

**Título em Português:** Obtenção da protease de ZIKV NS2B-NS3pro para avaliação de candidatos antivirais

**Título em Inglês:** Obtaining the ZIKV NS2B-NS3pro protease for evaluation of antiviral candidates

**Autor:** Isabela Dolci

**Instituição:** Universidade de São Paulo

**Unidade:** Instituto de Física de São Carlos

**Orientador:** Rafaela Sachetto Fernandes

**Área de Pesquisa / SubÁrea:** Biofísica Molecular

**Agência Financiadora:** FAPESP - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

## Expressão e purificação do complexo ZIKV NS2B-NS3 protease para triagem de candidatos antivirais

Isabela Dolci

Gabriela Dias Noske

Glaucius Oliva

Rafaela Sachetto Fernandes

USP São Carlos

isabela@estudante.ufscar.br

### Objetivos

O objetivo deste trabalho foi expressar, purificar e validar a atividade da protease recombinante da protease de Zika Vírus, ZIKV NS2B-NS3<sup>pro</sup>, para utilizá-la como alvo na busca de antivirais, por meio da avaliação de grandes bibliotecas de compostos em ensaios de atividade enzimática<sup>1</sup>.

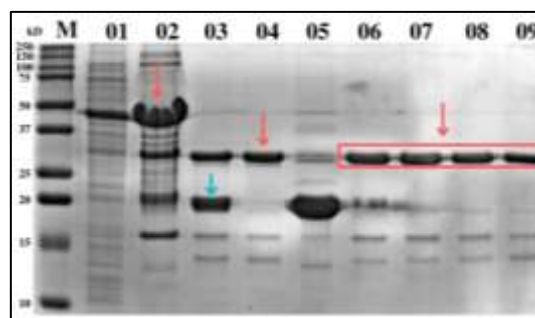
### Métodos e Procedimentos

Para a obtenção da protease recombinante de ZIKV, foi utilizada uma construção contendo os resíduos 45-96 do cofator NS2B ligados covalentemente aos resíduos 1-177 do domínio protease da NS3 por um linker rico em glicina [G4SG4]. O plasmídeo utilizado, denominado gZIPro, contém ainda, uma região codificante para uma cauda 6xHIS-tag e proteína de fusão SUMO ambos na porção N-terminal da proteína de interesse<sup>2</sup>. A expressão foi realizada em células de *E. coli* Rosetta 2 (DE3) através da indução com adição de 1 mM IPTG. A purificação foi realizada em duas etapas, iniciada por cromatografia de níquel-afinidade utilizando coluna HisTrap HP, seguida de cromatografia de exclusão molecular, realizada em uma coluna HiLoad 16/60 Superdex 75. O ensaio enzimático consistiu em medir a fluorescência obtida pela reação entre a NS2B-NS3<sup>pro</sup> e o substrato BZ-NKRR-AMC, que resulta na liberação de 7-amino-4-metilcumarina (AMC). A reação foi realizada em placas

Corning® de 384 poços, em tampão de reação. A NS2B-NS3<sup>pro</sup> foi adicionada a uma concentração final de 5 nM aos poços e, em seguida, o inibidor Aprotinina foi adicionado na concentração de 10 µM. Após 15 min de incubação à 37 °C, a reação foi iniciada com adição de substrato em uma concentração final de 30 µM. DMSO 1% foi utilizado como controle negativo.

### Resultados

A enzima foi obtida conforme descrito e os resultados das etapas de purificação foram analisados por SDS-PAGE (Figura 1).

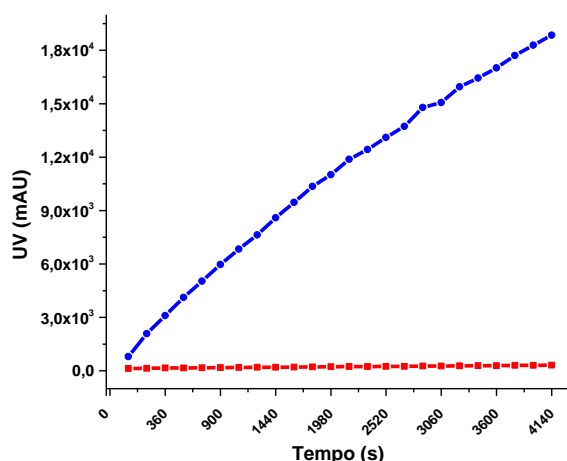


**Figura 1. Purificação do complexo NS2B-NS3<sup>pro</sup> analisada por SDS-PAGE.** A amostra M contém o marcador de peso molecular. As amostras de 01-10 contêm respectivamente, 01 - o lisado solúvel, 02 - fração eluída da primeira cromatografia de afinidade, 03 - pós clivagem pela TEV protease, 04 - *flowthrough* da segunda cromatografia de

afinidade, 05 - eluição da segunda afinidade, 06-09 – picos da cromatografia de exclusão molecular,

Como observado no SDS PAGE (Figura 1), a proteína foi obtida na afinidade 1 com tamanho esperado (~29kDa), e após a diálise, nota-se também a separação da proteína de fusão SUMO e da 6xHIS-tag (seta azul). Ao final da cromatografia de exclusão molecular, a NS2B-NS3<sup>pro</sup> foi obtida com pureza adequada e um elevado rendimento final de aproximadamente 9 mg de proteína por litro de cultura bacteriana.

A proteína purificada foi avaliada quanto à sua atividade enzimática, e como observado na Figura 2, a proteína encontra-se ativa e é capaz de clivar o substrato peptídico, atingindo níveis de fluorescência de 20.000 mAU. Já para a reação contendo o inibidor, aprotinina, mostrou ser altamente eficaz em inibir a atividade proteolítica da enzima, mantendo os níveis de leitura próximos de 0.



**Figura 2. Ensaio enzimático da NS2B-NS3<sup>pro</sup>.** Atividade da protease de ZIKV utilizando BZ-NKRR-AMC como substrato e aprotinina como inibidor. A fluorescência (eixo Y), foi medida a cada 1 min e 30 s (eixo X). A linha azul representa a leitura do substrato e a linha vermelha a leitura do substrato com aprotinina.

## Conclusão

A protease recombinante de ZIKV foi expressa e purificada com rendimento suficiente para os ensaios subsequentes. Sua atividade foi validada com o substrato peptídico e o inibidor Aprotinina, dessa forma, validando assim o ensaio enzimático que será utilizado nas triagens de alta performance para avaliação de grandes bibliotecas de moléculas.

## Referências Bibliográficas

1. Fernandes RS, Noske GD, Gawriljuk VO, et al. High-throughput Antiviral Assays to Screen for Inhibitors of Zika Virus Replication. *JoVE (Journal Vis Exp.* 2021;(176):e62422. doi:10.3791/62422
2. Phoo WW, Li Y, Zhang Z, et al. Structure of the NS2B-NS3 protease from Zika virus after self-cleavage. *Nat Commun* 2016 71. 2016;7(1):1-8. doi:10.1038/ncomms13410

## Expression and purification of the ZIKV NS2B-NS3 protease complex for screening of antiviral candidates.

Isabela Dolci

Gabriela Dias Noske

Glaucius Oliva

Rafaela Sachetto Fernandes

USP São Carlos

isabela@estudante.ufscar.br

### Objectives

The objective of this work was to express, purify and validate the activity of the recombinant Zika Virus protease, ZIKV NS2B-NS3<sup>pro</sup>, to use it as a target in the search for antivirals by evaluating large libraries of compounds in enzyme activity assays<sup>1</sup>.

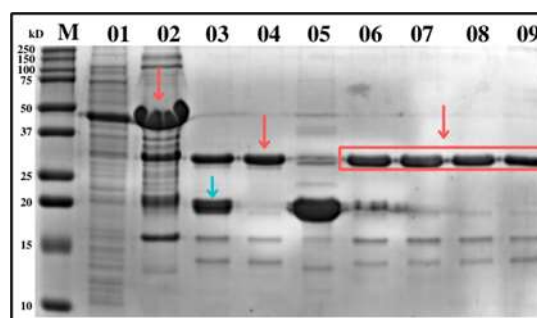
### Materials and Methods

To obtain the recombinant ZIKV protease, a construct containing residues 45-96 of the NS2B cofactor covalently linked to residues 1-177 of the NS3 protease domain by a glycine-rich linker [G4SG4] was used. The plasmid used, named gZIPro, also contains a region coding for a 6xHIS-tag tail and SUMO fusion protein both in the N-terminal portion of the protein of interest<sup>2</sup>. Expression was performed in *E. coli* Rosetta 2 (DE3) cells through induction with the addition of 1 mM IPTG. Purification was performed in two steps, initiated by nickel-affinity chromatography using a HisTrap HP column, followed by molecular exclusion chromatography performed on a HiLoad 16/60 Superdex 75 column. The enzymatic assay consisted in measuring the fluorescence obtained by the reaction between NS2B-NS3<sup>pro</sup> and the substrate BZ-NKRR-AMC, which results in the release of 7-amino-4-methylcoumarin (AMC). The reaction was performed in 384-well Corning® plates in reaction buffer. NS2B-NS3<sup>pro</sup> was added at a final concentration of 5 nM to the wells, and then the inhibitor Aprotinin was added at a concentration of 10  $\mu$ M. After 15 min of

incubation at 37 °C, the reaction was started by adding substrate at a final concentration of 30  $\mu$ M. DMSO 1% was used as a negative control.

### Results

The enzyme was obtained as described and the results of the purification steps were analyzed by SDS-PAGE (Figure 1)



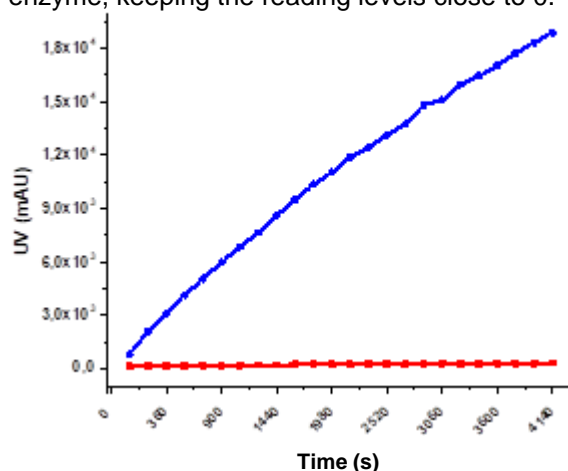
**Figure 1. Purification of the NS2B-NS3<sup>pro</sup> complex analyzed by SDS-PAGE.** Sample M contains the molecular weight marker. Samples 01-10 contain respectively, 01 - the soluble lysate, 02 - eluted fraction from the first affinity chromatography, 03 - post cleavage by TEV protease, 04 - flowthrough from the second affinity chromatography, 05 - elution from the second affinity, 06-09 - peaks from molecular exclusion chromatography

As observed on SDS PAGE (Figure 1), the protein was obtained at affinity 1 with expected size (~29kDa), and after dialysis, separation of the SUMO fusion protein and 6xHIS-tag is also noted (blue arrow). At the end of molecular

exclusion chromatography, NS2B-NS3<sup>pro</sup> was obtained with adequate purity and a high final yield of approximately 9 mg of protein per liter of bacterial culture.

of the NS2B-NS3 protease from Zika virus after self-cleavage. *Nat Commun* 2016 71. 2016;7(1):1-8. doi:10.1038/ncomms13410

The purified protein was evaluated for its enzymatic activity, and as observed in Figure 2, the protein is active and able to cleave the peptide substrate, reaching fluorescence levels of 20,000 mAU. As for the reaction containing the inhibitor, aprotinin, it proved to be highly effective in inhibiting the proteolytic activity of the enzyme, keeping the reading levels close to 0.



**Figure 2. enzyme assay of NS2B-NS3<sup>pro</sup>.** ZIKV protease activity using BZ-NKRR-AMC as substrate and aprotinin as inhibitor. Fluorescence (Y axis), was measured every 1 min and 30 s (X axis). The blue line represents the substrate reading and the red line represents the substrate reading with aprotinin.

## Conclusions

The recombinant ZIKV protease was expressed and purified with sufficient yield for subsequent assays. Its activity was validated with the peptide substrate and the inhibitor Aprotinin, thus validating the enzyme assay that will be used in high-performance screening to evaluate large libraries of molecules.

## References

1. Fernandes RS, Noske GD, Gawriljuk VO, et al. High-throughput Antiviral Assays to Screen for Inhibitors of Zika Virus Replication. *JoVE (Journal Vis Exp)*. 2021;(176):e62422. doi:10.3791/62422
2. Phoo WW, Li Y, Zhang Z, et al. Structure