CIENCIA CONECTADA

Ciencia Conectada (2026) Volumen 1, 1-14
https://uptlax.edu.mx/ciencia-conectada-2/



Comparación metabólica y de expresión entre *Pichia pastoris y Hansenula polymorpha* para la producción funcional de proteínas virales del dengue

Maza Lara, E[1] y Márquez Domínguez, L[2*]

[1]Universidad Popular Autónoma del Estado de Puebla. Posgrado en Biotecnología, Puebla, Puebla, México, 72410.

[2]Centro de Investigación Biomédica de Oriente, Instituto Mexicano del Seguro Social. Laboratorio de Virología. Metepec, Puebla, México, 74360.

Correspondencia:
*Márquez Domínguez, L.
lumardo80@gmail.com

Abstract

Dengue virus (DENV), a member of the Flavivirus genus, is transmitted by Aedes mosquitoes and causes a range of clinical manifestations, from mild fever to severe forms such as dengue shock syndrome (DSS). The virus has four serotypes (DENV-1, DENV-2, DENV-3, and DENV-4), each with distinct genetic characteristics that contribute to variability in immune response and complications during secondary infections. The yeast systems *Pichia pastoris* and *Hansenula polymorpha* have shown promise in the recombinant expression of viral proteins, such as the pre-membrane (prM) and membrane (M) proteins, which are essential for viral assembly and maturation. These yeast-based platforms provide a valuable tool for producing functional viral proteins needed for the development of diagnostics, therapies, and vaccines. This article analyzes the role of prM and M proteins in the dengue replication cycle and reviews the application of expression systems for these proteins, considering key aspects such as the metabolic pathways involved in protein synthesis, the use of inducible promoters, post-translational modifications especially glycosylation and the comparison of their treatment as structural viral proteins versus secondary metabolites in *Pichia pastoris* and *Hansenula polymorpha*. The potential of recombinant proteins derived from these systems is also highlighted for the development of antiviral drugs and their use in diagnostic assays, emphasizing their contribution to understanding DENV pathogenesis and prevention strategies.

Key words: Dengue virus, *Pichia pastoris*, *Hansenula polymorpha*, yeast expression system prM y M



Resumen

El virus del dengue (DENV), miembro del género *Flavivirus*, es transmitido por mosquitos *Aedes* y causa una variedad de manifestaciones clínicas, desde fiebre leve hasta formas graves como el síndrome de shock por dengue (DSS). El virus tiene cuatro serotipos (DENV-1, DENV-2, DENV-3, y DENV-4), cada uno con características genéticas distintas que conibuyen a la variabilidad en la respuesta inmune y a las complicaciones durante infecciones secundarias. Los sistemas de levadura *Pichia pastoris* y *Hansenula polymorpha* han mostrado ser prometedores en la expresión recombinante de proteínas virales, como las proteínas pre-membrana (prM) y membrana (M), esenciales para la ensamblaje y maduración viral. Estas plataformas basadas en levadura ofrecen una herramienta valiosa para producir proteínas virales funcionales necesarias para el desarrollo de diagnósticos, terapias y vacunas. En este artículo, se analiza el papel de las proteínas prM y M en el ciclo de replicación del dengue y se revisa la aplicación de sistemas de expresión de estas proteínas, considerando aspectos clave como las rutas metabólicas involucradas en la síntesis de proteínas, el uso de promotores inducibles, las modificaciones postraduccionales, especialmente la glicosilación y la comparación entre su tratamiento como proteínas estructurales de origen viral frente a metabolitos secundarios en *Pichia pastoris* y *Hansenula polymorpha*. También se destaca el potencial de las proteínas recombinantes derivadas de estos sistemas para el desarrollo de medicamentos antivirales y su uso en ensayos diagnósticos, subrayando su contribución a la comprensión de la patogénesis del DENV y las estrategias de prevención.

Palabras clave: Virus del dengue, *Pichia pastoris, Hansenula polymorpha*, expresión recombinante, prM y M

Introducción

Las levaduras metilotróficas, particularmente *Pichia pastoris* y *Hansenula polymorpha*, tienen la capacidad de utilizar el metanol como única fuente de carbono y energía, lo cual constituye una de sus principales ventajas biotecnológicas, este proceso comienza con la oxidación del metanol en el peroxisoma por la acción de la enzima alcohol oxidasa (AOX), generaron formaldehído y peróxido de hidrógeno, el formaldehído puede ser canalizado hacia dos rutas principales, la vía disimilatoria, que lo convierte en dióxido de carbono para la obtención de energía, y la vía asimilatoria, que lo incorpora a intermediarios del ciclo de Calvin o de la ruta de la xilulosa monofosfato para la biosíntesis celular, esta flexibilidad metabólica no solo permite el crecimiento eficiente en condiciones limitadas (Klepach *et al.*, 2021; Zhang *et al.*, 2010). También se han consolidado

como plataformas clave para la producción de proteínas recombinantes de interés industrial, farmacéutico y médico (Ganeva & Kranz, 2023; Karbalaei *et al.*, 2020). Su capacidad para realizar modificaciones postraduccionales similares a las células eucariotas superiores, su rápido crecimiento y la facilidad para su cultivo y manipulación genética. Estas características las posicionan como sistemas de expresión preferidos frente a bacterias como *Escherichia coli* y representan una alternativa más económica y escalable que utilizar células de mamífero (Cereghino & Cregg, 2000, Ahmad *et al.*, 2014). No obstante, optimizar la producción recombinante en estos sistemas exige una comprensión detallada de su fisiología, metabolismo central y respuestas celulares frente a la carga proteica (Baghban *et al.*, 2019). La elección entre *P. pastoris y H. polymorpha* puede depender de factores como la eficiencia de la secreción, la estabilidad del plásmido, la tolerancia al metanol, los perfiles de glicosilación y la adaptación a distintas condiciones de cultivo.

En este artículo se revisan las características generales de *Pichia pastoris* y *Hansenula polymorpha* como sistemas de expresión heteróloga con el objetivo de evaluar cuál de estas levaduras podría ofrecer mejores ventajas para la producción funcional de las proteínas estructurales prM y M del virus del dengue, cuya correcta expresión es esencial para estudios de ensamblaje viral, desarrollo de vacunas y diseño de antivirales.

Dengue

El dengue es una enfermedad viral que genera un síndrome febril, transmitida por mosquitos del género *Aedes*, particularmente *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus*, constituyendo un problema de salud pública (B.A. Seixas *et al.*, 2024). Se estima que más de 400 millones de infecciones ocurren cada año a nivel mundial, afectando principalmente a regiones tropicales y subtropicales con limitaciones en infraestructura sanitaria (Rehman *et al.*, 2024).

Aunque la mayoría de los casos son leves, con síntomas como fiebre, mialgia, artralgia, náuseas y exantema (Figura 1), ciertos grupos vulnerables como niños menores de un año, personas mayores con enfermedades crónicas y mujeres embarazadas, presentan mayor riesgo de desarrollar formas graves de la enfermedad (Lin *et al.*, 2018). Un factor importante en la progresión clínica de dengue es la potenciación mediada por anticuerpos (ADE, por sus siglas en ingles de A*ntibody-Dependent Enhancement*), fenómeno en el que anticuerpos generados tras una infección primaria por un serotipo viral facilita la entrada de un serotipo distinto en las células hospederas, lo que incrementa la viremia y la respuesta inflamatoria severa (Sarker *et al.*, 2023).

En este contexto, las proteínas estructurales prM (precursor de la proteína de membrana) y M (proteína de membrana) del virus de dengue desempeñan un papel esencial en el ensamblaje del virión y en el proceso de maduración viral. Por ello, la producción

eficiente de estas proteínas virales mediante sistemas recombinantes en levaduras metilotróficas representa una estrategia prometedora para el desarrollo de vacunas y estudios de ensamblaje viral (Rodenhuis-Zybert *et al.*, 2010, Thomas & Endy, 2011).

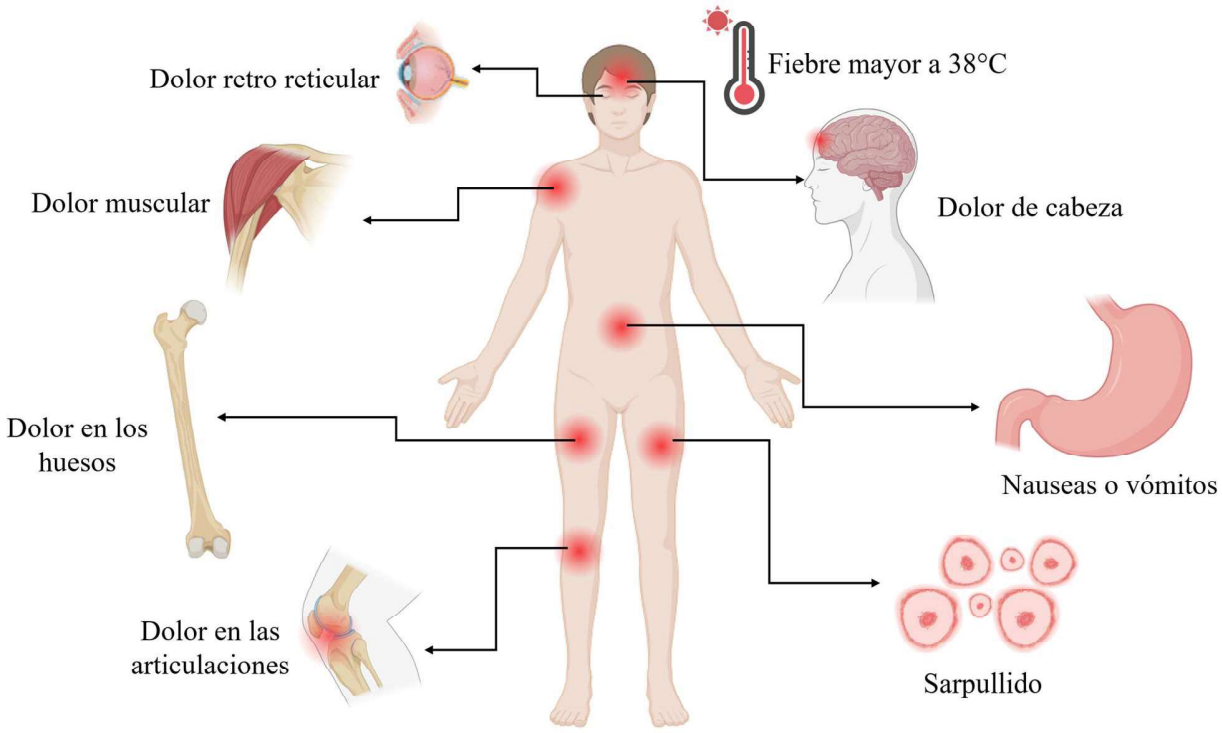


Figura 1. Manifestaciones clínicas de la infección por dengue.

Creado con Biorender.com

Características generales de las levaduras

Pichia pastoris

Es una levadura metilotrófica del filo Ascomycota, ampliamente utilizada como sistema de expresión de proteínas recombinantes en aplicaciones industriales, farmacéuticas y de investigación (Barone *et al.*, 2023). Su principal ventaja radica en la capacidad de utilizar metanol como única fuente de carbono y energía, los cual esta mediado por el promotor AOX1, altamente inducible por metanol. Este promotor regula la expresión de la enzima alcohol oxidasa (AOX), que participa en la oxidación del metanol y cuya actividad permite la transcripción eficiente de genes heterólogos. Como resultado, *P. pastoris* puede alcanzar niveles elevados de expresión proteica sin afectar significativamente su metabolismo central (Kielkopf et al., 2021). Otra característica relevante es su capacidad de realizar



modificaciones postraduccionales como la glicosilación y el plegamiento adecuado de proteínas. No obstante, su patrón de N-glicosilación difiere del humano, tendiendo a producir glicanos de tipo hipermaniado lo que puede ser un factor por considerar en la producción de proteínas virales para aplicaciones inmunológicas (Wang et al., 2022). Estas propiedades hacen de *P. pastoris* una plataforma prometedora para la expresión de proteínas del virus de dengue.

Hansenula polymorpha

Hansenula polymorpha (también conocida como *Ogataea polymorpha)* es otra levadura metilotrófica del filo Ascomycota, reconocida por su capacidad de metabolizar metanol y otras fuentes de carbono alternativas como glucosa, glicerol y etanol (Manfrao-Netto *et al.*, 2019). Su notable robustez fisiológica, estabilidad genética y capacidad de crecimiento a temperaturas elevadas (hasta 48°C) la convierten en una plataforma emergente para la producción de proteínas recombinantes (Manfrao-Netto *et al.*, 2021). Esta termotolerancia es particularmente útil para facilitar el plegamiento correcto de proteína termolábiles, como las de origen viral.

H. polymorpha expresa un conjunto de enzimas específicas para el metabolismo del metanol, entre ellas la metanol oxidasa (MOX) y la formaldehído deshidrogenasa (FMD), cuyos promotores son utilizados para inducir la expresión de genes heterólogos de manera eficiente (Genu et al., 2003). Además, cuenta con un sistema de transformación altamente efectivo, que permite la integración estable de los genes de interés en su genoma. Su patrón de glicosilación es menos extenso que el de otras levaduras como *P. pastoris*, lo que podría representar una ventaja de expresión de proteínas virales que requieren un patrón de glicosilación más cercano al humano.

Ambas levaduras presentan ventajas distintas para la producción de proteínas recombinantes. Mientras *P. pastoris* ofrece altos niveles de expresión bajo control del promotor AOX1, *H. polymorpha* destaca por su termotolerancia y menor hiperglicosilación, características que podrían favorecer la expresión de proteínas virales como prM y M con una conformación más cercana a la nativa.

Métodos

Esta investigación se llevó a cabo mediante una revisión documental centrada en artículos científicos disponibles en la base de datos de PubMed. Se seleccionaron publicaciones entre los años 2000 y 2024 que abordaran aspectos metabólicos, fisiológicos y aplicados de *Pichia pastoris* y *Hansenula polymorpha* como sistemas de expresión de proteínas recombinantes. Los criterios de inclusión fueron: acceso al texto completo, revisión por pares y relevancia temática directa con la expresión de proteínas virales, metabolismo del metanol, y estrés oxidativo. Se priorizaron aquellos estudios con enfoque en la expresión de proteínas virales, metabolismo del metanol y



mecanismos relacionados con el estrés oxidativo. La información recopilada fue analizada de forma crítica y sintetizada para identificar tendencias, avances y vacíos en el conocimiento actual.

Resultados

Metabolismo y expresión proteica

El rendimiento en la expresión de proteínas heterólogas en levaduras metilotróficas depende en gran medida del estado metabólico de la célula, particularmente del metabolismo de carbono, la capacidad oxidativa y el equilibrio redox (Zhang *et al.*, 2022). Tanto *P. pastoris* como *H. polymorpha* metabolizan el metanol a través de rutas específicas, que no solo le permiten utilizarlo como fuente de energía, sino también inducir la expresión de genes bajo promotores metanol-regulados (Brunner *et al.*, 2020, Suppi *et al.*, 2013).

El proceso del metabolismo del metanol en *P. pastoris* comienza con la entrada del metanol a la célula, seguido por su oxidación a formaldehído mediante la acción de la alcohol oxidasa (AOX), es una enzima abundante localizada en los peroxisomas, esta reacción genera peróxido de hidrógeno como subproducto, una especie reactiva que debe ser degradada por catalasas para evitar el daño celular, parte del formaldehído se canaliza hacia la vía de asimilación, donde se incorpora al ciclo del xilulosa monofosfato para la generación de intermediarios metabólicos y energía, el resto se oxida a dióxido de carbono a través de la vía disimilatoria, contribuyendo a la generación de NADH. Todo este proceso implica una alta demanda de oxígeno y un control estricto del balance redox, ya que el exceso de especies reactivas de oxígeno puede inducir estrés oxidativo. Durante este metabolismo, la célula genera ATP, NADH y compuestos precursores necesarios para la síntesis y modificación postraduccional de proteínas, pero el ambiente oxidativo puede afectar negativamente el plegamiento correcto y la eficiencia de secreción de proteínas recombinantes, representando un desafío importante en procesos de producción a gran escala (Cereghino & Cregg, 2000).

En contraste con *P. pastori*, *H. polymorpha* presenta una actividad peroxisomal más moderada durante la metabolización del metanol, lo que se asocia con una menor producción de especies reactivas de oxígeno (ROS). Esta levadura utiliza la enzima metanol oxidasa (MOX), cuya expresión está regulada por el promotor MOX, pero a diferencia del sistema AOX1 de *P. pastori*, no requiere niveles tan elevados de transcripción para lograr una expresión funcional de proteínas recombinantes, esta menor exigencia oxidativa contribuye a un ambiente intracelular más estable desde el punto de vista redox, reduciendo el riesgo de estrés oxidativo y favoreciendo un plegamiento más eficiente de las proteínas (Suppi *et al.*, 2013)

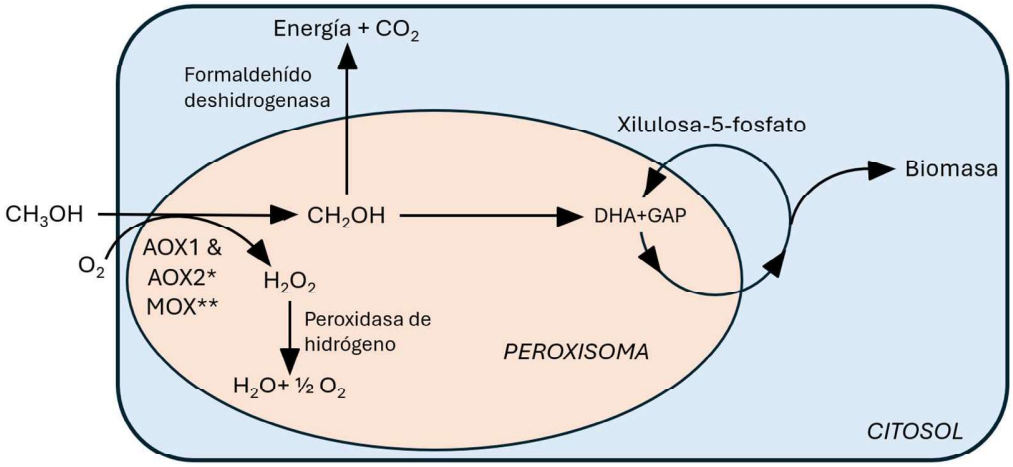


Figura 2. Metabolismo del metanol *Pichia pastoris* y *Hansenula polymorpha. Imagen modificada de Ali N. et al., 2020.* **Pichia pastoris*; ***Hansenula polymorpha*

Además *H. polymorpha* es capaz de crecer a temperaturas más altas y presenta una cinética metabólica más gradual, lo que puede beneficiar la estabilidad estructural de proteínas sensibles. Esta flexibilidad puede ser ventajosa al escalar procesos industriales para proteínas como prM y M del virus del dengue, cuyo correcto plegamiento y ensamblaje dependen tanto de la disponibilidad energética como del mantenimiento de condiciones redox favorables (Wang *et al.*, 2009).

La estrecha relación entre el metabolismo del metanol y la maquinaria de expresión heteróloga constituye un factor determinante en la elección de la levadura hospedadora para la producción de proteínas recombinantes. Tanto en *P. pastoris* como en *H. polymorpha*, el diseño adecuado de las condiciones de cultivo es esencial para alcanzar una expresión eficiente y funcional. La optimización del régimen de alimentación con metanol incluyendo la concentración, el tiempo, y la tasa de adición, así como una adecuada aireación y monitoreo del oxígeno disuelto, son fundamentales para sostener la actividad oxidativa sin inducir niveles perjudiciales de estrés oxidativo, como el uso de antioxidantes o la ingeniería de cepas más tolerantes, puede mejorar significativamente la calidad del producto final (van Zutphen *et al.*, 2010).

Aunque los estudios directos sobre la expresión diferencial de las proteínas virales prM y M en *P. pastoris* y *H. polymorpha* son escasos, es posible anticipar ciertas variaciones en su eficiencia de producción a partir de las características metabólicas de cada



hospedador. En *P. pastoris*, el alto flujo de metanol necesario para inducir el promotor AOX1 puede generar condiciones de estrés oxidativo que afecten negativamente el plegamiento y la estabilidad de proteínas estructurales como prM y M, que son sensibles al entorno redox y requieren un procesamiento adecuado en el retículo endoplasmático (Singh & Narang, 2020).

En cambio *H. polymorpha*, con su menor actividad peroxisomal y menor acumulación de ROS, puede ofrecer un ambiente intracelular más favorable para el ensamblaje y maduración de estas proteínas, la flexibilidad metabólica de *H. polymorpha* también permite una inducción más suave y sostenida, lo que podría favorecer una expresión más continua y funcional de proteínas recombinantes complejas (Ozimek *et al.*, 2004). Estas diferencias sugieren que la selección de condiciones de cultivo específicas como el régimen de metanol, la oxigenación y el manejo del estrés celular podría tener un impacto significativo en la calidad y el rendimiento de proteínas virales expresadas en cada sistema (Manfrao-Netto *et al.*, 2019).

Implicaciones para las proteínas prM y M

Aunque no se encontraron estudios que evalúen directamente la expresión de prM y M del virus del dengue en estos sistemas, los datos recopilados permiten inferir que su correcta producción dependería fuertemente del control del estrés oxidativo y de una inducción metabólica moderada. Las características fisiológicas de *H. polymorpha* podrían favorecer una mejor eficiencia de expresión y secreción de estas proteínas, especialmente en contextos industriales donde se requiere robustez y estabilidad del sistema.

Discusión

La comparación entre *P. pastoris y H. polymorpha* como sistemas de expresión para proteínas virales, como prM y M del virus del dengue, revela diferencias metabólicas y fisiológicas que influyen directamente en la eficiencia de producción y calidad de las proteínas recombinantes. *P. pastoris* ha sido ampliamente utilizada debido a su capacidad de alcanzar altos niveles de expresión bajo el control del promotor AOX1, inducido por metanol. No obstante, esta vía de expresión está estrechamente relacionada con una intensa actividad oxidativa en los peroxisomas, lo que incrementa la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y puede comprometer el correcto plegamiento y secreción de las proteínas heterólogas (Ahmad *et al.*, 2014; Karbalaei *et al.*, 2020). Esto es particularmente relevante para proteínas como prM y M, que requieren un ambiente redox equilibrado para mantener su conformación funcional (Rodenhuis-Zybert *et al.*, 2010). En contraste, *H. polymorpha* muestra una regulación más flexible del metabolismo del metanol y una actividad peroxisomal más moderada, lo que



Tabla 1. Comparación de sistemas de expresión y metabolismo en *Pichia pastoris* y *Hansenula polymorpha*

Levadura	Promotores principales	Uso de metanol / vía energética	Características destacadas	Referencias
P. pastoris	AOX1, GAP, TEF	Oxidación de metanol → formaldehído → formiato → CO_2	Alta inducción con metanol, sistema robusto adaptable a cultivo industrial.	Ahmad *et al.*, 2014; Barone *et al.*, 2023
			Optimización genética mejora la producción.	Singh & Narang, 2021
			Represión por hexosas vía Hxt1 y PpHxt1; papel del transporte de glucosa.	Zhang *et al.*, 2010
H. polymorpha	MOX, FMD, MPP1, MAL1	Crecimiento eficiente con metanol; MOX inducido por metanol; regulación dependiente de fosforilación	Sistema versátil, menos estudiado que *P. pastoris*, pero adaptable a bioprocesos.	Genu et al., 2003; Manfrao-Netto et al., 2019
			Expresión coordinada de genes peroxisomales; adaptación transcripcional al uso de metanol.	van Zutphen et al., 2010; Suppi et al., 2013
Ambas	AOX1, GAP, MOX, FMD	Uso eficiente de metanol	Diferencias contextuales según proteína objetivo; ventajas distintas según la levadura y condiciones.	Baghban et al., 2019

resulta en menores niveles de estrés oxidativo (Genu *et al.*, 2003; Manfrao-Netto *et al.*, 2019). Esta característica podría conferir ventajas al escalar procesos industriales, al minimizar la acumulación de proteínas mal plegadas y reducir la necesidad de condiciones estrictamente controladas para la aireación y alimentación con metanol. Además, se ha demostrado que esta levadura puede expresar de manera eficiente proteínas complejas,



incluso con modificaciones postraduccionales importantes (Ganeva & Kranz, 2023). Los resultados recopilados refuerzan la importancia de considerar no solo el nivel de expresión, sino también la calidad estructural y funcional de las proteínas obtenidas como se observa en la Tabla 1. Como indicaron Barone *et al.* (2023), la optimización de parámetros como la temperatura, la tasa de alimentación con metanol y la oxigenación son críticos para maximizar el rendimiento sin comprometer la integridad proteica. En este sentido, la elección del sistema hospedador debe alinearse con las características bioquímicas de la proteína objetivo, así como con la finalidad del producto (diagnóstico, vacuna o terapia).

Finalmente, si bien ambos sistemas presentan ventajas particulares, la relación entre el metabolismo del metanol, la respuesta al estrés oxidativo y la eficiencia de la maquinaria de plegamiento celular emerge como un eje decisivo para la producción funcional de proteínas del dengue, lo que abre la puerta a estudios comparativos más profundos para ajustar estrategias de cultivo y expresión según la proteína viral de interés (Baghban *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2022).

Conclusión

Las levaduras metilotróficas *P. pastoris* y *H. polymorpha* representan plataformas versátiles y eficientes para la producción de proteínas recombinantes, incluyendo antígenos virales de relevancia como las proteínas prM y M del virus del dengue. Si bien *P. pastoris* destaca por sus altos niveles de expresión bajo el promotor AOX1, su metabolismo altamente oxidativo implica un mayor riesgo de estrés intracelular, lo que puede comprometer el correcto plegamiento de proteínas sensibles. En contraste *H. polymorpha* ofrece una alternativa con menores niveles de estrés oxidativo, mayor estabilidad fisiológica y una inducción más gradual, condiciones que podrían favorecer la expresión funcional y estructuralmente adecuada de proteínas virales complejas. La elección entre uno u otro sistema debe considerar no solo el rendimiento en términos de cantidad, sino también la calidad estructural y conformacional del producto expresado. En este sentido *H. polymorpha* emerge como una opción prometedora para aplicaciones que requieren un ambiente redox más controlado, como es el caso de las proteínas estructurales del dengue. Estudios comparativos experimentales futuros serán esenciales para validar estas observaciones teóricas y optimizar las condiciones de producción a escala industrial.



Conflicto de intereses

No existe conflicto de interés.

Bibliografía

Ali, N., Zhang, Q., Liu, ZY., Li, FL., Lu, M. & Fang, XC. (2020). Emerging technologies for the pretreatment of lignocellulosic materials for bio-based products. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104, 455-473. https://doi.org/10.1007/s00253-019-10158-w

Ahmad, M., Hirz, M., Pichler, H. & Schwab, H. (2014). Protein expression in *Pichia pastoris*: recent achievements and perspectives for heterologous protein production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *98*(12), 5301-5317. https://doi.org/10.1007/s00253-014-5732-5

Baghban, R., Farajnia, S., Rajabibazl, M., Ghasemi, Y., Mafi, A., Hoseinpoor, R., Rahbarnia, L. & Aria, M. (2019). Yeast expression systems: overview and recent advances. *Molecular Biotechnology*, *61*(5), 365-384. https://doi.org/10.1007/s12033-019-00164-8

Barone, G. D., Emmerstorfer-Augustin, A., Biundo, A., Pisano, I., Coccetti, P., Mapelli, V. & Camattari, A. (2023). Industrial production of proteins with *Pichia pastoris-Komagataella phaffii*. *Biomolecules*, *13*(3), 441 . https://doi.org/10.3390/biom13030441

B.A. Seixas, J., Giovanni Luz, K., & Pinto Junior, V. (2024). [Clinical Update on Diagnosis, Treatment and Prevention of Dengue]. *Acta Med Port*, *37*(2), 126-135. https://doi.org/10.20344/amp.20569

Brunner, V., Siegl, M., Geier, D. & Becker, T. (2020). Biomass soft sensor for a *Pichia pastoris* fed-batch process based on phase detection and hybrid modeling.. *Biotechnology and bioengineering*, *117*(9), 2749-2759. https://doi.org/10.1002/bit.27454

Cereghino, JL. & Cregg, JM. (2000). Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiology Reviews*, *24*(1), 45-66. https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2000.tb00532.x

Ganeva, V. & Kranz, A. (2023). Selective extraction of recombinant membrane proteins from *Hansenula polymorpha* by pulsed electric field and lytic enzyme pretreatment. *Microbial cell factories*, *22*(1), 251. https://doi.org/10.1186/s12934-023-02259-z



Genu, V., Godecke, S., Hollenberg, CP. & Pereira, GG. (2003). The *Hansenula polymorpha* MOX gene presents two alternative transcription start points differentially utilized and sensitive to respiratory activity. *European journal of biochemistry*, *270*(11), 2467-2475. https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2003.03618.x

Karbalaei, M., Rezaee, SA. & Farsiani, H. (2020). *Pichia pastoris*: A highly successful expression system for optimal synthesis of heterologous proteins. *Journal of cellular physiology, 235*(9), 5867-5881. https://doi.org/10.1002/jcp.29583

Kielkopf, CL., Bauer, W. & Urbatsch, I. L. (2021). Expression of cloned genes in *Pichia pastoris* using the methanol-inducible promoter AOX1. *Cold Spring Harbor Protocols*, *2021*(1), pdb-prot102160. https://doi.org/10.1101/pdb.prot102160

Klepach, HM., Zakalskiy, AE., Zakalska, OM., Gayda, GZ., Smutok, OV. & Gonchar, M. V. (2021). Alcohol oxidase from the methylotrophic yeast *Ogataea polymorpha*: Isolation, purification, and bioanalytical application. *Flavins and Flavoproteins: Methods and Protocols*, *2280*, 231-248. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1286-6_15

Lin, GL., McGinley, JP., Drysdale, SB. & Pollard, AJ. (2018). Epidemiology and immune pathogenesis of viral sepsis. *Frontiers in immunology*, *9*, 2147. https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02147

Manfrao-Netto, JHC., Gomes, AMV. & Parachin, NS. (2019). Advances in using *Hansenula polymorpha* as chassis for recombinant protein production. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, *7*, 94. https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00094

Manfrao-Netto, JHC., Queiroz, EB., Rodrigues, KA., Coelho, CM., Paes, HC., Rech, EL. & Parachin, NS. (2021). Evaluation of *Ogataea* (Hansenula) *polymorpha* for hyaluronic acid production. *Microorganisms*, *9*(2) 312. https://doi.org/10.3390/microorganisms9020312

Ozimek, P., Lahtchev, K., Kiel, JA., Veenhuis, M. & van der Klei, IJ. (2004). *Hansenula polymorpha* Swi1p and Snf2p are essential for methanol utilisation. *FEMS yeast research*, *4*(7), 673-682. https://doi.org/10.1016/j.femsyr.2004.01.009



Rehman, B., Ahmed, A., Khan, S., Saleem, N., Naseer, F. & Ahmad, S. (2024). Exploring plant-based dengue therapeutics: from laboratory to clinic. *Tropical Diseases, Travel Medicine and Vaccines*, *10*(1), 23. https://doi.org/10.1186/s40794-024-00232-1

Rodenhuis-Zybert, IA., Wilschut, J. & Smit, JM. (2010). Dengue virus life cycle: viral and host factors modulating infectivity. *Cellular and molecular life sciences*, *67*(16), 2773-2786. https://doi.org/10.1007/s00018-010-0357-z

Sarker, A., Dhama, N. & Gupta, RD. (2023). Dengue virus neutralizing antibody: a review of targets, cross-reactivity, and antibody-dependent enhancement. *Frontiers in Immunology*, *14*, 1200195. https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1200195

Singh, A. & Narang, A. (2020). The Mut$^+$ strain of *Komagataella phaffii* (*Pichia pastoris*) expresses P_{AOX1} 5 and 10 times faster than Mut^s and Mut$^-$ strains: evidence that formaldehyde or/and formate are true inducers of P_{AOX1}. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *104*(18), 7801-7814. https://doi.org/10.1007/s00253-020-10793-8

Suppi, S., Michelson, T., Viigand, K. & Alamae, T. (2013). Repression vs. activation of MOX, FMD, MPP1 and MAL1 promoters by sugars in *Hansenula polymorpha*: the outcome depends on cell's ability to phosphorylate sugar. *FEMS Yeast Research*, *13*(2), 219-232. https://doi.org/10.1111/1567-1364.12023

Thomas, SJ. & Endy, TP. (2011). Critical issues in dengue vaccine development. *Current opinion in infectious diseases*, *24*(5), 442-450. https://doi.org/10.1097/QCO.0b013e32834a1b0b

van Zutphen, T., Baerends, RJ., Susanna, KA., de Jong, A., Kuipers, OP., Veenhuis, M. & van der Klei, IJ. (2010). Adaptation of Hansenula polymorpha to methanol: a transcriptome analysis. *BMC Genomics*, *11*, 1-12. https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-1

Wang, N., Yang, C., Peng, H., Guo, W., Wang, M., Li, G. & Liu, D. (2022). The introduction of an N-glycosylation site into prochymosin greatly enhances its production and secretion by *Pichia pastoris*. *Microbial Cell Factories*, *21*(1), 177. https://doi.org/10.1186/s12934-022-01904-3



Wang, PG., Kudelko, M., Lo, J., Siu, LY., Kwok, KT., Sachse, M., Nicholls, JM., Bruzzone, R., Altmeyer, RM. & Nal, B. (2009). Efficient assembly and secretion of recombinant subviral particles of the four dengue serotypes using native prM and E proteins. *PLoS One*, *4*(12), e8325. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008325

Zhang, P., Zhang, W., Zhou, X., Bai, P., Cregg, J. M. & Zhang, Y. (2010). Catabolite repression of Aox in *Pichia pastoris* is dependent on hexose transporter PpHxt1 and pexophagy. *Applied and Environmental Microbiology*, *76*(18), 6108-6118. https://doi.org/10.1128/AEM.00607-10

Zhang, Q., Wang, X., Luo, H., Wang, Y., Wang, Y., Tu, T., Qin, X., Su, X., Huang, H., Yao, B., Bai, Y. & Zhang, J. (2022). Metabolic engineering of *Pichia pastoris* for myo-inositol production by dynamic regulation of central metabolism. *Microbial Cell Factories*, *21*(1), 112. https://doi.org/10.1186/s12934-022-01837-x