DISSERTAÇÕES 2018

**Título:**

Obtenção dos enantiômeros do carbonato de propileno por rota quimioenzimática.

**Autor:**

GUSTAVO DE SOUZA POLILLO PINTO

**Tipo de Trabalho de Conclusão:**

DISSERTAÇÃO

**Abreviatura:**

PINTO, G. S. P.

**Data da Defesa:**

28/11/2018

**Resumo:**

A obtenção de substâncias enantiopuras desperta grande interesse tanto em esfera acadêmica, quanto industrialmente. No presente trabalho, estudou-se o emprego de lipases e de diferentes substratos em potencial, com o objetivo de se obter o carbonato de propileno enantiomericamente puro, sobretudo o (R)-carbonato de propileno. Este é utilizado pela indústria farmacêutica para a síntese do tenofovir, um antirretroviral para tratamento de primeira linha da infecção por HIV. Visualizaram-se três estratégias sintéticas: 1ª) a partir de resolução de derivados 1-O-acilados do propano-1,2-diol (1,2-PDO); 2ª) a partir da resolução do carbonato de propileno racêmico; 3ª) a partir da resolução de derivados 1-carbonatos acíclicos de 1,2-PDO. Pela primeira, e mais promissora dentre as três, estudaram-se diversas reações, tendo-se como sítio de reação tanto a hidroxila secundária, ligada ao estereocentro, quanto o grupo éster primário dos substratos. Foram ensaiadas esterificações com ácidos graxos, transesterificação, alcoxicarbonilação, assim como, alcoólises. Destacam-se os resultados obtidos com os substratos benzoato e p-anisoato de 2-hidroxipropila, com os quais se conseguiu avaliar diretamente a enantiosseletividade das reações estudadas por meio do excesso enantiomérico de substrato remanescente (ees). Os melhores resultados foram obtidos através de transesterificação com acetato de vinila. Com o benzoato de 2-hidroxipropila, conseguiu-se ees de 93 % (66 % de conversão), enquanto que com o derivado p-anisoato, 84 % de ees (59 % de conversão). Dados de polarimetria do benzoato de 2-hidroxipropila indicaram que o substrato enriquecido possui a configuração S. As alcoólises desses substratos mostraram-se com menor enantiosseletividade, mas, curiosamente, observou-se que as mesmas procederam com enantiodireção oposta, isto é, o substrato enriquecido foi o R. No caso do benzoato de 2-hidroxipropila, com maiores valores de conversão deste substrato na reação de metanólise, conseguiu-se obter moderado ees (80 %). Para as reações de alcoólise, logrou-se êxito no desenvolvimento de protocolo simples de separação física do substrato remanescente e produto, por meio de extração com água, conferindo alta praticidade ao processo. Os substratos remanescentes de metanólise e transesterificação foram convertidos a ambos enantiômeros do carbonato de propileno, segundo processo um pote de metanólise, seguida de reação com DMC.

**Palavras-chave:**

Carbonato de propileno;Resolução cinética;Lipase;Tenofovir

**Título:**

DIAGNÓSTICO DE ZIKA VÍRUS: PADRONIZAÇÃO DAS TÉCNICAS DE PCR CONVENCIONAL E QUANTITATIVO POR SYBR GREEN NA REGIÃO GENÔMICA C-prM.

**Autor:**

THAYANE DA ENCARNACAO SA GUIMARAES

**Tipo de Trabalho de Conclusão:**

DISSERTAÇÃO

**Abreviatura:**

GUIMARAES, T. E. S.

**Data da Defesa:**

20/09/2018

**Resumo:**

O vírus Zika (ZIKV) é o agente etiológico da febre zika, uma arbovirose transmitida principalmente por mosquitos do gênero Aedes. Além do mosquito, o ZIKV pode ser transmitido por via sexual, materno-fetal e transfusão de sangue. Esse arbovírus, integra a família Flaviviridae, seu genoma é composto por RNA de fita simples e polaridade positiva. Até o momento, sua patogênese não é bem estabelecida, todavia, sabe-se que o vírus é detectado em alguns tipos de amostras como: sangue, saliva, urina, líquido amniótico e sêmen de pacientes. Cerca de 80% dos infectados com ZIKV são assintomáticos, esta doença é autolimitante dura de 2 a 7 dias, apresentando como principais sintomas: febre, artralgia, mialgia, cefaleia, exantema, conjuntivite e mal-estar, alguns casos podem chegar a complicações neurológicas como síndrome de Guillain-Barré e malformações como a microcefalia. A recomendação da OMS é a realização do diagnóstico molecular do genoma viral para a confirmação da doença, utilizando ensaios da reação de cadeia de polimerase: RT-PCR e PCR quantitativo (qPCR). Esse projeto teve como objetivo desenvolver um protocolo qualitativo e quantitativo para detecção da carga viral do ZIKV, que inclui novos pares de iniciadores para diagnóstico, localizados na junção entre os genes do capsídeo e da pré-Membrana (C-prM). Esta região gênica foi escolhida por ser mais divergente entre os genomas virais da família Flaviviridae do que a região da proteína E, proposta por Lanciotti et al., 2008 para detectar o ZIKV. Para isso, foram utilizados os métodos de extração de RNA por TRIzol, síntese de cDNA, PCR convencional (hemi-nested), qPCR (SYBR Green), clonagen da sequência do vírus em vetor de expressão e sequenciamento. Foram desenhados e testados pares de iniciadores para detecção do ZIKV utilizando como template um plasmídeo sintético, e o cDNA do vírus, proveniente de células Vero. Dois pares de iniciadores foram testados e apenas um se apresentou mais específico e foi utilizado para detecção de ZIKV. O par selecionado foi testado por biologia computacional contra o banco de dados do NCBI utilizando as palavras chaves:“Zika virus" [porgn: \_txid64320] AND genome NOT partial NOT nearl". No banco foram encontradas 1.123 sequências completas de ZIKV e o par de iniciadores foi capaz de reconhecer todas. O protocolo do RT-PCR foi validado com as amostras de pacientes com aparente quadro clínico de febre zika, a saber: saliva (14) e urina (5), como controle negativo amostras de saliva de pacientes sem a presença do quadro clínico (protocolo de ética: 80709 HUCFF/FM/UFRJ). Das 19 amostras testadas, 15 delas apresentaram resultado positivo, utilizando para detecção o par GTZK-F/STZK-R na técnica de PCR convencional. No ensaio de qPCR, este par de iniciadores apresentou uma eficiência de 94% para o cDNA do vírus e 97% para o plasmídeo sintético. Na análise das curvas de dissociação foi observado um alto grau de especificidade do par de iniciadores, GTZK-F/STZK-R, tendo aparecido um pico em ≈81 ºC, característico da temperatura de Melting, nas duas amostras controles. Também foi testado a possibilidade reconhecimento cruzado com outros arbovírus pelo par de iniciadores tanto no ensaio de PCR convencional quanto no qPCR, o par de iniciadores não reconheceu os outros arbovírus. O cDNA de duas amostras biológicas, uma de saliva e uma de urina do mesmo paciente, foram amplificadas com o par de iniciadores, GTZK-F/STZK-R, e os produtos de PCR foram purificados, clonados em pGEM-T Easy Vector e sequenciados na plataforma de DNA PDTIS/FIOCRUZ. Os resultados do sequenciamento apontaram a cepa ZIKV, da República Centro-Africana, com maior similaridade. Na validação dos iniciadores no qPCR com as amostras clínicas, 4 amostras de saliva foram amplificadas e quantificadas, validando esses iniciadores nesta técnica. Os resultados obtidos demonstram que a metodologia utilizada no presente trabalho é capaz de realizar o diagnóstico do vírus Zika sem reconhecimento cruzado com outros vírus e pode ser usada nas detecções rotineiras de laboratórios públicos e privados.

**Palavras-chave:**

qPCR;Zika vírus;SYBR Green;Detecção viral

**Abstract:**

Zika virus (ZIKV) is the etiological agent of zika fever, an arbovirose transmitted mainly by mosquito Aedes genus. In addition to the mosquito, ZIKV can be transmitted sexually, maternal-fetal and blood transfusion. This arbovirus, is part of the Flaviviridae family, its genome is composed of single-stranded RNA and positive polarity. To date, its pathogenesis is not well established, however, it is known that the virus is detected in some types of samples such as: blood, saliva, urine, amniotic fluid and semen of patients. About 80% of those infected with ZIKV are asymptomatic; this disease is self-limiting for 2 to 7 days, presenting as main symptoms: fever, arthralgia, myalgia, headache, rash, conjunctivitis and malaise, some cases can reach neurological complications such as Guillain-Barré syndrome and malformations such as microcephaly. The WHO recommendation is to perform the molecular diagnosis of the viral genome to confirm the disease, using polymerase chain reaction assays: RT-PCR and quantitative PCR (qPCR). This project aimed to develop a qualitative and quantitative protocols for the detection of ZIKV viral load, which includes new pairs of primers for diagnosis, located at the genes junction between the capsid and pre-Membrane (C-prM). This gene region was chosen because it is more divergent among the viral genomes of the Flaviviridae family than the region of the prM-E proteins, proposed by Lanciotti et al., 2008 to detect ZIKV. For this, the methods were used of extracting RNA by TRIzol, cDNA synthesis, conventional PCR (hemi-nested), qPCR (SYBR Green), cloning of the virus sequence into expression vector and sequencing. Primer pairs were designed and tested for ZIKV detection using a synthetic plasmid as template and virus cDNA from Vero cells. Two pairs of primers were tested and only one was more specific and was used to detect ZIKV. The selected pair was tested by computational biology against the NCBI database using the keywords: “Zika virus" [porgn: \_txid64320] AND genome NOT partial NOT nearl". In the database, 1,123 complete ZIKV sequences were found and the primer pair was able to recognize all of them. The conventional PCR protocol was validated with the samples from patients with apparent clinical signs of zika fever, namely: saliva (14) and urine (5), as negative control salivary samples of patients without the presence of the clinical picture of ethics: 80709 HUCFF/FM/UFRJ). Of the 19 samples tested, 15 of them showed a positive result, using the pair for detecting GTZK-F/R-STZK-R pair in the conventional PCR technique. In the qPCR assay, this pair of primers had showed an efficiency of 94% for cDNA of the virus and 97% for the synthetic plasmid. In the analysis of the dissociation curves a high degree of specificity of the pair of primers, GTZK-F/STZK-R, was observed, showing a peak at ≈81 ºC, characteristic of Melting temperature, in the two control samples. Also tested was the possibility of cross-recognition with other arboviruses by the primer pair in both the conventional PCR assay and the qPCR, the primer pair did not recognize the other arboviruses. The cDNA from two biological samples, saliva and urine of the same patient, were amplified with the pair of primers, GTZK-F/STZK-R, and the PCR products were purified, cloned into pGEM-T Easy Vector and sequenced on the DNA PDTIS/FIOCRUZ platform. The results of the sequencing indicated the ZIKV strain, of the Central African Republic, with greater similarity. In the validation of the primers in the qPCR with the clinical samples, 4 saliva samples were amplified and quantified, validating these primers in this technique. The results obtained demonstrate that the methodology used in the present work is able to diagnose the Zika virus without cross-recognition with other viruses and can be used in the routine detections of public and private laboratories.

**Keywords:**

qPCR;Zika virus;SYBR Green;Viral detection

**Título:**

Citrato altera o Metabolismo Hepático e a sinalização da insulina in vivo.

**Autor:**

JESSICA MAGALHAES COTIAS RISTOW BRANCO

**Tipo de Trabalho de Conclusão:**

DISSERTAÇÃO

**Abreviatura:**

BRANCO, J. M. C.

**Data da Defesa:**

29/06/2018

**Resumo:**

Nas últimas décadas, o número de casos de obesidade no Brasil aumentou de 30% para 56% da população, promovendo um crescimento semelhante nas condições patológicas associadas, como Diabetes Mellitus Tipo 2 e Síndrome Metabólica. O consumo de dietas ocidentais, caracterizado por alimentos altamente processados, contendo alta quantidade de açúcares, sal, gordura e aditivos, está diretamente associado à prevalência de obesidade. Entre todos os aditivos alimentares, o citrato é predominante. O citrato é amplamente utilizado por ser considerado um produto natural, metabolizado pelo corpo e inerte. No entanto, o destino metabólico da sobrecarga de citrato alimentar é desconhecido. O objetivo desse trabalho foi analisar o efeito agudo do citrato no fígado de camundongos. Foram utilizados camundongos C57BL/6 tratados ou não com citrato, submetidos à dieta padrão ou hiperlipídica por 24h. Foi observado que o citrato: diminui a resposta insulinêmica, por aumentar a intolerância à glicose e diminuir a resposta de marcadores essenciais da sinalização da insulina, como AKT e mTOR; não modifica a expressão proteica de seu transportador, apesar de modular sua expressão gênica; altera o metabolismo de lipídeos, por aumentar a síntese e diminuir a oxidação de ácidos graxos; aumenta marcadores inflamatórios e diminui a expressão de reguladores metabólicos chave, como AMPK e SIRT1. Nossos resultados sugerem, portanto, que o consumo de citrato pode predispor camundongos a alterações metabólicas que contribuem para o desenvolvimento de resistência insulínica e inflamação no fígado. Assim, o consumo elevado de citrato, até então ignorado, pode corroborar com a alimentação contemporânea na epidemia de obesidade.

**Palavras-chave:**

Citrato;Obesidade;Resistencia à Insulina;Fígado;Dieta ocidental

**Abstract:**

In the last decades, the number of obesity cases in Brazil increased from 30% to 56% of the population, promoting similar growth of the associated pathological conditions, such as Type 2 Diabetes Mellitus and Metabolic Syndrome. The consumption of western diets, characterized by highly processed foods containing high amounts of sugars, salt, fat and additives, is directly associated with the prevalence of obesity. Among all food additives, citrate is prevalent. Citrate is widely used as it is considered a natural product, metabolized by the body and inert. However, the metabolic destination of food citrate overload is unknown. The objective of this study was to analyze the acute effect of citrate on the liver of mice. C57BL/6 mice were treated with or without citrate, submitted to the standard or hyperlipidic diet for 24 h. It has been observed that citrate: decreases insulinemic response by increasing glucose intolerance and decreasing the response of essential markers of insulin signaling, such as AKT and mTOR; does not modify the protein expression of its transporter, despite of modifying its gene expression; alters the metabolism of lipids, by increasing the synthesis and decreasing the oxidation of fatty acids; increases inflammatory markers and decreases the expression of key metabolic regulators, such as AMPK and SIRT1. Our results suggest, therefore, that the consumption of citrate may predispose mice to metabolic alterations that contribute to the development of insulin resistance and inflammation in the liver. Thus, the high consumption of citrate, previously ignored, can corroborate with the contemporary diet for the obesity epidemic.

**Keywords:**

Citrate;Obesity;Insulin Resistance;Liver;Western Diet

**Título:**

Obtenção e caracterização de transformantes de Trichoderma lentiforme (CFAM-422) com genes heterólogos de glicosil hidrolases e mono-oxigenases líticas de polissacarídeos.

**Autor:**

ELISA ZAPAROLI RAMOS

**Tipo de Trabalho de Conclusão:**

DISSERTAÇÃO

**Abreviatura:**

RAMOS, E. Z.

**Data da Defesa:**

16/05/2018

**Resumo:**

O direcionamento da economia voltada para indústria de biorrefinaria instiga a busca de tecnologias sustentáveis e rentáveis para obtenção de produtos de interesse industrial. Diante disso, os estudos são direcionados para superar a barreira da recalcitrância da biomassa, a fim de desconstruir a organização dos seus principais componentes (celulose, hemicelulose e lignina) e obter altos rendimentos de hidrólise enzimática. Com isso, o papel dos microrganismos produtores de enzimas lignocelulolíticas ganha destaque. O fungo Trichoderma lentiforme CFAM-422 mostrou ser promissor na produção de celulases e enzimas acessórias em comparação à linhagem mutante hipercelulolítica T. reesei RUT-C30. Porém, estudos anteriores mostraram que o extrato enzimático secretado não atua de forma eficientena hidrólise de biomassa submetida à pré-tratamentos que não diminuem a cristalinidade da celulose. Como objetivo de aumentar a eficiência de hidrólise do extrato enzimático produzido por essa linhagem, no presente trabalho foi realizada a transformação genética de T. lentiforme CFAM-422 com os genes codificadores de uma mono-oxigenase lítica de polissacarído de T. harzianum (AA9) e de uma celobioidrolase (CBHI) de T. reesei. Ambos os genes foram inseridos separadamente no vetor p500 sob controle do promotor constitutivo trpC de Aspergillus nidulans. O gene que confere resistência à higromicina B (gene hyg de Escherichia coli) foi utilizado como gene marcador seletivo. A transformação foi realizada via protoplasto-PEG e os transformantes obtidos foram purificados e preservados. Após os testes de estabilidade genética, foram obtidos 36 transformantes com o vetor p500 contendo a LPMO e 2 transformantes com o vetor p500 contendo a CBHI. Porém, ao expressar essas enzimas, houve uma queda brusca na atividade de celulases e xilanases, podendo ser explicado pela repressão da secreção sob estresse do retículo endoplasmático (repression under secretion stress – RESS). Como não houve produção de atividade em FPase para as linhagens transformadas, três foram escolhidas (15.11, 16.1 e 16.8) e testadas em hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor. A mistura enzimática de cada linhagem foi suplementada com uma carga enzimática de 4 e 8 FPU/g de biomassa do extrato puro obtido do CFAM-422. Para verificar a influência do sinergismo da LPMO com a carga de celulases, o pool enzimático secretado pelas linhagens transformantes foi testado em dois volumes (0,25 mL e 0,75 mL em 2,42 mL finais), com uma mistura do extrato bruto puro do CFAM-422. Os extratos enzimáticos suplementados com 0,75 mL, para ambas as cargas de celulases, obtiveram melhores resultados na liberação de glicose e de xilose. Conforme esperado, ao aplicar uma maior carga de celulases, a quantidade de açúcares liberados aumenta. Com destaque entre os transformantes selecionados, a linhagem 16.1 produziu 11,8 g/L de glicose após 24 horas de hidrólise suplementado com 8FPU/g. Apesar de ter uma melhora de 17% em relação a linhagem parental nessa condição, quando submetido a carga de 4FPU/g essa diferença passa para 40%. Mesmo com uma alta atividade enzimática de xilanase, o CFAM-422 possuiu o menor rendimento para todas as concentrações testadas. Dessa forma, foi possível notar uma melhora na hidrólise enzimática quando a LPMO atua em sinergismo com as celulases.

**Palavras-chave:**

Trichoderma lentiforme;expressão heteróloga;LPMO;enzimas celulolíticas;hidrólise enzimática

**Abstract:**

The direction of the economy focused on the biorefinery industry instigates the search for sustainable and profitable technologies to obtain products of industrial interest. Therefore, the studies are directed to overcome the biomass reclacitrance barrier in order to deconstructe the organizations of its main components (cellulose, hemicellulose and lignin) and to obtain high yields of enzymatic hydrolysis. Thus, the role of microorganisms producing lignocellulosic enzymes is highlighted. The fungi Trichoderma lentiforme CFAM-422 has been shown to be promising in the production of cellulases compared to the hipercellulolytic mutant T.reesi RUT C-30. However, secreted cellobiohydrolase showed a deficiency in the performance on crystalline cellulose. In order to increase the hydrolysis efficiency of the enzyme extract produced by this strain, the present work studied the genetic transformation of T. lentiforme CFAM-422 with the genes encoding a polysaccharide lytic mono-oxygenase of T. harzianum (AA9) and a T. reesei cellobiohydrolase (CBHI). Both genes were inserted separately into the p500 vector under control of the constitutive promoter trpC from Aspergillus nidulans. The hygromycin B resistance gene (Escherichia coli hyg gene) was used as a selective marker gene. The transformation was performed via protoplast-PEG and the obtained transformants were purified and preserved. After the genetic stability tests, 36 linages were transformed with the p500 vector containing LPMO and other 2 with p500 vetor containing CBHI. However, when expressing these enzymes, there was a sudden drop in the activity of cellulases and xylanases, which could be explained by a repression under secretion stress of the endoplasmic reticulum. As there was no production of FPase activity for the transformed strains, three were chosen (15.11, 16.1 and 16.8) and tested in the enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse pretreated by steam explosion. The enzyme mixtures from each strain were supplemented with 4 and 8 FPU per g of biomass, of the pure extract obtained from CFAM-422. To verify the influence of LPMO synergism with cellulases, the enzymatic pools secreted by the transformants were tested in two volumes (0.25 mL and 0.75 mL in 2.42 mL final), with a mixture of pure crude extract of CFAM-422. Enzymatic extracts supplemented with 0.75 mL, for both cellulase loads, obtained better results in glucose and xylose release. As expected, by applying a higher load of cellulases, the amount of released sugars increases. Among the selected transformants, line 16.1 produced 11.8 g/L glucose after 24 h of hydrolysis supplemented with 8 FPU/g.In spite of having an improvement of 17% in relation to the parental lineage in this condition, when submitted to the load of 4FPU/g this difference increased to 40%. Even with a high enzymatic activity of xylanase, CFAM-422 had the lowest yield for all concentrations tested. In conclusion, it is possible to notice an improvement in the enzymatic hydrolysis when the LPMO acte in synergism with the glycosyl hydrolases.

**Keywords:**

Trichoderma lentiforme;heterologous expression;LPMO;cellulolytic enzymes;enzymatic hydrolysis

**Título:**

Identificação, clonagem, expressão e purificação de dois peptídeos antimicrobianos obtidos a partir de insetos praga.

**Autor:**

LUIS FELIPE COSTA RAMOS

**Tipo de Trabalho de Conclusão:**

DISSERTAÇÃO

**Abreviatura:**

RAMOS, L. F. C.

**Data da Defesa:**

08/05/2018

**Resumo:**

O trato digestivo dos insetos é o primeiro contato interno de seu organismo com o ambiente. Por isso, o sistema imune inato dos insetos se mostra eficiente neste órgão, atuando através de resposta celular e humoral. Neste trabalho, dois peptídeos foram identificados em transcriptomas de intestinos de dois insetos diferentes. Um peptídeo do tipo defensina, nomeado S1A67, foi identificado em Syntermes sp. (gênero de cupim). Um segundo peptídeo, do tipo Cecropina B, foi identificado na lagarta de Anticarsia gemmatalis, inseto praga da soja. Temos por objetivo a produção destes peptídeos in vitro, bem como sua utilização em testes de cultivo para verificar sua ação contra diferentes tipos de microrganismos. Realizamos, em laboratório, clonagens para a inserção da defensina S1A67 em plasmídeos distintos, usando como molde uma construção sintetizada anteriormente em plasmídeo pET-26b. A inserção da cecropina B em plasmídeos foi feita a partir da amplificação de sua sequência utilizando cDNA obtido de RNA total extraído do intestino da lagarta de 5º instar. Para as amplificações das sequências foram adquiridos oligonucleotídeos específicos. Os amplicons das duas sequências foram clonados em diferentes plasmídeos. Os plasmídeos construídos foram transformados em células de expressão BL21 (DE3) de E. coli. Testes de expressão foram feitos variando condições experimentais. As construções pETM30-MBP-Cecropina B e pET32a-TRX-Defensina S1A67 se mostraram mais promissoras. Após uma primeira etapa de purificação, os dois peptídeos fusionados foram enriquecidos e submetidos à etapa de clivagem do tag de solubilidade. A Cecropina B recombinante foi clivada e foram feitos testes preliminares estruturais que mostram uma tendência de formação de estruturas secundárias de α-hélice na presença de SDS, além da análise por espectrometria de massas para a confirmação de sua massa. Além disto, testes preliminares sugeriram uma possível atividade antimicrobiana. Com relação à Defensina S1A67, testes antimicrobianos preliminares também foram realizados, porém nenhuma atividade foi observada.

**Palavras-chave:**

Peptídeos antimicrobianos;insetos praga;expressão heteróloga

**Abstract:**

The digestive tract of insects is the first internal contact of your body with the environment. Therefore, the innate immune system of the insects is efficient in this organ, acting through cellular and humoral response. In this work, two peptides were identified in intestinal transcripts of two different insects. A Defensin-like peptide, named S1A67, has been identified in Syntermes sp. (termite genus). A second peptide, type Cecropin B, was identified in the caterpillar of Anticarsia gemmatalis, insect pest of soybean. We aim to produce these peptides in vitro, as well as their use in culture tests to verify their action against different types of microorganisms. We cloned the insertion of Defensin S1A67 into separate plasmids using a plasmid previously synthesized in plasmid pET-26b as template. The insertion of Cecropin B into plasmids was done from the amplification of its sequence using cDNA obtained from total RNA extracted from the gut of the 5th instar caterpillar. For the amplifications of the sequences specific oligonucleotides were acquired. The amplicons of the two sequences were cloned into different plasmids. The constructed plasmids were transformed into BL21 (DE3) E. coli expression cells. Expression tests were done varying experimental conditions. The pETM30-MBP-Cecropin B and pET32a-TRX-Defensin S1A67 constructs were more promising. After a first purification step, the two fused peptides were enriched and subjected to the cleavage step of the solubility tag. Recombinant Cecropin B was cleaved and structural preliminary tests were performed showing a tendency of formation of secondary α-helix structures in the presence of SDS, in addition to mass spectrometric analysis for confirmation of mass. In addition, preliminary tests suggested a possible antimicrobial activity. Regarding Defensina S1A67, preliminary antimicrobial tests were also performed, but no activity was observed.

**Keywords:**

Antimicrobial peptides;prague insects;heterologous expression

**Título:**

Prospecção de novos alvos biotecnológicos: Caracterização bioquímica e estrutural da fosfatase hipotética DSM-14977 de Oceanithermus profundus.

**Autor:**

BEATRIZ ROSA PENNA

**Tipo de Trabalho de Conclusão:**

DISSERTAÇÃO

**Abreviatura:**

PENNA, B. R.

**Data da Defesa:**

22/03/2018

**Resumo:**

O rápido progresso do sequenciamento e deposição de genomas em bancos de dados provocou um grande desafio a comunidade científica, a identificação da função biológica de uma variedade de proteínas hipotéticas. Buscando impulsionar o conhecimento e o desenvolvimento de novos biocatalisadores foi realizada a prospecção da fosfatase hipotética, DSM-14977, de Oceanithermus profundus pertencente à superfamília das dehalogenases haloácidas (HAD). O objetivo deste trabalho consiste na caracterização bioquímica e estrutural da fosfatase putativa DSM-14977. O gene que codifica a DSM-14977 foi clonado e otimizado para expressão em E. coli pela empresa GenScript. A subclonagem foi realizada em três vetores de expressão: pETM30-MBP (pETM30-DSM) e pET32a (pET32a-DSM) e o pET22b (pET22b-DSM). Deste modo, a expressão solúvel destas construções foi alcançada utilizando a cepa BL21(DE3) a 37°C, 1 mM de IPTG em D.O600 0,8. Para as construções pETM30-DSM e pET32a-DSM a purificação foi realizada através da cromatografia de afinidade a níquel e para a pET22b-DSM através da cromatografia hidrofóbica seguida da afinidade à heparina. Os espectros de dicroísmo circular evidenciaram que a estrutura da proteína é rica em uma mistura de folhas-β e α-hélices, como já esperado para fosfatases pertencentes a superfamília HAD. Os estudos de estabilidade através de fluorescência indicaram que a DSM-14977 é mais estável na presença de ureia do que em cloreto de guanidina, além de ser termoestável até 85ºC. Os estudos bioquímicos usando o ρ-nitrofenol-fosfato mostraram que a atividade fosfatásica da DSM-14977 é maior em pH neutro e em altas temperaturas. A triagem de substratos fosforilados demonstrou maior atividade para o substrato natural frutose 1,6-bisfosfato e, o artificial, polifosfato-75. O modelo estrutural obtido através do I-TASSER foi semelhante ao enovelamento das fosfatases da superfamília HAD. Este modelo mostrou melhor predição funcional para uma fosfatase envolvida no metabolismo de açúcares, a CbbY de Rhodobacter sphaeroides, corroborando os dados bioquímicos obtidos. Esses eventos aliados à alta defosforilação para frutose 1,6-bifosfato podem evidenciar uma importante função da fosfatase DSM-14977 no metabolismo de açúcares da Oceanithermus profundus, sugerindo possíveis aplicações biotecnológicas para esta proteína.

**Palavras-chave:**

Biocatalisadores;superfamília das dehalogenases haloácidas (HAD);organismos extremófilos;estudos estruturais;estudos bioquímicos

**Abstract:**

The fast progress of sequencing and deposition of genomes in databases has challenged the scientific community, identifying the biological function of a hypothetical variety proteins. In order to promote the knowledge and development of new biocatalysts, the hypothetical phosphatase DSM-14977 from Oceanithermus profundus belonging to the haloacid dehalogenase (HAD) superfamily was prospected. The goal of this work is biochemical and structural characterization of the putative phosphatase DSM-14977. The gene encoding DSM-14977 was cloned and optimized for expression in E. coli by the company GenScript. Subcloning was performed on three expression vectors: pETM30-MBP (pETM30-DSM), pET32a (pET32a-DSM) and pET22b (pET22b-DSM). Thus, soluble expression of these constructs was achieved using BL21(DE3) strain at 37 ° C, 1 mM IPTG at 0.600 O8. For the pETM30-DSM and pET32a-DSM purification was performed by nickel affinity chromatography and pET22b-DSM by hydrophobic chromatography followed by heparin affinity. Circular dichroism spectra have shown that the protein structure is rich mixture of β-sheet and α-helix, as already expected for phosphatases belonging to HAD superfamily. Fluorescence stability studies indicated that DSM-14977 is more stable in the presence of urea than guanidine chloride, in addition to being thermostable up to 85 ° C. Biochemical studies using p-nitrophenol-phosphate showed that the phosphatase activity of DSM-14977 is higher at neutral pH and at higher temperatures. The phosphorylated substrates showed higher activity for the natural substrate fructose 1,6-bisphosphate and the artificial substrate, polyphosphate-75. The structural model obtained through I-TASSER was similar to phosphatases folding of HAD superfamily. This model showed better functional prediction for a phosphatase involved in sugars metabolism, CbbY of Rhodobacter sphaeroides, corroborating the obtained biochemical data. These events, coupled with the high dephosphorylation for fructose 1,6-bisphosphate, may demonstrate an important function of DSM-14977 phosphatase in sugars metabolism from Oceanithermus profundus, suggesting possible biotechnological applications for this protein.

**Keywords:**

biocatalysts;Haloacid Dehalogenase (HAD) superfamily;extremophile organisms;structural studies;biochemical studies

**Título:**

Análise Estrutural de um Complexo Miotoxina-Antimiotoxina por Cross-Linking, Espectrometria de Massas e Bioinformática.

**Autor:**

BARBARA DA SILVA SOARES

**Tipo de Trabalho de Conclusão:**

DISSERTAÇÃO

**Abreviatura:**

SOARES, B. S.

**Data da Defesa:**

19/01/2018

**Resumo:**

Os venenos de serpentes do gênero Bothrops são conhecidos por induzirem importantes danos teciduais locais, como hemorragia e mionecrose. A glicoproteína DM64 isolada do soro do gambá sul-americano Didelphis aurita interage de forma não covalente com fosfolipases A2 (Lys49 e Asp49) presentes no veneno de Bothrops asper, inibindo seu efeito miotóxico. Esta proteína possui massa molecular de 64 kDa e 5 domínios tipo imunoglobulina (Ig). Este estudo teve como objetivo a caracterização estrutural do complexo inibidor-toxina através da associação das técnicas de cross-linking, espectrometria de massas de alta resolução e modelagem molecular. O complexo formado entre DM64 e a miotoxina II (Lys49) de Bothrops asper foi estabilizado utilizando duas abordagens complementares de cross-linking: 1) o agente homobifuncional BS3 (que reage com Lys, Ser e N-terminal); 2) a estratégia XPlex, nova abordagem de cross-linking direcionada a resíduos ácidos (Glu, Asp e Cterminal). Após a digestão enzimática dos produtos de reação cruzada e sua análise por espectrometria de massas de alta resolução no nLC-nESI QExactive Plus, os espectros de MS/MS foram submetidos ao software SIM-XL (http://patternlabforproteomics.org/simxl). Após filtragem automática e validação manual dos resultados, vários links de alta confiança (inter- e intra-proteínas) foram observados. Uma vez que o tamanho do braço espaçador do reagente de cross-linking e o comprimento das cadeias laterais dos pares de resíduos reativos são conhecidos, os limites de distância máxima entre seus carbonos beta puderam ser estimados. A maior parte dos intra-links observados na miotoxina II foram validados de forma eficiente em sua estrutura cristalográfica (código PDB 1CLP). As restrições de distância intraDM64 foram utilizadas para modelagem molecular do inibidor: seus domínios foram modelados individualmente (servidor I-Tasser), seguido de docking molecular utilizando dados de cross-linking (servidor Rosetta). Esta abordagem híbrida foi fundamental para refinar o modelo molecular de DM64, possibilitando o melhor posicionamento relativo de seus domínios e a geração de uma estrutura globular mais condizente com os dados experimentais. Os dados de cross-linking proporcionaram um primeiro mapeamento da interação entre a DM64 e a miotoxina II, indicando o envolvimento importante do terceiro e quinto domínios da DM64 e da região C-terminal da toxina. Ainda que seja necessário refinar o modelo gerado com base nos dados de cross-linking através da integração com técnicas experimentais complementares, a estratégia adotada nesta dissertação nos possibilitou melhorar a compreensão acerca dos determinantes estruturais da interação entre a miotoxina II e a DM64. 1. Didelphis aurita. 2. DM64. 3. Venenos de serpentes. 4. Crosslinking. 5. Miotoxinas.

**Palavras-chave:**

Didelphis aurita;DM64;Venenos de serpentes;Crosslinking

**Abstract:**

Bothrops snake venoms are known to induce important local tissue damage, such as hemorrhage and myonecrosis. The glycoprotein DM64 isolated from the serum of the South American opossum Didelphis aurita binds non-covalently to Lys49 and Asp49 phospholipases A2 from Bothrops asper venom, inhibiting their myotoxic effect. This protein has a molecular mass of 64 kDa and 5 immunoglobulin (Ig)-like domains. This study aimed to the structural characterization of the inhibitor-toxin complex using cross-linking, high resolution mass spectrometry and molecular modeling strategies. The complex made of DM64 and myotoxin II (Lys49) from Bothrops asper was stabilized using two complementary crosslinking approaches: 1) the homobifunctional cross-linking agent BS3 (which targets Lys, Ser and the N-terminus); 2) the XPlex strategy, a new cross-linking approach targeting acidic residues (Glu, Asp and C-terminus). Following the enzymatic digestion of the cross-linked products and their analysis by high resolution mass spectrometry using a nLC-nESI QExactive Plus, the MS/MS spectra were submitted to the SIM-XL software (http://patternlabforproteomics.org/simxl). After automatic filtering and manual validation, several high confidence links matching cross-linked peptides (both inter- and intra-proteins) were observed. Since the size of the spacer arm of the cross-linking reagent and the length of the side chain of the cross-linked residues are known, the maximum distance limits between their beta carbons could be estimated. Most intra-links of myotoxin II could be efficiently validated on the crystallographic structure of myotoxin II (PDB code 1CLP). Distance constraints observed within DM64 were used for the molecular modeling of DM64: the individual domains were individually modeled (I-Tasser software suite), followed by molecular docking using cross-linking data (Rosetta software suite). This hydrid strategy allowed us to generate a refined model of DM64, where the relative position of the domains was in better accordance with the experimental data. The cross-linking strategy provided a first understanding of the interaction between DM64 and myotoxin II, showing the importannt involvement of the third and fifth domains of DM64 and the C-terminus of the toxin. Although new complementary strategies are still needed to further refine the model sctructure of the inhibitor, the cross-linking technique has contributed to deepen our understanding of the structural determinants of the interaction between myotoxin II and DM64.

**Keywords:**

Didelphis aurita;DM64;snake venons;Crosslinking;Miotoxins