

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA

Trabalho de Conclusão de Curso

Leticia Piazzentin Dantas

Otimização de protocolos de expressão e purificação de metiltransferases de ZIKV e YFV.

São Carlos
2025

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA

Trabalho de Conclusão de Curso

Leticia Piazzentin Dantas

Otimização de protocolos de expressão e purificação de metiltransferases de ZIKV e YFV.

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado junto à Universidade Federal de São Carlos como requisito para obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador: Nathalya Cristina de Moraes Roso Mesquita

Co-orientador: Profa. Dra. Andrea Soares da Costa Fuentes

São Carlos
2025

Dedico esse trabalho a todas as mulheres da minha vida, que sempre foram um exemplo e inspiração para mim.

AGRADECIMENTOS

Expresso minha mais profunda gratidão aos meus pais, Robson e Daniele, que sempre se dedicaram incansavelmente para que eu pudesse alcançar este marco tão importante em minha vida. Sou imensamente grata pelo incentivo constante, pela educação exemplar e pelo amor incondicional.

À minha irmã Larissa, por ser meu alicerce, por estar presente em todos os momentos desafiadores e por compartilhar comigo cada etapa da vida.

À minha irmã Ana Laura, por ser a motivação para que eu me torne uma pessoa melhor e por trazer alegria à minha vida.

À minha madrinha Graziela e à minha avó Ivanilde, por estarem sempre ao meu lado e serem exemplos de ser humano.

À Giovanna e à Luana, pela parceria inabalável e por alegrarem minha vida.

Ao Gustavo, meu companheiro nesta jornada, sou grata pelo apoio incondicional, pela paciência e por me ouvir. Estendo também a minha gratidão aos meus sogros, Fátima e Júlio, por me acolherem com tanto amor.

À minha avó Laura, que mesmo do céu sei que guiou meus passos, agradeço a cada ensinamento, comidas deliciosas, por ter sido o porto seguro para a nossa família. Cada memória criada sempre estará no meu coração.

Aos meus amigos, que tornaram essa etapa tão importante mais leve e cheia de alegria, minha mais sincera gratidão.

Aos professores da UFSCar, por serem exemplos de excelência profissional e por inspirarem meu desejo de seguir em frente na carreira acadêmica.

À minha orientadora, Nathalya, por cada ensinamento, por ser um exemplo de profissional e mulher. Pela confiança e orientação que foram fundamentais para o meu desenvolvimento pessoal.

À todas as pessoas do Centro de Pesquisa e Inovação em Biodiversidade e Fármacos (CIBFar) agradeço pela convivência e pelo aprendizado adquirido no laboratório, que foram imprescindíveis para a minha formação.

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo a otimização de protocolos para a expressão e purificação de metiltransferases dos vírus Zika (ZIKV) e Febre Amarela (YFV), pertencentes ao gênero Flavivirus, que inclui importantes patógenos associados a surtos epidêmicos e graves complicações, como microcefalia, síndrome de Guillain-Barré e hepatite hemorrágica. Esses vírus possuem genomas de RNA com um cap 5' modificado por metiltransferases (MTase), garantindo maior estabilidade e evasão do sistema imunológico do hospedeiro. Para explorar essas proteínas como potenciais alvos terapêuticos, foram realizados testes de expressão em *Escherichia coli Rosetta DE3*, identificando como condições ideais o plasmídeo M11, o meio ZYM 5052 e a temperatura de 18°C, para metiltransferase do vírus causador da Febre Amarela e para metiltransferase do vírus causador da Febre Zika. A purificação da metiltransferase de YFV foi realizada por cromatografia de afinidade e exclusão molecular, resultando em proteínas de alta pureza e uma estabilidade no tampão HEPES (NaOH) (pH 7,5, 500 mM de NaCl e 5% de glicerol), no qual é ideal para preservação funcional da proteína. No entanto, a metiltransferase do vírus Zika apresentou uma menor eficiência no processo de purificação, o que impactou negativamente sua estabilidade e rendimento final. Este estudo fornece uma base sólida de expressão e purificação de metiltransferases para futuras investigações bioquímicas e estruturais, além de contribuir para o avanço no desenvolvimento de estratégias antivirais contra esses flavivírus. As próximas etapas de trabalho incluem a otimização do protocolo de purificação de metiltransferase de ZIKV, caracterização biofísica, bioquímica e estrutural das metiltransferases, utilizando técnicas como, cromatografia de exclusão de tamanho (SEC) com dispersão de luz multiangular (MALS) (SEC-MALS), fluorimetria de varredura diferencial (*Differential Scanning Fluorimetry* - DSF), dicroísmo circular (*Circular Dichroism* - CD), espectroscopia de fluorescência e cristalografia de raios-X, além de análises funcionais de atividade enzimática.

Palavras-chaves: Flavivírus, Metiltransferase, Expressão, Purificação.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: (a) Representação da estrutura dos flavivírus. (b) Esquema da organização genômica dos flavivírus.	13
Figura 2: Representação tridimensional da estrutura molecular do domínio MTase.....	14
Figura 3: Representação do processo de metilação de flavivírus.....	16
Figura 4: Predição da estrutura secundária da metiltransferase de ZIKV.....	24
Figura 5: Predição da estrutura secundária da metiltransferase de YFV.....	25
Figura 6: Teste de expressão.....	26
Figura 7:Análise de solubilidade das metiltransferase YFV pETM11 (A) e ZIKV pETM11 (B) sob distintas condições de expressão.....	27
Figura 8: Purificação inicial das metiltransferases de ZIKV (A) e YFV (B), baseada no protocolo de Furtado, 2022.....	28
Figura 9: Purificação das metiltransferases de ZIKV (A) e YFV (B).....	29
Figura 10: Cromatogramas obtidos durante a etapa de cromatografia por gel filtração para purificação das metiltransferases de YFV (A) e ZIKV (B).....	30

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Tampões utilizados para a purificação de metiltransferases de flavivírus.....	22
Tabela 2: Características físico-químicas das metiltransferases de YFV e ZIKV.....	25
Tabela 3: Condições do teste de expressão.....	26
Tabela 4: Comparação das condições de estabilidade térmica da metiltransferase de YFV em diferentes tampões. A tabela apresenta os valores de temperatura de melting (T_m) determinados por Fluorescência Diferencia.....	31

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	8
1.1. Flavivírus.....	8
1.1.1. Zika Vírus.....	8
1.1.2. Febre Amarela.....	10
1.1.2.1. Biologia estrutural.....	12
1.2. Metilação.....	13
1.2.1. Metiltransferase de flavivírus (NS5).....	13
2. OBJETIVOS.....	17
2.1. Objetivos gerais.....	17
2.2. Objetivos Específicos.....	17
3. METODOLOGIA.....	18
3.1. Clonagem.....	18
3.2. Transformação.....	18
3.3. Expressão.....	19
3.3.1. Teste de expressão em baixa escala.....	19
3.3.2. Expressão em grande volume.....	19
3.4. Teste de solubilidade.....	20
3.5. Purificação.....	20
4. RESULTADOS.....	22
4.1. Análise de Bioinformática.....	22
4.2. Expressão.....	25
4.3. Teste de solubilidade.....	26
4.4. Purificação.....	27
4.5. Estabilidade térmica.....	31
4.6. Protocolos.....	32
5. CONCLUSÃO.....	32
6. PERSPECTIVAS.....	33
7. REFERÊNCIAS.....	34
8. ANEXOS.....	36
8.1. ANEXO A- Protocolo de expressão e purificação de YFV.....	36
8.2. ANEXO B- Protocolo de expressão de ZIKV.....	42

1. INTRODUÇÃO

1.1. Flavivírus

O gênero flavivírus possui cerca de 80 membros, entre eles, o vírus Zika, o vírus da febre amarela e o vírus da dengue. Derivado da palavra latina *flavus*, que significa "amarelo" em alusão à icterícia provocada pelo vírus da febre amarela (YFV). Com a elevação das temperaturas globais, a distribuição geográfica dos flavivírus está se expandindo devido à ampliação dos habitats de seus vetores, configurando um cenário alarmante para a saúde pública (NICHOLLS; MADHUMATI SEVVANA; KUHN, 2020).

1.1.1. Zika Vírus

O vírus Zika é um arbovírus pertencente ao gênero *Flavivirus* (família *Flaviviridae*), cuja transmissão ocorre por meio de artrópodes, especificamente mosquitos, apresentando dois ciclos distintos de disseminação (Weaver et al., 2016). O ciclo silvestre ocorre em florestas, onde o vírus é mantido em um ciclo zoonótico envolvendo primatas não humanos e mosquitos arbóreos (*Aedes africanus*, *Haemagogus* e *Sabethes*), enquanto o ciclo urbano predomina em áreas urbanas, envolvendo a transmissão entre humanos e mosquitos adaptados ao ambiente urbano (*Aedes aegypti*) (SONG et al., 2017).

O vírus Zika foi isolado pela primeira vez em 1947 a partir de um macaco *rhesus* febril encontrado na Floresta Zika, em Uganda. Posteriormente, também foi identificado em mosquitos *Aedes africanus* oriundos da mesma região. A primeira infecção humana documentada ocorreu em 1954, na Nigéria. No entanto, até 2007, os casos registrados foram esporádicos. Nesse ano, ocorreu uma infecção massiva em Yap, na Micronésia, marcando a primeira associação do vírus com a Síndrome de Guillain-Barré (Song et al., 2017).

Posteriormente, surtos foram registrados na Polinésia Francesa, Ilhas Cook, Ilha de Páscoa, Nova Caledônia e, mais tarde, nas Américas, com registros esporádicos também na Europa (Musso; Gubler, 2016). Durante os surtos na Polinésia Francesa, houve um aumento concomitante de complicações neurológicas, como a Síndrome de Guillain-Barré, consolidando sua associação com a infecção pelo vírus Zika (SONG et al., 2017).

Os primeiros casos de aparição do ZIKV no Brasil foram registrados em 2015, nos estados de Pernambuco, Rio Grande do Norte e Bahia, sequencialmente o vírus se disseminou por todas as regiões brasileiras. Neste mesmo ano, médicos observaram a

crescente de casos de microcefalia associados com as grávidas infectadas pelo vírus, concluindo assim, uma transmissão mãe-feto (BELOUSHI et al., 2024).

No ano de 2016, o Brasil entrou em uma condição de emergência de saúde pública, visto que a Febre Zika se espalhou por todo o país, exceto em áreas da Amazônia e no extremo sul, sendo registrados 205.578 casos de infecção pelo vírus Zika durante esse ano (S. C. WEAVER et al., 2016).

Nos anos subsequentes, houve uma queda brusca em números de casos, segundo o Ministério da Saúde, em 2018, foram registrados 8.104 casos prováveis da doença causada pelo vírus Zika no país. Em 2023, o Brasil observou um aumento de 1% nos casos de ZIKV, comparado a 2022, totalizando 7.275 registros. No primeiro semestre de 2024, o país já contabiliza 8.519 casos prováveis de Zika, correspondendo a 9% de aumento no número de casos registrados no mesmo período do ano anterior. O aumento da incidência da doença causa preocupação e um esforço dobrado de diagnóstico e tratamento dessas infecções pela comunidade médica (Boletim Epidemiológico, 2024).

Os sintomas clínicos da Febre Zika são, principalmente, febre, fadiga, dor de cabeça, dores nas articulações e conjuntivite, problemas na coagulação, semelhantes aos sintomas da dengue. Adicionalmente, alguns pacientes também podem manifestar sintomas como vômitos, diarreia, vermelhidão nos olhos, fraqueza, inchaço, dor abdominal, perda de apetite e até mesmo hematospermia. Os sintomas duram em média 7 dias. A maioria dos infectados pelo vírus são assintomáticos ou apresentam sintomas leves (MUSSO; GUBLER, 2016). Entretanto, possui o potencial de causar graves enfermidades, como abortos espontâneos (Shehu et al., 2018), microcefalia e malformações neurológicas em fetos de mães infectadas (Mlakar et al., 2016), e a síndrome de Guillain-Barré (SGB) em adultos (Cao-Lormeau et al., 2016).

O diagnóstico do vírus Zika é realizado, principalmente, por meio da detecção do RNA viral, utilizando a técnica de reação em cadeia da polimerase de transcrição reversa (RT-PCR). Esse método permite a identificação do vírus até sete dias após o início dos sintomas. Além disso, testes imunológicos para detecção de anticorpos IgM e IgG são usados, sendo particularmente úteis após a fase aguda, quando o RNA viral já não é mais detectável (MUNOZ-JORDAN, 2017).

Hodiernamente, não há vacinas e medicamentos específicos para o tratamento da Febre Zika. No caso de infecção, são tratados apenas os sintomas, sendo recomendado o uso de analgésicos para o controle da febre e amenizar as dores, repouso e ingestão de

líquidos. A administração de ácido acetilsalicílico não é permitida devido ao risco de complicações hemorrágicas (Ministério da Saúde, 2024).

Com o aumento de casos do ZIKV é de extrema necessidade um melhor conhecimento do funcionamento viral, para que assim possa-se avançar no desenvolvimento de vacinas e medicamentos específicos.

1.1.2. Febre Amarela

A Febre Amarela (FA) é uma das doenças mais fatais da humanidade (MONTALVO ZURBIA-FLORES; ROLLIER; REYES-SANDOVAL, 2021). A transmissão do YFV pode ocorrer em 3 ciclos diferentes, com vetores e hospedeiros distintos. O ciclo silvestre é a transmissão entre primatas não-humanos (NHPs) e os mosquitos zoofílicos; no ciclo intermediário, o vírus pode ser transmitido dos primatas não-humanos para os seres humanos através da picada de mosquitos antropozófilos; e o ciclo urbano acontece quando indivíduos infectados são picados por mosquitos antropozófilos infectados pelo vírus, *Aedes aegypti* e *Haemagogus* são os principais vetores epidêmicos do vírus da Febre Amarela (WAGGONER; ROJAS; PINSKY, 2018).

O vírus da Febre Amarela (YFV) surgiu na África, e se dissipou pelo hemisfério ocidental na época da escravidão. Os navios negreiros transportavam os escravos acometidos pela doença e os mosquitos vetores infectados. A primeira epidemia registrada ocorreu na península de Yucatán em 1648. No século XVIII, a Febre Amarela se alastrou pela América resultando em grandes surtos epidemiológicos, principalmente, na América do Norte (Nova Iorque, Boston, Baltimore, Filadélfia e Veracruz). Também houve surtos de grande escala na África e Europa (LITVOC; TERRA; IGOR, 2018).

O YFV também teve um impacto significativo nas políticas públicas. Um exemplo notável foi durante a Guerra Hispano-Americana (1898) em Cuba, onde um grande número de soldados morreu não devido aos combates, mas sim por estarem contaminados com o vírus. A alta mortalidade causada pela febre amarela evidenciou a necessidade de medidas sanitárias mais rigorosas, impulsionando pesquisas sobre a transmissão da doença. (GOTSCHLICH, 2005).

No ciclo silvestre, em áreas florestais, a Febre Amarela tem como vetor principal o mosquito *Haemagogus*, segundo dados de 1938. Em 1981, Carlos Finday descobriu que o mosquito *Aedes aegypti* através da sua picada conseguia transmitir a doença para humanos, levando esse ciclo para área urbana. Entretanto, apenas em 1900, através de estudos, o americano Walter Reed confirmou o agente transmissor entre humanos. Desta

forma, foi organizado um controle do vetor para a diminuição da incidência dos casos de FA (WAGGONER; ROJAS; PINSKY, 2018).

No Brasil, os primeiros casos de Febre Amarela apareceram no século XVII. O Rio de Janeiro enfrentou um grande desafio contra a enfermidade epidêmica em 1903. Para o controle da endemia foram adotadas medidas no combate do *Aedes aegypti* (LITVOC; TERRA; IGOR, 2018).

O isolamento do vírus ocorreu em 1927 por Adrian Stokes, em Gana, através da inoculação de sangue humano sintomático em macacos (TUELLS; HENAO-MARTÍNEZ; FRANCO-PAREDES, 2022). A partir da linhagem isolada foi possível o desenvolvimento da vacina 17D, em 1937, por Max Theiler (WAGGONER; ROJAS; PINSKY, 2018).

Desde o último caso urbano da doença em 1942, a maioria dos novos casos de Febre Amarela no Brasil ocorreram em áreas endêmicas próximas à região amazônica. Portanto, a vacinação era recomendada apenas para aqueles que moravam ou viajavam para essas áreas específicas. No entanto, a partir do ano 2000, o vírus começou a circular em outras regiões, incluindo o Centro-Oeste, Sul e Sudeste do país. Isso resultou em surtos significativos nos estados como Minas Gerais e Rio Grande do Sul entre 2002 e 2003, e posteriormente nos estados de Tocantins, Mato Grosso do Sul, Goiás, São Paulo, Rio Grande do Sul e Paraná, durante o período de 2007 a 2009 (CAMARA; DE; GOMES, 2013).

Com o aumento da população não vacinada na última década e surtos em áreas não-endêmicas, os riscos de um ressurgimento urbano da doença aumentaram. Esse perigo se tornou mais claro a partir de 2016, com um dos maiores surtos silvestres dos últimos 70 anos no país. Em menos de um ano, o vírus se espalhou pelos três estados mais populosos do Brasil, onde a cobertura vacinal era baixa, intensificando os riscos de casos urbanos em cidades como Rio de Janeiro e São Paulo (INGRID et al., 2020).

De 1980 a 2015, houve 789 casos humanos confirmados de Febre Amarela, enquanto entre 2016 e junho de 2020, foram registrados mais de 2200 casos, resultando em 773 mortes. Para enfrentar os surtos, foram conduzidas campanhas de vacinação em massa, sendo necessário fracionar as doses devido à escassez do imunizante, a fim de vacinar mais de 45 milhões de brasileiros entre 2016 e 2018. Embora o número de casos humanos tenha diminuído após 2018, a presença contínua do vírus foi observada em primatas não-humanos nas regiões Sul e Sudeste do Brasil por seis anos consecutivos, sugerindo a persistência do vírus nessas áreas silvestres próximas aos grandes centros urbanos (Boletim Epidemiológico). Em 2025, o estado de São Paulo registrou três óbitos decorrentes de febre amarela, conforme informações divulgadas pela Secretaria de Estado da Saúde. Além das mortes, foram

confirmados sete casos da doença na região. As vítimas não haviam sido vacinadas contra o vírus e pertencem a diferentes faixas etárias, abrangendo desde adultos jovens até idosos.

Os principais sintomas da Febre Amarela são febres, náuseas, vômitos, dor epigástrica, hepatite com icterícia, insuficiência renal, hemorragia, choque e morte em 20-60% dos casos (MONATH; VASCONCELOS, 2014). É caracterizada como uma doença aguda grave.

O diagnóstico é realizado pela detecção do RNA viral, através da reação em cadeia da polimerase de transcrição reversa, nos primeiros dias de sintomas. Ademais, é possível identificar o vírus no hospedeiro por meio de testes imunológicos, indicado na fase tardia da infecção, quando o RNA viral já não é detectável. A presença de anticorpos IgM sugere infecção recente (WAGGONER; ROJAS; PINSKY, 2018).

Atualmente, não existe medicamento antiviral eficaz e aprovado para o tratamento da Febre Amarela. O indivíduo infectado pelo vírus deve permanecer em repouso, ingerir alta reposição de líquidos, e ser hospitalizado para que haja a reposição sanguínea, se necessário. Em casos graves o indivíduo deve ser transferido para uma Unidade de Terapia Intensiva (OMS). É possível a prevenção da doença através da vacinação e do controle do vetor. Entretanto se torna imprescindível um tratamento para o vírus pós-infecção, sendo uma ferramenta eficaz para amenizar e controlar os sintomas em caso de surtos viral, ademais assegurar proteção em indivíduos de riscos ao efeito da vacina (JULANDER, 2013).

1.1.2.1. Biologia estrutural

O flavivírus é um vírus envelopado, caracterizado por um capsídeo icosaédrico com um diâmetro de 40–60 nm. É composto por uma molécula de RNA de fita simples com sentido positivo. Possui regiões não traduzidas 5' e 3', altamente estruturadas e essenciais para a replicação viral, com aproximadamente 11 kb. Todos os flavivírus possuem um genoma que codifica uma única poliproteína, que quando clivada por proteases virais e do hospedeiro, geram três proteínas estruturais (proteína do capsídeo (C), precursor de membrana (prM), e proteína do envelope (E)), figura 1a, e sete genes não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5), figuras 1b. As proteínas NS estão localizadas no lado citoplasmático das membranas do retículo endoplasmático (RE) e estão envolvidas na replicação do genoma viral (GABIANE; YEN; FAILLOUX, 2022).

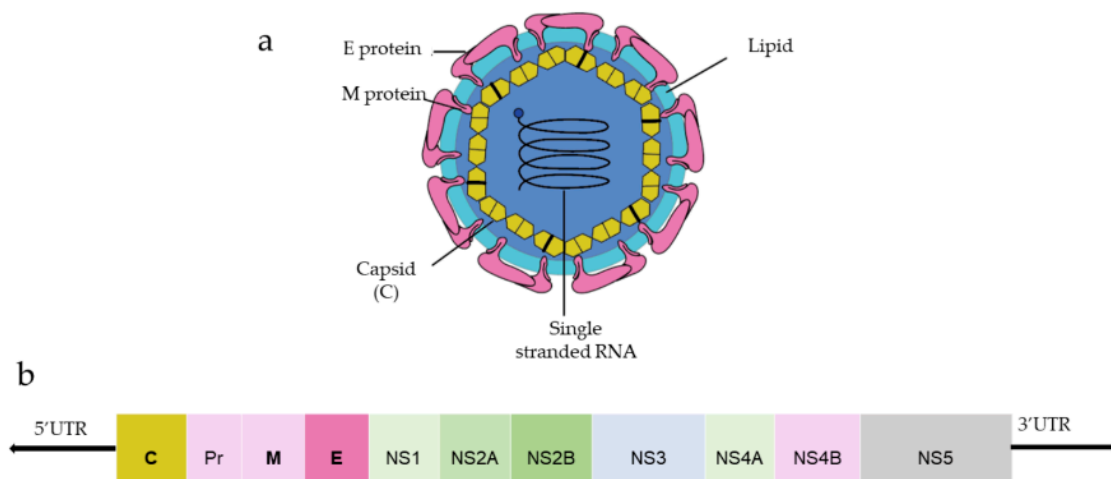


Figura 1: (a) Representação da estrutura dos flavivírus. (b) Esquema da organização genômica dos flavivírus. Fonte: BATRA; JARIN TASLEM MOUROSI; JAIN, 2022.

1.2. Metilação

A metilação é uma reação comum de extrema importância para todos os organismos vivos. Essa transformação, predominantemente catalisada por metiltransferases (MTs) dependentes de S-adenosilmetionina (SAM, AdoMet), desempenha um papel crucial em diversos processos biológicos, como sinalização celular, componentes de membrana, pigmentos e regulação da expressão, estrutura e função de moléculas biológicas, incluindo proteínas, DNA e RNA. Dentro do contexto viral, as metiltransferases desempenham papel fundamental na formação da estrutura 5'cap-0, contribuindo para uma evasão eficaz do sistema imunológico inato do hospedeiro (LIM; NOBLE; SHI, 2015).

1.2.1. Metiltransferase de flavivírus (NS5)

A NS5 é uma proteína não estrutural dos flavivírus, sendo a maior e mais conservada dentre elas. Essa proteína desempenha um papel crucial nas replicações virais, sendo indispensável para o ciclo de vida dos mesmos. A NS5 é composta por um domínio proteico metiltransferase (MTase) na porção N-terminal, que atua na modificação da extremidade 5' do RNA e um domínio proteico RNA polimerase dependente de RNA (RdRp) na porção C-terminal, responsável pela síntese do RNA viral.

A metiltransferase possui um sítio catalítico organizado em uma tétrede composta pelos resíduos K61, D146, K182 e E218. O grupo 2'-OH do substrato de RNA

encontra-se em proximidade a esses resíduos, o que facilita a desprotonação necessária para o ataque nucleofílico ao átomo de carbono do grupamento metila durante sua transferência. Nessa tétrade catalítica, os resíduos D146 e K182 são fundamentais para a reação de metilação, enquanto os resíduos K61 e E218 são necessários para otimizar sua eficiência. Em particular, o resíduo D146 apresenta a capacidade de formar uma ligação de hidrogênio com o grupo amino da molécula de SAM, estando, portanto, associado às duas reações de metilação catalisadas pela metiltransferase viral. Ademais, foi identificado na metiltransferase um sítio específico de ligação para a molécula de S-adenosil-L-metionina (SAM), essencial para a transferência do grupamento metila ao substrato. Esse sítio é caracterizado por uma alta concentração de resíduos de glicina, formando um loop que antecede uma região hidrofóbica, cuja estrutura é fundamental para a estabilização e funcionalidade da interação com a SAM. Além disso, foi descrita a presença de outro sítio associado à atividade de guanililtransferase (GTase), que desempenha um papel crucial no processo de capeamento do RNA viral, contribuindo para a proteção e funcionalidade do material genético do vírus (ZHOU et al., 2007). (Figura 2)

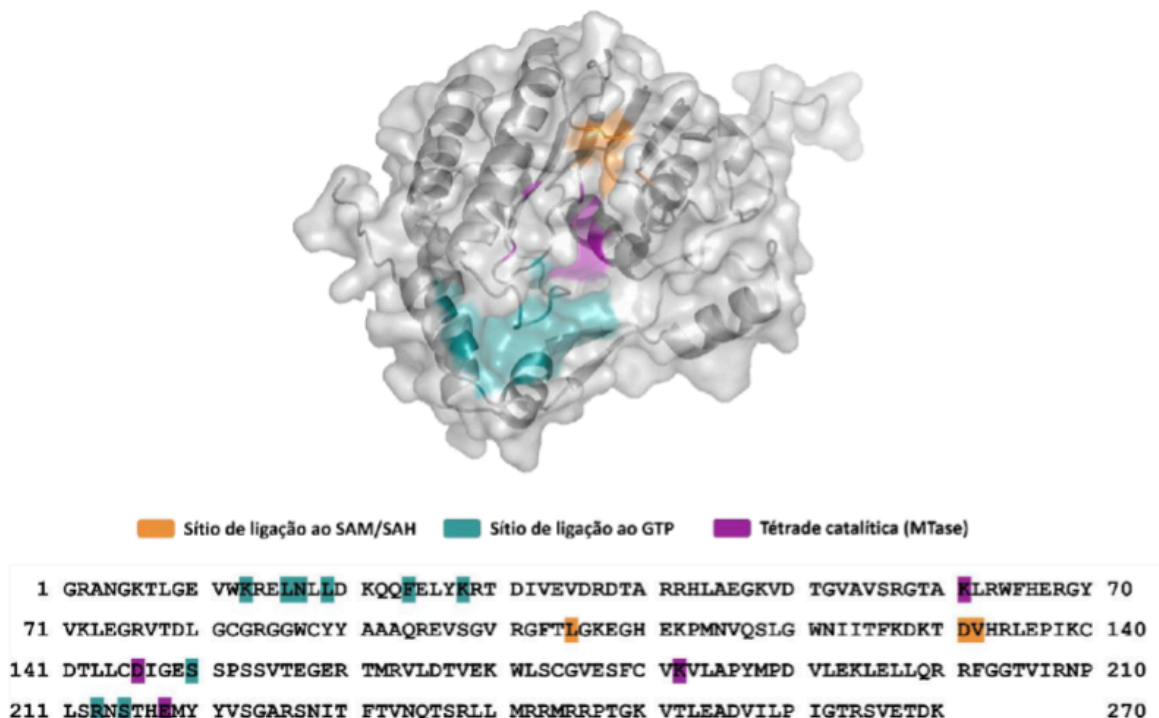


Figura 2: Representação tridimensional da estrutura molecular do domínio MTase, destacando a superfície molecular e os principais sítios e aminoácidos de cada sítio funcionais: o sítio de ligação ao SAM/SAH em laranja, o sítio de ligação ao GTP em ciano e o sítio catalítico em violeta. Fonte: Adaptado de FURTADO, 2022.

A metiltransferase (MTase) tem a função de catalisar a metilação da guanina na posição N-7 e da ribose na posição 2'-OH durante o processo de formação do cap viral. Esta

modificação é essencial para a estabilidade do RNA e para sua tradução eficiente pela maquinaria celular do hospedeiro. O cap 5' do RNA também protege o RNA viral da degradação por exonucleases celulares que atuam de 5'- a 3'-. Sem esta proteção, o RNA viral seria rapidamente degradado dentro da célula hospedeira. Ademais, a presença do cap 5' ajuda o RNA viral a evitar a detecção pelo sistema imunológico inato do hospedeiro. A ausência da modificação de capping poderia desencadear respostas imunológicas antivirais, como a produção de interferons (GEISS et al., 2009).

A NS5-Mtase de flavivírus pertence à família das metiltransferases dependentes de S-adenosilmetionina (SAM), uma molécula essencial em diversas reações bioquímicas. O SAM atua como doador universal de grupos metil em processos de metilação. Derivado de metionina e ATP, o SAM é utilizado por metiltransferases para transferir grupos metil para diferentes moléculas-alvo, incluindo DNA, RNA, proteínas e lipídios. Após a doação do grupo metil, o SAM é convertido em S-adenosil-homocisteína (SAH), que é posteriormente reciclado pelo organismo. Nesse contexto, a NS5-MTase utiliza o SAM como substrato para catalisar a metilação do cap 5' do RNA viral, um processo vital para a estabilidade e tradução do RNA (SUBODH KUMAR SAMRAT et al., 2023).

O processo de capeamento do RNA viral tem início com o RNA de fita simples e polaridade positiva, que está na forma de RNA-trifosfato (pppAN). Este RNA sofre uma reação mediada pela atividade RTPase da NS3Helicase do Flavivírus, na qual ocorre a remoção de um fosfato orgânico, resultando na liberação de um fosfato inorgânico (Pi) e na formação de RNA-difosfato (ppAN). Na etapa subsequente, o RNA-difosfato sofre uma modificação adicional, na qual um monofosfato de guanósina (GMP) é transferido para a extremidade 5'-difosfato do RNA, após a hidrólise de uma molécula de GTP pela atividade guanililtransferase (GTase) da NS5 MTase. Essa modificação resulta na formação do RNA genômico "capeado" (GpppAN), crucial para a estabilidade e funcionalidade do RNA viral. Após, a atividade de metiltransferase realiza a metilação de N7 da guanósina do GTP inserido, formando o cap 0 (m7GpppN). Subsequentemente, a ribose do primeiro nucleotídeo adjacente à guanósina do cap0 também é metilada na posição 2'-O, resultando no cap 1 (m7GpppNm), que é a forma funcional e predominante do *RNA capped* nos flavivírus (LIM; NOBLE; SHI, 2015). (Figura 3)

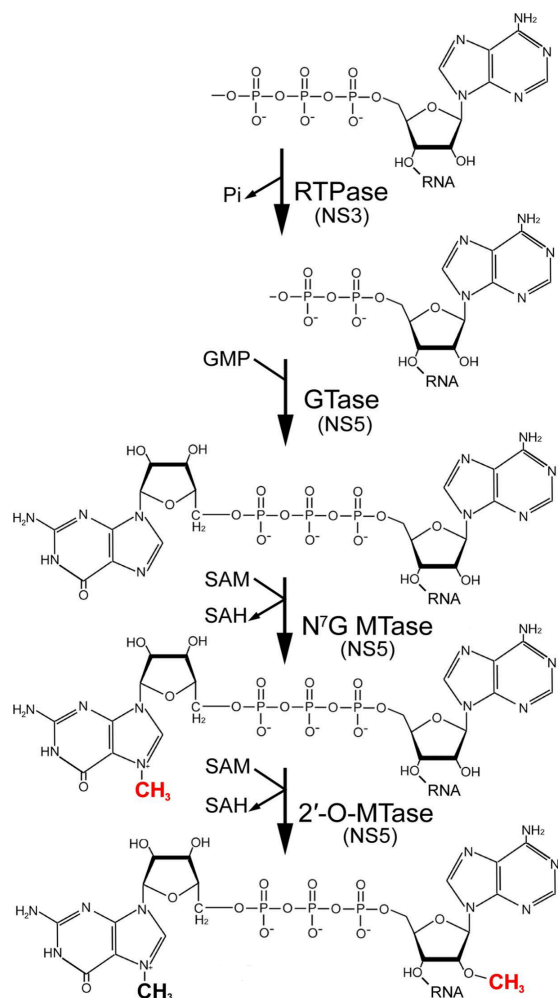


Figura 3: Representação do processo de metilação de flavivirus. Fonte: Adaptado de BRADRICK, 2017

Devido à sua importância crítica na replicação viral e modificação do RNA, a metiltransferase é um alvo promissor para o desenvolvimento de antivirais. Inibidores que bloqueiem a atividade da metiltransferase podem impedir a replicação do vírus, oferecendo um potencial caminho para o tratamento de infecções por flavivirus.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos gerais

O objetivo do presente trabalho foi a otimização de protocolos para a expressão e purificação de proteínas da classe metiltransferase de flavivírus (Febre Zika e Febre Amarela) que atingem a população mundial.

2.2. Objetivos Específicos

- Identificação da sequência gênica da proteína metiltransferase.
- Clonagem em plasmídeos de expressão.
- Transformação em células expressão bacterianas e teste de expressão das metiltransferases – triagem de meios, temperatura e tempo de expressão.
- Teste de Purificação das proteínas alvo.
- Caracterização Bioquímica e Biofísica das proteínas.
- Análise de resultados e determinação dos protocolos de expressão e purificação das metiltransferases.

3. METODOLOGIA

3.1. Clonagem

A priori, foram realizadas buscas em banco de dados para a identificação da sequência gênica codificante das metiltransferases dos flavivírus estudados. Sequencialmente, foram projetados oligonucleotídeos iniciadores (primers) para a seleção dos domínios proteicos truncados desejados, assegurando, assim, um aumento significativo na possibilidade de sucesso na obtenção de proteínas solúveis.

Para a realização da clonagem foram selecionados vetores de expressão possuindo proteínas de fusão, garantindo assim uma expressão eficiente de proteínas solúveis.

A clonagem foi feita pela metodologia LIC (*Ligation Independent Cloning*), conforme descrito em Aslanidis; de Jong, 1990, pela empresa biotecnológica Cellico, no qual consiste em uma técnica molecular que permite a inserção de fragmentos de DNA em vetores de expressão (pETM11 e pETNus) sem a necessidade de enzimas de restrição.

3.2. Transformação

O processo de transformação foi realizado utilizando células competentes de *E. coli Rosetta D3* para inserção do plasmídeo contendo o fragmento gênico de interesse. Foram adicionados 2 µL de DNA plasmidial (100 ng/mL) e 20 µL de células competentes de *E. coli Rosetta D3*, em um microtubo, no qual, foram mantidas em gelo por 5 min. Em seguida, a mistura foi submetida a um choque térmico em banho seco à 42 °C por 2 min e imediatamente resfriada em gelo por mais 10 min, facilitando a incorporação do plasmídeo pelas células. Posteriormente, foram adicionados 100 µL de meio Luria Broth(LB) e inseridos no Shaker sob 200 rpm por 1 h, para a multiplicação celular. Por fim, as alíquotas da cultura foram plaqueadas em placas de LB-ágar 3%, suplementadas com os antibióticos 50 µg/mL de canamicina e 34 µg/mL de cloranfenicol, para a seleção das colônias transformadas. As placas foram incubadas em estufa a 37 °C por 24 h, permitindo o crescimento das colônias bacterianas transformadas.

3.3. Expressão

3.3.1. Teste de expressão em baixa escala

O teste de expressão foi conduzido utilizando diferentes meios de cultura e condições de cultivo. Inicialmente, para o preparo do pré-inóculo, células bacterianas foram raspadas das placas e adicionadas em 5 mL de meio Luria-Bertani (LB) suplementado com 50 µg/mL de canamicina e 34 µg/mL de cloranfenicol. As culturas foram mantidas em shaker a 200 rpm por 16 h, a 37 °C.

Para a expressão proteica, os pré-inóculos foram transferidos para 100 mL de diferentes meios de cultivo, incluindo LB e o meio autoindutor ZYM-5052. As culturas foram mantidas em shaker a 200 rpm até atingirem uma densidade óptica de 600 nm (DO_{600nm}) igual a 0,6. No caso do meio LB, a expressão foi induzida pela adição de 0,5 mM de isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo (IPTG), enquanto, no meio ZYM-5052, a indução ocorreu automaticamente com o consumo total dos açúcares presentes. Após a indução, as culturas foram incubadas em duas condições distintas: a 18 °C e a 37 °C, ambas em shaker a 200 rpm por 16 h, para determinar as melhores condições de expressão.

Uma amostra da cultura celular antes e após a indução foi retirada. A eficiência da expressão proteica foi avaliada por eletroforese em gel de poliacrilamida a 12.5% (SDS-PAGE), corado com 0,01% de Coomassie Brilliant Blue R-250.

3.3.2. Expressão em grande volume

Após o teste em baixa escala realizado, foram estabelecidas as melhores condições para o cultivo em volume maior.

Para expressão em maior escala, foi utilizada a mesma abordagem descrita anteriormente, entretanto foram utilizados 10 mL de meio Luria-Bertani (LB) para cada litro de cultura de expressão. Os pré-inóculos foram transferidos para o meio de cultivo considerado mais adequado, com base nos testes preliminares, e mantidos em agitação de 200 rpm, a 37 °C até atingir uma densidade óptica (DO_{600nm}) entre 0,6 e 0,8. Em seguida, as culturas foram incubadas na temperatura otimizada e mantidas em agitação por 16 h.

As células foram coletadas por centrifugação (4.000 g, 45 min, 4 °C), e o pellet foi ressuscitado em tampão de lise (300 mM de NaCl, 50 mM de Tris pH 8, 10 mM de imidazol, 10% de glicerol, 1 mM de DTT). Para a lise celular, as células foram tratadas com 1 U/ml de benzonase, 1 U/ml de lisozima, 1 mM de DTT e 1 mM de PMSF, por 30 min sob

agitação. A ruptura da membrana celular foi realizada utilizando um processador ultrassônico, com ciclos de 2 s de ultrassom (ON) e 4 s de repouso (OFF), por 10 min, a 25% de amplitude.

Após a lise, as amostras foram centrifugadas (12.000 rpm, 20 min, 4 °C) para separar as frações solúveis e insolúveis. A eficiência da expressão proteica foi avaliada por eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida 12,5% (SDS-PAGE), corado com 0,01% de Coomassie Brilliant Blue R-250.

3.4. Teste de solubilidade

Foram coletadas amostras dos testes de expressão, antes da lise celular, com o objetivo de realizar uma análise de solubilidade das proteínas expressas. As culturas foram centrifugadas para coleta das células bacterianas.

Uma análise bioinformática foi conduzida através do programa Protparam (disponível em: < <https://web.expasy.org/protparam/> >) com a finalidade de identificar o ponto isoelétrico da metiltransferase de flavivírus, que foi estimado em aproximadamente 9,3 para a proteína de Febre Amarela e 9,4 para a proteína de Febre Zika. Esse valor foi crucial para a seleção das opções mais adequadas para a realização do teste de solubilidade, uma vez que a escolha do tampão deve ser compatível com as propriedades da proteína, a fim de melhorar a solubilização. Após esta análise foram adicionados a cada pellet 1 mL de tampão (20 mM de Tris pH 8, 250 mM de NaCl e 5% de glicerol), 1 mM de lisozima, 2 mM de DTT, 1 mM de benzonase, 0,5% de triton. Os pellets foram ressuspensos.

Em seguida, as amostras foram rapidamente congeladas em nitrogênio líquido e, posteriormente, descongeladas em água morna. Esse ciclo de congelamento e descongelamento foi repetido 10 vezes. Após esse processo, as amostras foram submetidas à centrifugação a 12.000 rpm por 20 min, resultando na separação do pellet e do sobrenadante. Para identificar a fração solúvel, pellet e sobrenadante foram analisados por meio de eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida 12,5% (SDS-PAGE), a fim de identificar a presença e a quantidade de proteína.

3.5. Purificação

A técnica utilizada para a purificação foi baseada no artigo de FURTADO, 2022, e consiste na utilização de uma cauda de hexa-histidina (6His-Tag) inserida via vetor de expressão nas metiltransferases. A 6His Tag se liga de forma específica a íons de níquel (Ni^{2+})

imobilizados em uma resina de cromatografia, permitindo a captura e purificação da proteína de interesse.

Após o processo de expressão e ruptura celular descrito na secção 3.3.2, o procedimento inicial de purificação envolveu a aplicação do extrato bruto contendo a resina Ni Sepharose High Performance (GE Healthcare) imobilizada em coluna, no qual a 6His-Tag possui uma capacidade excepcional de se ligar. Para eliminar as proteínas que não se ligaram à coluna, foi utilizada etapa de lavagem com tampão A (Tabela 1). Em seguida, para despojar a coluna das proteínas que poderiam ter se ligado de forma não específica, foi feito um processo de lavagem utilizando um teor de tampão que continha 10% de B, promovendo a eluição gradual dessas proteínas indesejadas. Para aumentar a seletividade do processo e garantir que apenas a proteína de interesse fosse retida, foi implementado um gradiente cromatográfico com aumento progressivo da concentração de B, chegando até 20%. Esse gradiente foi essencial para separar as proteínas que estavam ligadas de maneira inespecífica a resina, permitindo que elas fossem removidas de forma eficiente. Finalmente, a proteína de interesse foi eluída da coluna utilizando o tampão B (Tabela 1), que continha uma alta concentração de imidazol, um composto que compete com a 6His-Tag pela ligação aos íons níquel na resina. A competição entre o imidazol e a 6His-Tag permitiu a coleta da fração eluída, que continha a proteína de interesse com alto grau de pureza.

Seguindo com a purificação, foi realizada uma cromatografia de gel filtração por tamanho utilizando a resina Superdex 75 10/300, um método que explora as diferenças de tamanhos globulares entre as proteínas em solução, permitindo que elas se difundam através da resina de maneira seletiva. Esse processo facilita a separação das proteínas com base no seu tamanho, permitindo a purificação de proteínas de diferentes massas moleculares, nesse processo foi utilizado o tampão C (Tabela 1) para eluição. A pureza da amostra e o progresso das etapas de purificação foram monitorados ao longo do processo por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), utilizando uma concentração de 12,5%, assegurando assim uma análise adequada da integridade e pureza das proteínas isoladas.

Tabela 1: Tampões utilizados para a purificação de metiltransferases de flavivírus. Fonte: Autoria própria

Tampão A	300 mM de NaCl, 50 mM de Tris pH 8, 10 mM de imidazol, 10% de glicerol, 1 mM de DTT
Tampão B	300 mM de NaCl, 50 mM de Tris pH 8, 250 mM de imidazol, 10% de glicerol
Tampão C	500 mM de NaCl, 20 mM de Hepes pH 7,5, 5% de glicerol, 1 mM de DTT

3.6. DSF

O experimento DSF (*Differential Scanning Fluorimetry*) foi realizado com o objetivo de rastrear o tampão mais adequado, avaliando a estabilidade térmica de proteínas em diferentes condições. Os termogramas foram obtidos em um termociclador PCR quantitativo convencional Mx3005P (Agilent Technologies), utilizando a sonda fluorescente Sypro Orange 5x (Sigma). A análise foi conduzida em uma escala de temperatura de 25–95 °C, com uma taxa de aquecimento de 1 °C por min, conforme descrito por Niesen et al. (2007). Os experimentos foram realizados em duplicata, e as curvas de desnaturação térmica resultantes foram processadas e plotadas utilizando o software GraphPad Prism 8.0. A análise dos dados foi realizada com base na equação de Boltzmann, seguindo a metodologia proposta por Huynh e Partch (2016).

4. RESULTADOS

4.1. Análise de Bioinformática

Para o início da análise bioinformática, foram realizadas investigações planejadas sobre as sequências de metiltransferases dos vírus YFV e ZIKV disponíveis no banco de dados GenBank. Este processo teve como objetivo principal a identificação e determinação das sequências de nucleotídeos e dos aminoácidos correspondentes.

- **Sequência de nucleotídeos:**

ZIKV – (GenBank AY632535.2):

ATGGGTGGTGGTACCGGCGAAACCCTGGGCGAAAAATGGAAAGCACGTCTGAATCAGATG
AGTGCCCTGGAATTTATAGCTATAAAAAAAGCGGCATCACCGAAGTTTGTTCGTGAAGAAG
CACGTCGTGCCCTGAAAGATGGTGTGGCCACCGGCGGCCATGCAGTGAGTCGTGGTAGTG
CCAAACTGCGCTGGCTGGTTGAACGCGGTTATCTGCAGCCGTATGGTAAAGTTATTGATCT
GGGCTGTGGTTCGTGGCGGTTGGAGTTATTATGCAGCAACCATTTCGTAAAGTGCAGGAAGTT
AAAGGCTATACCAAAGGTGGCCCCGGGTCATGAAGAACCGGTGCTGGTTCAGAGCTATGGT
TGGAATATTGTGCGCCTGAAAAGCGGCGTGGATGTTTTTCATATGGCAGCAGAACCGTGTG
ATACCCTGCTGTGTGATATTGGTAAAAGTAGCAGTAGTCCGGAAGTGGAAGAAGCCCGCA
CCCTGCGCGTGTGAGCATGGTTGGCGATTGGCTGGAAAAACGTCCGGGCGCATTTTGCAT
TAAAGTGTGTGTCCTATACCAGTACCATGATGGAAACCCTGGAACGCCTGCAGCGCCGC
TATGGTGGTGGCTTAGTTTCGTGTTCCGCTGAGTCGTAATAGTACCCATGAAATGTATTGGGT
GAGTGGCGCAAAAAGTAATACCATTAAGCGTTAGTACCACAGTCAGCTGCTGCTGGG
CCGCATGGATGGTCCGCGTCGTCCTGTAAATAT

YFV – (GenBank - KY885001.1)

GGGAGAGCGAATGGGAAGACCCTGGGTGAGGTCTGGAAAAGGGAGCTGAACCTGCTGGA
CAAACAGCAGTTTGAGCTGTATAAACGGACAGACATTGTGGAGGTGGACCGTGACACAGC
TCGCCGACACCTGGCTGAAGGGAAAGTGGACACCGGAGTGGCCGTCTCGAGAGGGACCG
CAAATGAGATGGTTCCATGAACGTGGCTATGTCAAGTTGGAAGGAAGAGTGACTGACC
TGGGATGTGGGCGTGGTGGCTGGTGTACTACGCTGCTGCACAGAGAGAAGTGAGTGGGG
TCAGGGGATTACCCCTTGGAAGGAAGGCCACGAAAAGCCCATGAATGTGCAGAGCCTGG
GGTGGAAACATCATCACCTCAAGGACAAGACTGATGTCCATCGCCTTGAGCCGATAAAGTG
TGATACCCTGCTGTGCGACATTGGAGAGTCGTCCCATCATCAGTGACCGAAGGGGAAAG
AACCATGAGAGTTCTTGACACTGTTGAGAAATGGTTGAGCTGTGGTGTGAAAGCTTCTGT
GTGAAGGTGTTGGCTCCATACATGCCTGATGTGCTTGAAAAGTTAGAGTTGCTCCAAAGGA
GGTTTGGTGGAACGGTAATCAGGAATCCCCTCTCTAGAAATCAACCCACGAGATGTATTAT
GTGTCGGGAGCCCGCAGTAACATCACGTTACTGTGAATCAAACATCCCGCCTCTTAATGA
GGAGAATGAGGCGCCCGACAGGCAAGGTGACTCTTGAAGCCGATGTCATCCTCCCAATTG
GAACACGCAGTGTGGAACAGATAAAGG

- **Sequência de aminoácidos:**

ZIKV (GenBank - AY632535.2):

MGGGTGETLGEKWKARLNQMSALEFYKSGITEVCREEARALKDGVATGGHAVSRGSA
KLRWLVERGYLQPYGKVIDLGCGRGGWSYAAATIRKVQEVKGYTKGGPGHEEPVLVQSYGW
NIVRLKSGVDVFHMAAEPDILLCDIGESSSSPEVEEARTLRVLSMVGDWLEKRPGAFCIKVL
CPYTSTMMETLERLQRRYGGGLVRVPLSRNSTHEMYWVSGAKSNTIKSVSTTSQLLLGRMDG
PRRPVKY

YFV (GenBank - KY885001.1):

GRANGKTLGEVWKRELNLLDKQQFELYKRTDIVEVDRDTARRHLAEGKVDTGVAVSRGTAK
LRWFHERGYVKLEGRVTDLGCGRGGWCYAAAQREVSGVRGFTLGKEGHEKPMNVQSLG
WNIITFKDKTDVHRLEPIKCDTLLCDIGESSPSSVTEGERTMRVLDTVEKWLSCGVESFCVKVL
APYMPDVLEKLELLQRRFGGTVIRNPLSRNSTHEMYVSGARSNITFTVNQTSRLLMRRMRR
PTGKVTLEADVILPIGTRSVETDK

Utilizando as sequências de aminoácidos acima, realizamos previsões de estrutura secundária através da ferramenta de bioinformática Psipred, disponível em < <http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>> com o objetivo de garantir que as construções projetadas não interferissem em regiões críticas da proteína relacionadas à manutenção do seu enovelamento em solução. O enovelamento correto é fundamental para a funcionalidade da proteína, pois alterações nesta estrutura podem comprometer sua estabilidade e, conseqüentemente, sua atividade biológica. Assim, ao mapear as regiões estruturais relevantes, foi possível evitar que as construções coincidisse com trechos de alfa-hélices ou folhas beta importantes para a estabilidade global da proteína. Isso minimizou os riscos de desestabilização estrutural, garantindo que as alterações introduzidas não prejudicassem o funcionamento adequado da proteína. Através dessa análise pudemos verificar que conseguiríamos clonar as proteínas completas sem nenhum dano a estruturas secundárias previstas: Metiltransferase de ZIKV do aminoácido 1 ao 254 e Metiltransferase de YFV do aminoácido 1 ao 270.

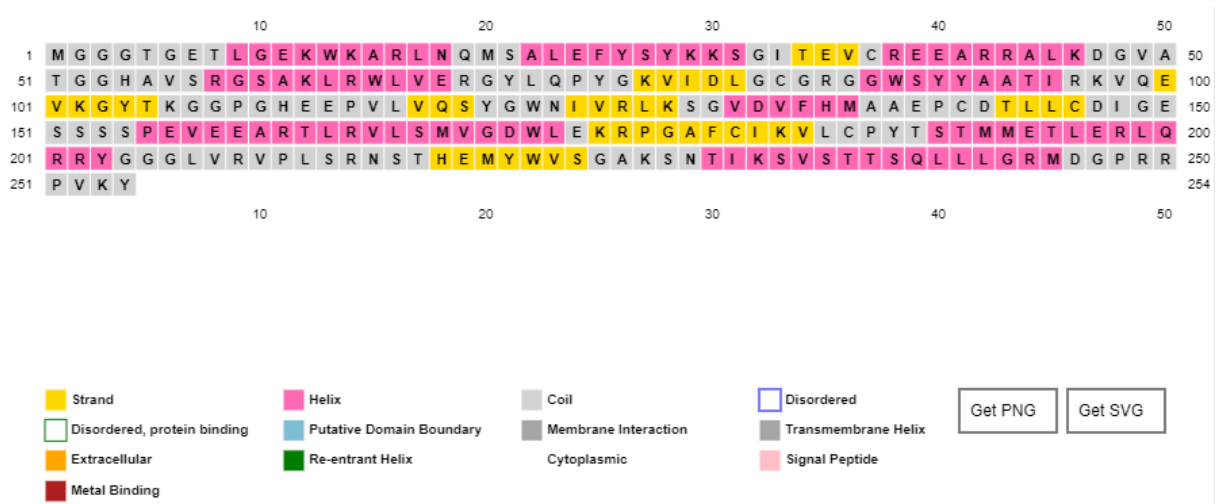


Figura 4: Predição da estrutura secundária da metiltransferase de ZIKV. As alfa-hélices estão representadas em rosa, as fitas beta (*strands*) em amarelo e as regiões em *coil*, que correspondem a segmentos desordenados ou flexíveis, estão indicadas em cinza claro. Fonte: Autoria própria

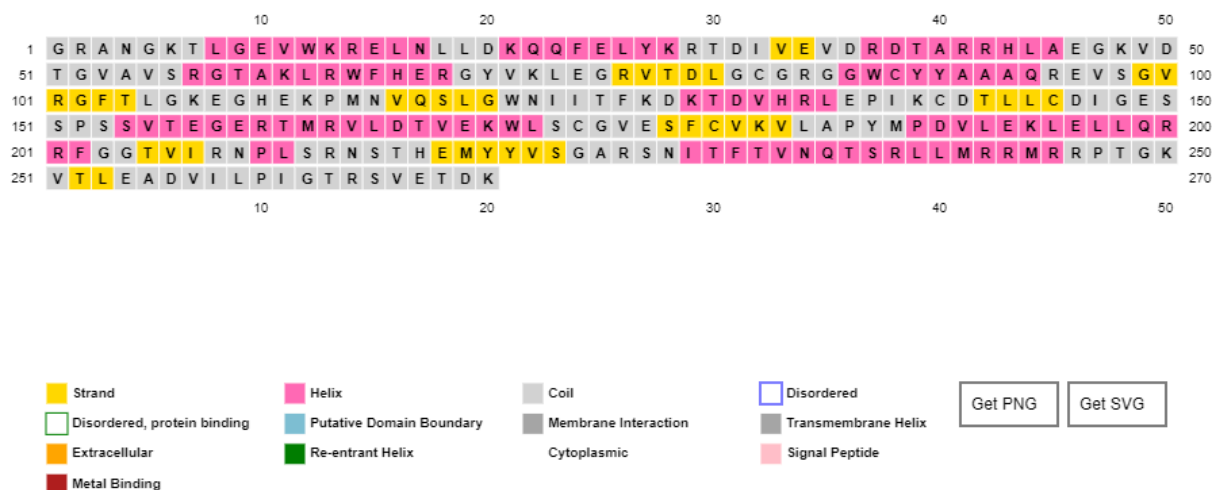


Figura 5: Predição da estrutura secundária da metiltransferase de YFV. As alfa-hélices estão representadas em rosa, as fitas beta (*strands*) em amarelo e as regiões em *coil*, que correspondem a segmentos desordenados ou flexíveis, estão indicadas em cinza claro. Fonte: Autoria própria

Em sequência às etapas iniciais de busca das sequências codificadoras das proteínas e suas respectivas sequências codificadas, foram realizadas análises por meio da ferramenta ProtParam, disponível no portal ExPASy. Essa ferramenta permitiu a obtenção de informações relevantes sobre as características físico-químicas das proteínas estudadas, fornecendo subsídios importantes para o entendimento detalhado de suas propriedades. Dentre os parâmetros analisados, destacam-se: o número total de resíduos de aminoácidos, a massa molecular, o coeficiente de extinção e o ponto isoelétrico (pI) (Tabela 2).

Tabela 2: Características físico-químicas das metiltransferases de YFV e ZIKV. Fonte: ProtParam.

Proteína	Número de Aminoácidos (aa)	Massa Molecular (Da)	Coefficiente de Extinção ($M^{-1}cm^{-1}$)	Ponto Isoelétrico (pI)
Metiltransferase ZIKV	254	28123.28	51255	9.40
Metiltransferase YFV	270	30568.02	38305	9.30

4.2. Expressão

A clonagem do fragmento de interesse foi realizada pela empresa de biotecnologia Cellco, utilizando tecnologias avançadas para assegurar a precisão e eficiência do processo. Após a conclusão da etapa de clonagem, os fragmentos obtidos foram

introduzidos em células competentes de *E. coli Rosetta DE3* por meio do processo de transformação bacteriana.

Inicialmente, foram conduzidos testes de expressão com o objetivo de determinar as condições de cultivo mais adequadas. As variáveis verificadas estão descritas na Tabela 3:

Tabela 3: Condições do teste de expressão. Fonte: Autoria própria.

Plasmídeos	Meios	Temperatura
pETM11	LB	37 °C
pETNUS	ZYM	18 °C

Os resultados de cada variável foram analisados e diferenciados por meio da eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE a 12,5% (Figura 6).

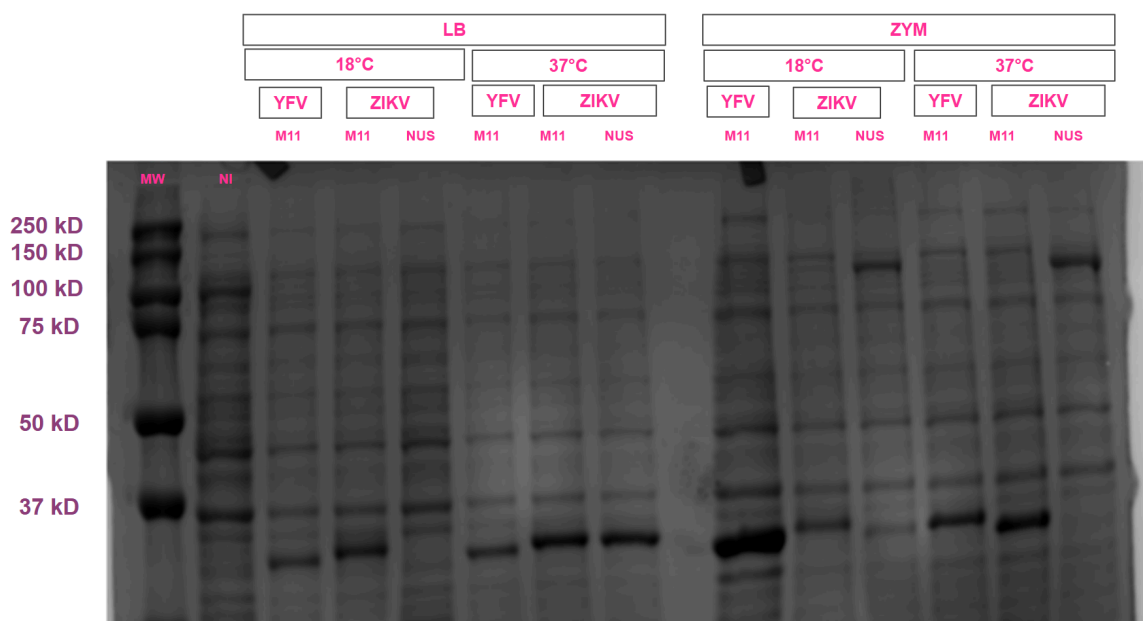


Figura 6: Teste de expressão. Análise por SDS-PAGE, com a primeira coluna representando o marcador de massa molecular. A partir da segunda coluna, são apresentadas amostras da cultura celular de *E. coli* para expressão da metiltransferase de cada vírus e suas respectivas condições experimentais. Fonte: Autoria própria.

Sabendo-se da predição por Protparam apresentada na Tabela 2 que a metiltransferases apresentam, uma massa molecular de 30 kDa quando expressa a partir do plasmídeo pETM11, e de 90 kDa (quando expressa pelo plasmídeo pETNUS (6-His+non-glycosylated polypeptide), temos como resultado as condições experimentais

mais adequadas para a expressão eficiente de ambas as variantes virais foram alcançadas utilizando a construção do plasmidial em pETM11. Além disso, o cultivo das células em meio ZYM5052, um meio autoindutor amplamente utilizado em experimentos de expressão heteróloga, combinado com uma temperatura de incubação de 18 °C, mostrou-se mais eficaz para obter os resultados desejados.

4.3. Teste de solubilidade

A solubilidade da metiltransferase pode ser avaliada por meio da análise de eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS a 12,5%. Esse método permite uma separação eficaz das proteínas presentes na amostra de proteína, fornecendo informações úteis sobre suas características físico-químicas. A análise visual das bandas formadas no gel representa diferentes frações proteicas. Especificamente, as bandas provenientes da fração do pellet indicam a presença de proteínas insolúveis, enquanto as bandas correspondentes à fração do sobrenadante revelam a porção solúvel da proteína. Como pode ser observado na imagem abaixo.

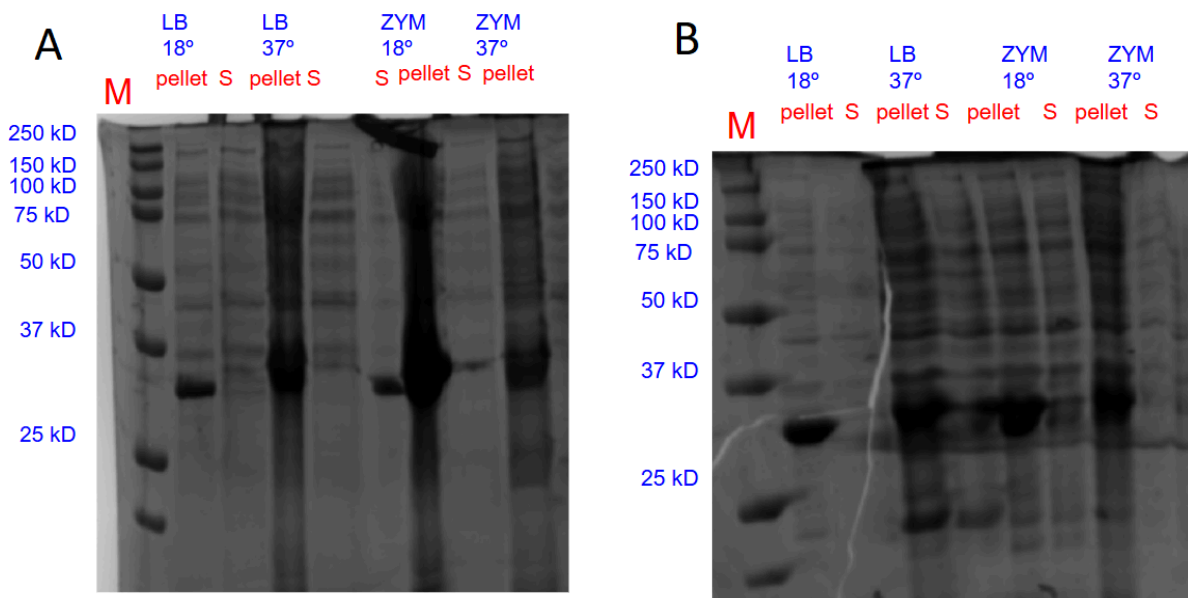


Figura 7: Análise de solubilidade das metiltransferase YFV pETM11 (A) e ZIKV pETM11 (B) sob distintas condições de expressão. A fração insolúvel está representada pelo pellet, enquanto a fração solúvel é indicada por "S". Fonte: Autoria própria.

Analisando o gel acima pudemos observar uma porção de proteína na fração do sobrenadante, significando que a proteína está solúvel. Assim, pudemos seguir para as etapas de expressão em larga escala e purificação de proteína.

4.4. Purificação

Seguindo o protocolo descrito no artigo de Nathalia Furtado (FURTADO, 2022), foi realizada a purificação da amostra utilizando cromatografia de afinidade, que apresentou resultados promissores, conforme evidenciado na Figura 8. No entanto, apesar do sucesso na obtenção de um perfil de purificação, a análise da banda no gel revelou uma intensidade relativamente baixa, indicando uma recuperação limitada da proteína-alvo. Esse resultado sugeriu que, embora o método seja eficaz, ele ainda necessitava de ajustes para maximizar o rendimento e a qualidade da purificação.

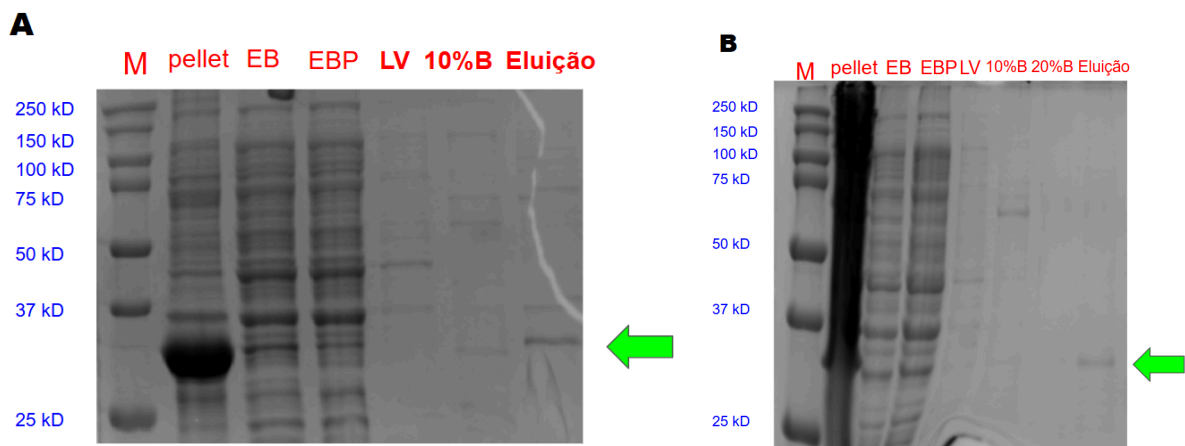


Figura 8: Purificação inicial das metiltransferases de ZIKV (A) e YFV (B), baseada no protocolo de Furtado, 2022. A análise por SDS-PAGE da purificação em coluna de níquel, apresenta, na primeira coluna, o marcador de massa molecular. Nas colunas subsequentes, são mostradas as diferentes etapas do processo de purificação, incluindo: pellet, extrato bruto (EB), extrato bruto pós-interação com a coluna de níquel (EBP), lavagem com tampão A (LV), lavagem com 10% de tampão B (10%B), lavagem com 20% de tampão B (20%B) e, por fim, a fração eluída. Fonte: Autoria própria.

Analisando todos os componentes e etapas iniciais da purificação por afinidade, questionamos o uso de betamercaptoetanol, pois o mesmo é um agente redutor que pode interagir com os íons Ni^{2+} da resina de afinidade, potencialmente reduzindo-os e comprometendo a eficiência de ligação da proteína de interesse. Para minimizar esses efeitos adversos, é recomendado manter a concentração de agentes redutores abaixo de 1 mM durante o processo de purificação. Alternativamente, o uso de agentes redutores mais estáveis, como ditioneitol (DTT) ou tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP), pode ser considerado, pois são menos propensos a interagir com o níquel da resina (Marques, A. H. S., 2011) (Reyes, L. F. 2011) (Ribeiro, V. T. 2016).

Após uma otimização agente redutor, mudando de betamercaptoetanol para ditioneitol (DTT), a purificação das metiltransferases por meio de cromatografia por afinidade apresentou resultados expressivos, conforme ilustrado na Figura 9. Observamos

que, após o processo de eluição, foi possível identificar a presença de uma banda bem definida e de intensidade significativa no gel de eletroforese. Esse resultado indica a eficiência do método empregado para isolar a metiltransferase, garantindo uma boa recuperação da proteína de interesse com alta especificidade.

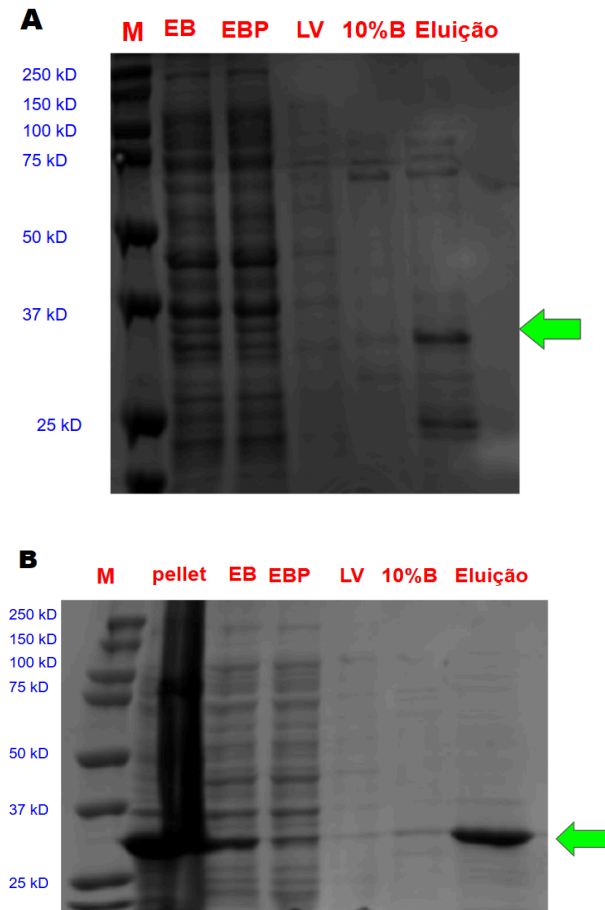


Figura 9: Purificação inicial das metiltransferases de ZIKV (A) e YFV (B). A análise por SDS-PAGE da purificação em coluna de níquel, apresenta, na primeira coluna, o marcador de massa molecular. Nas colunas subsequentes, são mostradas as diferentes etapas do processo de purificação, incluindo: pellet, extrato bruto (EB), extrato bruto pós-interação com a coluna de níquel (EBP), lavagem com tampão A (LV), lavagem com 10% de tampão B (10%B), por fim, a fração eluída. Fonte: Autoria própria.

Apesar do sucesso inicial, a proteína não estava completamente pura, o que tornou necessária a execução de uma etapa complementar de cromatografia em gel filtração por tamanho para refinar ainda mais o processo de purificação. Essa técnica adicional apresentou resultados altamente significativos, evidenciados pelo pico de absorvância de 980 mAU para a metiltransferase de YFV, destacado com uma seta azul na Figura 10 abaixo. Esse pico reflete a separação eficiente das frações proteicas, indicando a obtenção de uma amostra mais pura e adequada para análises posteriores. Já para a metiltransferase de ZIKV, houve um

pequeno pico (segundo pico – destacado com uma seta vermelha), 30 mAU, significando uma pequena quantidade de proteína.

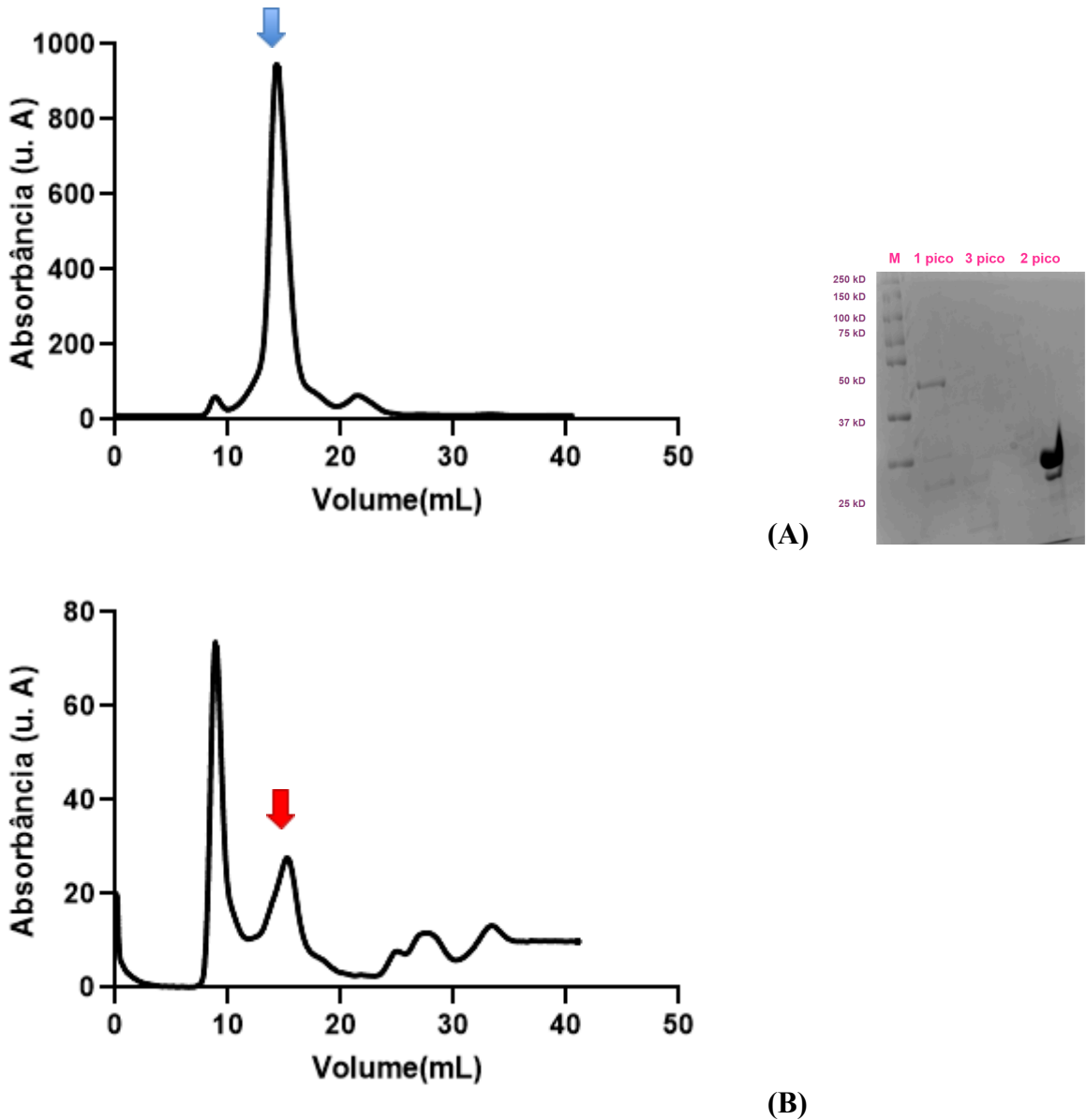


Figura 10: Cromatogramas obtidos durante a etapa de cromatografia por gel filtração para purificação das metiltransferases de YFV (A) e ZIKV (B). (A) O pico de absorbância de 980 mAU, indicado pela seta azul, representa a fração purificada da metiltransferase de YFV, evidenciando uma separação eficiente das proteínas. confirmada no gel de SDS-PAGE (B) Para a metiltransferase de ZIKV, um segundo pico menor, de 30 mAU, destacado com uma seta vermelha, indica a presença de uma quantidade reduzida de proteína na amostra. Fonte: A autoria própria

Os resultados obtidos demonstram que o protocolo otimizado em nosso laboratório para a obtenção de metiltransferases apresentou alta eficiência na produção da proteína do YFV. Através das etapas de expressão e purificação, foi possível alcançar rendimentos satisfatórios, confirmando a eficácia do protocolo para essa proteína específica.

Entretanto, ao aplicar o mesmo protocolo para a metiltransferase do ZIKV, observou-se a necessidade de ajustes adicionais. Apesar de a proteína ser expressa, o rendimento final ao término da etapa de purificação por gel filtração foi considerado insatisfatório, indicando problemas na estabilidade ou no processo de recuperação da proteína. Além disso, foi observado que a metiltransferase do ZIKV apresenta elevada tendência à precipitação após a etapa de purificação por afinidade, sugerindo possíveis questões relacionadas à estabilidade conformacional, agregação ou interação inadequada com os componentes do buffer de purificação.

4.5. Estabilidade térmica

A partir das análises realizadas por meio da técnica de Fluorescência Diferencial de Varredura (DSF), foi possível avaliar em detalhes as condições que melhor favorecem a estabilidade térmica da metiltransferase do vírus da febre amarela (YFV). Conforme os resultados apresentados na Tabela 4, observou-se que o tampão HEPES (NaOH) (pH 7,5, 500 mM de NaCl e 5% de glicerol) destacou-se significativamente na comparação entre a temperatura de melting (T_m) da referência e das diferentes condições testadas ($\Delta T_m = T_m - T_m$ referência). Esse tampão demonstrou um desempenho superior na manutenção da estabilidade térmica da proteína, sugerindo que proporciona maior integridade estrutural e funcional da metiltransferase sob condições de aquecimento controlado. Dessa forma, o tampão HEPES (NaOH) (pH 7,5, 500 mM de NaCl e 5% de glicerol) foi considerado a escolha mais adequada para preservar a estabilidade da proteína durante os experimentos.

Tabela 4: Comparação das condições de estabilidade térmica da metiltransferase de YFV em diferentes tampões. A tabela apresenta os valores de temperatura de melting (T_m) determinados por Fluorescência Diferencial de Varredura (DSF) para cada condição testada, além da variação diferencial de T_m ($\Delta T_m = T_m - T_m$ referência), indicando o impacto de cada tampão na estabilização térmica da proteína. Fonte: Autoria própria.

Tamponante (100mM)	pH	NaCl (mM)	%Glicerol	TM	TM -TM reference
Sodium acetate	5.0	150	0	26,4	-11,8
Sodium cacodylate (HCL)	6.0	150	0	27,2	-10,9
MES (NaOH)	6.0	150	0	30,4	-7,8
BIS-THIS	6.5	150	0	34,6	-3,6
Imidazole (HCl)	7.0	150	0	34,7	-3,5

MOPS (NaOH)	7.2	150	0	36,5	-1,7
Tricine (NaOH)	8.0	150	0	36,2	-2,0
TRIS (HCl)	8.0	150	0	37	-1,2
TRIS (HCl)	8.5	150	0	36,5	-1,7
Bicine (NaOH)	8.3	150	0	33	-4,2
HEPES (NaOH) REFERENCE	7.5	150	0	38,2	0
GLYCINE (NaOH)	9.0	150	0	33	-5,2
CHES (NaOH)	9.5	150	0	29,9	-8,4
Sodium borate	10.0	150	0	27,7	-10,5
HEPES (NaOH)	7.5	0	0	31,9	-6,2
HEPES (NaOH)	7.5	50	0	35,7	-2,4
HEPES (NaOH)	7.5	500	0	40,4	2,2
HEPES (NaOH)	7.5	150	5	36,8	-1,5
HEPES (NaOH) REFERENCE	7.5	150	0	38,2	0
HEPES (NaOH)	7.5	150	10	36,1	-2
HEPES (NaOH)	7.5	500	5	41,0	2,8

O mesmo ensaio não foi possível ser realizado para a proteína de ZIKV devido ao seu baixo rendimento em todas as purificações realizadas até o momento.

4.6. Protocolos

Os protocolos de expressão e purificação foram otimizados especificamente para a produção e caracterização das metiltransferases. Esses protocolos foram projetados para otimizar a expressão heteróloga das proteínas em *E. coli*, garantindo alta eficiência de produção e preservação da funcionalidade enzimática. A metodologia incluiu etapas rigorosas, como a padronização das condições de crescimento celular, seleção do tampão ideal para purificação, ajustes no uso de cromatografia de afinidade com matriz de níquel, e purificação final por filtração em gel para obtenção de proteínas de alta pureza. Os protocolos de expressão e purificação de YFV, ANEXO A, e o protocolo de expressão de ZIKV, ANEXO B, foram estabelecidos, otimizados e sendo possível sua replicabilidade.

5. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no presente trabalho foram de grande relevância para o desenvolvimento e aprimoramento de protocolos voltados para a expressão e purificação de metiltransferases de flavivírus. A pesquisa permitiu o estabelecimento de condições experimentais ideais para a expressão dessas proteínas, destacando-se a utilização do plasmídeo pETM11 para a clonagem, a temperatura de incubação de 18 °C e o uso do meio de cultivo ZYM5052, que foram as melhores condições para maximizar a expressão proteica. Além disso, foi possível alcançar uma purificação eficiente da metiltransferase de YFV, evidenciada pela taxa de absorção de 980 mAU, obtendo alta concentração e pureza da proteína obtida. O HEPES (NaOH), pH 7,5, 500 mM de NaCl e 5% de glicerol proporcionou o melhor desempenho, contribuindo significativamente para a estabilização e possível funcionalidade da enzima ao longo dos demais experimentos.

O protocolo desenvolvido otimizado neste estudo para YFV mostrou-se bem-sucedido, oferecendo uma base sólida para futuras pesquisas envolvendo metiltransferase desse flavivírus e uma base para otimização de um protocolo de obtenção da mesma proteína de ZIKV. Esses apenas não melhoraram um avanço no campo da biologia estrutural e funcional dessas enzimas, mas também abrem caminho para novas aplicações, como a investigação de potenciais alvos terapêuticos e o desenvolvimento de estratégias antivirais. Assim, o trabalho realizado reafirma a importância de estabelecer protocolos robustos e reproduzíveis para estudos envolvendo proteínas de importância biotecnológica.

6. PERSPECTIVAS

Os próximos passos deste trabalho incluem uma otimização de um protocolo de obtenção da proteína de ZIKV, bem como uma abordagem ampla para a caracterização bioquímica e biofísica das metiltransferases de flavivírus, com o objetivo de compreender detalhadamente suas propriedades funcionais e estruturais.

Inicialmente, será realizada a caracterização das enzimas em solução, utilizando técnicas como Fluorescência Diferencial de Varredura (DSF) e Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC), que permitirão avaliar a estabilidade térmica e as transições conformacionais das proteínas em diferentes condições. Complementarmente, a Circular do Dicroísmo (CD) será utilizada para analisar a organização secundária das metiltransferases em

solução e verificar possíveis alterações estruturais em resposta aos inibidores. Além das análises também em solução, o trabalho incluirá esforços para a determinação da estrutura cristalográfica das metiltransferases por meio de técnicas de cristalografia de raios-X. Essa abordagem será essencial para compreender, em alta resolução, os detalhes moleculares do domínio catalítico e os sítios de ligação aos ligantes, como SAM/SAH e GTP, permitindo a identificação de características importantes para sua atividade biológica.

Essas perspectivas futuras não apenas aprofundarão o conhecimento sobre as metiltransferases de flavivírus, mas também fornecerão uma base para a investigação de novos alvos terapêuticos, com implicações significativas no combate às doenças causadas por esses vírus. O avanço nessa área poderá contribuir para o desenvolvimento de estratégias antivirais mais específicas e eficazes, consolidando a relevância do presente estudo.

7. REFERÊNCIAS

- ALMERINDA AGRELLI et al. ZIKA virus entry mechanisms in human cells. *Infection, Genetics and Evolution*, v. 69, p. 22–29, 1 abr. 2019.
- BELOUSHI, M. A. et al. Congenital and Perinatal Viral Infections: Consequences for the Mother and Fetus. *Viruses*, v. 16, n. 11, p. 1698–1698, 30 out. 2024.
- BRADRICK, S. S. Causes and Consequences of Flavivirus RNA Methylation. *Frontiers in Microbiology*, v. 8, 5 dez. 2017.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Situação epidemiológica da febre amarela no Monitoramento 2019/2020. *Boletim Epidemiológico*, v. 51, n. 46, p. 1–19, 2020.
- BYUNG HAK SONG et al. Zika virus: History, epidemiology, transmission, and clinical presentation. *Journal of Neuroimmunology*, v. 308, p. 50–64, 1 jul. 2017.
- CAI, X.-C.; K. KAPILASHRAMI; LUO, M. Synthesis and Assays of Inhibitors of Methyltransferases. *Methods in Enzymology*, p. 245–308, 1 jan. 2016.
- CÂMARA, F. P.; CARVALHO, L. M.; BACELLAR GOMES, A. L. Demographic profile of sylvatic yellow fever in Brazil from 1973 to 2008. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 107, n. 5, p. 324–327, 2013.
- DONG, H. et al. Flavivirus RNA methylation. *Journal of General Virology*, v. 95, n. 4, p. 763–778, 1 abr. 2014.
- EMAN ABDELRAHEEM et al. Methyltransferases: Functions and Applications. *ChemBioChem*, v. 23, n. 18, 5 jul. 2022
- FERRARIS, P.; YSSEL, H.; DOROTHÉE MISSÉ. Zika virus infection: an update. *Microbes and Infection*, v. 21, n. 8-9, p. 353–360, 1 out. 2019.
- FURTADO, N. D. Caracterização funcional dos polimorfismos detectados no vírus da febre amarela durante o surto no Brasil em 2017. *Fiocruz.br*, 2022.
- GAELE GABIANE; YEN, P.; ANNA-BELLA FAILLOUX. Aedes mosquitoes in the emerging threat of urban yellow fever transmission. *Reviews in Medical Virology*, v. 32, n. 4, 6 fev. 2022.

GEISS, B. J. et al. Focus on flaviviruses: current and future drug targets. *Future Medicinal Chemistry*, v. 1, n. 2, p. 327–344, 1 maio 2009.

GOTSCHLICH, E. C. Bullets and bacilli: The Spanish-American War and military medicine. *Journal of Clinical Investigation*, v. 115, n. 1, p. 1-3, 2005.

JULANDER, J. G. Experimental therapies for yellow fever. *Antiviral Research*, v. 97, n. 2, p. 169–179, 2013.

LIN, H.-H. et al. Zika virus structural biology and progress in vaccine development. *Biotechnology Advances*, v. 36, n. 1, p. 47–53, 1 jan. 2018.

MARCELO NÓBREGA LITVOC; TERRA, C.; IGOR, M. Yellow fever. *Revista da Associação Médica Brasileira*, v. 64, n. 2, p. 106–113, 1 fev. 2018.

MONATH, T. P. Treatment of yellow fever. *Antiviral Research*, v. 78, n. 1, p. 116–124, 1 abr. 2008.

MONATH, T. P.; PEDRO F. C. VASCONCELOS. Yellow fever. *Journal of Clinical Virology*, v. 64, p. 160–173, 1 mar. 2015.

MUNOZ-JORDAN, J. L. Diagnosis of Zika Virus Infections: Challenges and Opportunities. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 216, n. suppl_10, p. S951–S956, 13 out. 2017.

NICHOLLS, C. M. R.; MADHUMATI SEVVANA; KUHN, R. J. Structure-guided paradigm shifts in flavivirus assembly and maturation mechanisms. *Advances in Virus Research*, p. 33–83, 1 jan. 2020.

OSPINA, M. L. et al. Zika Virus Disease and Pregnancy Outcomes in Colombia. *New England Journal of Medicine*, v. 383, n. 6, p. 537–545, 6 ago. 2020.

PIELNAA, P. et al. Zika virus-spread, epidemiology, genome, transmission cycle, clinical manifestation, associated challenges, vaccine and antiviral drug development. *Virology*, v. 543, p. 34–42, 1 abr. 2020.

RAMDHAN, P.; LI, C. Targeting Viral Methyltransferases: An Approach to Antiviral Treatment for ssRNA Viruses. *Viruses*, v. 14, n. 2, p. 379–379, 12 fev. 2022.

Re-thinking yellow fever vaccines: Fighting old foes with new generation vaccines. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 2022.

Reyes, L. F. . UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS. [2011.]. Disponível em: <<https://teses.usp.br/teses/disponiveis/76/76132/tde-27052011-114447/publico/LuisFernandoReyesDOdefendida.pdf>>. Acesso em: 24 fev. 2025.

RIBEIRO, V. Universidade Federal do Rio Grande do Norte DISSERTAÇÃO DE MESTRADO AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DO PLASMÍDEO pQE-30 E EXPRESSÃO DO ANTÍGENO 503 DE LEISHMANIA I. CHAGASI EM ESCHERICHIA COLI M15 EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE IPTG E TEMPERATURAS DE CULTIVO. [2016]. Disponível em: <https://repositorio.ufrn.br/bitstream/123456789/25113/1/VitorTroccoliRibeiro_DISSERT.pdf>. Acesso em: 24 fev. 2025.

R. LOWE et al. The Zika virus epidemic in Brazil: From discovery to future implications. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, v. 15, n. 1, 2018.

S. C. WEAVER et al. Zika virus: History, emergence, biology, and prospects for control. *Antiviral Research*, v. 130, p. 69–80, 2016.

SIEW PHENG LIM; NOBLE, C. G.; SHI, P.-Y. The dengue virus NS5 protein as a target for drug discovery. *Antiviral Research*, v. 119, p. 57–67, 1 jul. 2015.

SILVA, N. I. O. et al. Recent sylvatic yellow fever virus transmission in Brazil: The news from an old disease. *Virology Journal*, v. 17, n. 1, p. 1–12, 2020.

SONG, B.-H. et al. Zika virus: History, epidemiology, transmission, and clinical presentation. *Journal of Neuroimmunology*, v. 308, p. 50–64, 3 mar. 2017.

TUELLS, J.; HENAO-MARTÍNEZ, A. F. FRANCO-PAREDES, C. Yellow Fever: A Perennial Threat. *Archives of Medical Research*, v. 53, n. 7, p. 649–657, 1 nov. 2022.

WAGGONER, J. J.; ROJAS, A.; PINSKY, B. A. Yellow Fever Virus: Diagnostics for a Persistent Arboviral Threat. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 56, n. 10, 1 out. 2018.

ZHOU, Y. et al. Structure and Function of Flavivirus NS5 Methyltransferase. *Journal of Virology*, v. 81, n. 8, p. 3891–3903, 3 fev. 2007.

8. ANEXOS

8.1. ANEXO A- Protocolo de expressão e purificação de YFV

YFV_NS5_metiltransferase

Clonagem YFV_NS5_metiltransferase

A clonagem da sequência codificante da proteína de Febre Amarela iniciou-se com a obtenção de cDNA derivado do isolado não humano ES-504, por colaboradores do Laboratório de Biologia Molecular de Flavivírus, Instituto Oswaldo Cruz-Fiocruz, gerenciado pela Prof. Dra Myrna C. Bonaldo e depositado no GenBank :

- KY885001.1

Foi clonada uma construção, fazendo o uso do sistema LIC “Clonagem Independente de Ligase” (LIC, do inglês, Ligase Independent Cloning), do plasmídeo pETM-11/LIC e incluindo as sequências 5’-CAGGGCGCCATG-3’ na extremidade 5’ de cada primer forward, e a sequência 5’-GACCCGACGCGGTTA-3’ na extremidade 5’ de cada primer reverse para obtenção da construção ES-504_Methyl (1aa -270aa) de acordo com o gene e a sequência de aminoácidos abaixo.

(Gene:GGGAGAGCGAATGGGAAGACCCTGGGTGAGGTCTGGAAAAGGGAGCTGAACCTGCTGGACA AACAGCAGTTTGAGCTGTATAACGGACAGACATTGTGGAGGTGGACCGTGACACAGCTCGCCGAC ACCTGGCTGAAGGGAAAGTGGACACCGGAGTGGCCGCTCGAGAGGGACCGCAAAATTGAGATGG TTCCATGAACGTGGCTATGTCAAGTTGGAAGGAAGAGTGACTGACCTGGGATGTGGGCGTGGTGGC TGGTGCTACTACGCTGCTGCACAGAGAGAAGTGAGTGGGGTCAGGGGATTACCCCTTGAAAGGAA GGCCACGAAAAGCCCATGAATGTGCAGAGCCTGGGGTGGAAACATCATCACCTTCAAGGACAAGACT GATGTCCATCGCCTTGAGCCGATAAAGTGTGATACCCTGCTGTGCGACATTGGAGAGTCGTCCCCATC ATCAGTGACCGAAGGGGAAAGAACCATGAGAGTTCTTGACACTGTTGAGAAATGGTTGAGCTGTGG TGTGAAAGCTTCTGTGTGAAGGTGTTGGCTCCATACATGCCTGATGTGCTTGAAAAGTTAGAGTTG CTCAAAGGAGGTTTGGTGGAAACGGTAATCAGGAATCCCCTCTCTAGAAATTCAACCCACGAGATGT ATTATGTGTCGGGAGCCCGCAGTAACATCACGTTCACTGTGAATCAAACATCCCGCCTCTTAATGAGG AGAATGAGGCGCCCGACAGGCAAGGTGACTCTTGAAGCCGATGTCATCCTCCCAATTGGAACACGC AGTGTGGAAACAGATAAAGG)

(Proteína:GRANGKTLGEVWKRELNLLDKQQFELYKRTDIVEVDRDTARRHLAEGKVDTGVAVSRGTAKL RWFHERGYVKLEGRVTDLGCGRGGWCYAAAQREVSQVIRGFTLGKEGHEKPMNVQSLGWNIIITFKD KTDVHRLEPIKCDTLLCDIGESSPSSVTEGERTMRVLDTVEKWLSGCVESFCVKVLAPYMPDVLEKLEL

LQRRFGGTVIRNPLSRNSTHEMYVSGARSNITFTVNQTSRLLMRRMRRPTGKVTLEADVILPIGTRSVE
TDK)

Expressão YFV_NS5_Metiltransferase

Dia1

Preparação e transformação

- Preparar 8 L de meio ZYM5052.
- Preparar 100mL de LB para pré-inóculo
- Preparar LB-ágar (3%)

Transformação de *E. coli* Rosetta DE3:

- Adicionar 100 ng de plasmídeo pET M11 com o gene YFV_NS5_Metiltransferase (pETM11_YFV_NS5_Metil) a 50 µL de células competentes de *E. coli* Rosetta DE3 em um tubo de microcentrífuga.
- Incubar a mistura por 10 minutos em banho de gelo.
- Realizar choque térmico, colocando o tubo em banho-maria a 42°C por 2 minutos.
- Retornar imediatamente o tubo para o banho de gelo por 10 minutos.

Recuperação das Células Transformadas:

- Adicionar 500 µL de meio LB ao tubo contendo as células transformadas.
- Transferir o tubo para o shaker, mantendo a agitação a 200 rpm e incubando a 37°C por 1 hora.

Seleção de Colônias Transformadas:

- Preparar placas de LB-ágar (3%) suplementadas com 50 µg/mL de Canamicina e 34 µg/mL de Cloranfenicol.
- Espalhar 100 µL da suspensão celular em cada placa de LB-ágar.
- Incubar as placas "overnight" (cerca de 16 horas) em estufa a 37°C.

DIA 2

Pré-inóculo

- Retirar as placas da estufa.
- Vedá-las e armazená-las na geladeira a 8°C para conservação.

Preparação do pré-inóculo:

- Suplementar 10 mL de LB com 50 µg/mL de Canamicina e 34 µg/mL de Cloranfenicol.

- Raspar as colônias crescidas nas placas do dia anterior utilizando uma ponteira estéril.
- Transferir as colônias raspadas para o meio LB suplementado.
- Incubar a suspensão celular a 37°C, 200 rpm por aproximadamente 18 horas para crescimento celular.

Dia3

Expressão de proteína

Preparação do Meio ZYM5052:

- Suplementar cada litro de meio ZYM5052 com 50 µg/mL de Canamicina e 34 µg/mL de Clorafenicol sob fluxo laminar, para manter as condições assépticas.

Inoculação para Expressão:

- Adicionar 10 mL do pré-inóculo preparado no dia anterior a cada 1L de meio ZYM5052.
- Crescer a cultura até atingir uma Densidade Óptica (DO) de 0,6 a 37°C, com agitação de 200 rpm.

Indução da Expressão:

- Reduzir a temperatura para 18°C e continuar a agitação a 200 rpm por 16 horas para induzir a expressão da proteína recombinante.

DIA 4

COLETA DE CÉLULAS

Tampão A

- 500 mM NaCl
 - 50 mM Tris pH 8
 - 10 mM Imidazol
 - 10% glicerol
 - 1mM DTT (colocar no momento do uso)
- *Fazer 1L para afinidade**

Coleta das Células:

1. Coletar as células por centrifugação a 4.000 rpm por 40 minutos, a 4°C.
2. Descartar o sobrenadante.

Ressuspensão das Células:

1. Adicionar 40 mL de tampão A a cada pellet de células.
2. Colocar os pellets no shaker para ressuspender uniformemente as células.
3. Armazenar os pellets em tubos Falcon de 50 mL e guardar em freezer a -20°C para posterior purificação.

Purificação YFV_NS5_Methyl

Preparação

- Fazer gel acrilamida 12%
- Ligar centrifugas de chão e colocar a 4 °C
- Descongelar pellet equivalente a 2L de expressão
- Preparar tampões A, B e gel filtração

Tampão A

- 300 mM NaCl ***Fazer 1L para afinidade + 2L para diálise**
- 50 mM Tris pH 8
- 10 mM Imidazol
- 10% glicerol
- 1mM DTT

Tampão b

- 300 mM NaCl ***Fazer 500 mL**
- 50 mM Tris pH 8
- 250 mM Imidazol
- 10% glicerol

Tampão Exclusão Molecular

- 500 mM NaCl *** Fazer 500 mL**
- 20 mM Hepes pH 7,5
- 5% glicerol
- 1 mM DTT

Dia 1

Lise Celular

Descongelamento das Células:

- Retirar os pellets de células armazenados a -20°C e descongelá-los em água em temperatura ambiente.
- Evitar descongelamento em temperaturas elevadas para prevenir danos às células.

Adição de Reagentes:

- Após o descongelamento, adicionar os seguintes reagentes para preparar a solução de lise:
 - **β-mercaptoetanol:** 1 mM
 - **Lisozima (50mg/mL):** 1 µL/mL
 - **Benzonase (500U/mL):** 1 µL/mL
 - **PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride):** 1 mM (inibidor de proteases)

Incubação:

- Deixar a mistura no gelo por 30 minutos, agitando ocasionalmente para garantir a dispersão uniforme dos reagentes.

Lise das Células:

- Realizar a lise celular por sonicação, utilizando as seguintes condições:

- Sonicar por 10 minutos, com 2 segundos ON e 4 segundos OFF.
- Ajustar a amplitude da sonicação para 25%.

Afinidade 1

Centrifugação do Lisado Celular

- Centrifugar o lisado a **12.900 rpm** por **20 minutos a 4°C**.
- Após a centrifugação:
 - Separar o sobrenadante (lisado solúvel).
 - Coletar o pellet (fração insolúvel) para análise posterior.

Preparação da Coluna de Níquel

- Lavar a coluna de afinidade com **10 volumes de coluna (CV)** de água ultrapura utilizando fluxo de **5 mL/minuto**.
- Equilibrar a coluna com **10 CV de tampão A**, também a um fluxo de **5 mL/minuto**.

Coleta de Amostras para Análise

- Após a centrifugação:
 - Separar uma alíquota de **18 µL** do lisado solúvel (sobrenadante).
 - Para o pellet (fração insolúvel):
 - Adicionar uma pequena quantidade de pellet (usando uma ponta de ponteira) a **18 µL de SDS a 10%**.
 - Homogeneizar bem para facilitar a análise em gel de SDS-PAGE.

Aplicação do Lisado Solúvel na Coluna

- Manter o lisado solúvel em banho de gelo durante toda a manipulação.
- Inserir o lisado solúvel na coluna de afinidade
- Garantir que todo o volume seja aplicado de forma uniforme e sem interrupções.

Lavar a Coluna

- Após a aplicação do lisado:
 - Lavar a coluna com **10 VC de tampão A** para remover proteínas não ligadas.
 - Lavar novamente com **10VC de tampão 10% de tampão B** para eliminar proteínas fracamente ligadas.

Eluição da Proteína Recombinante

- Eluir a proteína de interesse utilizando um gradiente de tampão B, conforme segue:
 - Gradualmente aumentar a concentração de tampão B, atingindo **100% de tampão B em 5 VC**.
 - Coletar as frações de eluição em tubos Falcon.
 - Retirar uma alíquota de **18 µL** da eluição para análise posterior em gel de SDS-PAGE.

Exclusão molecular

Concentração da Proteína

- Transferir a proteína eluída da coluna de afinidade para um concentrador de corte 10 kDa.
- Centrifugar o concentrador em 1.500 g a 4°C por 10 minutos.
- Repetir o processo em ciclos de 10 minutos, verificando o volume entre cada ciclo, até que o volume total seja reduzido para 2 mL.
- Após atingir o volume desejado, transferir a proteína concentrada para um tubo novo, mantendo-a em gelo.

Preparação do Sistema ÄKTA

- Preparação do Loop:
 - o Conectar um loop de 1 mL ao sistema ÄKTA.
 - o Lavar o loop com água ultrapura utilizando uma seringa para remover possíveis resíduos.
 - o Lavar novamente injetando o tampão de gel filtração (o mesmo que será usado durante o experimento).
- Preparação do Coletor de Tubos:
 - o Colocar 30 tubos de coleta no coletor do sistema ÄKTA.
 - o Organizar a posição dos tubos no coletor, garantindo o alinhamento correto com o sistema.
- Configuração do Sistema:
 - o Selecionar o protocolo de gel filtração já existente no sistema ÄKTA.
 - o Ajustar o protocolo para iniciar no modo Manual Load.
- Injeção da Amostra
 - o Filtrar a proteína concentrada com uma seringa de filtro de 0,22 µm para remover partículas insolúveis.
 - o Injetar a proteína filtrada no loop de 1 mL, garantindo que não haja bolhas no sistema.
- Configurar o descarte inicial:
 - o Direcionar os primeiros 20% do volume da coluna para o descarte (essa etapa remove possíveis contaminantes ou proteínas agregadas).
- Configurar a coleta do restante:
 - o Coletar as frações correspondentes aos picos detectados por leitura de UV.

Coleta e Análise dos Picos

- Identificar os picos detectados pelo sistema ÄKTA e coletar as frações correspondentes em tubos específicos.
- Retirar amostras de 18 µL de cada tubo que contenha um pico para análise.
- Análise das amostras por eletroforese SDS-PAGE

- Avaliar a presença de bandas únicas, indicando a pureza da proteína. Caso haja múltiplas bandas, considerar etapas adicionais de purificação.

8.2. ANEXO B- Protocolo de expressão de ZIKV.

ZIKV_NS5_METILTRANSFERASE

CLONAGEM ZIKV_NS5_METILTRANSFERASE

A clonagem da sequência codificante da proteína do vírus Zika foi realizada utilizando um gene sintético, cuja síntese foi conduzida pela empresa Genscript.

-AY632535.2

Foi clonada uma construção, fazendo o uso do sistema LIC “Clonagem Independente de Ligase” (LIC, do inglês, Ligase Independent Cloning), do plasmídeo pETM-11/LIC e pETNUS incluindo as sequências 5’-CAGGGCGCCATG-3’ na extremidade 5’ de cada primer forward, e a sequência 5’-GACCCGACGCGTTA-3’ na extremidade 5’ de cada primer reverse para obtenção da construção ES-504_Methyl (1aa -254aa) de acordo com o gene e a sequência de aminoácidos abaixo.

(Gene:ATGGGTGGTGGTACCGGCGAAACCCTGGGCGAAAAATGGAAAGCACGTCTGAATCAGATGAG TGCCCTGGAATTTTATAGCTATAAAAAAGCGGCATCACCGAAGTTTGTTCGTGAAGAAGCACGTCGT GCCCTGAAAGATGGTGTGGCCACCGGCGGCCATGCAGTGAGTCGTGGTAGTGCCAAACTGCGCTGG CTGGTTGAACGCGGTTATCTGCAGCCGTATGGTAAAGTTATTGATCTGGGCTGTGGTCGTGGCGGTTG GAGTTATTATGCAGCAACCATTCGTAAAGTGCAGGAAGTTAAAGGCTATAACCAAAGGTGGCCCGGT CATGAAGAACCGGTGCTGGTTCAGAGCTATGGTTGGAATATTGTGCGCCTGAAAAGCGGCGTGGATG TTTTTCATATGGCAGCAGAACCCTGTGATACCCTGCTGTGTGATATTGGTGAAAGTAGCAGTAGTCCG GAAGTGGAAGAAGCCCGCACCCCTGCGCGTGTGAGCATGGTTGGCGATTGGCTGGAAAAACGTCCG GGCGCATTTTGCATTAAGTGTGTGTCCGTATAACCAGTACCATGATGGAAACCCTGGAACGCCTGC AGCGCCGCTATGGTGGTGGCTTAGTTCGTGTTCCGCTGAGTCGTAATAGTACCCATGAAATGTATTGG GTGAGTGGCGAAAAAGTAATACCATTAAGCGTTAGTACCACAGTCAGCTGCTGCTGGGCCG ATGGATGGTCCGCGTCGTCCTGTAAATAT)

(Proteína:MGGGTGETLGEKWKARLNQMSALEFYKSGITEVCREEARRALKDGVATGGHAVSRGSA KLRWLVERGYLQPYGKVIDLGCGRGGWSYAAATIRKVQEVKGYTKGGPGHEEPVLVQSYGWNIVRLK SGVDVFHMAAEPDILLCDIGESSSSPEVEEARTLRVLSMVGDWLEKRPGAFCIKVLCPYTSTMMETLE RLQRRYGGGLVRVPLSRNSTHEMYWVSGAKSNTIKSVSTTSQLLLGRMDGPRRPVKY)

EXPRESSÃO ZIKV_ns5_METILTRANSFERASE

DIA1

PREPARAÇÃO E TRANSFORMAÇÃO

- Preparar 8 L de meio ZYM5052.
- Preparar 100mL de LB para pré-inóculo
- Preparar LB-ágar (3%)

Transformação de *E. coli* Rosetta DE3:

- Adicionar 100 ng de plasmídeo com o gene YFV_NS5_Metiltransferase a 50 µL de células competentes de *E. coli* Rosetta DE3 em um tubo de microcentrífuga.
- Incubar a mistura por 10 minutos em banho de gelo.
- Realizar choque térmico, colocando o tubo em banho-maria a 42°C por 2 minutos.
- Retornar imediatamente o tubo para o banho de gelo por 10 minutos.

Recuperação das Células Transformadas:

- Adicionar 500 µL de meio LB ao tubo contendo as células transformadas.
- Transferir o tubo para o shaker, mantendo a agitação a 200 rpm e incubando a 37°C por 1 hora.

Seleção de Colônias Transformadas:

- Preparar placas de LB-ágar (3%) suplementadas com 50 µg/mL de Canamicina e 34 µg/mL de Cloranfenicol.
- Espalhar 100 µL da suspensão celular em cada placa de LB-ágar.
- Incubar as placas "overnight" (cerca de 16 horas) em estufa a 37°C.

DIA 2

PRÉ-INÓCULO

- Retirar as placas da estufa.
- Vedá-las e armazená-las na geladeira a 8°C para conservação.

Preparação do pré-inóculo:

- Suplementar 10 mL de LB com 50 µg/mL de Canamicina e 34 µg/mL de Clorafenicol.
- Raspar as colônias crescidas nas placas do dia anterior utilizando uma ponteira estéril.
- Transferir as colônias raspadas para o meio LB suplementado.
- Incubar a suspensão celular a 37°C, 200 rpm por aproximadamente 18 horas para crescimento celular.

DIA3

EXPRESSÃO DE PROTEÍNA

Preparação do Meio ZYM5052:

- Suplementar cada litro de meio ZYM5052 com 50 µg/mL de Canamicina e 34 µg/mL de Cloranfenicol sob fluxo laminar, para manter as condições assépticas.

Inoculação para Expressão:

- Adicionar 10 mL do pré-inóculo preparado no dia anterior a cada 1L de meio ZYM5052.
- Crescer a cultura até atingir uma Densidade Óptica (DO) de 0,6 a 37°C, com agitação de 200 rpm.

Indução da Expressão:

- Reduzir a temperatura para 18°C e continuar a agitação a 200 rpm por 16 horas para induzir a expressão da proteína recombinante.

DIA 4

COLETA DE CÉLULAS

TAMPÃO A

- 500 mM NaCl ***Fazer 1L para afinidade**
- 50 mM Tris pH 8
- 10 mM Imidazol
- 10% glicerol
- 1mM DTT

Coleta das Células:

- Coletar as células por centrifugação a 4.000 rpm por 40 minutos, a 4°C.
- Descartar o sobrenadante.

Ressuspensão das Células:

- Adicionar 40 mL de tampão A a cada pellet de células.
- Colocar os pellets no shaker para ressuspender uniformemente as células.
- Armazenar os pellets em tubos Falcon de 50 mL e guardar em freezer a -20°C para posterior purificação.

PURIFICAÇÃO ZIKV_NS5_METHYL

A ESTABELEECER