

EXPESSÃO E PURIFICAÇÃO DO DOMÍNIO METILTRANSFERASE DA PROTEÍNA NS5 DO ZIKV

Palavras-chave: Zika Virus, Metiltransferase, Arbovírus

Mayara Roquette Valentim – IB/UNICAMP e LNBio/CNPq

Dra. Juliana Helena Costa Smetana – LNBio/CNPq

1. OBJETIVOS

O objetivo geral deste estudo é ampliar o conhecimento acerca da metiltransferase do Zika Virus (ZIKV), auxiliando na busca por inibidores virais. Para isto, tem-se como objetivo específico expressar, purificar, e analisar a atividade enzimática, através de testes bioquímicos, do domínio N-terminal da proteína viral NS5, que possui atividade de metiltraferase.

2. METODOLOGIA

2.1. CONSTRUÇÃO DO VETOR DE EXPRESSÃO

O vetor pET28a-NS5_nt, que expressa o domínio N-terminal da NS5 em fusão a uma cauda de histidina (6xHis) foi construído sob encomenda pela empresa Genscript com otimização de códons. Esse vetor foi transformado na cepa de de *E. coli* DH5alpha para realizar a extração de DNA plasmidial utilizando sistema comercial da Qiagen.

2.2. EXPRESSÃO

A expressão da proteína a partir do vetor pET28a-NS5_nt foi feita na cepa BL21(DE3) de *E. coli*. A cultura cresceu em meio LB com canamicina, a 37° C, 200 rpm até a OD atingir 0,7. A expressão foi induzida com lactose 14 mM a 22° C, 200 rpm por 16 horas e em seguida as bactérias foram coletadas por centrifugação a 4° C, 6.000 rpm por 10 minutos.

2.3. PURIFICAÇÃO

2.3.1. CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE POR METAL IMOBILIZADO

O *pellet* de bactérias resultante da expressão foi ressuscitado em tampão de lise (50 mM Tris-HCl; 300 mM NaCl; 20 mM Imidazol; 5% Glicerol; 5 mM beta-mercaptoetanol.) contendo Lisozima (0,1 mg.mL⁻¹) e o inibidor de protease, PMSF (0,5 mM), e incubado a 4° C por 1h sob agitação constante. A amostra foi sonicada (10x 12”, amplitude 20% com intervalos de 30”) e centrifugada (1h, 14.000 rpm e 4° C). O sobrenadante foi incubado com resina de cobalto (Talon® Superflow™ - GE Healthcare) sob agitação por 1h30’ a 4°C. A amostra foi transferida para uma coluna e foram feitas 5 lavagens com tampão de lise, seguidas de 6 eluições com o tampão de eluição (50 mM Tris-HCl; 300 mM NaCl; 250 mM Imidazol; 5% Glicerol; 5 mM beta-mercaptoetanol).

2.3.2. CROMATOGRAFIA POR EXCLUSÃO MOLECULAR

As frações da cromatografia de afinidade foram analisadas por SDS-PAGE e as frações selecionadas foram reunidas, concentradas em concentrador e submetidas a cromatografia de exclusão molecular que foi realizada em tampão de gel filtração (50 mM Tris-HCl; 300 mM NaCl; 5% Glicerol; 5 mM beta-mercaptoetanol), em uma coluna Superdex 200 10/300 GL (GE), a um fluxo de 0,1 ml.min⁻¹ em um AKTA FPLC. As frações coletadas foram de 1 ml cada

3. INTRODUÇÃO

O Zika virus (ZIKV) foi isolado e descrito, pela primeira vez, a partir de macacos do gênero *Rhesus*, em 1947, na Uganda. Os primeiros casos de infecção em humanos foram reportados no ano de 1954, na Nigéria. Segundo as notificações, as infecções sintomáticas eram esporádicas até o ano de 2007, quando então, ocorreu o primeiro surto de infecção em humanos por ZIKV, na Oceania. No ano de 2015, o vírus foi encontrado pela primeira vez no Brasil e depois em outros países americanos, onde também infectou milhares de pessoas (PLOURDE; BLOCH, 2016). Esta infecção viral, quando sintomática, pode levar à febre; conjuntivite; artralgia; e até complicações no sistema nervoso, como encefalite nos fetos em que a mãe foi infectada, e síndrome de Guillain-Barré (COUTARD et al., 2016).

Este vírus pertence ao Gênero Flavivirus e a família Flaviviridae, grupo que também inclui outros vírus que infectam humanos, como o da febre amarela (YFV) e da dengue (DENV), e assim como eles, é caracterizado como um arbovírus, ou seja, é transmitido através de artrópodes, especificamente pelo *Aedes aegypti* (SIROHI et al., 2016). Este grupo viral apresenta o material genético organizado em uma fita simples de RNA de sentido positivo, o qual contém cerca de 11.000 nucleotídeos, e regiões não traduzidas (UTR's) nas extremidades 5' e 3', a estrutura 5' cap é formada por resíduos de guanosina (COUTARD et al., 2016). A tradução do RNA viral ZIKV resulta em uma grande poliproteína, a qual contém 3 proteínas estruturais, responsáveis pela construção física do vírus; e 7 não estruturais, as quais estão envolvidas nos processos bioquímicos, replicação do material genético; e no papel contra a resposta imune do hospedeiro (WANG, et al., 2019; COUTARD et al., 2016). Dentre as proteínas não estruturais, a NS5 é a que apresenta maior tamanho e conservação evolutiva (LIM, et al., 2015).

Esta proteína é composta por 2 grandes domínios, N-terminal e C-terminal, os quais apresentam suas particularidades estruturais e funcionais (Figura 1). A porção C-terminal é funcionalmente classificada como uma RNA polimerase dependente de RNA (RdRp), sendo crucial para a replicação viral (ZHAO, et al., 2017).

A porção N-terminal apresenta função catalítica de metiltransferase, transferindo grupamentos metil para duas posições da região cap do RNA, a partir de um mesmo doador, S-adenosilmetionina (SAM) (ISSUR, et al., 2009). Uma destas posições é o 7-nitrogênio da guanosina, esta modificação pós-transcricional leva à estabilidade do RNA viral e permite o reconhecimento pelo fator de iniciação eIF4E, estimulando assim, a tradução das proteínas virais. O átomo 2'-oxigênio da ribose N1 também é metilado, que passa a proteger o RNA de ser reconhecido por alguns sensores celulares do sistema imune do hospedeiro. Dessa forma, a atividade da NS5nt é essencial para o sucesso da infecção viral (COUTARD et al., 2016) (Figura 2). Estudos de caracterização funcional e estrutural da NS5, envolvendo sua estrutura e funcionalidade, como ensaios de atividade, são necessários para ampliar o conhecimento acerca dela, encaminhando assim, a busca por inibidores para este vírus e outros que pertencem à mesma família como o YFV e o DENV já que eles apresentam uma alta similaridade na estrutura e função da NS5, 70%, 55%, 61% e 70%, respectivamente (ZHANG-JIN et al., 2017).

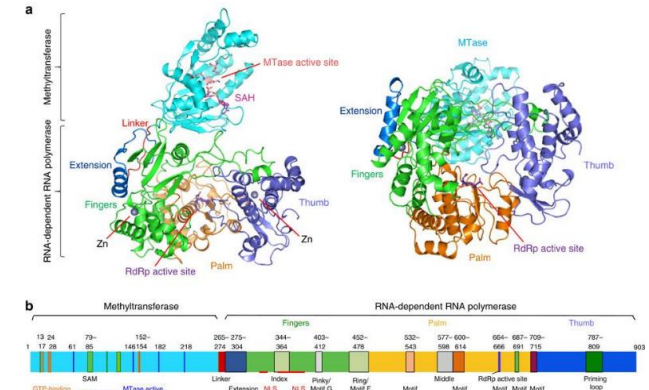


Figura 1. Estrutura da proteína NS5 do ZIKV contendo os domínios N-terminal e C-terminal. (ZHAO-LI et al., 2017)

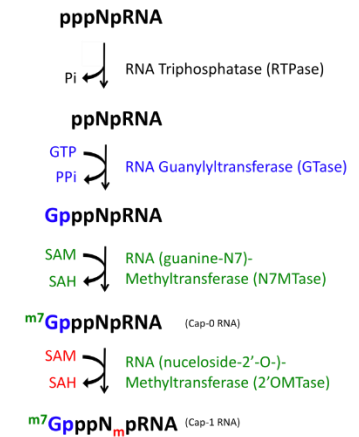


Figura 2. Sequência de reações químicas que levam à formação da estrutura Cap-1 RNA. Em preto, destacado o substrato inicial (pppNpRNA); em azul, a enzima e o co-fator que levam à transferência de guanosina; em verde, a enzima e o co-fator que levam às transferências de metil; e em vermelho, o doador de grupamento metil (SAM). (PICARD-JEAN et al., 2013).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Durante os procedimentos de expressão e purificação da proteína viral NS5nt, amostras foram coletadas e analisadas em gel 12 % (v/v) poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE) com um marcador molecular (*True Color Tris-Glycine*), permitindo identificar as proteínas contidas nas amostras através do seus respectivos pesos moleculares. Sabendo que a proteína de interesse apresenta um peso molecular de 34 kDa, é possível verificar se ela está presente nas amostras em questão e em qual nível de pureza.

4.1. EXPRESSÃO E CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE

Foram coletadas amostras após a expressão, no qual tem-se o extrato total de proteínas. Após a centrifugação, foram coletadas porções da parte solúvel e insolúvel. Em todas estas coletas, foi possível verificar a presença da proteína NS5nt (Figura 2). Outro gel foi corrido contendo amostras das eluições e uma lavagem de 5 ml com o tampão de eluição, para garantir que não ficassem proteínas ligadas à resina. É possível observar que a fração adsorvida perdeu muitos contaminantes bacterianos em relação ao *flowthrough* (Figura 3).

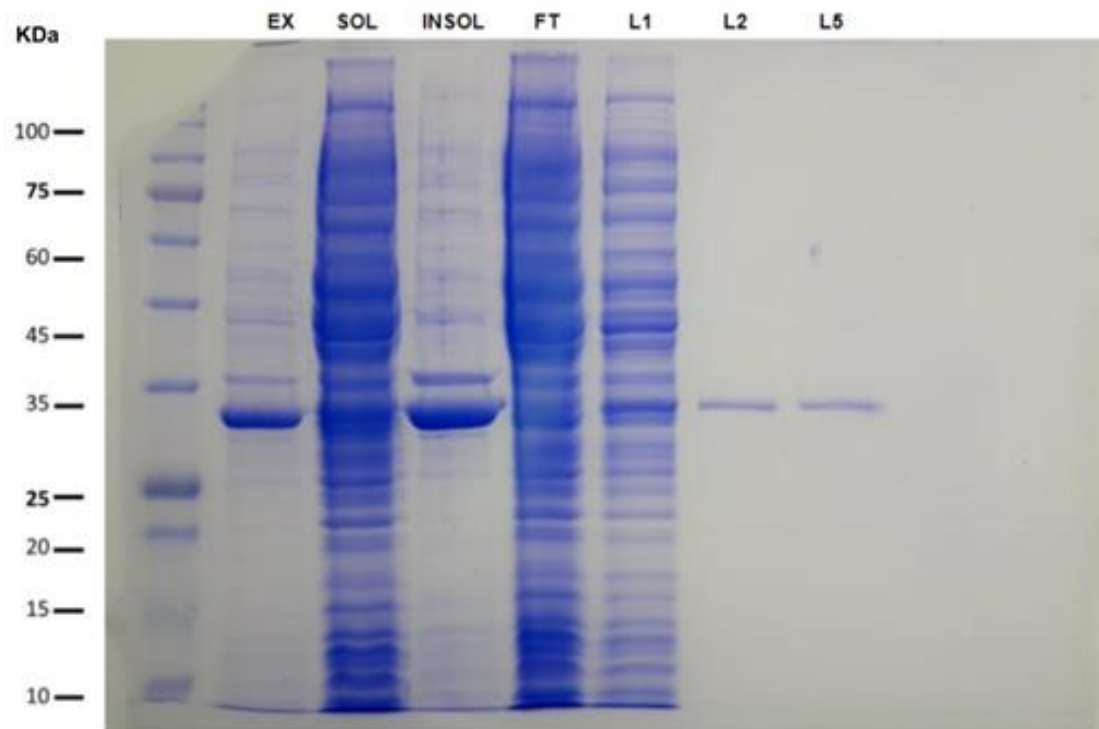


Figura 2: Análise por SDS-PAGE 12% das amostras das lavagens da cromatografia de afinidade: extrato total de proteínas (EX), e parte solúvel (SOL) e insolúvel (INSOL) coletadas após a centrifugação. O gel mostra também o *flowthrough* (FT), e lavagens L1, L2 e L5.

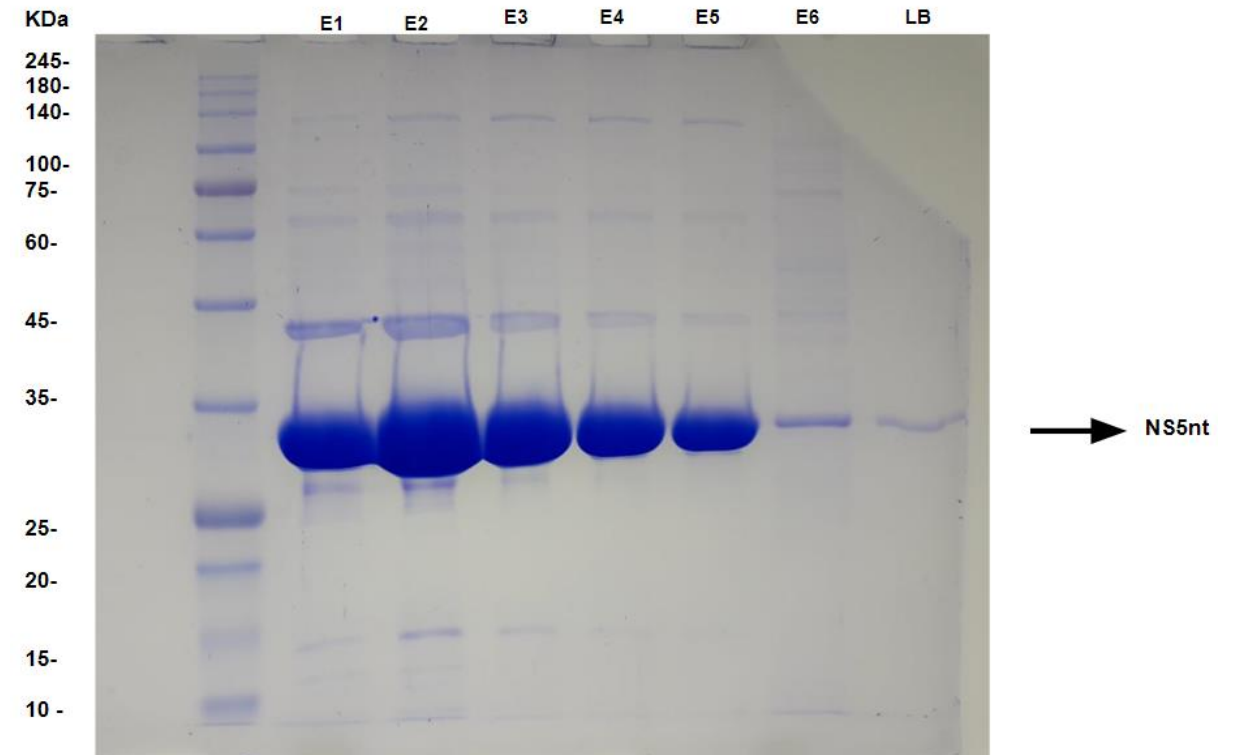


Figura 3: Análise por SDS-PAGE das amostras das eluições (E1, E2, E3, E4, E5 e E6) da cromatografia de afinidade uma lavagem de 5 ml com o tampão de eluição.

4.2. CROMATOGRAFIA POR EXCLUSÃO MOLECULAR

A amostra obtida na cromatografia de afinidade foi concentrada e aplicada na coluna de exclusão molecular. Após a passagem pela coluna, as amostras foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida (Figura 4) que mostrou que as frações do pico de absorvância apresentam a proteína de interesse com alto grau de pureza. No cromatograma (Figura 5), é possível observar que o pico principal, referente a NS5nt, é simétrico, indicando que a amostra está monodispersa.

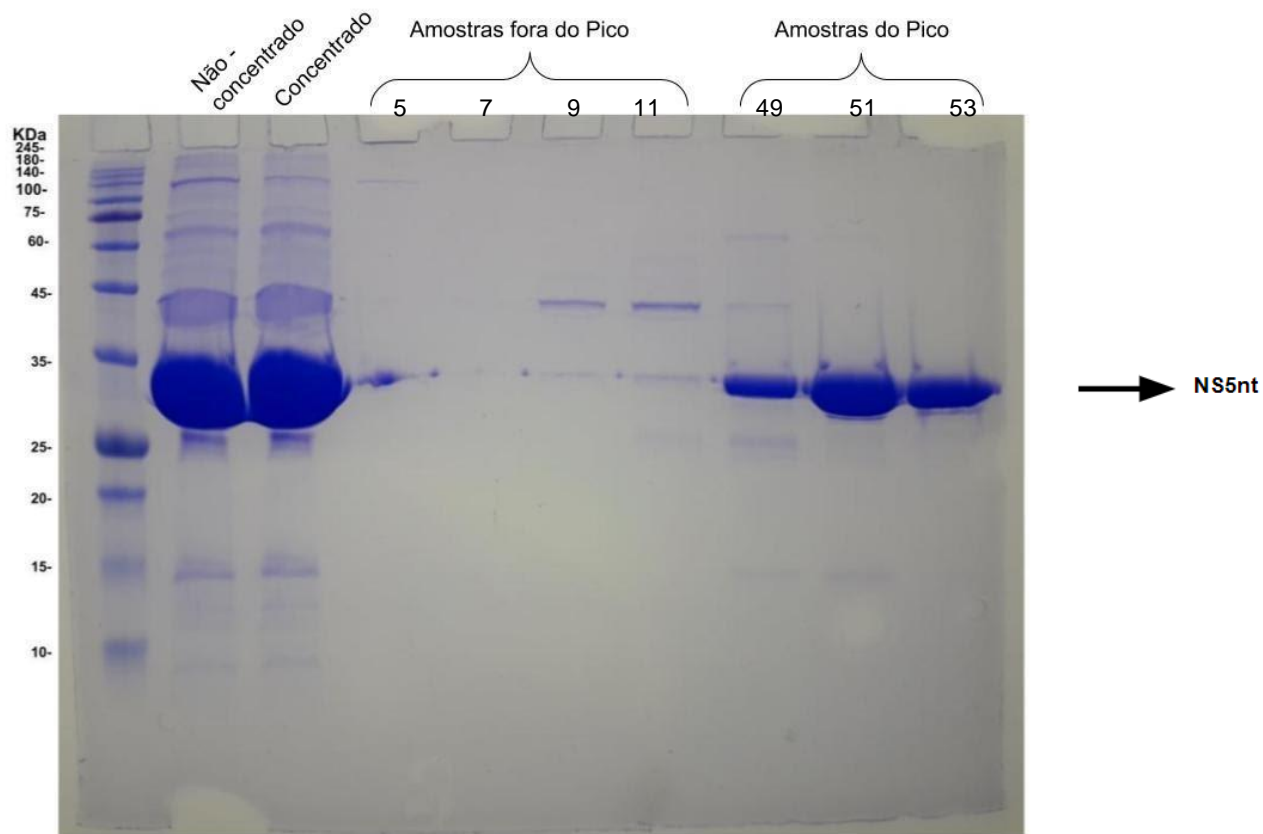


Figura 4: Análise por SDS-PAGE das amostras da cromatografia por exclusão de tamanho. Foram coletadas amostras antes e depois da concentração (“Não-concentrado” e “Concentrado”, respectivamente) assim como amostras do pico de absorvância e outras frações fora do pico conforme indicado na figura.

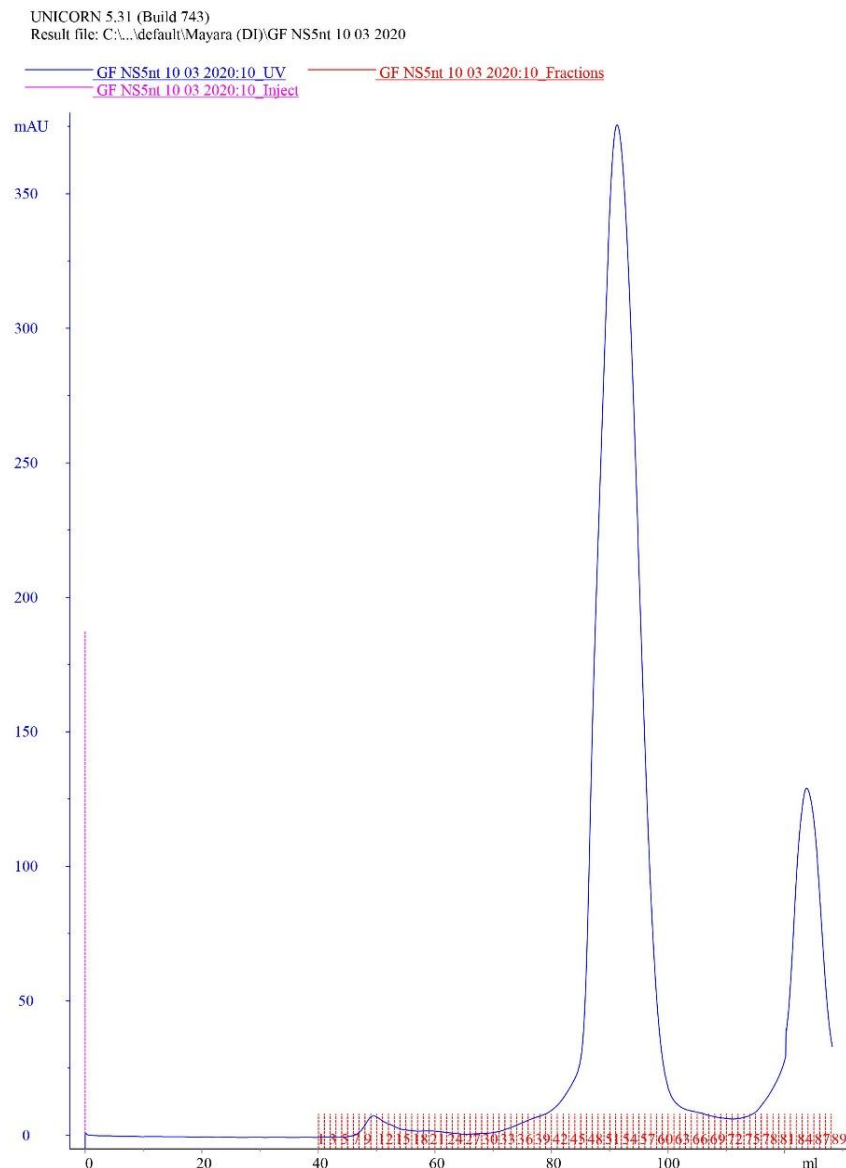


Figura 5: Perfil de eluição da cromatografia de exclusão molecular da proteína NS5nt obtido no AKTA FPLC. A curva em azul representa a absorvância a 280 nm.

4.3 ANÁLISE DAS AMOSTRAS CONSERVADAS

Para verificar se essa proteína pode ser armazenada, amostras conservadas em 3 temperaturas diferentes (4° C, -20° C e -80° C) nas etapas de purificação de Cromatografia de Afinidade, e Cromatografia por Exclusão Molecular foram analisadas por SDS-PAGE (Figura 6). A análise indica que não há indício de degradação das amostras.

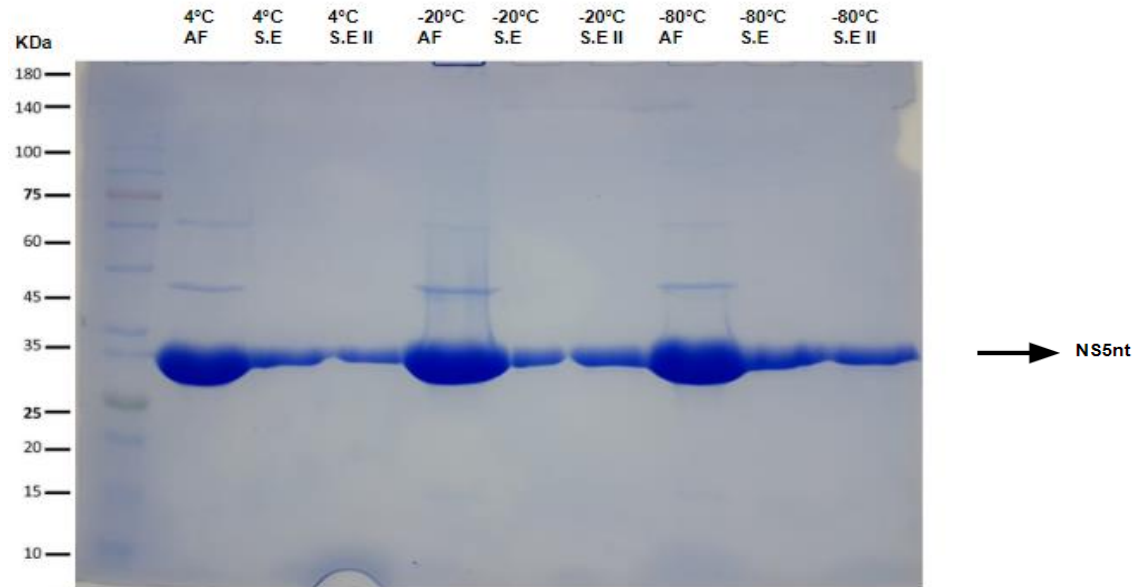


Figura 5: Análise por SDS-PAGE das amostras conservadas em diferentes temperaturas (4° C, -20° C e -80° C) nas etapas de purificação de Cromatografia de Afinidade (AF), e Cromatografia por Exclusão Molecular (S.E; S.EII).

CONCLUSÕES

Com este trabalho, foi possível reproduzir o protocolo de expressão e purificação do domínio N-terminal da proteína viral NS5 do ZIKV, já estabelecido pelo grupo, com alto grau de pureza e rendimento.

Além disso, conclui-se que essa proteína pode ser armazenada por cerca de 5 dias em temperaturas de 4° C, -20° C e -80° C. Esses resultados permitirão que o projeto avance para o desenvolvimento do ensaio de atividade.

BIBLIOGRAFIA

- COUTARD, B. et al. Zika Virus Methyltransferase: Structure and Functions for Drug Design Perspectives. **Journal of Virology**, v. 91, n. 5, p. 1-15, 2017.
- ISSUR, M. et al. The flavivirus NS5 protein is a true RNA guanylyltransferase that catalyzes a two-step reaction to form the RNA cap structure. **Rna**, v. 15, n. 12, p.2340-2350, 2009.
- LIM, Siew Pheng; NOBLE, Christian G.; SHI, Pei-yong. The dengue virus NS5 protein as a target for drug discovery. **Antiviral Research**, v. 119, p.57-67, 2015.
- PLOURDE, Anna R.; BLOCH, Evan M. A literature review of Zika Virus. **Emerging Infectious Diseases**, v. 22, n. 7, p. 1185-1192, 2016.
- SIROHI, D. et al. The 3.8 Å resolution cryo-EM structure of Zika virus. **Science**, v. 352, n. 6284, p. 467-470, 2016.
- WANG, Anyou. Zika Virus genome biology and molecular pathogenesis. **Emerging Microbes & Infections**, v. 6, n. 1, p. 1-6, 2017.
- ZHANG, C.; JIM, T., et al. Structure of the NS5 methyltransferase from Zika virus and implications in inhibitor design. **Science Direct**, v. 492, n. 4, p. 624-630, 2017.
- ZHAO, B. et al. Structure and function of the Zika virus full-length NS5 protein. **Nature Communications**, v. 8, p. 1-9, 2017.