

Universidade de São Paulo
Instituto de Física de São Carlos

XIV Semana Integrada do Instituto de
Física de São Carlos

Livro de Resumos da Pós-Graduação

São Carlos
2024

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

143

Caracterização funcional da nspE4 do vírus Monkeypox como alvo para desenvolvimento de antivirais

SILVA, Bianca Righetti da¹; OLIVA, Glaucius¹; TORINI, Juliana¹

bianca.rsilva@usp.br

¹Instituto de Física de São Carlos - USP

Introdução: Em maio de 2022, a Organização Mundial da Saúde (OMS) foi notificada sobre um caso confirmado de varíola dos macacos no Reino Unido, causada pelo vírus Monkeypox (MPXV). Posteriormente, houve uma rápida disseminação da doença para outros países. O MPXV, pertence ao gênero Orthopoxvirus e contém um genoma de DNA de fita dupla, além de codificar duas polimerases essenciais: uma DNA polimerase (DNApol) (1) e uma RNA polimerase dependente de DNA (DdRp). Uma das enzimas do complexo de replicação da DNApol é a uracil DNA glicosilase (E4), uma enzima que desempenha um papel fundamental na manutenção da estabilidade genômica, removendo uracilas incorporadas incorretamente no DNA e prevenindo mutações, que no MPXV são extremamente altas a ponto de inviabilizarem a replicação. (2) Além disso, essa enzima também participa do processo de replicação do DNA viral, o que a torna um alvo promissor na busca por compostos antivirais. **Objetivo:** Caracterizar funcionalmente a nspE4 por meio de ensaios biofísicos, cinéticos e estruturais. **Materiais e métodos:** O gene nspE4 foi clonado no vetor pET28a para expressão em *Escherichia coli* BL21 (DE3). A proteína resultante foi purificada por cromatografia de afinidade utilizando coluna de Ni²⁺ e quando necessário, foi realizada uma etapa de cromatografia de exclusão molecular utilizando uma coluna Superdex 75 10/300. Para a realização dos ensaios cinéticos foi utilizado como substrato uma sequência sintética de DNA contendo uracilas pareadas com adenina. O ensaio é realizado em tampão contendo 20mM Tris pH7, 1mM EDTA, 1mM DTT e 100ug/ml BSA. Foram realizados ensaios de cristalização com a proteína a 6,87 mg/mL, em sistema de difusão de vapor em gota sentada. **Resultados:** O melhor rendimento da proteína nspE4 foi obtido através da expressão do gene utilizando o meio TB independentemente da concentração por isso, foi utilizada 500 mM de IPTG. A proteína nspE4 foi purificada com alto rendimento, 12 mg de proteína por litro de cultura. A purificação foi feita somente em cromatografia de afinidade para os ensaios cinéticos e com uma etapa adicional de cromatografia de exclusão molecular para os ensaios de cristalização, afim de se obter apenas um estado oligomérico da proteína. Ensaio cinéticos foram otimizados testando diferentes concentrações de substrato e enzima. Para a enzima, foram testadas concentrações entre 10 e 80 nM e para o substrato, entre 0,1 e 400 nM. Estabeleceu-se que para ensaios futuros, serão utilizadas concentrações de 10 nM para enzima e 3,5 nM de substrato. Foram obtidos cristais após 21 dias na condição E1 do kit SG1, que é composta de 2M (NH₄)₂SO₄ e 0,1M BIS-TRIS pH5,5, a 20°C. **Conclusão:** serão realizados novos ensaios cristalográficos visando melhorar a condição de cristalização da proteína. Com o estabelecimento das condições cinéticas será possível prosseguir com a busca por compostos inibidores com potencial terapêutico antiviral.

Palavras-chave: Monkeypox; DNA polimerase; Inibidores.

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

Referências:

- 1 PENG, Q. *et al.* Structure of monkeypox virus DNA polymerase holoenzyme. **Science**, v. 379, n. 6627, p. 100–105, 2022.
- 2 DURAFFOUR, S. *et al.* Substrate specificity of homogeneous monkeypox virus uracil-DNA glycosylase. **Biochemistry**, v. 46, p. 11874–11881, 2007.