

Título em Português: metiltransferase de flavívirus como obtê-las?

Título em Inglês: flavivirus methyltransferase how to obtain them?

Autor: Letícia Piazzentin Dantas

Instituição: Universidade Federal de São Carlos / Universidade de São Paulo

Unidade: Instituto de Física de São Carlos

Orientador: Nathalya Cristina de Moraes Roso Mesquita

Área de Pesquisa /
SubÁrea: Biologia Molecular

Agência Financiadora: Sem fomento

METILTRANSFERASE DE FLAVIVÍRUS COMO OBTÊ-LAS?

Letícia Piazzentin Dantas¹

Glaucius Oliva²

Nathalya Cristina de Moraes Roso Mesquita²

¹ Universidade Federal de São Carlos, ² Universidade de São Paulo

leticiadantas@estudante.ufscar.br; nathy.mesquita2016@gmail.com

Objetivo

Os flavivírus são uma classe viral responsável por causar inúmeras doenças recorrentes em seres vivos, como Febre Amarela, Dengue e Febre Zika, podendo ou não deixar sequelas severas nos mesmos. Até o momento não existem vacinas ou medicamentos disponíveis para tratamentos dessas viroses, demonstrando a necessidade de melhor compreensão com relação a seus processos de infecção, co-infecção e replicação viral, bem como de compostos químicos que impeçam tais processos (DUTTA SK; LANGENBURG T, 2023). Flavivírus possuem como material genético uma fita simples positiva de RNA que codifica uma única poliproteína. Essa poliproteína é clivada em 3 proteínas estruturais e 7 proteínas não-estruturais necessárias para o processo de envelopamento e replicação viral, respectivamente (ZHOU et al., 2007). Dentre essas proteínas, a metiltransferase é domínio proteico presente na porção N-terminal da proteína não-estrutural 5 (NS5) dos flavivírus. Essa proteína possui uma das funções enzimáticas imprescindíveis para replicação viral e ainda pouco explorado. Assim, as metiltransferases são alvos promissores para o desenvolvimento de busca e desenvolvimento de antivirais (H;ZHANG, 2014). Assim, o presente trabalho visa o estabelecimento de protocolos de clonagem, expressão e purificação das metiltransferases de flavivírus circulantes no Brasil.

Métodos e Procedimentos

Inicialmente foi realizada uma análise bioinformática dos genomas dos vírus causadores da Febre Amarela (YFV) e da Febre Zika (ZIKV) para a identificação das sequências gênicas codificantes das metiltransferases. Os fragmentos gênicos identificados foram sintetizados com códons otimizados para a expressão em células *Escherichia coli* Rosetta 2 (DE3). Os genes foram amplificados e implementados em plasmídeo de expressão via sistema *Ligation Independent Cloning* (LIC). Sequencialmente, para avaliação da expressão das metiltransferases foram realizados testes em condições diferentes de temperatura (18°C e 37 °C) e meios de cultura (ZYM5052 e LB), variando os tempos de indução.

Resultados

A clonagem foi realizada em diferentes vetores de expressão tipo pET, utilizando o sistema *Ligation Independent Cloning* (LIC), no qual permitiu uma integração mais rápida e eficiente dos fragmentos de codificante da proteína nos vetores de interesse.

A inserção dos genes foi confirmada por amplificação via PCR e sequenciados para verificação de sua identidade codificante, obtendo como melhor conjunto de gene codificante e vetor de expressão com

sequência codificante o vetor pETM11+NS5Methyltransferase, tanto para a proteína dos vírus da Febre Amarela quanto para a proteína do vírus da Zika. Os vetores de expressão pETtrx e pETNUS também obtiveram resultado significativo, entretanto, optou-se pelo pETM11 pela eficiência para esta proteína e detalhamento da literatura.

Testes de expressão foram realizados em meio autoindutor, ZYM5052 (F.W. Studier. 2005) e meio Luria Broth (LB) - induzido por *isopropylthio-β-galactoside* (IPTG). Além disso, para garantir a variabilidade e a completude dos resultados, os experimentos foram prolongados em diferentes temperaturas controladas, sendo elas de 18°C e de 37°C, durante o período de 1 noite. Assim, teve como resultado uma expressão bacteriana significativa quando utilizado o meio autoindutor a 18°C tanto para a metiltransferase do vírus causador da Febre Amarela quanto para a mesma proteína do vírus causador da Febre Zika.

Referências

- DUTTA SK;LANGENBURG T. A Perspective on Current Flavivirus Vaccine Development: A Brief Review. *Viruses*, v. 15, n. 4, 2023.
- H;ZHANG, Dong. Flavivirus methyltransferase: a novel antiviral target. *Antiviral research*, v. 80, n. 1, 2014. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18571739/>>. Acesso em: 13 set. 2024.
- H;FINK, Dong. Flavivirus RNA methylation. *The Journal of general virology*, v. 95, n. Pt 4, 2014. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24486628/>>. Acesso em: 13 set. 2024.
- PJ, Jong. Ligation-independent cloning of PCR products (LIC-PCR). *Nucleic acids research*, v. 18, n. 20, 2014. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2235490/>>. Acesso em: 13 set. 2024.
- F.W. Studier. Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures. *Prot. Exp. Pur.* 41, 207-234. L, 2005.

Conclusões

É possível concluir que até o momento estabelecemos um bom meio de clonagem dos genes de interesse, em diferentes vetores de expressão, tipo pET. Ainda, foi possível determinar as melhores condições de crescimento bacteriano e expressão de proteína, sendo elas: meio ZYM-5052 à 18°C.

Agradecimentos

Agradeço à minha orientadora Nathalya por todo empenho e dedicação para me ensinar. Aos companheiros de laboratório por todo o suporte. Ao professor Glaucius Oliva por ter me inserido nesse projeto.

A Fapesp pelo fomento de pesquisa do CIBFar através do projeto: 2013/07600-3; e do projeto:2023/01046-6.

FLAVIVIRUS METHYLTRANSFERASE HOW TO OBTAIN THEM?

Letícia Piazzentin Dantas¹

Glaucius Oliva²

Nathalya Cristina de Moraes Roso Mesquita²

¹ Universidade Federal de São Carlos, ² Universidade de São Paulo

leticiadantas@estudante.ufscar.br; nathy.mesquita2016@gmail.com

Objectives

Flaviviruses are a viral class responsible for causing numerous recurrent diseases in living beings, such as Yellow Fever, Dengue, and Zika Fever, which may or may not leave severe sequelae. So far, there are no vaccines or drugs available for the treatment of these viral diseases, highlighting the need for a better understanding of their infection, co-infection, and viral replication processes, as well as chemical compounds that can prevent these processes (DUTTA SK; LANGENBURG T, 2023). Flaviviruses possess positive single-stranded RNA as their genetic material, which encodes a single polyprotein. This polyprotein is cleaved into 3 structural proteins and 7 non-structural proteins necessary for the viral encapsulation and replication processes, respectively (ZHOU et al., 2007). Among these proteins, methyltransferase is a protein domain present in the N-terminal portion of the non-structural protein 5 (NS5) of flaviviruses. This protein has one of the essential enzymatic functions for viral replication, which is still underexplored. Therefore, methyltransferases are promising targets for the search and development of antiviral agents (H;ZHANG, 2014). Thus, the present work aims to establish protocols for the cloning, expression, and purification of methyltransferases from flaviviruses circulating in Brazil

Materials and Methods

Initially, a bioinformatic analysis was carried out on the genomes of the viruses that cause Yellow Fever (YFV) and Zika Fever (ZIKV) to identify the gene sequences coding for methyltransferases. The identified gene fragments were synthesized with codons optimized for expression in *Escherichia coli* Rosetta 2 (DE3) cells. The genes were amplified and implemented into an expression plasmid via the Ligation Independent Cloning (LIC) system.

Sequentially, to evaluate the expression of methyltransferases, tests were carried out under different temperature conditions (18°C and 37 °C) and culture media (ZYM5052 and LB), varying the induction times.

Results

Cloning was performed in different pET-type expression vectors using the Ligation Independent Cloning (LIC) system, which allowed for faster and more efficient integration of the protein-coding fragments into the vectors of interest.

The insertion of the genes was confirmed by PCR amplification and sequencing to verify their coding identity, resulting in the best combination of coding gene and expression vector being the pETM11+NS5Methyltransferase vector, both for

the Yellow Fever virus protein and the Zika virus protein. The expression vectors pETtrx and pETNUS also yielded significant results; however, the pETM11 was chosen for its efficiency with this protein and detailed literature support.

Expression tests were carried out in autoinduction medium, ZYM5052 (F.W. Studier, 2005), and Luria Broth (LB) induced by isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG). Additionally, to ensure variability and completeness of the results, experiments were extended at controlled temperatures of 18°C and 37°C for one night. This resulted in significant bacterial expression when using the autoinduction medium at 18°C for both the Yellow Fever virus methyltransferase and the Zika virus methyltransferase.

H;ZHANG, Dong. Flavivirus methyltransferase: a novel antiviral target. *Antiviral research*, v. 80, n. 1, 2014. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18571739/>>.

Acesso em: 13 set. 2024.

H;FINK, Dong. Flavivirus RNA methylation. *The Journal of general virology*, v. 95, n. Pt 4, 2014. Disponível em:

<<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24486628/>>.

Acesso em: 13 set. 2024.

PJ, Jong. Ligation-independent cloning of PCR products (LIC-PCR). *Nucleic acids research*, v. 18, n. 20, 2014. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2235490/>>.

Acesso em: 13 set. 2024.

F.W. Studier. Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures. *Prot. Exp. Pur.* 41, 207-234. L, 2005.

Conclusions

It is possible to conclude that so far we have established a good means of cloning the genes of interest, in different expression vectors, such as pET. Furthermore, it was possible to determine the best conditions for bacterial growth and protein expression, namely: ZYM-5052 medium at 18°C.

Acknowledgements

I thank my advisor Nathalya for all her commitment and dedication to teaching me. To my lab mates for all their support. To Professor Glaucius Oliva for including me in this project. Fapesp for supporting CIBFar research through the project: 2013/07600-3; and project:2023/01046-6.

References

DUTTA SK;LANGENBURG T. A Perspective on Current Flavivirus Vaccine Development: A Brief Review. *Viruses*, v. 15, n. 4, 2023.