularmente o diagnóstico de casos isolados continua sendo difícil por várias razões. Diferenças em cada caso grave, e no conjunto de sintomas observados, fazem com que esta doença seja de difícil reconhecimento e os casos menos graves acabam, geralmente, escapando ao diagnóstico. Apesar dos casos clássicos serem facilmente reconhecidos, a icterícia é mais frequentemente ausente que presente, e a FA pode não ser incluída no diagnóstico diferencial de pacientes que apresentem sintomas como dor de cabeça, náusea,

dores nas costas e febre, especialmente durante a fase precoce da infecção. A FA é facilmente confundida com dengue, lassa, ebola, febre tifóide, hepatites e outras doenças, bem como envenenamento (GARDNER; RYMAN, 2010).

1.3.3.2 Diagnóstico laboratorial

O diagnóstico laboratorial é um ponto chave mas, infelizmente, requer profissionais altamente treinados e com acesso a equipamentos e materiais especializados. Os critérios para o diagnóstico laboratorial são: presença de IgM anti-FA específica ou aumento nos níveis de IgG no soro da fase aguda e de convalescência (na ausência de vacinação recente), isolamento viral, resultado positivo do histopatológico do fígado (*postmortem*), detecção de seqüências genômicas do vírus através de ensaios de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) ou detecção de antígenos virais em tecidos através de ensaios de imunohistoquímica. Frequentemente a FA não é diagnosticada até que o paciente recupere-se ou não resista à infecção. A definição de um caso como caso suspeito é caracterizado pelo surgimento agudo de febre seguido por icterícia dentro de 2 semanas, após o surgimento dos primeiros sintomas, enquanto que a confirmação de FA requer confirmação laboratorial ou uma ligação epidemiológica para uma confirmação de caso ou epidemia (GARDNER; RYMAN, 2010).

1.3.4 Tratamento

Não existe um tratamento específico para a infecção por FA sendo, conseqüentemente, os cuidados de suporte essenciais. O ideal para pacientes, que apresentam a forma grave da doença, é serem internados em unidades de terapia intensiva (UTI). Sintomas incluindo coagulação intravascular disseminada, hemorragia, disfunções hepáticas e renais e possível infecção secundária, devem ser tratados. O uso de medicamentos que contenham em suas fórmulas o ácido acetil-salicílico não é recomendado, devido ao aumento do risco de hemorragias. Apesar da FA não ser transmitida de pessoa para pessoa, pacientes com viremia devem ser isolados (uso de mosquiteiros) em áreas onde haja potencial transmissão vetorial. Apesar do fato de não existir drogas antivirais específicas, muitos compostos com atividade antiviral *in vitro* tem sido descritas, incluindo rivabarin e interferon- α (GARDNER; RYMAN, 2010; MONATH, 2008; VASCONCELOS, 2003).

1.4 O Vírus da Febre Amarela

O VFA é o protótipo da família *Flaviviridae* (do latim *flavus*, ou amarelo), representada por um total de 70 membros, dos quais 40 estão envolvidos no desenvolvimento de doenças em humanos (PUGACHEV et al., 2003). A grande maioria dos representantes desta família são arbovírus, transmitidos aos hospedeiros vertebrados através da picada de mosquitos ou carrapatos infectados. Além do VFA, pertencem a família *Flaviviridae* outros vírus de importância médica como os vírus causadores da febre do Oeste do Nilo, das encefalites Saint Louis e Japonesa, assim como da Dengue (CHAMBERS et al., 1990; LI et al., 2008; PUGACHEV et al., 2003) . Ao contrário do vírus da Dengue, que possui quatro sorotipos bem estabelecidos, o VFA possui apenas um sorotipo reconhecido. Por outro lado, devido a identificação de pequenas alterações genéticas entre as cepas circulantes na América e na África, atualmente são caracterizados 7 genótipos distintos (2 Americanos e 5 Africanos) não se sabendo ainda se existe diferença de patogenicidade, entre os referidos genótipos (MUTEBI et al., 2001)

O VFA apresenta-se na forma de uma partícula esférica, de aproximadamente 40 a 60nm de diâmetro, contendo um centro eletrodense de aproximadamente 30nm de diâmetro envolvido por uma camada lipídica bilaminada (Figura 3). O genoma do VFA é organizado numa molécula positiva de RNA mensageiro, de aproximadamente 10.8Kb, flanqueada pelas estruturas cap 5' e alça 3' terminal não-poliadenilada. O RNA do VFA possui 3 genes estruturais (Capsídeo - C, Membrana - M e Envelope - E) e 7 genes que codificam proteínas não-estruturais (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b e NS5) (Figura 4). Durante a montagem do vírus, o domínio carboxi-terminal da proteína C atua como seqüência sinal para a translocação do precursor de M (PreM/M) para dentro do lúmen do retículo endoplasmático (RE) da célula hospedeira, permitindo a maturação apropriada das proteínas M e E (CHAMBERS et al., 1990; PUGACHEV et al., 2003; RUIZ-LINARES et al., 1989).

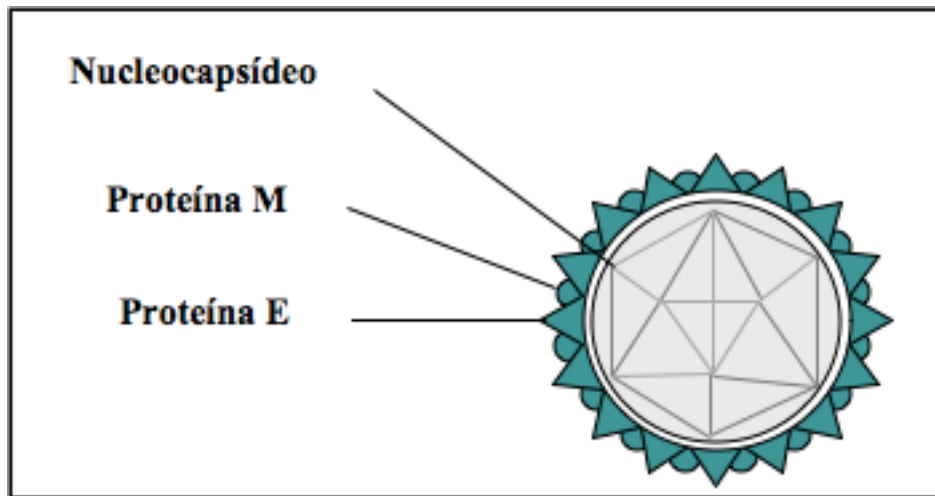


Figura 3. Esquema representativo do vírus da Febre Amarela.

Fonte: Dr. Ricardo Galler

Nota: O envoltório de VFA é formado por uma mistura das proteínas de Membrana (M) e Envelope (E). Seu centro eletrodens é composto pelo Nucleocapsídeo, formado por proteínas do Capsídeo (C) interagindo com o RNA viral.

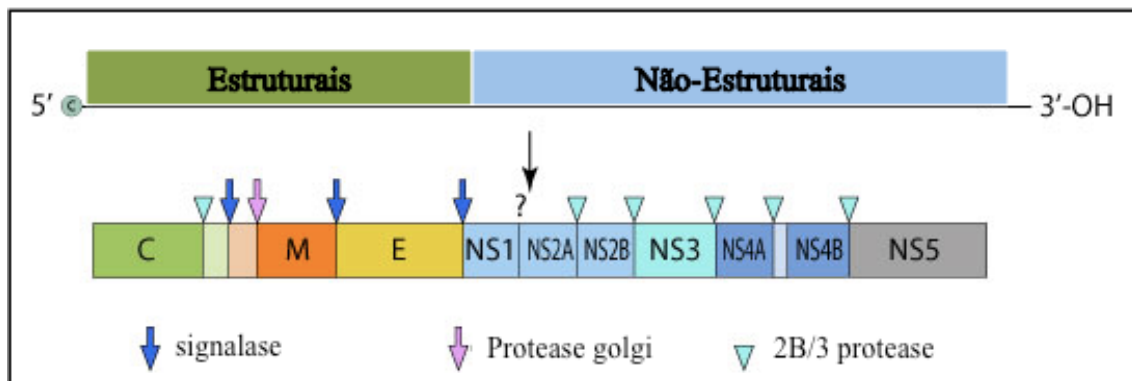


Figura 4. Esquema da organização do genoma do vírus da Febre Amarela.

Fonte: ExPASy/Viralzone

Nota: O RNA de VFA codifica 3 genes estruturais (Capsídeo - C, Membrana - M e Envelope - E) responsáveis pela conformação do vírus. Também codifica 7 genes não-estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5) responsáveis pela replicação e processamento do vírus. Este RNA fita positiva é traduzido na forma de uma poliproteína que é em seguida clivada, em diferentes regiões do genoma, por proteases do hospedeiro (sinalase e protease de Golgi) e do próprio vírus, formada pela interação entre NS2B e NS3 - 2B/3 protease. (Fo

A proteína E é a principal proteína de superfície da partícula viral e tem a função de ligação do vírus à superfície da célula hospedeira e também de mediar a fusão das membranas viral e do endossomo, processo que é desencadeado pelo pH ácido (HEINZ; ALLISON, 2001). Muitas proteínas/moléculas de superfície celular têm sido descritas como possíveis receptores para a ligação e entrada dos flavivírus. Ensaio de interação, utilizando proteína E recombinante do vírus dengue 2 [DENV 2], demonstraram uma forte interação entre a proteína E e glicosaminoglicanos sulfatados (CHEN et al., 1997).

Uma vez ligado à membrana da célula, via proteína E, o vírus é fagocitado (endocitose mediada por receptor) e o pH ácido do endossomo induz alterações estruturais na proteína E, que de dimérica passa a ser trimérica. Esta alteração promove a fusão das membranas do vírus e do endossomo e o nucleocapsídeo é liberado no citoplasma. No citoplasma, o nucleocapsídeo é aberto e o RNA viral é liberado, iniciando assim a sua tradução no citoplasma até a síntese da região carboxi-terminal do capsídeo. Após a síntese deste peptídeo sinal, o RNA migra para o retículo endoplasmático rugoso (RER) onde o restante da poliproteína é sintetizada no lúmen do RER. O RNA viral é traduzido em uma poliproteína de aproximadamente 3000 aminoácidos. A poliproteína é clivada por proteases virais e do hospedeiro. A replicação do RNA viral começa em membranas próximas ao núcleo. O RNA de polaridade positiva é transcrito em um RNA intermediário de polaridade negativa o qual atua como molde para produção de múltiplas moléculas de RNA de polaridade positiva. O novo RNA viral interage com a proteína C, retida na membrana do RER, para formar o nucleocapsídeo. O nucleocapsídeo é envelopado nesta membrana, a qual também contém as proteínas E e M imobilizadas, e forma um vírus imaturo dentro de vesículas citoplasmáticas. Ocorre mudança nos arranjos das proteínas E e M para que o vírus imaturo saia do RER e possa entrar no complexo de golgi. No complexo de golgi, resíduos de açúcar são adicionados ao vírus imaturo e isto faz com que a proteína E seja maturada corretamente e volte a se tornar dímero. O vírus maduro passa através do complexo de Golgi, é transportado por vesículas secretoras e liberado da célula por exocitose. Figura 5. (LINDENBACH, 2001; STIASNY; HEINZ, 2006).

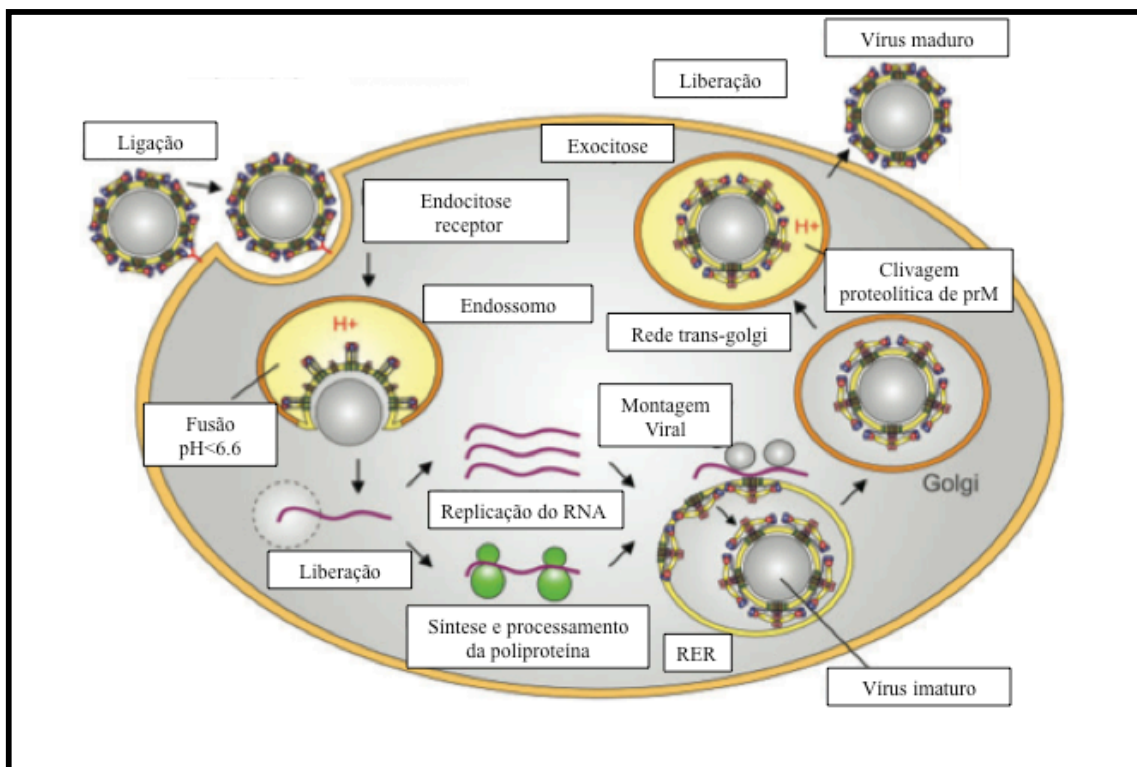


Figura 5. Representação do ciclo de replicação do vírus da Febre Amarela.

Fonte: Adaptado de Stiasny e Heinz (2006).

Nota: A entrada do vírus ocorre através de endocitose mediada por receptor, e o pH ácido do endossomo induz alterações estruturais na proteína E que lideram a fusão das membranas virais e do endossomo então o nucleocapsídeo é liberado no citoplasma. Depois da liberação, o RNA genômico de polaridade positiva é traduzido para iniciar a replicação viral. A montagem do vírus ocorre nas membranas do retículo endoplasmático rugoso (ER), formando partículas virais imaturas que são exocitadas. A passagem do vírus imaturo pelo complexo de golgi promove mudanças conformacionais irreversíveis no complexo prM-E, o que é necessário para a maturação, através de clivagem por furinas celulares ou proteases. A partícula viral madura, agora infecciosa é liberada por exocitose.

1.5 Vacinação contra VFA

A estratégia mais segura de prevenção da doença continua sendo a vacinação, considerando que não existe ainda nenhuma droga efetiva contra a infecção por FA. Esforços para o desenvolvimento de uma vacina contra a FA começaram logo depois do isolamento do vírus em 1927. O vírus foi isolado do sangue de um paciente na região oeste do continente africano (cepa Asibi). A cepa original 17D foi desenvolvida seguindo 176 passagens alternadas, do vírus selvagem Asibi, em tecido de camundongo e galinha. Duas sub-cepas são usadas hoje como vacinas (vacinas atenuadas), a 17D-204 e a 17DD (usada no Brasil), as quais são de passagem 235-240 e 287-289, respectivamente. As vacinas diferem do vírus selvagem em 48 nucleotídeos. Mais de 500 milhões de dose da vacina já foram administradas desde sua derivação em 1937 (BARNETT, 2007; BARRETT; TEUWEN, 2009; MONATH, 2005; PULENDRAN, 2009).

A vacinação contra FA produz altos níveis de proteção, com soroconversão maior que 95% em crianças e adultos, com duração de imunidade superior a 10 anos (BARNETT, 2007; BARRETT; TEUWEN, 2009; PUGACHEV et al., 2003; PULENDRAN, 2009; TOLLE, 2009). Aproximadamente 90% dos vacinados desenvolvem anticorpos neutralizantes, 10 dias após a vacinação, e 99% os desenvolvem 30 dias após. Apesar da resposta humoral ser considerada o principal mediador de proteção, a imunidade celular inata e adaptativa tem demonstrado importante papel na geração de uma efetiva proteção contra a infecção com vírus selvagem. Uma viremia média ocorre de 3 a 7 dias após a imunização em indivíduos que recebem a primeira dose. Elevação nos níveis de IFN- α , TNF- α e marcadores de ativação de células T, ocorrem neste tempo, e a viremia é debelada com o desenvolvimento de anticorpos neutralizantes (PULENDRAN, 2009).

A vacina é contra-indicada para pessoas imunossuprimidas, crianças menores de 6 meses, gestantes, idosos e aqueles que apresentem algum tipo de alergia à proteína do ovo. A infecção por HIV não é uma contra-indicação para a vacinação, apesar de indivíduos sintomáticos ou aqueles com a contagem de linfócitos T CD4 menor que 200 células/mm³ sejam desaconselhados a receber a vacina (TOLLE, 2009).

Apesar de ser considerada uma vacina segura, casos de eventos adversos graves pós-vacinação começaram a ser reportados (ENGEL et al., 2006; LINDSEY et al., 2008; MARTIN et al., 2001; VASCONCELOS et al., 2001). Dois tipos de eventos adversos graves tem sido reportados: primeiro, a doença neurotrópica associada à vacina, causada pela neuroinvasão do vírus vacinal e segundo, é a doença viscerotrópica associada à vacina, que é uma infecção multissistêmica que começa geralmente com envolvimento hepático, uma condição muito semelhante à infecção causada pelo vírus selvagem (BARRETT; TEUWEN, 2009).

No período de outubro de 2008 a agosto de 2009 foram distribuídas no Brasil, 22.452.800 doses da vacina febre amarela. No mesmo período, foram notificados 112 eventos adversos graves pós-vacinação no país, sendo 56 classificados como confirmados, 11 como prováveis, 29 inconclusivos, 9 descartados e 7 permanecem como suspeitos. Dos casos confirmados, 9 foram classificados como doença viscerotrópica aguda e todos evoluíram para o óbito e 47 como doença neurotrópica aguda, sem registro de óbitos (BRASIL, 2010). Diante deste cenário o desenvolvimento de novas estratégias de vacinação, é de fundamental importância para o desenvolvimento de estratégias vacinais ainda mais seguras.

1.6 Nova estratégia de vacinação

1.6.1 Vacinas de DNA

A vacina de DNA é composta de um DNA plasmidial que codifica o antígeno de interesse, sob o controle de um promotor, e pode ser facilmente produzida em bactéria. Uma vez que o DNA plasmidial é administrado, o antígeno é expresso na célula hospedeira e então processado e apresentado por células apresentadoras de antígenos (APCs), como as células dendríticas, para o sistema imune (COBAN et al., 2008).

As vacinas de DNA apresentam muitas vantagens em relação às vacinas tradicionais, como as vacinas atenuadas, de subunidade proteica ou inativadas (Quadro 1). Primeiro, as vacinas de DNA são mais seguras que as vacinas atenuadas ou inativadas, nas quais há o risco de ocorrer uma infecção patogênica. São relativamente simples e baratas em relação ao processo de produção. Sua alta estabilidade, em relação à temperatura de acondicionamento e transporte, faz com que as mesmas sejam bastante apropriadas para produção em massa e distribuição em nações industrializadas e não-industrializadas (ABDULHAQQ; WEINER, 2008; COBAN et al., 2008; SHEDLOCK; WEINER, 2000; ULMER; VALLEY; RAPPUOLI, 2006).

As suspeitas de que as vacinas de DNA podem causar tumores, integrar-se ao cromossomo do hospedeiro ou induzir resposta autoimune anti-DNA chegaram a ser questionadas, mas poucas evidências tem sustentado a ocorrência destes fenômenos, particularmente em modelos experimentais humanos e primatas (SHEDLOCK; WEINER, 2000). A frequência das mutações, ocorridas da integração do DNA plasmidial no cromossomo do hospedeiro, tem sido calculada em estudos animais e o encontrado foi muito menor que as frequências de mutações ocorridas espontaneamente nos genomas de mamíferos (MARTIN et al., 1999; NICHOLS et al., 1995). Um estudo conduzido em peixes tem demonstrado também que a administração de vacinas de DNA podem gerar imunidade efetiva, sem a iniciação de autoimunidade ou integração ao cromossomo do hospedeiro (KANELLOS et al., 1999).

Imunogenicidade	<ul style="list-style-type: none"> • Induz resposta imune celular e humoral. • Pequenas dosagens são efetivas em modelos animais (microgramas).
Segurança	<ul style="list-style-type: none"> • Incapacidade para tornar-se virulenta como as vacinas vivas. • A eficácia não requer o uso de tratamentos tóxicos.
Desenvolvimento	<ul style="list-style-type: none"> • Plasmídeos são de simples manipulação e podem ser testados rapidamente.
Estabilidade	<ul style="list-style-type: none"> • São mais termoestáveis que as vacinas convencionais. • Longa vida.
Fabricação	<ul style="list-style-type: none"> • Baixo custo e produção em larga escala. • Produzidos com alta frequência em bactéria e facilmente isolados.
Mobilidade	<ul style="list-style-type: none"> • Fáceis de estocar e transportar. • Não requer baixas temperaturas.

Quadro 1. Qualidade das vacinas de DNA. inserir no sumário abaixo da figura 5
 Fonte: Adaptado de Sheldock e Weiner (2000).

1.6.2 Desenvolvimento de vacinas de DNA contra flavivirus

A co-expressão das proteínas PreM/M e E, como estratégia vacinal, foi descrita como sendo capaz de induzir a produção de anticorpos neutralizantes contra os vírus da Encefalite Japonesa e da Dengue (KONISHI et al., 1998, 2000; KONISHI; TERAZAWA; IMOTO, 2003). Entretanto, estas vacinas não foram capazes de induzir resposta duradoura com títulos apropriados de anticorpos neutralizantes (DONNELLY; BERRY; ULMER, 2003). A ineficiência destas formulações está provavelmente relacionada ao mecanismo de apresentação destes antígenos, ao sistema imune dos hospedeiros. A maioria dos antígenos

produzidos endogenamente, característicos das vacinas de DNA, é seqüestrada e apresentada ao sistema imune do hospedeiro por moléculas do Complexo Maior de Histocompatibilidade de classe I (MHC I). Para uma resposta imune satisfatória, com alta produção de anticorpos neutralizantes, é crítico que os antígenos sejam apresentados a células do tipo T helper $CD4^+$ por moléculas do Complexo Maior de Histocompatibilidade de classe II (MHC II). O processamento e a apresentação antigênica via MHC II induz a ativação de células T $CD4^+$ que é vital para o funcionamento das vacinas genéticas, como já foi demonstrado em estudos de deleção do MHC II (RAVIPRAKASH et al., 2001) e depleção $CD4^+$ em camundongos (DONNELLY; BERRY; ULMER, 2003). A ativação de células $CD4^+$ é de fundamental importância para a indução de resposta $CD8^+$, desenvolvimento de células de memória (LU et al., 2003) e expansão clonal de células B antígeno-específicas (CHIKHLIKAR et al., 2004). Para que antígenos produzidos endogenamente sejam dirigidos a moléculas de classe II, ao invés de classe I, é necessário que estas proteínas sejam fusionadas a peptídeos-sinais que as direcionem para o compartimento lisossomal da célula.

A possibilidade de direcionamento de antígenos, produzidos endogenamente, para o processamento via MHC II foi firmemente reforçada após o descobrimento de uma proteína trans-membrana do tipo I, denominada de Proteína de Associação à Membrana Lisossomal – LAMP. LAMP é uma proteína que se liga à membrana externa do lisossomo, através de sua seqüência carboxi-terminal YXXØ, presente numa cauda citoplasmática de 11 aminoácidos (GUARNIERI et al., 1993; OBERMULLER et al., 2002; ROHRER et al., 1996). O tráfego intracelular de LAMP inclui compartimentos multilaminares especializados de Células Apresentadoras de Antígenos (APCs) imaturas, chamados MIIC e CIIV, onde ocorre o processamento e formação dos complexos peptídeos antigênicos-MHC II (DRAKE et al., 1999; KLEIJMEER et al., 1997; TURLEY et al., 2000). A constatação da co-localização das moléculas LAMP e MHC II permite sua utilização como suporte para antígenos quiméricos, contendo as seqüências alvos de LAMP, visando o direcionamento do processamento antigênico para o compartimento MHC II (Figura 6). Vários trabalhos vem demonstrando que os antígenos fusionados à LAMP (antígeno/LAMP) são capazes de gerar uma maior atividade proliferativa de linfócitos antígeno-específicos, altos títulos de anticorpos e intensa atividade T- citotóxica em relação aos antígenos selvagens não fusionados à LAMP (ANWAR et al., 2005; DONNELLY; BERRY; ULMER, 2003; RAVIPRAKASH, et al., 2001; ROWELL et al., 1995; RUFF et al., 1997; WU et al., 1995)

O desenvolvimento de vacinas genéticas contra a Febre Amarela utilizando a estratégia de co-expressão de PreM/M-E, fusionado e não-fusionado à LAMP (pL/YFE e

p/YFE, respectivamente) foram previamente realizados em nosso laboratório (Laboratório de Virologia e Terapia Experimental – LaViTE / Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães – CPqAM/FIOCRUZ). Estas vacinas foram avaliadas quanto à imunogenicidade e ambas vacinas induziram os mesmos repertórios de células T induzidos pela vacina 17DD, e também foram capazes de proteger camundongos contra desafio letal com o VFA (DHALIA, 2009). Nesta dissertação abordaremos o desenvolvimento e avaliação de vacinas de DNA otimizadas contra o VFA, onde serão discutidos os principais resultados e as perspectivas.

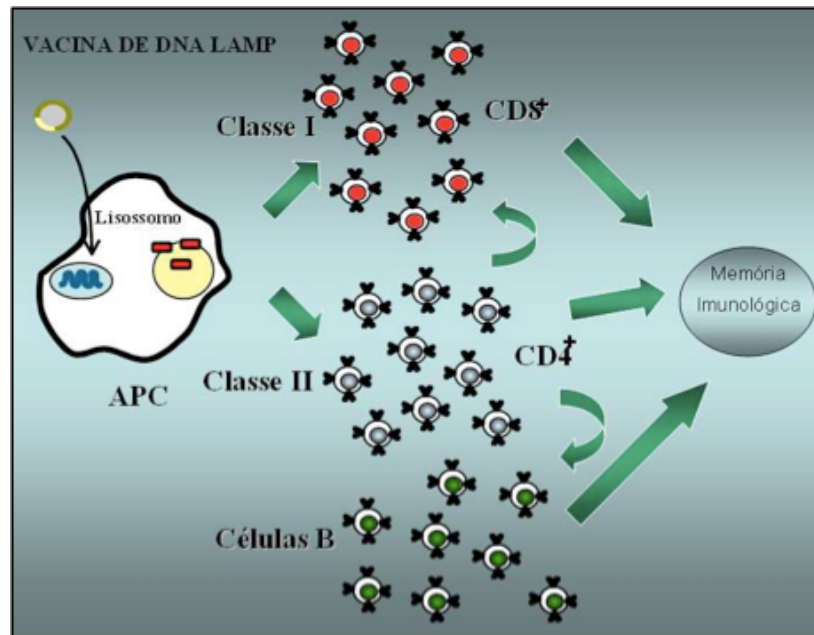


Figure 6. Apresentação antigênica, para a via MHC II, mediada pela Proteína de Associação à Membrana Lisossomal – LAMP

Fonte: Dr. Rafael Dhalia

Nota: Antígenos endógenos, produzidos dentro da célula (característicos das vacinas de DNA), são principalmente apresentados ao sistema imune pela via MHC I para células T CD8+. Antígenos fusionados a LAMP, apesar de serem expressos endogenamente, são direcionados para corpúsculos precursores do lisossomo diretamente associados à apresentação antigênica MHC II. Estes antígenos de fusão são principalmente apresentados para células T CD4+ que por sua vez estimulam a produção clonal de células T CD8+, assim como formação de células de memória.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliação da expressão de vetores vacinais otimizados, codificando a proteína Cap-PreM/M-E do Vírus da Febre Amarela-VFA, em células eucarióticas.

2.2 Objetivos específicos

- a) Otimizar a sequência que codifica PreM/M e E do VFA, para a expressão em células eucarióticas.
- b) Construir vetores de expressão, codificando a sequência otimizada fusionada e não-fusionada à região c-terminal de Proteína de Associação à Membrana Lisossomal-LAMP.
- c) Avaliar a expressão das proteínas otimizadas, fusionadas e não-fusionadas à LAMP.

3 MATERIAS E MÉTODOS

3.1 Construção dos genes sintéticos otimizados

3.1.1 Otimização e síntese da sequência Cap-PreM/M-Env para expressão em células eucarióticas

A sequência codificadora do gene Cap-pM/M-Env foi identificada no banco de dados NCBI (número de acesso NC 002031) e analisada quanto ao seu perfil de hidrofobicidade. As sequências obtidas foram analisadas, através do algoritmo genético do programa LETO 1.0 (Entelechon®), em relação aos seguintes parâmetros: codon usage (ADANG et al., 1993; BATEMAN; PURTON, 2000; DONG; NILSSON; KURLAND, 1996; DURET, 2000; FUHRMANN; GOLDMAN et al., 1995; HAAS; PARK; SEED, 1996; IKEMURA, 1981; KANAYA et al., 1999; KANE, 1995; KIM; KOMAR et al., 1998; KOTSOPOULOU et al., 2000; OH; LEE, 1997; OERTEL; HEGEMANN, 1999; ROUWENDAL et al., 1997; SLIMKO; LESTER, 2003; VERVOORT et al., 2000; ZHOU et al., 1999); estrutura secundária do mRNA (DALLMANN; DUNN, 1994; LEE et al., 1987); distribuição do conteúdo de GC (AUEWARAKUL, 2005; DURET, 2005; GALTIER et al., 2001; NAVARRE et al., 2006; SEMON; MOUCHIROUD; VINOGRADOV, 2005;) sequências longas repetitivas e motivos de DNA (DEL TITO et al., 1995; GURVICH et al., 2005; OXENDER; ZURAWSKI; YANOFSKY, 1979; WEISS, 1991;); sítios críticos de splicing (MAJOROS et al., 2003; SALZBERG et al., 1999;). Utilizando este algoritmo é possível desenhar sequências sintéticas de DNA para cada proteína, com o objetivo de melhorar sua expressão no organismo alvo, levando em consideração diversos parâmetros biológicos simultaneamente. As discrepâncias entre os codon usage do vírus e das células eucarióticas são minimizadas através de mutações silenciosas pontuais, capazes de alterar códons sem alterar a sequência final de aminoácidos. Desta forma, as sequências sintéticas de DNA são compostas pelos códons preferencialmente utilizados pelo organismo alvo (células eucarióticas). Outros parâmetros como estrutura secundária do mRNA, distribuição do conteúdo de GC, sequências longas repetitivas de DNA, motivos repetitivos de DNA, sítios de restrição e sítios críticos de splicing foram ajustados para permitir um aumento significativo nos níveis de expressão das proteínas virais em células eucarióticas.

A seqüência otimizada Cap-pM/M-Env foi fusionada a dois sítios múltiplos de clonagem: 5'(Sal I, NheI e XhoI) e 3'(EcoRI, KpnI e HindIII) que permitiu a construção de vetores através de estratégias de subclonagem (sem a necessidade de amplificação por PCR). A seqüência do gene otimizado, flanqueada pelos sítios múltiplos de clonagem, foi enviada para a síntese comercial (Genearth) e em seguida foi subclonada no vetor de expressão p43.2 LAMP/Gag (gentilmente cedido pelo Dr. Ernesto Marques/Pesquisador do Departamento de Virologia – CPqAM/FIOCRUZ) originando as construções p/YFE_{OPT} (sem LAMP) e pL/YFE_{OPT} (com LAMP).

3.1.2 Obtenção do antígeno vacinal otimizado

Uma alíquota do vetor comercial contendo o gene otimizado Cap-pM/M-Env foi utilizada para transformar células competentes, afim de se obter o gene em larga escala. As transformações foram realizadas em um volume final de 76µL contendo: 50µL de células competentes (*E. coli* K12TB1); 25µL de tampão de transformação (5mM MgCl₂; 5mM Tris-HCl pH 7.4); 1µL do vetor comercial. A reação de transformação foi incubada durante 30 minutos, no gelo, sendo em seguida submetida a choque térmico (37°C - 5 minutos) e esfriada novamente no gelo. As células foram semeadas em placa com meio sólido de cultura Luria-Bertani (LB), contendo ampicilina na concentração de 50µg/mL . A placa foi incubada, durante aproximadamente 15 horas a 37°C.

3.1.3 Preparação do DNA plasmidial

Visando a purificação do gene otimizado, uma colônia isolada da placa foi utilizada para ser inoculada em 400mL de meio LB líquido, contendo ampicilina (50µg/mL), e crescidas durante aproximadamente 15 horas a 37°C. Em seguida a cultura foi centrifugada (7.741 g - 10 minutos), para a obtenção de sedimento bacteriano. A partir deste sedimento bacteriano foi realizada a extração de DNA plasmidial utilizando o kit plasmid midi kit®(Qiagen), de acordo com as recomendações do fabricante. O DNA plasmidial foi digerido e a reação de digestão foi realizada em um volume final de 10µL contendo: 1X tampão de digestão; 1.5µg/µL de DNA plasmidial. Toda a digestão foi realizada a 37°C, durante aproximadamente 4 horas. O vetor comercial contendo o fragmento Cap-pM/M-Env foi

digerido com 0.01 U da enzima NheI (Biolabs) e 0.01 U da enzima KpnI. A partir dos resultados das digestões, verificados em gel de agarose, foi realizada a digestão em larga escala para posterior purificação do fragmento. A reação de digestão em larga escala foi realizada em um volume final de 50 μ L contendo: 1X tampão de digestão; 15 μ g/ μ L de DNA plasmidial. Toda a digestão foi realizada a 37°C, durante aproximadamente 4 horas. O vetor comercial contendo o fragmento Cap-pM/M-Env foi digerido com 0.1U da enzima NheI (Biolabs) e 0.05U da enzima KpnI (Biolabs). O mesmo vetor também foi digerido com 0.1U da enzima XhoI (Biolabs) e com 0.1U da enzima EcoRI (Biolabs) para permitir a inserção de LAMP. Todas as digestões foram realizadas a 37°C, durante aproximadamente 4 horas. Em seguida os fragmentos foram purificados através de extração de gel de agarose, utilizando o kit QIAEX II Gel Extraction Kit (Qiagen).

3.1.4 Subclonagem dos genes otimizados no vetor p43.2 LAMP/Gag

O vetor p43.2 LAMP/Gag foi submetido a reações de digestões para criar sítios de restrição, compatíveis com os sítios dos fragmentos Cap-pM/M-Env. Para a clonagem de Cap-pM/M-Env (NheI/KpnI), que gerou o vetor p/YFE_{OPT}, a reação de digestão foi realizada em um volume final de 10 μ L contendo: 1X tampão de digestão; 1 μ g/ μ L da amostra do vetor, 0.01U da enzima NheI (Biolabs) e 0.01U da enzima KpnI (Biolabs). A digestão foi realizada a 37°C, durante aproximadamente 4 horas. Para a clonagem de Cap-pM/M-Env (XhoI/EcoRI), que gerou pL/YFE_{OPT}, a reação de digestão foi realizada em um volume final de 10 μ L contendo: 1X tampão de digestão; 1 μ g/ μ L da amostra do vetor, 0.01U da enzima XhoI (Biolabs) e 0.01U da enzima EcoRI (Biolabs). A digestão foi realizada a 37°C, durante aproximadamente 4 horas. As reações de ligação de ambos os fragmentos, ao vetor p43.2 com e sem LAMP, foram realizadas em um volume final de 10 μ L contendo: 1X tampão T4 DNA Ligase; 100ng de vetor p43.2 LAMP/Gag (clivado com NheI/KpnI e XhoI/EcoRI); 0.4 U de T4 DNA ligase; 1 μ L de cada fragmento purificado. As reações de ligação foram realizadas a 16°C, durante aproximadamente 20 horas. As ligações foram em seguida utilizadas para a transformação de células competentes, visando a confirmação da clonagem. Os procedimentos de transformação, preparação e digestão foram os mesmos descritos anteriormente.

3.2 Cultivo, infecção e transfecção de células eucarióticas

Células eucarióticas 293 foram cultivadas em meio DMEM (Invitrogen®) acrescido de: 10% soro bovino fetal (Gibco®); 1% penicilina/estreptomicina (Gibco®); 1% L-glutamina (Sigma®). Estas células foram utilizadas tanto para ensaios de infecção viral, como para os experimentos de transfecção. Após atingirem uma confluência de aproximadamente 90%, as células foram infectadas com um extrato viral de VFA na concentração de 0.36×10^6 PFU (gentilmente cedido pela Dra. Marli Tenório, pesquisadora do Departamento de Virologia – CpqAM/FIOCRUZ). Para a infecção, as células foram inicialmente incubadas com o extrato VFA puro (1 hora /37°C /5% de CO₂), sendo acrescido em seguida meio DMEM completo para a manutenção celular. As células infectadas permaneceram nas mesmas condições de incubação (37°C /5% de CO₂), durante 48 horas, até apresentarem os efeitos citopatológicos provocados pelo vírus. Para os ensaios de transfecção, as células 293 foram crescidas nas mesmas condições supracitadas. Em seguida foram incubadas com 1.6µg de cada DNA (p/YFE_{OPT} e pL/YFE_{OPT}), utilizando como controle negativo o p43.2 vazio e como controle positivo um plasmídeo codificando o gene repórter da β-galactosidase. As reações de transfecção foram realizadas utilizando o kit Lipofectamine 2000 (Invitrogen®), seguindo as recomendações do fabricante. As células transfectadas foram incubadas (48 horas /37°C /5% de CO₂) e processadas para a avaliação da eficiência de transfecção, pela atividade de expressão do gene repórter. Para a reação de coloração do β-gal, as células foram inicialmente lavadas em 1X PBS e fixadas em solução 0.2% glutaraldeído/PBS. Em seguida as células fixadas foram incubadas em um volume final de 1ml de uma solução contendo: 20mg de X-Gal; 0.005M de ferriciana de potássio; 0.005M de ferrociana de potássio; 0.002M de MgCl₂ em 1X PBS, para o desenvolvimento de coloração pela atividade de β-gal.

3.3 Análise da expressão de p/YFE_{OPT} e pL/YFE_{OPT} através das técnicas de microscopia de fluorescência e confocal

Células humanas 293 foram semeadas em lamínulas de placas de cultura de 24 poços, transfectadas como descrito anteriormente e incubadas a 37°C por 48 horas. Em seguida as células foram lavadas com tampão PBS 1X, fixadas em metanol e bloqueadas em solução 1% albumina bovina em PBS 1X. Os antígenos VFA foram então detectados com o anticorpo monoclonal IgG 2A anti-Febre Amarela produzido em camundongos (Santa Cruz®) na

diluição 1:250, utilizando como segundo anticorpo anti-IgG de camundongo (produzido em cabra) conjugado a marca de fluorescência alexa flúor 488. As lamínulas foram em seguida montadas com ProLong (Molecular Probes, Seattle, WA) em lâminas de vidro. A microscopia de fluorescência foi realizada utilizando o microscópio Leica DMI 6000 B. Os campos analisados foram escolhidos de acordo com a dispersão e morfologia das células. Todas as imagens foram adquiridas no plano 100x fluor 1.3 NA objetiva (em óleo de imersão) com UV-2A, B-2E/C, G-2A, ou banda dupla através de filtros de fluorescência F-R. As imagens digitalizadas foram obtidas com uma câmera “cooled RT slider CCD” (Diagnostics Instrument Corp., Sterling Heights, MI) acoplada a um computador “Macintosh PowerBook G4”. Para a aquisição das imagens foi utilizado o “software SPOT 3.0” com o formato RGB de 24 bit e área de 1520 x 1080 pixels. O processamento da imagem foi realizado com o programa “Adobe Photoshop 4.0” (Adobe System Corp., San Jose, CA), ajustando a densidade de distribuição dos pixels.

3.4 Análise da expressão de p/YFE_{OPT} e pL/YFE_{OPT} por western-blot

As reações de western-blot foram realizadas com extratos de células transfectadas com as construções p/YFE_{OPT} e pL/YFE_{OPT}, utilizando-se como controle positivo extratos de células 293 infectadas com VFA e como controle negativo o vetor p43.2 vazio. Os extratos celulares foram ressuspensos em tampão 2X Laemmli desnaturante (125mM Tris-HCl pH 6.8, 40% Glicerol, 5% SDS, 0.005% azul de bromofenol, 10% β-mercaptoetanol) e inibidor de protease (1:1). Os extratos proteicos foram quantificados quanto à concentração total de proteínas, utilizando o método de Bradford, fracionados em gel SDS-PAGE 10% e transferidos para membrana de nitrocelulose. As membranas foram incubadas com anticorpo policlonal (1:250) específico contra proteína E (VIANA, 2009), 1 hora sob agitação, e lavadas 3X (15 minutos cada) em 1X PBS-Tween. Em seguida, as membranas foram incubadas com anticorpo secundário (1:5.000) anti-IgG de camundongo conjugado a peroxidase (Jackson ImmunoResearch), 1 hora sob agitação, lavadas e reveladas utilizando um kit de quimioluminescência - ECL (Amersham, England, UK).

4 RESULTADOS

4.1 Construção do gene sintético

4.1.1 Otimização para expressão em células eucarióticas

Inicialmente, a sequência selvagem do gene Cap-pM/M-Env obtida no GenBank foi flanqueada por dois sítios múltiplos de clonagem (5'- SalI, NheI, XhoI e 3'- EcoRI, KpnI,HindIII), com a finalidade de permitir posterior construção de vetores de expressão através de estratégias de subclonagem. Uma sequência Kozak contendo o códon de iniciação da tradução (ATG) foi inserida entre os sítios de NheI e XhoI, enquanto que o stop códon foi inserido entre os sítios de restrição de EcoRI e KpnI (Figura 7).

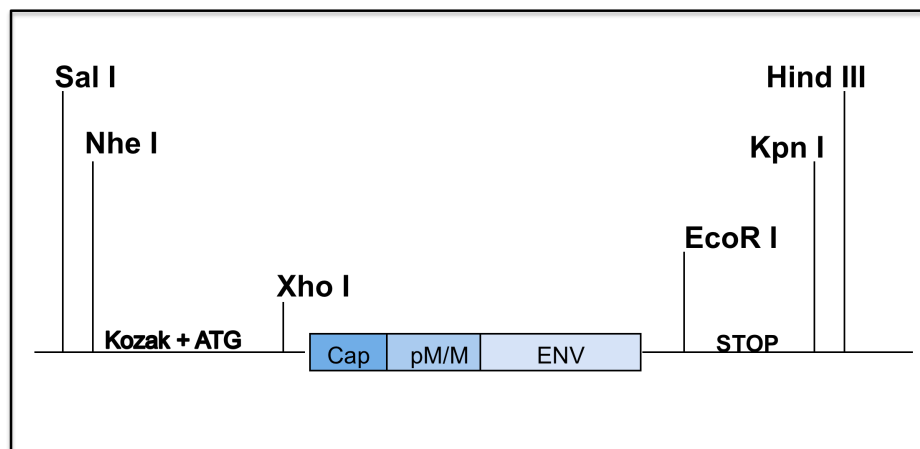


Figura 7. Esquema representativo da construção gênica.

Fonte: Elaborado da autora

Nota: Sítios de restrição específicos foram inseridos, flanqueando o gene de interesse, para permitir a construção de proteínas selvagens e fusionadas à LAMP. A sequência Kozak foi inserida para aumentar a eficiência da tradução e o stop códon foi inserido para permitir a finalização da tradução da proteína selvagem.

Esta sequência foi otimizada utilizando o algoritmo genético do programa LETO 1.0 (Entelechon®), com o objetivo de promover uma maior expressão de Cap-pM/M-Env em células eucarióticas humanas (Figura 8 a 12). As sequências flanqueadoras foram bloqueadas

antes do processo de otimização, para preservar as sequências dos sítios de restrição desejáveis para permitir as estratégias de clonagem.

Através do algoritmo genético, foi observado uma significativa discrepância entre a frequência de códons utilizadas pelo VFA em relação àqueles utilizados por células eucarióticas humanas para expressar suas proteínas. A figura 8 ilustra o processo de otimização do codon usage da proteína viral Cap-pM/M-Env para expressão em células humanas, exemplificando a alteração de códons utilizados para expressar o aminoácido cisteína (o mesmo processo foi realizado para todos os aminoácidos). Dos dois códons possíveis para expressar a cisteína (UGU e UGC), o VFA utiliza predominantemente o códon UGC (“original” – 66.7%). Em células humanas (“target”), os dois códons são utilizados com frequências similares (45 e 55%). Desta forma, a frequência dos códons utilizados pelo VFA para expressar a cisteína foi substituído na sequência otimizada (“optimized”) por frequências similares às utilizadas em células humanas. A barra azul, indicada no gráfico, representa a discrepância entre os códons utilizados pelo vírus para expressar a cisteína em relação aos possíveis códons utilizados para expressar o mesmo aminoácido em células humanas. Quanto maior for a barra, maior é a discrepância entre os codon usage das espécies comparadas. Observe que após o processo de otimização, ou seja, após a melhor distribuição dos códons para facilitar a expressão em eucariotos, a barra é significativamente reduzida na sequência otimizada (barra verde).

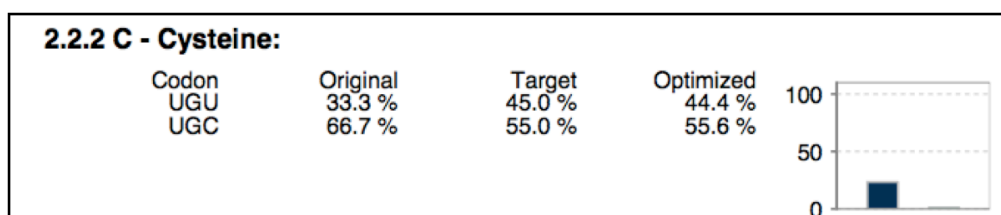


Figura 8. Otimização de codon usage para o aminoácido cisteína, visando melhorar a eficiência de expressão da proteína Cap-pM/M-Env em células eucarióticas humanas.

Fonte: Dados da autora

Nota: A sequência da proteína Cap-pM/M-Env do VFA está representada como original, onde o códon UGC é utilizado predominantemente (66,7%) para expressar o aminoácido cisteína. Por outro lado, o organismo alvo (células humanas- Target) utiliza os dois códons em frequências similares para expressar a cisteína com proporções de 45 e 55%. A sequência otimizada (Optimized) apresenta uma maior equilíbrio entre os dois códons, permitindo que as células humanas aproveitem melhor seus dois tRNAs disponíveis para a tradução do referido aminoácido, o que leva a uma maior eficiência de expressão. As barras indicam a discrepância entre os codon usage das sequências original e alvo (azul- antes da otimização; verde- após a otimização). A redução do tamanho da barra e, conseqüentemente da discrepância entre os codon usage das duas espécies ilustra bem o processo de otimização.

Embora o tamanho e a quantidade de estruturas secundárias, ao nível de mRNA não estejam diretamente relacionadas com a baixa eficiência de tradução, de um modo geral, estas estruturas podem causar um efeito negativo na tradução dos mRNAs. Sua presença pode interferir no processo traducional prejudicando tanto o deslizamento dos ribossomos ao longo do mRNA, quanto o acesso dos anti-códons dos tRNAs aos seus respectivos códons. Baseado nesta informação, o processo de otimização também pode contribuir para a redução do número e do comprimento destas estruturas harpin like, visando aumentar a eficiência da síntese proteica. As sequências foram também avaliadas quanto à distribuição do conteúdo GC, visando a obtenção de estruturas mais estáveis (Figura 9), e quanto à presença de sítios crípticos de splicing, além de sítios internos de restrição (Figuras 10 e 11). O processo completo de otimização da proteína Cap-pM/M-Env foi realizada pelo Dr. Rafael Dhalia (Pesquisador do Departamento de Virologia – CPqAM/FIOCRUZ), e os relatórios de otimização encontram-se anexados a esta dissertação (ver anexos). A sequência otimizada obtida foi enviada para síntese comercial (Geneart®).

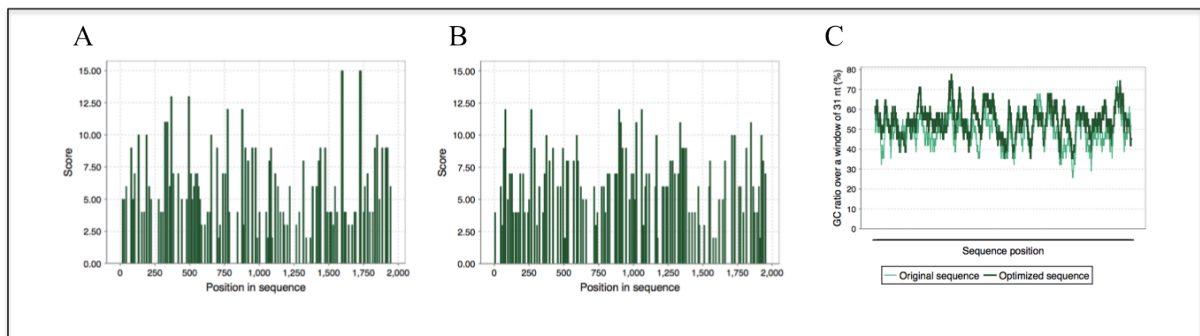


Figura 9. Estruturas secundárias e distribuição do conteúdo GC da sequência Cap-pM/M-Env.

Fonte: Dados da autora

Nota: (A) Estruturas secundárias da sequência de mRNA original do VFA, que codifica a proteína Cap-pM/M-Env. Um total de 50 hélices, com um comprimento médio de 6.28 foram detectadas na estrutura secundária predita do mRNA de Cap-pM/M-Env. (B) Estruturas secundárias da sequência otimizada do mRNA que codifica a proteína Cap-pM/M-Env. O número total de hélices foi alterado para 53 obtendo-se uma redução do comprimento médio das hélices (6.15). (C) Distribuição do conteúdo de GC das sequências dos mRNAs de Cap-pM/M-Env original e otimizado. O conteúdo de GC do mRNA, numa janela de 31 nt, foi detectado como 49% e foi otimizado para 53.97%, visando aumentara sua estabilidade e consequente taxa de expressão.

A	Type	Position	Relevance
	Acceptor	497	Likely
	Acceptor	503	Likely
	Acceptor	593	Possible
	Acceptor	706	Possible
	Acceptor	1246	Possible
	Acceptor	1631	Possible
	Acceptor	1756	Possible
	Acceptor	1854	Possible
	Donor	215	Possible
	Donor	312	Possible
	Donor	328	Likely
	Donor	473	Likely
	Donor	477	Possible
	Donor	812	Possible
	Donor	1085	Possible
	Donor	1115	Likely
	Donor	1143	Possible
	Donor	1165	Possible
	Donor	1557	Possible

B	Type	Position	Relevance
	Donor	1557	Possible

Figura 10. Sítios críticos de splicing da sequência de DNA que codifica Cap-pM/M-Env.

Fonte: Dados da autora.

Nota: (A) Sítios de splicing na sequência Cap-pM/M-Env original. Um total de 19 prováveis sítios críticos de splicing foram detectados ao longo do mRNA, onde 8 foram considerados aceptores e 11 doadores. (B) Sítios de *splicing* na sequência Cap-pM/M-Env otimizada. O número de Sítios críticos de splicing foi reduzido para apenas 1 doador, evitando possíveis eventos de splicing que poderiam gerar proteínas truncadas não-imunogênicas.

Enzyme	Positions in original sequence	Positions in optimized sequence
EcoRI	2	1
HindIII	0	0
KpnI	0	0
NheI	0	0
Sall	0	0
XbaI	1	1
XhoI	1	1

Figura 11. Sítios internos de restrição da sequência de DNA que codifica Cap-pM/M-Env.

Fonte: Dados da autora.

Nota: Sítios de restrição nas sequências original e otimizada de Cap-pM/M-Env. Os sítios desejáveis foram preservados e um sítio indesejável (de EcoRI) foi removido manualmente na sequência otimizada.

4.2 Construção dos vetores de expressão

A sequência de Cap-pM/M-Env otimizada para expressão em células humanas e enviadas para síntese comercial (Genart®), foi recebida já clonada em um vetor comercial. Esta sequência foi subclonada no vetor vacinal p43.2, o qual contém a sequência completa do gene que codifica o LAMP-1 humano (hLAMP-1). Para tanto, o vetor comercial e o p43.2 foram digeridos com as enzimas NheI e KpnI, cuja ligação do fragmento liberado permitiu a produção da construção p/YFE_{OPT} (sem fusão com LAMP) (Figura 12). Para obter a construção fusionada à LAMP, os vetores foram digeridos com as enzimas XhoI e EcoRI, cuja ligação do fragmento resultou na construção pL/YFE_{OPT} (Figura 13). Estas construções foram preparadas em larga escala, livre de endotoxinas, e armazenadas para ensaios posterior.

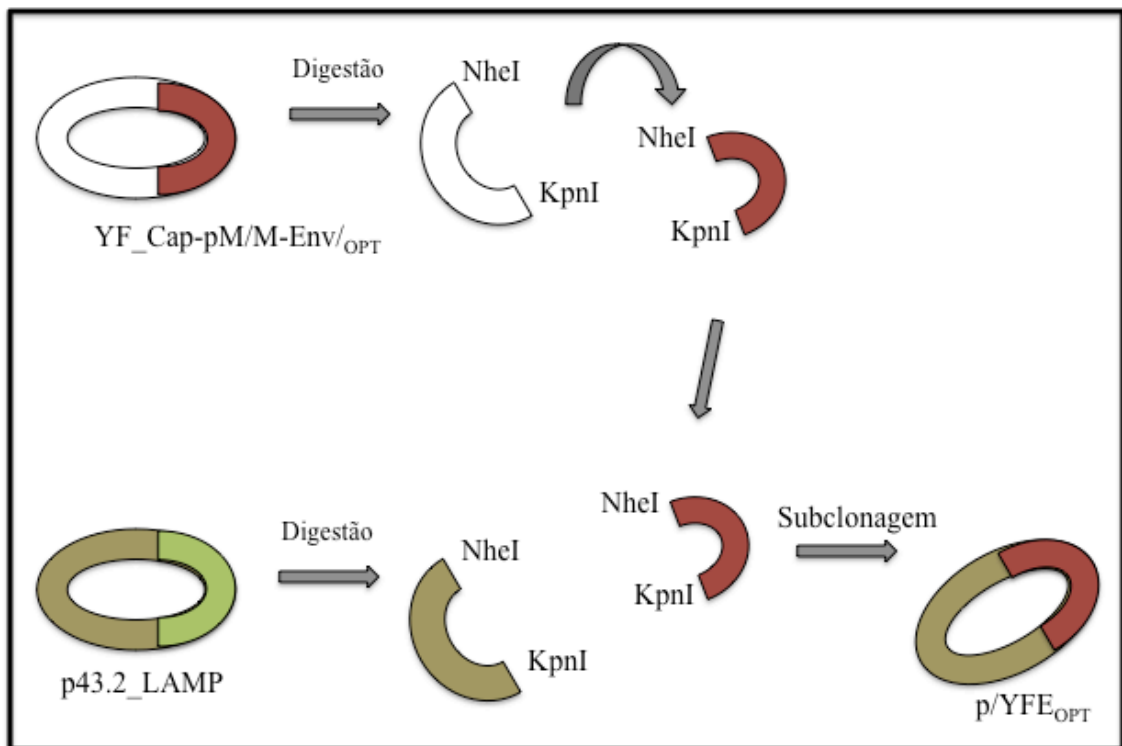


Figura 12. Esquema de subclonagem da sequência otimizada Cap-pM/M-Env no vetor p43.2, sem fusão com LAMP.

Fonte: Elaborado pela autora.

Nota: Após a digestão da sequência otimizada a partir do vetor comercial utilizando as enzimas NheI e KpnI que flanqueiam o inserto, este fragmento foi purificado para posterior subclonagem no vetor p43.2. Para tal, o vetor p43.2 também foi clivado com as respectivas enzimas (liberando LAMP), purificado e quantificado. Em seguida, o vetor p43.2 clivado foi utilizado para a ligação do fragmento Cap-pM/M-Env otimizado, gerando a construção p/YFE_{OPT}.

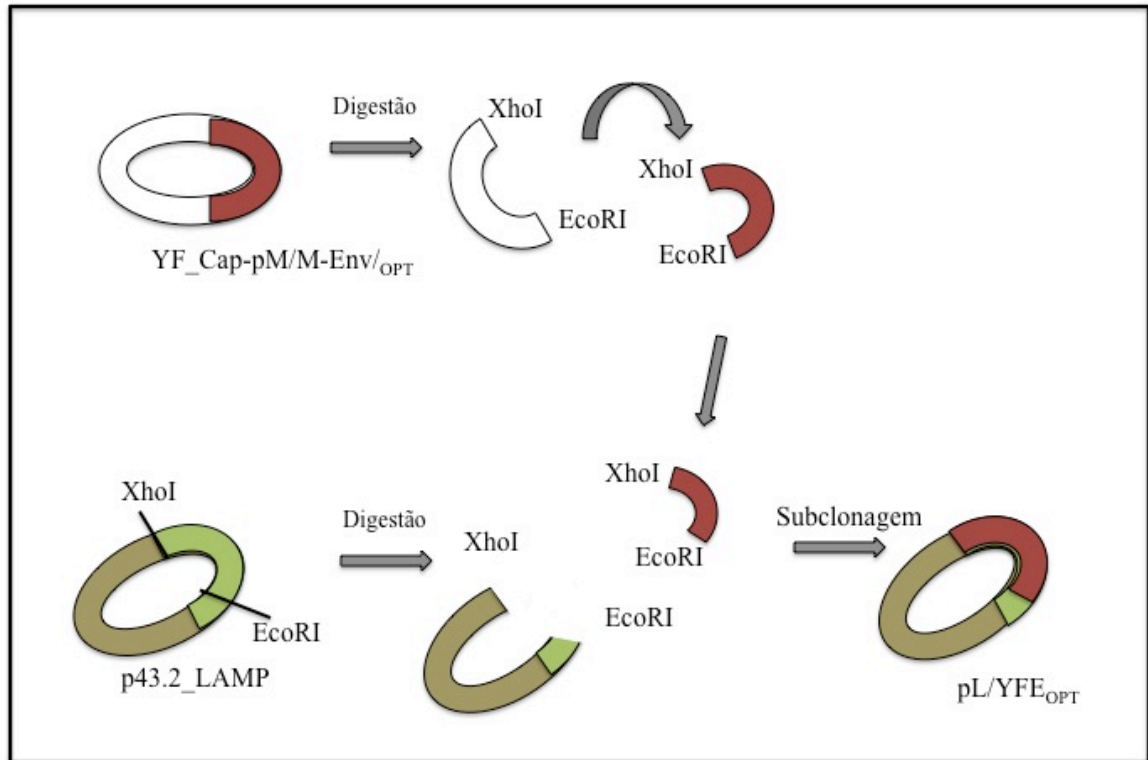


Figura 13. Esquema de subclonagem da sequência otimizada Cap-pM/M-Env no vetor p43.2, fusionadas à LAMP.

Fonte: Elaborado pela autora.

Nota: Após a digestão da sequência otimizada a partir do vetor comercial utilizando as enzimas XhoI e EcoRI que flanqueiam o inserto, este fragmento foi purificado para posterior subclonagem no vetor p43.2. Para tal, o vetor p43.2 também foi clivado com as respectivas enzimas, purificado e quantificado. Em seguida, o vetor p43.2 clivado foi utilizado para a ligação do fragmento Cap-pM/M-Env otimizado, gerando a construção pL/YFE_{OPT}, com o inserto localizado entre as regiões N e C terminais de LAMP.

4.3 Análise da expressão das construções vacinais Cap-pM/M-Env em células eucarióticas através de western-blot

Com o intuito de avaliar a eficiência de expressão das construções p/YFE_{OPT} e pL/YFE_{OPT} em células eucarióticas, foram realizados ensaios de western-blot com extratos de células humanas 293, processados 48 horas após transfecção com as referidas construções. A detecção proteica foi realizada utilizando anticorpo policlonal contra VFA produzido em coelho, desenvolvido por nossos colaboradores. Nestes ensaios, foram utilizados extratos de células 293 transfectadas com o vetor p43.2 vazio, como controle negativo, além de extratos de células 293 infectadas com o VFA, como controle positivo. Os extratos proteicos foram

quantificados quanto à concentração total de proteínas, através da metodologia de Bradford fracionadas em gel SDS-PAGE e transferidos para membrana de nitrocelulose para posterior detecção proteica. Como esperado, as expressões das proteínas Cap-pM/M-Env, nas formas fusionadas e não-fusionadas à LAMP (ambas com aproximadamente 48kDa) , foram detectadas [assim como a expressão da proteína nativa do vírus (Figura 14).

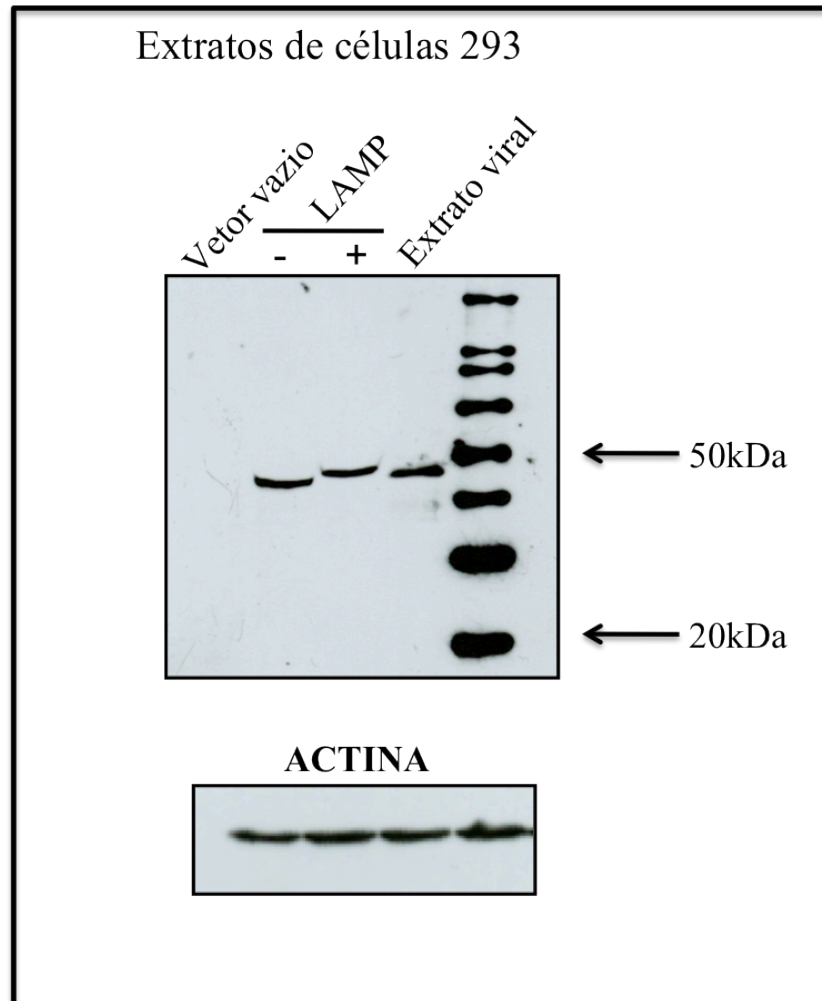


Figura 14. Análise da expressão da construção vacinal de Cap-pM/M-Env em células humanas, por western-blot.

Fonte: Elaborado pela autora.

Nota: Células humanas 293 foram transfectadas com os vetores vacinais codificando a proteína Cap-pM/M-Env do VFA, afim de avaliar a expressão protéica. Como controles, foram utilizadas células 293 transfectadas com p43.2 vazio e infectadas com o VFA. Extratos protéicos processados 48 horas após a transfecção/infecção foram fracionados em gel de poliacrilamida e transferidos para membrana de nitrocelulose, para revelação por western-blot. O anticorpo policlonal anti-Cap-pM/M-Env foi capaz de detectar as proteínas codificadas pelas construções vacinais, nas formas fusionada e não-fusionada à LAMP, assim como a proteína nativa do vírus. Como controle da quantidade de extrato total, foram realizados ensaios com anti- β -actina, utilizando o anticorpo monoclonal anti-beta-actin AC-15 (Invitrogen®) produzido em camundongo, os quais demonstraram quantidades equivalentes dos extratos utilizados. O marcador de peso molecular utilizado foi o MagicMarker (Invitrogen®).

4.4 Análise da expressão das construções vacinais Cap-pM/M-Env em células eucarióticas através de microscopia de imunofluorescência

A análise da expressão das proteínas expressas pelas construções vacinais foi realizada através de ensaios de imunofluorescência. Células humanas 293 foram transfectadas com p/YFE_{OPT}, pL/YFE_{OPT}, p43.2 vazio e infectadas com o VFA, sendo incubadas com o anticorpo monoclonal IgG 2A anti-Febre Amarela produzido em camundongos (Santa Cruz®), 48 horas após a transfecção, para detecção proteica. Como esperado, a expressão da proteína Cap-pM/M-Env, nas formas fusionadas e não-fusionadas a LAMP, foi detectada, com uma distribuição reticular característica da proteína não-fusionada à LAMP, assim como a distribuição lisossomal característica da proteína fusionada a LAMP (Figura 15)

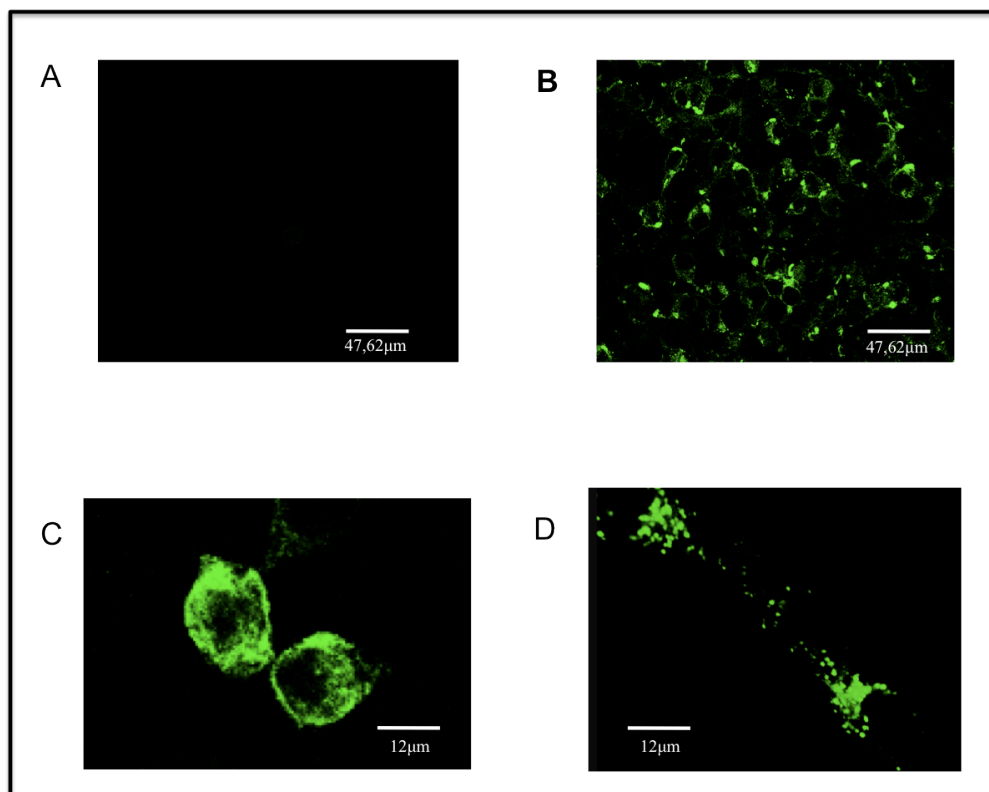


Figura 15 Análise da expressão das construções vacinais Cap-pM/M-Env em células eucarióticas através de microscopia de imunofluorescência.

Fonte: Elaborado pela autora.

Nota: Células humanas 293 foram transfectadas com os vetores vacinais codificando a proteína Cap-pM/M-Env do VFA, afim de avaliar a expressão proteica. Como controles, foram utilizadas células 293 transfectadas com p43.2 vazio e infectadas com o VFA. Estas células foram incubadas com o anticorpo monoclonal IgG 2A anti-Febre Amarela produzido em camundongos (Santa Cruz®), que detectou a proteína nativa do VFA (B), a proteína não-fusionada à LAMP que demonstrou uma distribuição reticular característica (C) e a proteína fusionada à LAMP que demonstrou uma distribuição lisossomal pontual (D). Em (A), controle negativo, não houve detecção.

5 DISCUSSÃO

Muitas ferramentas têm sido utilizadas hoje com o intuito de melhorar a imunogenicidade das vacinas de DNA. A utilização de antígenos quiméricos fusionados à LAMP, que possibilita a apresentação de antígenos endógenos via MHCII e otimização de códons vem sendo amplamente usados e seus benefícios em relação ao aumento da imunogenicidade vem sendo reportados. Em relação à otimização de códons, vários estudos tem demonstrado um aumento da expressão e imunogenicidade de antígenos alvos otimizados. Carnero e colaboradores (CARNERO et al., 2009) estudaram a habilidade de um vetor viral, o Newcastle Disease Virus, NDV, de expressar a proteína Gag de HIV, afim de gerar uma resposta imune Gag-específica em camundongos. A proteína Gag foi otimizada em relação ao codon usage, no intuito de se averiguar se haveria diferenças quanto à expressão da proteína, proteção dos camundongos e indução de resposta imune celular e atividade citotóxica em relação à proteína nativa. Após a inserção da sequência HIV Gag otimizada em NDV (NDV-HIVGag-_{OPT}), foi obtido um aumento expressivo da expressão de HIV-Gag (em células infectadas com NDV) quando comparado com o nível de expressão da proteína nativa (NDV-HIVGag-XbaI). O aumento na expressão do antígeno otimizado foi ainda correlacionado com um alto nível de proteção em camundongos imunizados, após desafio com o vírus da vaccínia expressando HIV Gag. Um significativo aumento na intensidade da resposta imune, também foi observado assim como uma atividade citotóxica específica anti-Gag *in vivo* e aumento da resposta de células T CD8 nos camundongos imunizados com NDV-HIVGag-_{OPT} em relação aos imunizados com as construções não otimizadas.

Burgess-Brown e colaboradores (BURGESS-BROWN et al., 2008) estudaram o padrão de expressão de 30 genes humanos desidrogenase/reductase (SDRs) de cadeia curta, em *E. Coli*. Este padrão foi analisado comparando as versões nativa e otimizada em relação ao codon usage e estrutura de mRNA de cada gene. Além disso, a expressão dos genes nativos e otimizados foram comparados em duas linhagens isogênicas de bactéria. Uma destas linhagens continha um plasmídeo (pRARE2) que carregava 7 códons raros de tRNA. Primeiro, foi analisada a expressão e solubilidade entre os genes nativos e otimizados em bactéria *E. coli* BL21(DE3)-R3. O resultado foi que, em geral, os genes que foram otimizados aumentaram sua expressão e em alguns casos, o nível de solubilidade, quando comparado aos genes nativos. Os 30 genes SDRs nativos e otimizados foram expressos em *E.coli* BL21(DE3)-R3-pRARE2 e a expressão foi então comparada à linhagem parental de *E. coli*, a

qual falta o plasmídeo pRARE2. A comparação da expressão de gene nativo na linhagem parental e na que tem um aumento de tRNA mostrou 15 casos onde os níveis de expressão foram melhorados; para 3 destas proteínas (DHRS3, DHRS6 e RDH14) um aumento na solubilidade também foi observado. Os resultados apresentados mostraram que tanto a otimização quanto a suplementação de tRNA obtiveram um impacto positivo na expressão heteróloga de uma significativa fração dos genes testados, porém, os resultados foram melhores quando o gene otimizado foi utilizado.

Shinoda e colaboradores (SHINODA et al., 2009) tem investigado uma vacina de DNA contra a varíola, vírus pertencente à família *Poxviridae*. Esta vacina se baseia na proteína L1, componente da membrana do vírion maduro, que é conservada em todos poxvírus sequenciados e é requerida para a entrada do vírus nas células do hospedeiro e é alvo para anticorpos neutralizantes. Quando expressa pelo vírus da varíola, a proteína L1 se liga à membrana viral através de uma âncora transmembrana C-terminal sem passar pela via secretória. Deste modo, a proteína L1 foi otimizada (codon usage) para ser expressa em células eucarióticas e também houve a adição de um peptídeo sinal para que a mesma trafegasse pelo retículo endoplasmático e pelo complexo de Golgi. Deste modo, as construções otimizadas com peptídeo sinal (SL10p) e otimizada sem o peptídeo sinal (L10p) foram usadas para transfectar células BS-C-1 e a expressão proteica foi analisada em ensaios de western-blot, onde a construção sL10p foi a mais abundante. Os títulos de anticorpos de neutralizantes também foram investigados e o resultado foi que os camundongos que foram imunizados com sL10p apresentaram títulos 3 vezes maior do que os imunizados com L10p.

Nos trabalhos que estão acima relatados, a otimização dos antígenos alvo foram realizadas apenas em relação a um parâmetro, o codon usage, nos trabalhos de Carnero e Shinoda, ou dois, o codon usage e estrutura secundária de mRNA, realizada por Burgess-Brown e colaboradores. As otimizações dos antígenos virais desenvolvidas neste trabalho foram realizadas pelo algoritmo genético do programa LETO 1.0 (Entelechon®) que, além da otimização em relação ao codon usage e estrutura secundária de mRNA, leva em consideração outros parâmetros como regiões ricas em conteúdo de GC, regiões repetitivas de DNA e sítios críticos de splicing, que podem afetar a expressão. Sendo assim, todos os parâmetros supracitados são considerados simultaneamente, e o balanceamento entre os mesmos permite a obtenção de altos níveis de expressão proteica.

Diferentes grupos vêm utilizando a estratégia de co-expressão das proteínas que codificam a membrana (M) e o envelope (E) de flavivirus, selvagens e fusionadas à LAMP, para o desenvolvimento de vacinas de DNA. Raviprakash e colaboradores (RAVIPRAKASH

et al., 2001) foram os primeiros a avaliar esta estratégia em termos de localização e imunogenicidade, utilizando o sorotipo tipo 2 de Dengue como modelo. A expressão e a localização intracelular dos antígeno E e E/LAMP de Dengue foram comparados com a do LAMP endógeno, através das microscopias de fluorescência e confocal. As imagens obtidas demonstraram a co-localização dos antígenos E/LAMP com a membrana lisossomal em células NIH3T3 transfectadas. Para ensaios *in vivo*, 50µg do vetor que codifica PreM/M-E (1040D2ME; proteína selvagem) e do vetor que codifica PreM/M-E/LAMP (1040D2MEL; químera E/LAMP) foram utilizados em ensaios de imunização de camundongos. Nenhum dos animais imunizados com 1040D2ME apresentaram soroconversão, enquanto todos os camundongos imunizados com 1040D2MEL soroconverteram no dia 30, apresentando títulos de PRTN₅₀ variando entre 49 e 270.

Lu e colaboradores (Lu et al., 2003) continuaram estes estudos para avaliar a resposta imune em termo de memória imunológica. Inicialmente os autores analisaram a expressão de ambas as proteínas por western-blot, confirmando as bandas específicas correspondentes às formas glicosiladas e processadas das proteínas E nativa e da químera E/LAMP. A distribuição lisossomal de E/LAMP e sua co-localização com MHC II e moléculas de LAMP foi também confirmada através das microscopias de fluorescência e confocal. Para avaliar a imunogenicidade de suas vacinas, E (pD2) e E/LAMP (pD2/LAMP), as respostas imunes de camundongos imunizados com estas construções foram monitoradas durante 1 ano. 50µg de pD2 e de pD2/LAMP foram utilizados para imunizar grupos de 6 camundongos, visando a avaliar a resposta por anticorpos através de ensaios de Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay- ELISA. Quatro camundongos do grupo imunizado com pD2, e todos os camundongos imunizados com pD2/LAMP, soroconverteram sem nenhuma diferença significativa entre as respostas antígeno-específicas elicitadas por ambas as construções. Entretanto, nenhum soro proveniente dos animais imunizados com pD2 apresentou títulos significantes de anticorpos neutralizantes, enquanto todos os soros dos animais imunizados com pD2/LAMP apresentaram uma intensa capacidade de neutralização viral.

Anwars e colaboradores (ANWAR et al., 2005) utilizaram a estratégia de co-expressão M-E/LAMP para desenvolver uma vacina de DNA contra o vírus da Febre do Oeste do Nilo. Seus resultados de western-blot demonstraram uma concentração intracelular acrescida de E/LAMP, quando comparada a de E nativa, indicando uma secreção natural da proteína E nativa que deve ser retardada pela associação entre LAMP e a membrana externa do lisossomo. Assim como os trabalhos prévios, os ensaios de confocal demonstraram a co-localização intracelular de E/LAMP com LAMP endógeno, MHC classe II e moléculas H-

2M, sendo estas últimas intimamente relacionadas com a apresentação antigênica. Para avaliar a imunogenicidade das vacinas E e E/LAMP da Febre do Oeste do Nilo, 50µg da vacina PreM/M-E (pVax-WN) e da vacina PreM/M-E/LAMP (pVax-WNL) foram injetadas, em grupos de 5 camundongos que foram monitorados durante 2 anos após as imunizações. Dois dos 5 camundongos imunizados com pVax-WN apresentaram títulos de anticorpos considerados satisfatórios, embora a resposta de anticorpos destes camundongos não foi considerada sustentável após 3 meses. Em contraste, todos os camundongos imunizados com pVax-WNL demonstraram altos títulos de anticorpos, com acréscimo nos títulos entre os dias 55 e 125. Em adição, as amostras de soro dos camundongos imunizados com pVax-WN não apresentaram diferença significativa nos títulos de anticorpos neutralizantes, quando comparados com os camundongos imunizados com o vetor vazio (pVax1). Entretanto, foi observado um significativo título de anticorpos neutralizantes nos soros dos camundongos imunizados com pVax-WNL, entre os dias 90 e 125. No intuito de se analisar a presença de resposta por células B de memória, os camundongos foram novamente imunizados (19 meses depois após a última imunização) e amostras de soro foram coletadas duas semanas depois. Enquanto nenhuma atividade significativa de neutralização foi detectada no grupo imunizado com pVax-WN, significantes títulos de anticorpos neutralizantes foram detectados no grupo imunizado com pVax-WNL.

Neste trabalho nós descrevemos, pela primeira vez, a utilização concomitante de duas estratégias para o melhoramento da expressão e imunogenicidade de vacinas de DNA, que são a otimização e co-expressão de PreM/M-E como vetor vacinal contra o Vírus da Febre Amarela – VFA. Nós desenvolvemos e avaliamos a eficiência de expressão/imunogenicidade da proteína E otimizada selvagem (p/YFE_{OPT}) e fusionada a LAMP (pL/YFE_{OPT}). A otimização da sequência que codifica a proteína E foi realizada através do algoritmo genético do programa LETO (Entelechon®). Após a síntese comercial da sequência otimizada, a mesma foi subclonada em um vetor de expressão e uma vez confirmada a identidade das duas construções, através de provas de digestão, as mesmas foram inicialmente utilizadas para transfectar células eucarióticas para análise de expressão. Ambas as proteínas foram detectadas, através da técnica de imunofluorescência, em seus compartimentos celulares característicos: proteína Cap-pM/M-Env não-fusionada à LAMP (ao longo da membrana reticular) e Cap-pM/M-Env fusionada à LAMP (associadas a corpúsculos lisossomais). As proteínas também foram detectadas por ensaios de western-blot no qual tanto a proteína nativa do vírus foi detectada quanto as proteínas otimizadas fusionada e não-fusionada à LAMP.

Os vetores vacinais selvagens p/YFE e pL/YFE (não-otimizados) foram utilizados em estudos realizados em camundongos a fim de avaliar as respostas celular e humoral, bem como a proteção conferida pelas referidas construções. Os plasmídeos p/YFE e pL/YFE foram inoculados em camundongos Balb/c e C57, utilizando como controle positivo a vacina 17DD e controles negativos solução salina e vetor vazio. As respostas imunes, induzidas por cada construção, foram analisadas em termos de resposta celular (através de ensaios de ELISPOT) e humoral (através de ensaios de neutralização viral - PRNT).

Os resultados foram considerados bastante promissores uma vez que as duas construções são capazes de induzir resposta de célula T contra os mesmos epítomos induzidos pela vacina de vírus atenuado convencional, sendo que ainda com maior magnitude, em ambas as espécies. A construção pL/YFE foi ainda capaz de induzir anticorpos neutralizantes numa concentração considerada satisfatória, após o terceiro pulso de imunização. Os vetores p/YFE e pL/YFE foram então preparados em larga escala, livre de endotoxinas, e inoculados 3 vezes (50ug/imunização) em camundongos Balb/c e C57. A vacina 17DD foi utilizada como controle positivo e tanto o vetor vazio, como solução salina (PBS), foram utilizados como controles negativos. Duas semanas após a última imunização, os animais foram desafiados contra VFA pelo inóculo de 10^5 PFU da vacina 17DD (via intracerebral). Tanto a vacina 17DD, como as vacinas de DNA p/YFE e pL/YFE, conferiram 100% de proteção aos camundongos desafiados.

Diante destes promissores resultados com os vetores vacinais não otimizados, esperamos que as formulações otimizadas sejam ainda mais eficientes, haja vista que em estudos onde houve a otimização de códons, a expressão proteica do gene de interesse foi melhorada de forma significativa. Desse modo, as construções otimizadas mesmas serão utilizadas para imunizar macacos em 2011.

6 CONCLUSÃO

A otimização de genes para a expressão de antígenos vacinais, assim como o direcionamento de sua apresentação antigênica para a via MHC II, pode revolucionar as estratégias de vacina de DNA que vem sendo desenvolvidas no Brasil e no mundo. Esperamos melhorar significativamente os níveis de expressão de antígenos codificados pela vacina de DNA contra a Febre Amarela, assim como aumentar a sua capacidade de induzir uma resposta imune adequada com formação de células de memória. A otimização de genes deverá ainda servir de subsídio não só para o desenvolvimento de vacinas, como também para o desenvolvimento de kits de diagnósticos mais eficientes. Finalmente o protótipo vacinal, aqui proposto, deverá servir de modelo para a elaboração de vacinas genéticas contra outros flavivírus de importância médica como os vírus causadores da Encefalite Japonesa, Febre do Oeste do Nilo e Dengue.

A vacinação utilizando seqüências codificantes de antígenos virais, ao invés de vacinas baseadas em vírus atenuados, é ainda potencialmente muito mais segura com relação a processos alérgicos e sintomatológicos. O desenvolvimento industrial para a produção de uma vacina de DNA contra FA pode ainda reduzir bastante o custo e aumentar a capacidade de produção vacinal, além de facilitar bastante a distribuição da amostra, pois este tipo de vacina pode ser melhor dosada, manipulada e armazenada na temperatura ambiente. O aumento da segurança e da capacidade de produção, acompanhado da redução de preço, pode contribuir significativamente para a promoção de campanhas em massa de vacinação principalmente nas regiões com os maiores índices de infecção como a África.

A vacina de DNA contra a Febre Amarela apresenta também a vantagem de poder ser administrada para infantes, mulheres grávidas, imunodeprimidos, e alérgicos a componentes do ovo, cuja administração da vacina 17DD não é recomendada. Considerando todos estes fatores nós acreditamos que o desenvolvimento da vacina de DNA contra a Febre Amarela é de extrema relevância, cientificamente e tecnologicamente, pois esta formulação pode complementar e até substituir a vacina convencional de vírus atenuado.

REFERÊNCIAS

- ABDULHAQQ, S. A.; WEINER, D. B. DNA vaccines: developing new strategies to enhance immune responses. Immunologic Research, Basel, v. 42, n. 1/3, p. 219-232, 2008.
- ADANG, M. J. et al. The reconstruction and expression of a *Bacillus thuringiensis* cryIII_A gene in protoplasts and potato plants. Plant Molecular Biology, Dordrecht, v. 21, n.6, p. 1131-1145, Mar. 1993.
- ANWAR, A. et al. West Nile pre-membrane-envelope genetic vaccine encoded as a chimera containing the transmembrane and cytoplasmic domains of a lysosome-associated membrane protein: increased cellular concentration of the transgene product, targeting to the MHC II compartment, and enhanced neutralizing antibody response. Virology, New York, v.332, n.1, p. 66-77, Feb. 2005.
- AUEWARAKUL, P. Composition bias and genome polarity of RNA viruses. Virus Research, Amsterdam, v. 109, n.1, p. 33-37, Apr. 2005.
- BARNETT, E. D. Yellow fever: epidemiology and prevention. Clinical Infectious Disease, Boston, v. 44, n. 6, p. 850-856, Mar. 2007.
- BARRETT, A. D.; HIGGS, S. Yellow fever: a disease that has yet to be conquered. Annual Review of Entomology, Palo Alto, v. 52, p. 209-229, 2007.
- BARRETT, A. D. ; TEUWEN D. E. Yellow fever vaccine - how does it work and why do rare cases of serious adverse events take place? Current Opinion in Immunology, London, v. 21, n. 3, p. 308-313, Jun. 2009.
- BATEMAN, J. M.; PURTON, S. Tools for chloroplast transformation in *Chlamydomonas*: expression vectors and a new dominant selectable marker. Molecular and General Genetics, Berlin, v. 263, n. 3, p. 404-410, Apr. 2000.
- BRASIL, Ministério da Saúde. Boletim Eletrônico Epidemiológico, Brasília, n.2, Abril, p.2-6. 2010. Disponível em:
<http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/boletim_eletronico_02_ano10.pdf>. Acesso em: 30 nov. 2010.(os dados autor/título/se não tiver autor, posso colocar: título. revista
- BRYANT, J. E.; HOLMES, E. C.; BARRETT, A. D. Out of Africa: a molecular perspective on the introduction of yellow fever virus into the Americas. PLoS Pathogens, San Francisco v. 3, n. 5, p.e75, May. 2007.

BURGESS-BROWN, N. A. et al. Codon optimization can improve expression of human genes in *Escherichia coli*: A multi-gene study. Protein Expression and Purification, San Diego, v. 59, n. 1, p.94-102, May. 2008.

CARNERO, E. et al. Optimization of human immunodeficiency virus gag expression by newcastle disease virus vectors for the induction of potent immune responses. Journal of Virology, Baltimore, v. 83, n. 2, p. 584-597, 2009.

CHAMBERS, T. J. et al. Flavivirus genome organization, expression, and replication. Annual Review of Microbiology, Palo Alto, v. 44, p. 649-688, 1990.

CHEN, Y. et al. Dengue virus infectivity depends on envelope protein binding to target cell heparan sulfate. Nature Medicine, New York, v. 3, n. 8, p.866-871, Aug. 1997.

CHIKHLIKAR, P. et al. Inverted terminal repeat sequences of adeno-associated virus enhance the antibody and CD8(+) responses to a HIV-1 p55Gag/LAMP DNA vaccine chimera. Virology, New York, v. 323, n. 2, p. 220-232, Jun. 2004.

COBAN, C. et al. Molecular and cellular mechanisms of DNA vaccines. Human Vaccine, Georgetown, v. 4, n. 6, p. 453-456, Nov./Dec. 2008.

DALLMANN, H. G.; DUNN, S. D. Translation through an uncDC mRNA secondary structure governs the level of uncC expression in *Escherichia coli*. Journal of Bacteriology, Washington, v. 176, n. 5, p. 1242-1250, Mar. 1994.

DEL TITO, B. J. et al. Effects of a minor isoleucyl tRNA on heterologous protein translation in *Escherichia coli*. Journal of Bacteriology, Washington, v. 177, n. 24, p. 7086-7091, Dec. 1995.

DHALIA, R. et al. Membrane and envelope virus proteins co-expressed as lysosome associated membrane protein (LAMP) fused antigens: a potential tool to develop DNA vaccines against flaviviruses. Anais da Academia Brasileira de Ciências, Rio de Janeiro, v. 81, n. 4, p. 663-669, Dec. 2009.

DONG, H.; NILSSON, L.; KURLAND, C. G. Co-variation of tRNA abundance and codon usage in *Escherichia coli* at different growth rates. Journal of Molecular Biology, London, v. 260, n. 5, p. 649-663, Aug. 1996.

DONNELLY, J.; BERRY, K.; ULMER, J. B. Technical and regulatory hurdles for DNA vaccines. International Journal for Parasitology, Oxford, v. 33, n. 5/6, p. 457-467, May. 2003

DRAKE, J. R. et al. Involvement of MIIC-like late endosomes in B cell receptor-mediated antigen processing in murine B cells. Journal of Immunology, Baltimore, v. 162, n. 2, p. 1150-1155, Jan. 1999.

DURET, L. tRNA gene number and codon usage in the *C. elegans* genome are co-adapted for optimal translation of highly expressed genes. Trends in Genetics, Amsterdam, v. 16, n. 7, p. 287-289, Jul. 2000.

ENGEL, A. R. et al. Characterization of a viscerotropic yellow fever vaccine variant from a patient in Brazil. Vaccine, Guildford, v. 24, n. 15, p. 2803-2809, Apr. 2006.

FUHRMANN, M.; OERTEL, W.; HEGEMANN, P. A synthetic gene coding for the green fluorescent protein (GFP) is a versatile reporter in *Chlamydomonas reinhardtii*. The Plant Journal, London, v. 19, n. 3, p. 2803-2809, Aug. 1999.

GALTIER, N. et al. GC-content evolution in mammalian genomes: the biased gene conversion hypothesis. Genetics, Austin, v. 159, n. 2, p. 907-911, Oct. 2001.

GARDNER, C. L.; RYMAN, K. D. Yellow fever: a reemerging threat. Clinics in Laboratory Medicine, Philadelphia, v. 30, n. 1, p. 237-260, Mar. 2010.

GOLDMAN, E. et al. Consecutive low-usage leucine codons block translation only when near the 5' end of a message in *Escherichia coli*. Journal of Molecular Biology, London, v. 245, n. 5, p. 467-473, Feb. 1995.

GOULD, E. A.; SOLOMON, T. Pathogenic flaviviruses. The Lancet, London, v. 371, n. 9611, p. 500-509, Feb. 2008.

GUARNIERI, F. G. et al. The motif Tyr-X-X-hydrophobic residue mediates lysosomal membrane targeting of lysosome-associated membrane protein 1. Journal of Biological Chemistry, Baltimore v. 268, n. 3, p. 1941-1946, Jan. 1993.

GUBLER, D. J. The changing epidemiology of yellow fever and dengue, 1900 to 2003: full circle? Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases, New York, v. 27, n. 5, p. 319-330, Sep. 2004.

GURVICH, O. L. et al. Expression levels influence ribosomal frameshifting at the tandem rare arginine codons AGG_AGG and AGA_AGA in *Escherichia coli*. Journal of Bacteriology, Washington v. 187, n. 12, p. 4023-4032, Jun. 2005.

HAAS, J.; PARK, E. C.; SEED, B. Codon usage limitation in the expression of HIV-1 envelope glycoprotein. Current Biology, London, v. 6, n. 3, p. 315-324, Mar. 1996.

HEINZ, F. X.; ALLISON, S. L. The machinery for flavivirus fusion with host cell membranes. Current Opinion in Microbiology, New York, v. 4, n. 4, p. 450-455, Aug. 2001.

IKEMURA, T. Correlation between the abundance of Escherichia coli transfer RNAs and the occurrence of the respective codons in its protein genes: a proposal for a synonymous codon choice that is optimal for the E. coli translational system. Journal of Molecular Biology, London, v. 151, n. 3, p. 389-409, Sep. 1981.

KANAYA, S. et al. Studies of codon usage and tRNA genes of 18 unicellular organisms and quantification of Bacillus subtilis tRNAs: gene expression level and species-specific diversity of codon usage based on multivariate analysis. Gene, Amsterdam, v. 238, n. 1, p. 143-155. Sep. 1999.

KANE, J. F. Effects of rare codon clusters on high-level expression of heterologous proteins in Escherichia coli. Current Opinion in Biotechnology, London, v. 6, n. 5, p. 494-500, Oct. 1995.

KANELLOS, T. et al. The safety and longevity of DNA vaccines for fish. Immunology, Oxford, v. 96, n. 2, p. 307-313, Feb. 1999.

KIM, C. H.; OH, Y.; LEE, T. H. Codon optimization for high-level expression of human erythropoietin (EPO) in mammalian cells. Gene, Amsterdam, v. 199, n. 1/2, p. 293-301, Oct. 1997.

KLEIJMEER, M. J. et al. Major histocompatibility complex class II compartments in human and mouse B lymphoblasts represent conventional endocytic compartments. The Journal of Cell Biology, New York, v. 139, n. 3, p. 639-649, Nov. 1997.

KOMAR, A. A. et al. Enhanced expression of the yeast Ure2 protein in Escherichia coli: the effect of synonymous codon substitutions at a selected place in the gene. Biological Chemistry, Berlin, v. 379, n. 10, p. 1295-1300, Oct. 1998.

KONISHI, E.; TERAZAWA, A.; IMOTO, J. Simultaneous immunization with DNA and protein vaccines against Japanese encephalitis or dengue synergistically increases their own abilities to induce neutralizing antibody in mice. Vaccine, Guildford, v. 21, n. 17/18, p. 1826-1832, May. 2003.

KONISHI, E. et al. Induction of protective immunity against Japanese encephalitis in mice by immunization with a plasmid encoding Japanese encephalitis virus premembrane and envelope genes. Journal of Virology, Baltimore, v. 72, n. 6, p.4925-4930, Jun. 1998.

_____. Japanese encephalitis DNA vaccine candidates expressing premembrane and envelope genes induce virus-specific memory B cells and long-lasting antibodies in swine. Virology, New York, v. 268, n. 1, p. 49-55, Mar. 2000.

KOTSOPOULOU, E. et al. A Rev-independent human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-based vector that exploits a codon-optimized HIV-1 gag-pol gene. Journal of Virology, Baltimore, v. 74, n. 10, p. 4839-4852, May. 2000.

LEE, N. et al. Modification of mRNA secondary structure and alteration of the expression of human interferon alpha 1 in Escherichia coli. Gene, Amsterdam, v. 58, n. 1, p. 77-86, Jan. 1987.

LI, L. et al. The flavivirus precursor membrane-envelope protein complex: structure and maturation. Science, Washington, v. 319, n. 5871, p. 1830-1834, Mar. 2008.

LINDENBACH, B. D.; RICE, C. M. Flaviviridae: the viruses and their replication. In: KNIPE, D. M; HOWLEY, P. M. Fields Virology. 4. ed . Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, p. 991-1041. 2001.

LINDSEY, N. P. et al. Adverse event reports following yellow fever vaccination. Vaccine, Guildford, v. 26, n. 48, p. 6077-6082, Nov. 2008.

LU, Y. et al. Dengue 2 PreM-E/LAMP chimera targeted to the MHC class II compartment elicits long-lasting neutralizing antibodies. Vaccine, Guildford, v. 21, n. 17/18, p. 2178-2189, May. 2003.

MAJOROS, W. H. et al. GlimmerM, Exonomy and Unveil: three ab initio eukaryotic genefinders. Nucleic Acids Research, London, v. 31, n. 13, p. 3601-3604, Jul. 2003.

MARTIN, M. et al. Fever and multisystem organ failure associated with 17D-204 yellow fever vaccination: a report of four cases. The Lancet, London, v. 358, n. 9276, p. 98-104, Jul. 2001.

MARTIN, T. et al. Plasmid DNA malaria vaccine: the potential for genomic integration after intramuscular injection. Hum Gene Therapy, New York, v. 10, n. 5, p. 759-768, Mar. 1999

MONATH, T. P. Yellow fever: an update. The Lancet Infectious Diseases, New York, v. 1, n. 1, p. 11-20, Aug. 2001.

_____. Yellow fever vaccine. Expert Review of Vaccines, London, v. 4, n. 4, p. 553-574, Aug. 2005.

_____. Treatment of yellow fever. Antiviral Research, Amsterdam, v. 78, n. 1, p. 116-124, Apr. 2008.

MONATH, T. P.; GIESBERG, J. A.; FIERROS, E. G. Does restricted distribution limit access and coverage of yellow fever vaccine in the United States? Emerging Infectious Disease, Atlanta, v. 4, n. 4, p. 698-702, Oct./Dec. 1998.

MUTEBI, J. P. et al. Phylogenetic and evolutionary relationships among yellow fever virus isolates in Africa. Journal of Virology, Baltimore, v. 75, n. 15, p. 6999-7008, Aug. 2001.

NAVARRE, W. W. et al. Selective silencing of foreign DNA with low GC content by the H-NS protein in Salmonella. Science, Washington, v. 313, n. 5784, p. 236-238, Jul. 2006.

NICHOLS, W. W. et al. Potential DNA vaccine integration into host cell genome. Annals of New York Academy of Sciences, New York, v. 772, p. 30-39, Nov. 1995.

OBERMULLER, S. et al. The tyrosine motifs of Lamp 1 and LAP determine their direct and indirect targeting to lysosomes. Journal of Cell Science, Cambridge, v. 115, n. Pt 1, p. 185-194, Jan. 2002.

OXENDER, D. L.; ZURAWSKI, G.; YANOFSKY, C. Attenuation in the Escherichia coli tryptophan operon: role of RNA secondary structure involving the tryptophan codon region. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, Washington, v. 76, n. 11, p. 5524-5528, Nov. 1979.

PUGACHEV, K. V. et al. Traditional and novel approaches to flavivirus vaccines. Int J Parasitol, v. 33, n. 5/6, p. 567-582, May. 2003.

PULENDRAN, B. Learning immunology from the yellow fever vaccine: innate immunity to systems vaccinology. Nature Review Immunology, London, v. 9, n. 10, p. 741-747, Oct. 2009.

RAVIPRAKASH, K. et al. Synergistic neutralizing antibody response to a dengue virus type 2 DNA vaccine by incorporation of lysosome-associated membrane protein sequences and use of plasmid expressing GM-CSF. Virology, New York, v. 290, n. 1, p. 74-82, Nov. 2001.

ROHRER, J. et al. The targeting of Lamp1 to lysosomes is dependent on the spacing of its cytoplasmic tail tyrosine sorting motif relative to the membrane. The Journal of Cell Biology, New York, v. 132, n. 4, p. 565-576, Feb. 1996.

ROUWENDAL, G. J. et al. Enhanced expression in tobacco of the gene encoding green fluorescent protein by modification of its codon usage. Plant Molecular Biology, Dordrecht, v. 33, n. 6, p. 989-999, Apr. 1997.

ROWELL, J. F. et al. Lysosome-associated membrane protein-1-mediated targeting of the HIV-1 envelope protein to an endosomal/lysosomal compartment enhances its presentation to MHC class II-restricted T cells. Journal of Immunology, Baltimore, v. 155, n. 4, p. 1818-1828, Aug. 1995.

RUFF, A. L. et al. The enhanced immune response to the HIV gp160/LAMP chimeric gene product targeted to the lysosome membrane protein trafficking pathway. Journal of Biological Chemistry, Baltimore, v. 272, n. 13, p. 8671-8678, Mar. 1997.

RUIZ-LINARES, A. et al. Processing of yellow fever virus polyprotein: role of cellular proteases in maturation of the structural proteins. Journal of Virology, Baltimore, v. 63, n. 10, p. 4199-4209, Oct. 1989.

SALZBERG, S. L. et al. Interpolated Markov models for eukaryotic gene finding. Genomics, San Diego, v. 59, n. 1, p. 24-31, Jul. 1999.

SEMON, M.; MOUCHIROUD, D.; DURET, L. Relationship between gene expression and GC-content in mammals: statistical significance and biological relevance. Human Molecular Genetics, Harlow, v. 14, n. 3, p. 421-427, Feb. 2005.

SHEDLOCK, D. J.; WEINER D. B. DNA vaccination: antigen presentation and the induction of immunity. Journal of Leukocyte Biology, Bethesda, v. 68, n. 6, p. 793-806, Dec. 2000.

SHINODA, K. et al. Engineering the vaccinia virus L1 protein for increased neutralizing antibody response after DNA immunization. Virology Journal, London, v. 6, p. 1-8, Mar. 2009.

SLIMKO, E. M.; LESTER, H. A. Codon optimization of *Caenorhabditis elegans* GluCl ion channel genes for mammalian cells dramatically improves expression levels. Journal of Neuroscience Methods, Amsterdam v. 124, n. 1, p. 75-81, Mar. 2003.

STAPLES, J. E.; MONATH, T. P. Yellow fever: 100 years of discovery. The Journal of American Medical Association, Chicago, v. 300, n. 8, p. 960-962, Aug. 2008.

STIASNY, K.; HEINZ, F. X. Flavivirus membrane fusion. Journal of General Virology, London, v. 87, n. Pt 10, p. 2755-2766, Oct. 2006.

TOLLE, M. A. Mosquito-borne diseases. Current Problems in Pediatric and Adolescent Health Care, St. Louis, v. 39, n. 4, p. 97-140, Apr. 2009.

TURLEY, S. J. et al. Transport of peptide-MHC class II complexes in developing dendritic cells. Science, Washington, v. 288, n. 5465, p. 522-5227, Apr. 2000.

ULMER, J. B.; VALLEY, U.; RAPPUOLI, R.; Vaccine manufacturing: challenges and solutions. Nature Biotechnology, New York, v. 24, n. 11, p. 1377-1383, Nov. 2006.

VASCONCELOS, P. F. [Yellow Fever]. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Rio de Janeiro, v. 36, n. 2, p. 275-293, Mar./Apr. 2003.

VASCONCELOS, P. F. et al. Serious adverse events associated with yellow fever 17DD vaccine in Brazil: a report of two cases. The Lancet, London, v. 358, n. 9276, p. 91-97, Jul. 2001.

VERVOORT, E. B. et al. Optimizing heterologous expression in dictyostelium: importance of 5' codon adaptation. Nucleic Acids Research, London, v. 28, n. 10, p. 2069-2074, May. 2000.

VINOGRADOV, A. E. Noncoding DNA, isochores and gene expression: nucleosome formation potential. Nucleic Acids Research, London, v. 33, n. 2, p. 559-563, Jan. 2005.

VIANA, I. F.T. Produção de anticorpos policlonais para a avaliação da eficiência de expressão de vacinas de DNA desenvolvidas contra o vírus da Febre Amarela. 2009. Monografia (Graduação em Biomedicina) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2009.

WEISS, R. B. Ribosomal frameshifting, jumping and readthrough. Current Opinion in Cell Biology, Philadelphia, v. 3, n. 6, p. 1051-1055, Dec. 1991

WU, R. et al. Thermostabilization of live virus vaccines by heavy water (D₂O). Vaccine, Guildford, v. 13, n. 12, p. 1058-1063, Aug. 1995.

ZHOU, J. et al. Papillomavirus capsid protein expression level depends on the match between codon usage and tRNA availability. Journal of Virology, Baltimore, v. 73, n. 6, p. 4972-4982, Jun. 1999.

ANEXO A - OPTIMIZATION REPORT

Optimization report



Optimization report Created with Leto 1.0

1 General Information:

Gene: YF_Cap_pM/M_Env
 Optimization requested by: With restriction sites included
 Date: Sep 26, 2007
 Operator: Dhalia
 Target organism: Homo sapiens_Cut_off_50%
 Optimization iteration: 1
 Length: 1985 bp

1.1 Sequence

Below the original sequence and optimized sequence are listed, labelled with 'Org:' and 'Opt:' respectively. Where both are identical, the original sequence contains dots instead of nucleotides ('.'). Where the original sequence was locked against editing, it contains underscores ('_'). The names of the restriction enzymes start at the first nucleotide after the restriction cut in the forward strand.

```

      5     10     15     20     25     30     35     40     45     50
ORF:                M  S  R  L  E  G  G  L  S  S  R
Org:  _____  ... ..A T.. TC. TCA ..G
Opt:  GTCGA CGCTA GCAAG AA ATG TCT AGA CTC GAG GGA GGG CTG AGC AGC AGA
      Sali  NheI                XbaI  XhoI

      55     60     65     70     75     80     85     90     95
ORF:  K  R  R  S  H  D  V  L  T  V  Q  F  L  I  L  G
Org:  ... ..C ..T TC. ... ..T ... ..A ..C ..A ..T T.G ..A
Opt:  AAA CGA CGG AGC CAT GAT GTG CTG ACT GTG CAG TTT CTG ATC CTT GGG

     100     105     110     115     120     125     130     135     140     145
ORF:  M  L  L  M  T  G  G  V  T  L  V  R  K  N  R  W
Org:  ... .. T.. ... ..T ..A ... ..C T.G ... C.. ..A ..C ..A ...
Opt:  ATG CTG CTG ATG ACG GGA GGC GTG ACA CTT GTG AGG AAG AAT AGG TGG
  
```

150 155 160 165 170 175 180 185 190
 ORF: L L L N V T S E D L G K T F S V
 Org: T.. ..C ..AA ..TCA ..C TCT ...
 Opt: CTG CTG CTC AAT GTG ACT TCC GAG GAC CTG GGG AAA ACC TTT AGC GTG

195 200 205 210 215 220 225 230 235 240
 ORF: G T G N C T T N I L E A K Y W C
 Org: ..C ..A ..CC ..AT T.GCG ..G ..G
 Opt: GGA ACG GGT AAC TGT ACC ACA AAC ATA CTC GAA GCT AAG TAC TGG TGC

ScaI

245 250 255 260 265 270 275 280 285 290
 ORF: P D S M E Y N C P N L S P R E E
 Org:CACC ..T ..C ..TA ..G ..G
 Opt: CCA GAT TCA ATG GAG TAC AAT TGT CCA AAC CTG AGC CCG AGG GAA GAA

MfeI

295 300 305 310 315 320 325 330 335
 ORF: P D D I D C W C Y G V E N V R V
 Org: ..AT ..TT ..G ..GTC
 Opt: CCT GAT GAC ATA GAC TGC TGG TGC TAC GGA GTC GAA AAC GTC AGA GTG

340 345 350 355 360 365 370 375 380 385
 ORF: A Y G K C D S A G R S R R S R R
 Org: ..A ..TT ... TCAC A.G TCT A.G A.. TCA ..A ..G
 Opt: GCT TAC GGT AAG TGC GAC AGC GCA GGA CGC AGC CGT CGG AGT AGG AGA

390 395 400 405 410 415 420 425 430
 ORF: A I D L P T H E N H G L K T R Q
 Org: ..C ..T ... T.. ..T ..G ..T ..AT ..TG ..CA
 Opt: GCT ATA GAC CTG CCG ACA CAC GAG AAC CAC GGC TTG AAA ACA CGG CAG

BssSI

435 440 445 450 455 460 465 470 475 480
 ORF: E K W M T G R M G E R Q L Q K I
 Org: ..A ..AT ..A ..AT ..A ..GCT
 Opt: GAG AAG TGG ATG ACA GGC AGG ATG GGA GAG AGA CAA CTG CAA AAG ATC

485 490 495 500 505 510 515 520 525 530
 ORF: E R W F V R N P F F A V T A L T
 Org: ... A.AG A.. ..CT ..TG ..A ..TC
 Opt: GAG CGG TGG TTC GTT CGG AAT CCC TTC TTC GCA GTT ACG GCG CTG ACT

BsrBI

535 540 545 550 555 560 565 570 575
 ORF: I A Y L V G S N M T Q R V V I A
 Org: ..TC C.TA AG.G ..A C.. ..CT ...
 Opt: ATA GCC TAT TTG GTG GGC TCC AAC ATG ACT CAG AGA GTG GTG ATA GCC

580 585 590 595 600 605 610 615 620 625
 ORF: L L V L A V G P A Y S A H C I G
 Org: ..AC T.. ..T ..T ..T ..GC TCA ..TT ..A
 Opt: CTT CTG GTT CTG GCC GTG GGG CCC GCC TAT AGC GCC CAC TGC ATC GGG

PspOMI

ApaI

630 635 640 645 650 655 660 665 670
 ORF: I T D R D F I E G V H G G T W V
 Org:TG ..GTA ..TT
 Opt: ATT ACC GAC AGG GAT TTC ATT GAA GGC GTG CAC GGA GGC ACC TGG GTG

ApaLI

675 680 685 690 695 700 705 710 715 720
 ORF: S A T L E Q D K C V T V M A P D
 Org: ..A ..T ..C ..G ..G ..A ..CT ..C ..TC ..T ...
 Opt: TCT GCC ACA CTC GAA CAG GAT AAG TGC GTG ACA GTT ATG GCA CCC GAC

725 730 735 740 745 750 755 760 765 770
 ORF: K P S L D I S L E T V A I D R P
 Org: ..G ... TCA T.G ..C ... TCA C.A ..G ..A ..A ..C ..T ..T A.A ...
 Opt: AAA CCT AGC CTT GAT ATC AGT TTG GAA ACC GTC GCG ATA GAC CGT CCT

EcoRV

NruI

775 780 785 790 795 800 805 810 815
 ORF: A E A R K V C Y N A V L T H V K
 Org: ..TGTT ..A ..T ..C ..T ..T
 Opt: GCC GAG GCC AGG AAA GTG TGC TAC AAC GCT GTG CTG ACG CAC GTG AAG

PmlI

820 825 830 835 840 845 850 855 860 865
 ORF: I N D K C P S T G E A H L A E E
 Org: ..T ..T ..CC ... AGC ..T ..A ..G ..CA ..T ..A ...
 Opt: ATC AAC GAT AAG TGT CCC TCT ACA GGC GAA GCG CAC CTG GCA GAG GAG

870 875 880 885 890 895 900 905 910
 ORF: N E G D N A C K R T Y S D R G W
 Org:AT ..GT TCT ..T ..A ..C ...
 Opt: AAC GAG GGG GAC AAC GCC TGC AAG CGC ACT TAC AGC GAC AGG GGT TGG

915 920 925 930 935 940 945 950 955 960
 ORF: G N G C G L F G K G S I V A C A
 Org: ..C ..TAGG AG. ...T ..G ..A ..C ..C
 Opt: GGA AAC GGC TGT GGC CTG TTT GGC AAA GGT TCC ATC GTT GCT TGT GCT

965 970 975 980 985 990 995 1000 1005 1010
 ORF: K F T C A K S M S L F E V D Q T
 Org: ..ATAG AGT T.G ..TTC
 Opt: AAG TTC ACC TGT GCC AAA TCC ATG TCA CTT TTC GAG GTG GAT CAG ACT

1015 1020 1025 1030 1035 1040 1045 1050 1055
 ORF: K I Q Y V I R A Q L H V G A K Q
 Org: ..AG ..T ..C ..C A..A T.. ..T ..A ..G ..C ..G ..G
 Opt: AAG ATT CAA TAC GTG ATT CGA GCA CAG CTG CAC GTG GGA GCG AAA CAA

PvuII PmlI

1060 1065 1070 1075 1080 1085 1090 1095 1100 1105
 ORF: E N W N T S I K T L K F D A L S
 Org: ..A ..TA AGC ..TCT ..T ..C ... TCA
 Opt: GAG AAC TGG AAT ACC TCA ATC AAG ACT CTG AAG TTC GAC GCA CTG AGT

1110 1115 1120 1125 1130 1135 1140 1145 1150
 ORF: G S Q E V E F I G Y G K A T L E
 Org: ..C TC.AC ..T ..G ..T ..AT ..AA
 Opt: GGT AGC CAG GAA GTC GAG TTT ATC GGC TAC GGG AAA GCA ACC CTG GAG

1155 1160 1165 1170 1175 1180 1185 1190 1195 1200
 ORF: C Q V Q T A V D F G N S Y I A E
 Org: ..CA ..T ..GT ..C ..TT ...
 Opt: TGT CAG GTG CAG ACA GCA GTG GAC TTT GGG AAT AGC TAC ATA GCA GAG

1205 1210 1215 1220 1225 1230 1235 1240 1245 1250
 ORF: M E T E S W I V D R Q W A Q D L
 Org:G AG.AA.ACC T..
 Opt: ATG GAA ACA GAA TCC TGG ATC GTG GAC CGT CAG TGG GCT CAG GAT CTG

1255 1260 1265 1270 1275 1280 1285 1290 1295
 ORF: T L P W Q S G S G G V W R E M H
 Org:G ..AGG AGTGCC
 Opt: ACC CTT CCT TGG CAA AGT GGA TCA GGC GGT GTG TGG AGA GAG ATG CAT

NsiI

BfrBI

```

1300 1305 1310 1315 1320 1325 1330 1335 1340 1345
ORF: H L V E F E P P H A A T I R V L
Org: ..T C.T ..C ... ..A ..T ... ..T ..C ..C ..T ..C A.A ..A ...
Opt: CAC TTG GTT GAA TTT GAG CCA CCG CAC GCT GCT ACC ATT CGG GTC CTG

```

```

1350 1355 1360 1365 1370 1375 1380 1385 1390
ORF: A L G N Q E G S L K T A L T G A
Org: ... C.. ..A ..C ... ..A ... TCC T.. ... ..A ..T ..T ..T ..C ..A
Opt: GCC TTG GGC AAT CAG GAG GGC AGT CTG AAA ACT GCC CTG ACC GGA GCC

```

```

1395 1400 1405 1410 1415 1420 1425 1430 1435 1440
ORF: M R V T K D T N D N N L Y K L H
Org: ... A.. ..T ... ..G ..C ..A ..T ... ..T ... ..A ..T
Opt: ATG CGG GTG ACA AAA GAT ACG AAC GAC AAC AAC CTC TAC AAA CTG CAC

```

```

1445 1450 1455 1460 1465 1470 1475 1480 1485 1490
ORF: G G H V S C R V K L S A L T L K
Org: ..T ... ..T ..T TCT ... ..T ..C ..A ... ..T T.. ..A C.C ...
Opt: GGC GGA CAC GTC AGC TGC AGA GTG AAA CTG TCA GCA CTG ACC TTG AAG

```

PvuII

PstI

```

1495 1500 1505 1510 1515 1520 1525 1530 1535
ORF: G T S Y K I C T D K M F F V K N
Org: ... ..A TC. ... ..A ..A ... ..T ..C ..A ... ..T ..T ..C ... ..C
Opt: GGG ACT AGC TAC AAG ATT TGC ACA GAT AAG ATG TTC TTC GTG AAG AAT

```

```

1540 1545 1550 1555 1560 1565 1570 1575 1580 1585
ORF: P T D T G H G T V V M Q V K V P
Org: ..A ... ..C ... ..C ..T ... ..T ... ..G ... ..A ..G ...
Opt: CCC ACT GAT ACT GGG CAC GGC ACT GTG GTG ATG CAA GTG AAG GTC CCA

```

```

1590 1595 1600 1605 1610 1615 1620 1625 1630
ORF: K G A P C R I P V I V A D D L T
Org: ..A ... ..C ..C A.G ..T ..A ... ..A ..A ... ..T ... ..T ..A
Opt: AAG GGA GCC CCT TGT CGA ATC CCT GTG ATT GTG GCT GAC GAT CTG ACC

```

```

1635 1640 1645 1650 1655 1660 1665 1670 1675 1680
ORF: A A I N K G I L V T V N P I A S
Org: ..G ..A ... ..T ... ..C ..T T.. ... ..A ..T ..C ... ..C TCA
Opt: GCT GCT ATC AAC AAA GGA ATC CTG GTT ACC GTG AAT CCC ATC GCG AGT

```

NruI

1685 1690 1695 1700 1705 1710 1715 1720 1725 1730
 ORF: T N D D E V L I E V N P P F G D
 Org: ..C ..T ..T ..TGTCTA ...
 Opt: ACA AAC GAC GAC GAA GTC CTG ATC GAG GTG AAT CCA CCC TTT GGC GAC

1735 1740 1745 1750 1755 1760 1765 1770 1775
 ORF: S Y I I V G R G D S R L T Y Q W
 Org:T ..C ..T ..A ..AT TCA C.T ..C ..T ..C
 Opt: AGC TAC ATC ATT GTC GGG AGG GGA GAC AGC AGG CTG ACG TAT CAG TGG

1780 1785 1790 1795 1800 1805 1810 1815 1820 1825
 ORF: H K E G S S I G K L F T Q T M K
 Org:G ..A AG.A ..A ... T.. ..C ..TC
 Opt: CAC AAA GAA GGG TCC TCA ATC GGG AAG CTG TTT ACC CAG ACA ATG AAA

1830 1835 1840 1845 1850 1855 1860 1865 1870
 ORF: G V E R L A V M G D V A W D F S
 Org:A ..CCCCT ... AG.
 Opt: GGC GTG GAG CGA CTG GCC GTG ATG GGA GAC GTG GCC TGG GAC TTC TCC

1875 1880 1885 1890 1895 1900 1905 1910 1915 1920
 ORF: S A G G F F T S V G K G I H T V
 Org: TCC ..T ..A ..GC ..T ..G ..T ..G ..ATG ...
 Opt: AGT GCC GGC GGC TTC TTT ACC TCC GTG GGC AAG GGA ATC CAT ACC GTG

NgmIIV

NaeI

1925 1930 1935 1940 1945 1950 1955 1960 1965 1970
 ORF: F G S A F Q G L F G G L N E F !
 Org:TG ..AC ..C
 Opt: TTT GGC TCA GCC TTT CAG GGA CTG TTT GGT GGT TTG AAC GAA TTC TGA

EcoRI

1975 1980 1985
 Org: _____
 Opt: TAAGG TACCA AGCTT
 KpnI HindIII
 Acc65I

1.1.1 Restriction table

Enzyme	Recognition	Frequency	Positions
Acc65I	g'gtac_c	1	1973
ApaI	g_ggcc'c	1	596
ApaLI	g'tgca_c	1	653
BfrBI	atg'_cat	1	1292
BsrBI	ccg'_ctc	1	482
BssSI	c'acga_g	1	404
EcoRI	g'aatt_c	1	1961
EcoRV	gat'_atc	1	734
HindIII	a'agct_t	1	1979
KpnI	g_gtac'c	1	1973
MfeI	c'aatt_g	1	259
NaeI	gcc'_ggc	1	1877
NgoMIV	g'ccgg_c	1	1877
NheI	g'ctag_c	1	6
NruI	tcg'_cga	2	753, 1674
NsiI	a_tgca't	1	1292
PmlI	cac'_gtg	2	809, 1040
PspOMI	g'ggcc_c	1	596
PstI	c_tgca'g	1	1456
PvuII	cag'_ctg	2	1034, 1453
Sall	g'tcga_c	1	0
Scal	agt'_act	1	231
XbaI	t'ctag_a	1	20
XhoI	c'tcga_g	1	26

1.1.2 Enzymes that cut five or fewer times

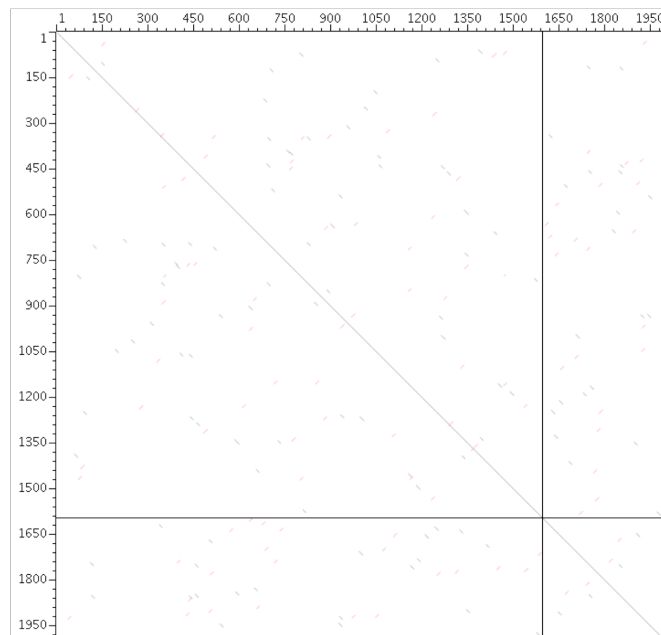
Enzyme	Recognition	Frequency	Positions
Acc65I	g'gtac_c	1	1973
ApaI	g_ggcc'c	1	596
ApaLI	g'tgca_c	1	653
BfrBI	atg'_cat	1	1292
BsrBI	ccg'_ctc	1	482
BssSI	c'acga_g	1	404
EcoRI	g'aatt_c	1	1961
EcoRV	gat'_atc	1	734
HindIII	a'agct_t	1	1979
KpnI	g_gtac'c	1	1973
MfeI	c'aatt_g	1	259
NaeI	gcc'_ggc	1	1877
NgoMIV	g'ccgg_c	1	1877
NheI	g'ctag_c	1	6
NruI	tcg'_cga	2	753, 1674
NsiI	a_tgca't	1	1292
PmlI	cac'_gtg	2	809, 1040
PspOMI	g'ggcc_c	1	596
PstI	c_tgca'g	1	1456
PvuII	cag'_ctg	2	1034, 1453
Sall	g'tcga_c	1	0

Scal	agt'_act	1	231
Xbal	t'ctag_a	1	20
XhoI	c'tcga_g	1	26

1.1.3 Enzymes that do not cut

AatII, AclI, AfeI, AfiII, AgeI, AscI, AseI, AsiSI, AvrII, BamHI, BbeI, BbvCI, BclI, BglII, BsiWI, BspEI, BspHI, BsrGI, BssHII, BstBI, BstZ17I, ClaI, DraI, EagI, FseI, FspI, HpaI, KasI, MluI, MscI, NarI, NcoI, NdeI, NotI, PacI, PciI, PmeI, PstI, PvuI, SacI, SacII, SbfI, SfoI, SmaI, SnaBI, SpeI, SphI, SrfI, SspI, StuI, SwaI, XmaI, ZraI

1.2 Dotplot



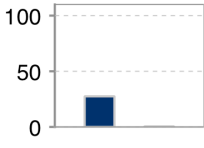
1.3 ORFs

The gene was optimized using the following ORF(s). Please note that sequence positions are given relative to the continuous DNA sequence defined by all ORFs:

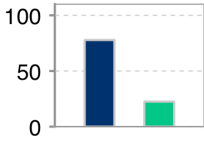
ORF: 18-1970

2.2.9 K - Lysine:

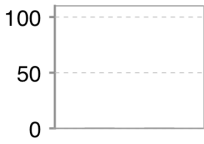
Codon	Original	Target	Optimized
AAA	56.8 %	43.0 %	43.2 %
AAG	43.2 %	57.0 %	56.8 %


2.2.10 L - Leucine:

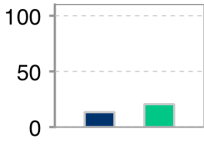
Codon	Original	Target	Optimized
UUA	0.0 %	0.0 %	0.0 %
UUG	35.8 %	12.0 %	13.2 %
CUU	9.4 %	13.0 %	11.3 %
CUC	17.0 %	19.0 %	9.4 %
CUA	15.1 %	0.0 %	0.0 %
CUG	22.6 %	56.0 %	66.0 %


2.2.11 M - Methionine:

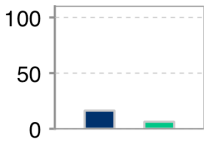
Codon	Original	Target	Optimized
AUG	100.0 %	100.0 %	100.0 %


2.2.12 N - Asparagine:

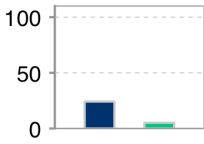
Codon	Original	Target	Optimized
AAU	39.3 %	46.0 %	35.7 %
AAC	60.7 %	54.0 %	64.3 %


2.2.13 P - Proline:

Codon	Original	Target	Optimized
CCU	28.6 %	28.0 %	28.6 %
CCC	23.8 %	32.0 %	33.3 %
CCA	33.3 %	27.0 %	23.8 %
CCG	14.3 %	13.0 %	14.3 %


2.2.14 Q - Glutamine:

Codon	Original	Target	Optimized
CAA	38.1 %	26.0 %	28.6 %
CAG	61.9 %	74.0 %	71.4 %



2.2.15 R - Arginine:

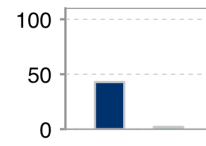
Codon	Original	Target	Optimized
CGU	5.9 %	8.0 %	8.8 %
CGC	8.8 %	18.0 %	5.9 %
CGA	2.9 %	10.0 %	11.8 %
CGG	5.9 %	20.0 %	20.6 %
AGA	44.1 %	21.0 %	23.5 %
AGG	32.4 %	23.0 %	29.4 %


2.2.16 S - Serine:

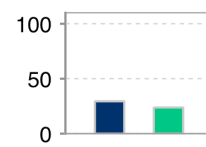
Codon	Original	Target	Optimized
UCU	17.1 %	18.0 %	7.3 %
UCC	17.1 %	21.0 %	19.5 %
UCA	31.7 %	15.0 %	17.1 %
UCG	2.4 %	0.0 %	0.0 %
AGU	12.2 %	14.0 %	17.1 %
AGC	19.5 %	32.0 %	39.0 %


2.2.17 T - Threonine:

Codon	Original	Target	Optimized
ACU	40.8 %	24.0 %	24.5 %
ACC	18.4 %	35.0 %	34.7 %
ACA	32.7 %	28.0 %	28.6 %
ACG	8.2 %	13.0 %	12.2 %


2.2.18 V - Valine:

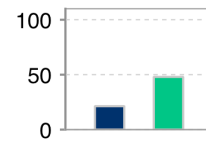
Codon	Original	Target	Optimized
GUU	25.5 %	18.0 %	12.7 %
GUC	18.2 %	23.0 %	16.4 %
GUA	7.3 %	0.0 %	0.0 %
GUG	49.1 %	59.0 %	70.9 %

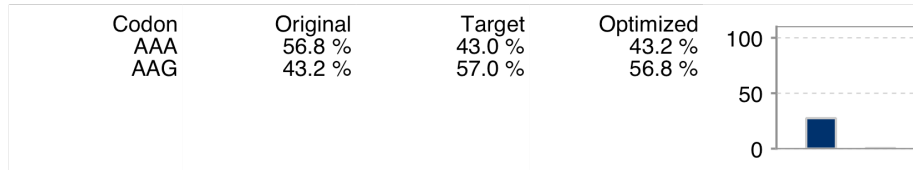
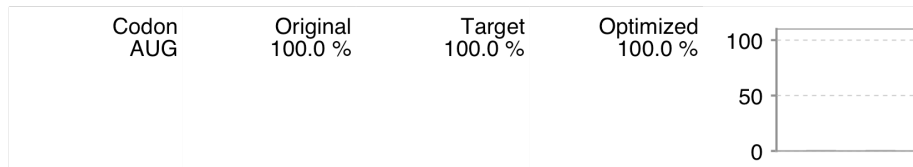
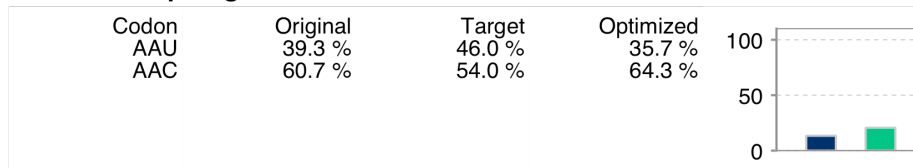
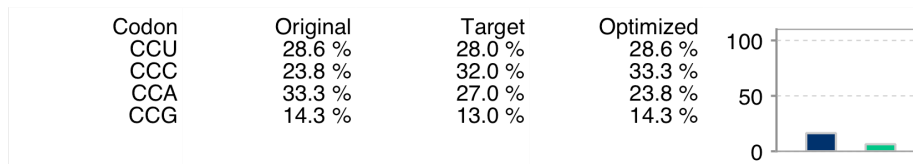
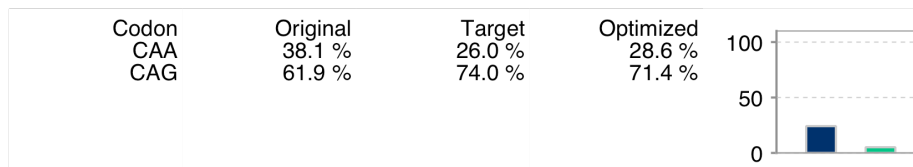

2.2.19 W - Tryptophan:

Codon	Original	Target	Optimized
UGG	100.0 %	100.0 %	100.0 %


2.2.20 Y - Tyrosine:

Codon	Original	Target	Optimized
UAU	33.3 %	44.0 %	20.0 %
UAC	66.7 %	56.0 %	80.0 %



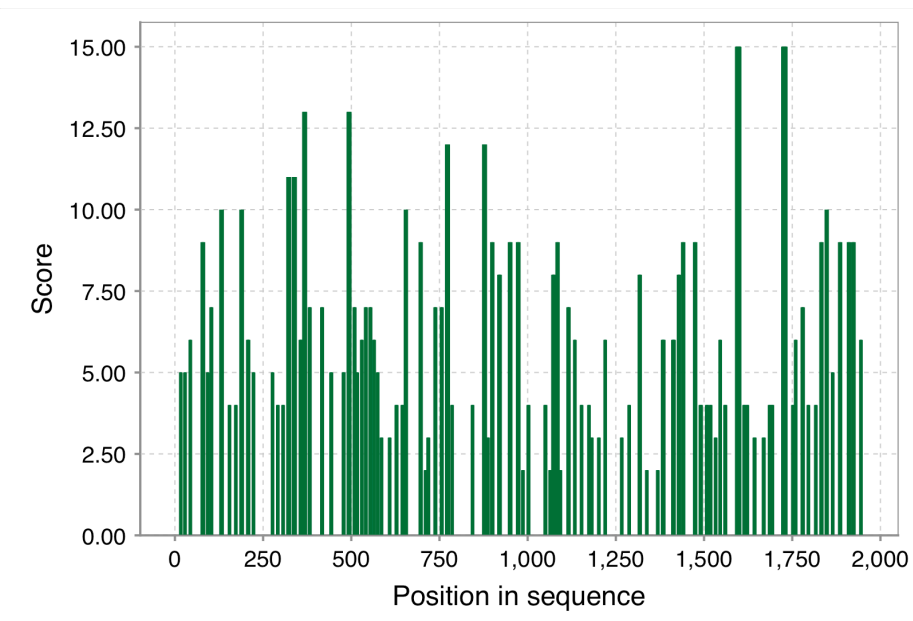
2.2.9 K - Lysine:**2.2.10 L - Leucine:****2.2.11 M - Methionine:****2.2.12 N - Asparagine:****2.2.13 P - Proline:****2.2.14 Q - Glutamine:**

2.2.21 ! - Stop:**2.3 Secondary structure**

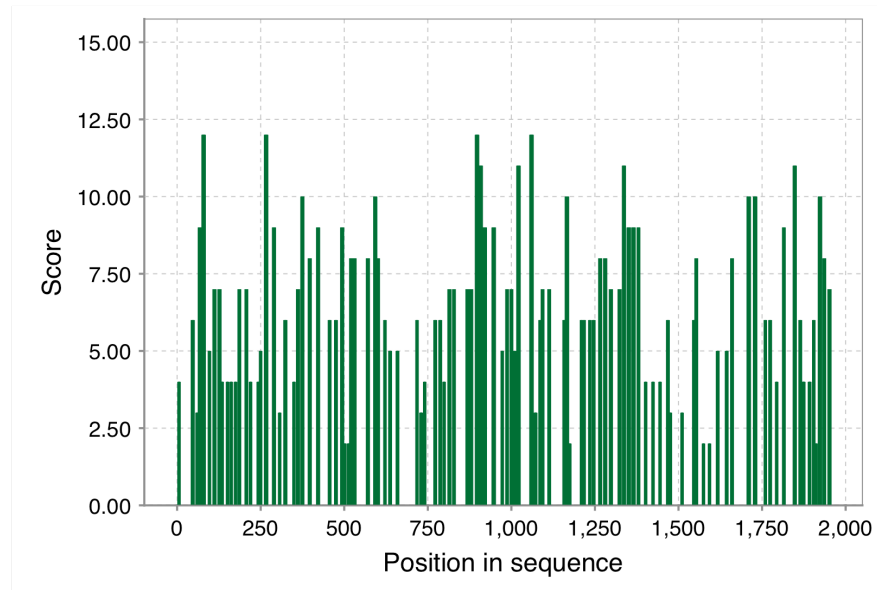
In general, an extended secondary structure of the mRNA can interfere with the translation process. Therefore, the gene optimization tries to reduce the number and length of potential hairpin loops.

2.3.1 Original sequence

Number of helices	50
Average helix length	6.28
Maximum helix length	13
Average helix score	6.12

**2.3.2 Optimized sequence**

Number of helices	53
Average helix length	6.15
Maximum helix length	8
Average helix score	6.49



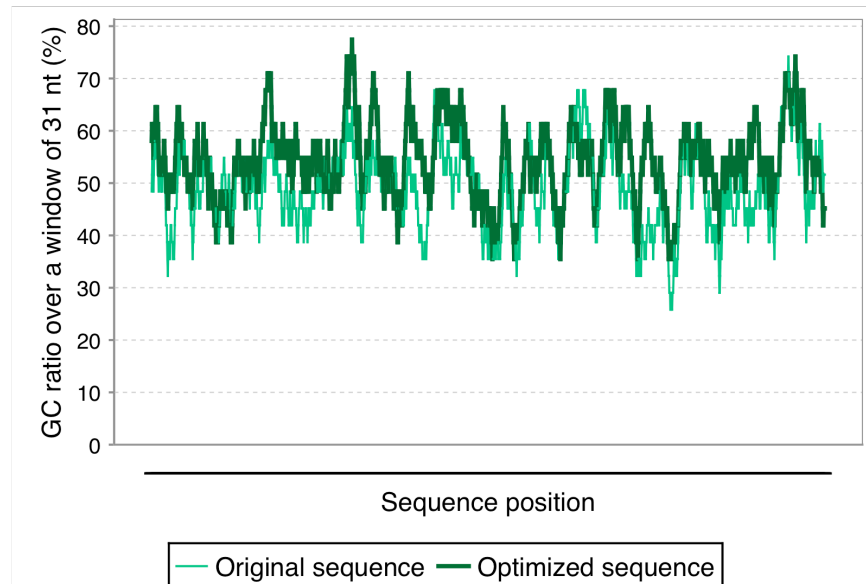
2.4 GC distribution

GC ratio over a window of 31 nt:

Original sequence: 49.00% (25.81% - 74.19%)

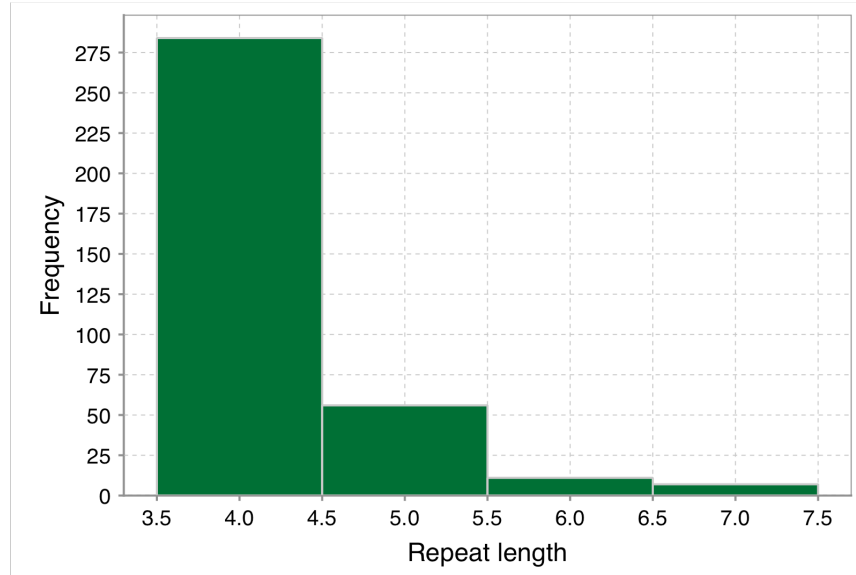
Optimized sequence: 53.97% (35.48% - 77.42%)

The number indicate the average GC content. The values in brackets indicate the interval containing 95% of all nucleotides if the GC content is averaged over a window of 11 nucleotides.



2.5 Long range repeats

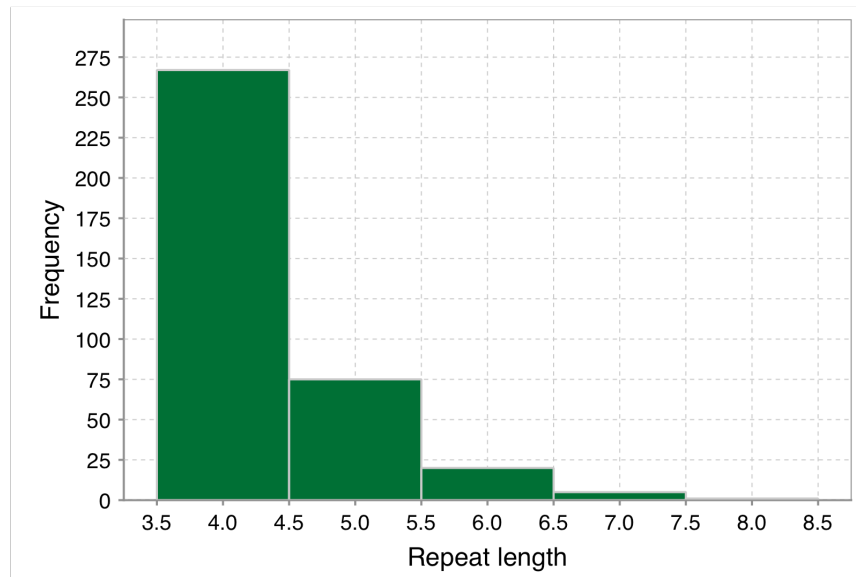
2.5.1 Original sequence



Number of repeats: 358

Longest repetitive sequence: 7 bases

2.5.2 Optimized sequence



Number of repeats: 368

Longest repetitive sequence: 8 bases

2.6 Secondary ORFs

During the optimization, secondary ORFs were removed. These are ORFs in the second or third frame or on the opposite strand. The removal was done by inserting stop codons by silent mutagenesis, or by changing start codons. The optimization tries to avoid secondary ORFs with more than 50 nucleotides.

2.6.1 Original sequence:

Number of secondary ORFs: 74
 Total length of sec. ORFs: 1717
 Number of ORFs with >50nt: 9

2.6.2 Optimized sequence:

Number of secondary ORFs: 20
 Total length of sec. ORFs: 409
 Number of ORFs with >50nt: 3

2.7 Restriction sites

The table lists the unwanted restriction sites contained in the sequence, as well as their positions.

Enzyme	Positions in original sequence	Positions in optimized sequence
EcoRI	2	1
HindIII	0	0
KpnI	0	0
NheI	0	0
Sall	0	0
XbaI	1	1
XhoI	1	1

2.8 Cryptic splice sites

The following table shows possible splice sites in the specified sequence. The score is relative to the range between the best-scoring and worst-scoring splice sites in the training set.

2.8.1 Splice sites in original sequence

Type	Position	Relevance
Acceptor	497	Likely
Acceptor	503	Likely
Acceptor	593	Possible
Acceptor	706	Possible
Acceptor	1246	Possible
Acceptor	1631	Possible
Acceptor	1756	Possible

Acceptor	1854	Possible
Donor	215	Possible
Donor	312	Possible
Donor	328	Likely
Donor	473	Likely
Donor	477	Possible
Donor	812	Possible
Donor	1085	Possible
Donor	1115	Likely
Donor	1143	Possible
Donor	1165	Possible
Donor	1557	Possible

2.8.2 Splice sites in optimized sequence

Type	Position	Relevance
Donor	1557	Possible

2.9 AT/GC stretch restrictor

2.9.1 Original sequence

Number of stretches longer than 4 nt: 44

Average AT/GC stretch length: 5.48

2.9.2 Optimized sequence

Number of stretches longer than 4 nt: 15

Average AT/GC stretch length: 5.80

3 Optimized sequence

This is the optimized sequence, ready for copying and pasting into other applications.

```
GTCGA CGCTA GCAAG AAATG TCTAG ACTCG AGGGA GGGCT GAGCA GCAGA
AAACG ACGGA GCCAT GATGT GCTGA CTGTG CAGTT TCTGA TCCTT GGGAT
GCTGC TGATG ACGGG AGGCG TGACA CTTGT GAGGA AGAAT AGGTG GCTGC
TGCTC AATGT GACTT CCGAG GACCT GGGGA AAACC TTTAG CGTGG GAACG
GGTAA CTGTA CCACA AACAT ACTCG AAGCT AAGTA CTGGT GCCCA GATTC
AATGG AGTAC AATTG TCCAA ACCTG AGCCC GAGGG AAGAA CCTGA TGACA
TAGAC TGCTG GTGCT ACGGA GTCGA AAACG TCAGA GTGGC TTACG GTAAG
TGCGA CAGCG CAGGA CGCAG CCGTC GGAGT AGGAG AGCTA TAGAC CTGCC
GACAC ACGAG AACCA CGGCT TGAAA ACACG GCAGG AGAAG TGGAT GACAG
GCAGG ATGGG AGAGA GACAA CTGCA AAAGA TCGAG CGGTG GTTCG TTCCG
AATCC CTTCT TCGCA GTTAC GGCGC TGAAT ATAGC CTATT TGGTG GGCTC
CAACA TGAAT CAGAG AGTGG TGATA GCCCT TCTGG TTCTG GCCGT GGGGC
```

CCGCC TATAG CGCCC ACTGC ATCGG GATTA CCGAC AGGGA TTTCA TTGAA
 GGCGT GCACG GAGGC ACCTG GGTGT CTGCC ACACT CGAAC AGGAT AAGTG
 CGTGA CAGTT ATGGC ACCCG ACAAA CCTAG CCTTG ATATC AGTTT GGAAA
 CCGTC GCGAT AGACC GTCCT GCCGA GGCCA GGAAA GTGTG CTACA ACGCT
 GTGCT GACGC ACGTG AAGAT CAACG ATAAG TGTCC CTCTA CAGGC GAAGC
 GCACC TGGCA GAGGA GAACG AGGGG GACAA CGCCT GCAAG CGCAC TTACA
 GCGAC AGGGG TTGGG GAAAC GGCTG TGGCC TGTTT GGCAA AGGTT CCATC
 GTTGC TTGTG CTAAG TTCAC CTGTG CCAAA TCCAT GTCAC TTTTC GAGGT
 GGATC AGACT AAGAT TCAAT ACGTG ATTCC AGCAC AGCTG CACGT GGGAG
 CGAAA CAAGA GAACT GGAAT ACCTC AATCA AGACT CTGAA GTTCG ACGCA
 CTGAG TG GTA GCCAG GAAGT CGAGT TTATC GGCTA CGGGA AAGCA ACCCT
 GGAGT GTCAG GTGCA GACAG CAGTG GACTT TGGGA ATAGC TACAT AGCAG
 AGATG GAAAC AGAAT CCTGG ATCGT GGACC GTCAG TGGGC TCAGG ATCTG
 ACCCT TCCTT GGCAA AGTGG ATCAG GCGGT GTGTG GAGAG AGATG CATCA
 CTTGG TTGAA TTTGA GCCAC CGCAC GCTGC TACCA TTCGG GTCCT GGCCT
 TGGGC AATCA GGAGG GCAGT CTGAA AACTG CCCTG ACCGG AGCCA TGCGG
 GTGAC AAAAG ATACG AACGA CAACA ACCTC TACAA ACTGC ACGGC GGACA
 CGTCA GCTGC AGAGT GAAAC TGTCA GCACT GACCT TGAAG GGGAC TAGCT
 ACAAG ATTTG CACAG ATAAG ATGTT CTTCC TGAAG AATCC CACTG ATACT
 GGGCA CGGCA CTGTG GTGAT GCAAG TGAAG GTCCC AAAGG GAGCC CCTTG
 TCGAA TCCCT GTGAT TGTGG CTGAC GATCT GACCG CTGCT ATCAA CAAAG
 GAATC CTGGT TACCG TGAAT CCCAT CGCGA GTACA AACGA CGACG AAGTC
 CTGAT CGAGG TGAAT CCACC CTTTG GCGAC AGCTA CATCA TTGTC GGGAG
 GGGAG ACAGC AGGCT GACGT ATCAG TGGCA CAAAG AAGGG TCCTC AATCG
 GGAAG CTGTT TACCC AGACA ATGAA AGGCG TGGAG CGACT GGCCG TGATG
 GGAGA CGTGG CCTGG GACTT CTCCA GTGCC GGCGG CTTCT TTACC TCCGT
 GGGCA AGGGA ATCCA TACCG TGTTT GGCTC AGCCT TTCAG GGACT GTTTG
 GTGGT TTGAA CGAAT TCTGA TAAGG TACCA AGCTT