

Universidade de São Paulo Instituto de Física de São Carlos

Semana Integrada do Instituto de Física de São Carlos

13^a edição

Livro de Resumos

São Carlos
2023

Ficha catalográfica elaborada pelo Serviço de Informação do IFSC

Semana Integrada do Instituto de Física de São Carlos
(13: 21-25 ago.: 2023: São Carlos, SP.)

Livro de resumos da XIII Semana Integrada do Instituto de Física de São Carlos – Universidade de São Paulo / Organizado por Adonai Hilário da Silva [et al.]. São Carlos: IFSC, 2023.
358p.

Texto em português.

1.Física. I. Silva, Adonai Hilário da, org. II. Título.

ISSN: 2965-7679

PG155

Caracterização funcional do complexo de replicação (DNA polimerase) do vírus Monkeypox, visando a busca por candidatos a fármacos antivirais

OLIVEIRA, Juliana Roberta Torini de Souza¹; OLIVA, Glaucius¹; SILVA, Bianca Righetti da¹

bianca.rsilva@usp.br

¹Instituto de Física de São Carlos - USP

Em maio de 2022, a Organização Mundial da Saúde (OMS) foi informada de um caso confirmado da varíola do macaco causada pelo vírus Monkeypox (MPXV) no Reino Unido, e após isto, houve uma rápida disseminação da doença em outros países. (1) O MPXV, pertence ao gênero Orthopoxvirus, família Poxviridae e apresenta DNA de fita dupla. (2) Esse vírus possui duas polimerases essenciais, uma DNA polimerase (DNApol) e uma RNA polimerase dependente de DNA (DdRp). A DNApol é um complexo catalítico que possui 3 subunidades proteicas, que juntas estabilizam a holoenzima, são elas, F8, A22 e E4. (3) Além disso, essa enzima é um importante alvo molecular, por ser essencial tanto na replicação viral quanto na síntese precoce no processo de infecção. Obter a DNA polimerase do vírus MPXV com suas 3 subunidades, com alto grau de rendimento e solubilidade, visando caracterizá-las funcionalmente através da padronização de ensaios cinéticos e estruturais. Os genes para expressão em *E.coli* das subunidades F8, A22 e E4 foram sintetizados comercialmente em vetores pET28a. Para expressão em células de inseto *S. frugiperda* (Sf9) foram desenhados primers para a subclonagem em diferentes vetores (pFastBac-6Hzb, pFastBac-Bse e pFastBac-CT10) visando analisar o melhor processo de purificação. Esses vetores permitem a expressão da proteína alvo fusionada à proteína 6Hzb; à uma cauda de histidinas no N-terminal e à uma cauda de histidinas no C terminal, respectivamente. Os vetores pET28a contendo o gene das subunidades F8, A22 e E4 foram ressuspensos em água autoclavada na concentração de 50 ng/μl, 2 μl foram utilizados para transformar cepas de *E. coli* BL21, BL21 Star e Rosetta. Observou-se o aparecimento de colônias isoladas após 24 horas, que foram inoculadas em meio LB seletivo contendo 50 μg/mL de kanamicina. Os plasmídeos foram recuperados utilizando o Kit Fast-n-Easy Plasmid mini-prep e serão utilizados para amplificação e posterior subclonagem dos genes em vetores de expressão em células Sf9, caso seja necessário. As cepas transformadas serão submetidas à teste de expressão em pequena escala, variando o meio de expressão (LB – Luria Bertani, TB - Terrific Broth e ZYM - meio auto indutor) e a concentração de IPTG (0,25 mM, 0,5 mM e 1M). Após os testes de expressão, será possível avaliar rendimento e solubilidade das proteínas alvo, estabelecendo um protocolo otimizado de expressão e assim seguir para os testes de purificação e padronização dos ensaios cinéticos.

Palavras-chave: Monkeypox. DNA polimerase. Inibidores.

Agência de fomento: FAPESP (2023/04660-7)

Referências:

- 1 BOING, A. C. *et al.* Monkeypox: o que estamos esperando para agir? **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 25, p. e220020-1e220020-3. DOI: 10.1590/1980-549720220020.2
- 2 CLARO, I. M. *et al.* Shotgun metagenomic sequencing of the first case of monkeypox virus in Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 64, p. e48-1-48-4, 2022.
- 3 PENG, Q. *et al.* Structure of monkeypox virus DNA polymerase holoenzyme. **Science**, v. 379, n. 6627, p. 100-105, 2022.