



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA MOLECULAR

## **Expressão heteróloga de proteínas quiméricas contendo peptídeos antimicrobianos**

Flávia Cabral Netto Resende

Orientador: Prof. Dr. Fernando Araripe Gonçalves Torres



BRASÍLIA, 2025



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA MOLECULAR

FLÁVIA CABRAL NETTO RESENDE

EXPRESSÃO HETERÓLOGA DE  
PROTEÍNAS QUIMÉRICAS CON-  
TENDO PEPTÍDEOS ANTIMICRO-  
BIANOS

Dissertação apresentada ao Instituto de  
Biologia da Universidade de Brasília  
como requisito parcial para a obtenção  
do título de Mestre em Ciências  
Biológicas (Biologia Molecular).

Orientador: Prof. Dr. Fernando Araripe Gonçalves Torres

BRASÍLIA, 2025

Ficha catalográfica elaborada automaticamente,  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

R433e      Resende, Flávia Cabral Netto  
Expressão heteróloga de proteínas quiméricas contendo  
peptídeos antimicrobianos / Flávia Cabral Netto Resende;  
orientador Fernando Araripe Gonçalves Torres. -- Brasília,  
2025.  
143 p.

Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular) --  
Universidade de Brasília, 2025.

1. Peptídeos antimicrobianos. I. Torres, Fernando Araripe  
Gonçalves, orient. II. Título.

## **Banca Examinadora**

---

Prof. Dr. Fernando Araripe Gonçalves Torres

Prof. Titular - Universidade de Brasília

Presidente da Banca

---

Prof. Dr. Spartaco Astolfi Filho

Prof. Emérito - Universidade Federal do Amazonas

Membro Titular

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Elisabeth Nogueira Ferroni Schwartz

Prof<sup>a</sup>. Titular – Universidade de Brasília

Membro Titular

---

Prof. Dr. Ricardo Henrique Kruger

Prof. Adjunto IV – Universidade de Brasília

Membro Suplente



**“Faz o que deves e está no que fazes.”**

São Josemaria Escrivá



## AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus por ter me dado a vida, por sustentá-la a cada dia e por mais tantas graças, como as que se seguem.

Agradeço imensamente à minha mãe, Mônica, por me apoiar diariamente, com o seu amor e seu exemplo, pelos valores transmitidos a mim, por sua paciência e por sempre me incentivar a seguir os meus sonhos, me oferecendo todas as condições ao seu alcance para tal. Ao meu pai, Rômulo, e à família. Gratidão aos meus amigos, que me incentivam constantemente. Agradeço a todos nas pessoas da Maria Júlia (Maju) e Rodrigo Bélló (Rod). Ao Rogério Muniz Netto (*in memoriam*) pelo grande incentivo e por ter redirecionado as velas do meu barco.

Ao Prof. Fernando Araripe por me abrir as portas do seu laboratório, por acreditar no meu trabalho e pelas discussões sobre experimentos, vida acadêmica e outros assuntos. Por me apresentar as possibilidades da Biotecnologia. Além disso, por me propor pensar em soluções e refletir sobre a minha pesquisa. Muito obrigada pela oportunidade de desenvolver esse mestrado e por ser exemplo de ser humano e de profissional. “*Veritas filia temporis.*”

Aos amigos e colegas do Laboratório de Espectrometria de Massa (LEM) da Embrapa CENARGEN: obrigada Prof. Dr. Carlos Bloch Jr., Carlos, por ser exemplo de ser humano e de pesquisador, pela sua dedicação contínua à formação de pessoas e de profissionais, pela sua coragem, humildade e genialidade inspiradoras, pela amizade e, sobretudo, pelo seu compromisso com a verdade. Obrigada por me acolher em seu laboratório, desde a época da graduação, e por cada uma das conversas que possibilitam com que eu me aproxime de Deus e cresça pessoal e profissionalmente. Obrigada pela oportunidade de realizar esse mestrado. Por me incentivar, assim como a todos do grupo, a buscar a verdade com honestidade, sinceridade, profundidade e humildade. Por desempenhar, em muitos momentos, além do papel de mestre, o de pai. Por me oferecer liberdade e autonomia na pesquisa. Gratidão por ter me possibilitado enxergar além em tantas áreas que compõem uma só realidade: a vida. Muito obrigada!

<sup>4</sup> Tendo acabado de falar, disse a Simão: “*Vá para onde as águas são mais profundas*”, e a todos: “*Lancem as redes para a pesca*”. <sup>5</sup> Simão respondeu: “*Mestre, esforçamo-nos a noite inteira e não pegamos nada. Mas, porque és tu quem está dizendo isto, vou lançar as redes*”. <sup>6</sup> Quando o fizeram, pegaram tal quantidade de peixes que as redes começaram a rasgar-se. <sup>7</sup> Então fizeram sinais a seus companheiros no outro barco, para que viessem ajudá-lo; e eles vieram e encheram ambos os barcos, a ponto de quase começarem a afundar. <sup>8</sup> Quando Simão

*Pedro viu isso, prostrou-se aos pés de Jesus e disse: "Afasta-te de mim, Senhor, porque sou um homem pecador!"<sup>9</sup> Pois ele e todos os seus companheiros estavam perplexos com a pesca que haviam feito,<sup>10</sup> como também Tiago e João, os filhos de Zebedeu, sócios de Simão. Então Jesus disse a Simão: "Não tenha medo; de agora em diante você será pescador de homens".*

*Lucas 5:4-10*

Ao Dr. André Melro Murad, André, pela amizade, pelos seus valiosos ensinamentos e por me oportunizar e confiar trabalhar nesse e em outros projetos conjuntos desde a graduação. Muito obrigada por me mostrar como construir “minha parede de tijolos”, pelas boas conversas, por seu bom humor e por compartilhar suas experiências de pesquisa comigo. Ao José de Lima Cardozo Filho, o Zé, por todas as nossas prosas e experiências. Ao Stephan Nielen, Jorge Taquita, Giovanna e Maura pelos aprendizados e momentos compartilhados. A todos pelo café!

Agradeço a todos do grupo de Biotecnologia de Leveduras do Laboratório de Biologia Molecular da UnB. À Prof<sup>a</sup>. Lúcia Pepe de Moraes pelas conversas, por compartilhar com tanto entusiasmo os conhecimentos adquiridos ao longo da sua experiência na bancada, sobretudo com *Pichia pastoris*. Obrigada pela sua parceria e exemplo docente nas aulas práticas de Engenharia Genética. À Prof<sup>a</sup>. Janice Lisboa pelo auxílio na bancada e pelo incentivo constante. À Prof<sup>a</sup>. Viviane Reis, à Luiza Piva, à Ana Laura, ao Henrique (Fetz), à Adriana (Didi), ao Igor, ao Jacob, à Roberta, ao Bruno, à Carmen e à Ágatha pela experiência compartilhada e por sempre se mostrarem dispostos a colaborar. Aos professores do Laboratório de Biologia Molecular. Ao José e ao Thompson, pela manutenção do laboratório e pela convivência. Aos colegas de outros grupos de pesquisa: Igor, Isabel, Luís, Luísa e Talita. À Prof<sup>a</sup>. Cíntia Coelho e aos os colegas do laboratório de Biologia Sintética: Matheus e cia. À Izadora e ao Prof. Aisel Garay do laboratório de Biofísica. Aos Prof. Spartaco, Prof.<sup>a</sup> Elisabeth e Prof. Kruger pelas valiosas sugestões. A todos aqueles que porventura posso ter me esquecido de mencionar.

À Prof<sup>a</sup>. Celina de Oliveira Martin pela amizade, por ter formado os meus professores e por sempre ter uma palavra de luz. תודה.

Ao Prof. Marcelo Ramada da Universidade Católica de Brasília (UCB) e à sua aluna Ana Laura pelo auxílio no planejamento e na condução dos ensaios antimicrobianos. Ao Prof. Guilherme Dotto Brand, do Instituto de Química da UnB pelos ensinamentos sobre a DS 01.

A todos os professores que em algum momento contribuíram para a minha formação.

## **AGRADECIMENTO ÀS AGÊNCIAS DE FOMENTO**

Agradeço às agências de fomento, sem as quais esse trabalho não teria sido possível: ao Conselho Nacional de Pesquisa Científica (CNPq) pela bolsa de mestrado e à Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal (FAPDF) pelo financiamento do projeto. À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), onde foram realizados a maioria dos experimentos deste trabalho, em especial ao Laboratório de Espectrometria de Massa (LEM) da unidade Recursos Genéticos e Biotecnologia (CENARGEN), bem como ao Laboratório de Biologia Molecular da Universidade de Brasília (UnB) e à Universidade Católica de Brasília (UCB) pela infraestrutura. A todas as instituições supracitadas pela contribuição de incalculável valor para a minha formação.



## SUMÁRIO

|                                                                            |           |
|----------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>ABREVIACÕES .....</b>                                                   | <b>17</b> |
| <b>ÍNDICE DE FIGURAS.....</b>                                              | <b>21</b> |
| <b>ÍNDICE DE TABELAS .....</b>                                             | <b>22</b> |
| <b>RESUMO .....</b>                                                        | <b>24</b> |
| <b>ABSTRACT .....</b>                                                      | <b>25</b> |
| <b>PREFÁCIO.....</b>                                                       | <b>27</b> |
| <b>CAPÍTULO I.....</b>                                                     | <b>27</b> |
| <b>1. INTRODUÇÃO.....</b>                                                  | <b>27</b> |
| 1.1 Potência, ato e peptídeos bioativos encriptados.....                   | 27        |
| 1.2. Peptídeos antimicrobianos.....                                        | 29        |
| 1.3. Mecanismos de ação dos peptídeos antimicrobianos membrano-ativos..... | 30        |
| 1.4. Expressão heteróloga de proteínas e de peptídeos antimicrobianos..... | 34        |
| 1.5. Peptídeos antimicrobianos encriptados .....                           | 40        |
| 1.6. Peptídeos antimicrobianos recombinantes e a agricultura .....         | 41        |
| <b>2. ESTRATÉGIA.....</b>                                                  | <b>43</b> |
| <b>3. OBJETIVOS.....</b>                                                   | <b>50</b> |
| 3.1. Objetivo geral.....                                                   | 50        |
| 3.2. Objetivos específicos.....                                            | 50        |
| <b>4. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>                                         | <b>50</b> |
| 4.1. Linhagens bacterianas.....                                            | 50        |
| 4.2. Vetores, enzimas de restrição e <i>primers</i> .....                  | 50        |
| 4.3. Soluções.....                                                         | 51        |
| 4.4. Transformação bacteriana por choque térmico.....                      | 51        |
| 4.5. Cultura celular.....                                                  | 51        |
| 4.6. Extração de DNA plasmidial .....                                      | 54        |
| 4.7. Digestão dos plasmídeos com enzimas de restrição .....                | 54        |

|                                                                                |            |
|--------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 4.8. Eletroforese de DNA em gel de agarose.....                                | 54         |
| 4.9. Ligação.....                                                              | 54         |
| 4.10. Sequenciamento dos plasmídeos de expressão.....                          | 55         |
| 4.11. PCR de colônia.....                                                      | 55         |
| 4.12. Indução da expressão heteróloga das proteínas e peptídeos.....           | 55         |
| 4.13. Cinética de crescimento.....                                             | 55         |
| 4.14. Determinação do peso da cultura celular.....                             | 56         |
| 4.15. Eletroforese de proteínas por SDS-PAGE .....                             | 56         |
| 4.16. Western Blot.....                                                        | 56         |
| 4.17. Cromatografia de afinidade.....                                          | 56         |
| 4.18. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC).....                     | 57         |
| 4.19. Redução, alquilação e digestão com tripsina (tripsinização).....         | 60         |
| 4.20. Digestão com outras enzimas.....                                         | 60         |
| 4.21. Análise das proteínas por Espectrometria de Massa.....                   | 60         |
| <b>5. RESULTADOS .....</b>                                                     | <b>61</b>  |
| 5.1. Construção dos plasmídeos de expressão.....                               | 61         |
| 5.2. Confirmação dos transformantes por PCR de colônia.....                    | 62         |
| 5.3. Confirmação dos transformantes por digestão com enzimas de restrição..... | 65         |
| 5.4. Cinética de crescimento.....                                              | 65         |
| 5.5. Detecção das proteínas.....                                               | 69         |
| 5.6. Purificação das proteínas recombinantes.....                              | 72         |
| 5.7. Caracterização das proteínas recombinantes.....                           | 75         |
| <b>6. DISCUSSÃO.....</b>                                                       | <b>85</b>  |
| <b>7. CONCLUSÃO .....</b>                                                      | <b>94</b>  |
| <b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>                                      | <b>96</b>  |
| <b>CAPÍTULO II.....</b>                                                        | <b>105</b> |
| <b>1. INTRODUÇÃO.....</b>                                                      | <b>105</b> |

|                                                                  |            |
|------------------------------------------------------------------|------------|
| 1.1. Expressão heteróloga de peptídeos em leveduras.....         | 105        |
| 1.2. <i>Komagataella phaffii</i> ( <i>Pichia pastoris</i> )..... | 107        |
| 1.3. Dermaseptina (DS 01).....                                   | 109        |
| 1.4. Calcitonina.....                                            | 111        |
| <b>2. ESTRATÉGIA.....</b>                                        | <b>111</b> |
| <b>3. OBJETIVOS.....</b>                                         | <b>114</b> |
| 3.1. Objetivo geral.....                                         | 114        |
| 3.2. Objetivos específicos.....                                  | 114        |
| <b>4. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>                               | <b>114</b> |
| 4.1. Microrganismos.....                                         | 114        |
| 4.2. Vetores, enzimas de restrição e <i>primers</i> .....        | 114        |
| 4.3. Síntese química em fase sólida (SPPS).....                  | 116        |
| 4.4. Purificação da DS 01 s por HPLC.....                        | 116        |
| 4.5. Análise da DS 01 s por Espectrometria de Massa.....         | 117        |
| 4.6. Ensaio de Concentração Inibitória Mínima (MIC).....         | 117        |
| 4.7. Transformação de bactérias por choque térmico.....          | 118        |
| 4.8. Cultura de células.....                                     | 118        |
| 4.9. Extração de DNA plasmidial.....                             | 118        |
| 4.10. Digestão dos plasmídeos com enzimas de restrição.....      | 119        |
| 4.11. Ligação.....                                               | 119        |
| 4.12. Linearização do vetor de expressão.....                    | 119        |
| 4.13. Transformação das leveduras por eletroporação.....         | 120        |
| 4.14. PCR de colônia.....                                        | 120        |
| 4.15. Indução da expressão heteróloga dos peptídeos.....         | 121        |
| 4.16. Cinética de crescimento.....                               | 121        |
| <b>5. RESULTADOS .....</b>                                       | <b>121</b> |
| 5.1. Construção dos plasmídeos de expressão.....                 | 121        |

|                                                                  |            |
|------------------------------------------------------------------|------------|
| 5.2. Confirmação dos transformantes por PCR de colônia.....      | 123        |
| 5.3. Teste de crescimento diferencial em placas com metanol..... | 125        |
| 5.4. Cinética de crescimento.....                                | 126        |
| 5.5. Purificação da DS 01 s.....                                 | 127        |
| 5.6. Caracterização da DS01 s.....                               | 128        |
| 5.7. Teste de MIC da DS01 sintética em <i>K. phaffii</i> .....   | 129        |
| <b>6. DISCUSSÃO.....</b>                                         | <b>131</b> |
| <b>7. CONCLUSÃO.....</b>                                         | <b>134</b> |
| <b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>                        | <b>135</b> |
| <b>ANEXO .....</b>                                               | <b>140</b> |

**Tabela de aminoácidos**

| Aminoácido      | Símbolo de uma<br>letra | Símbolo de três<br>letras | Massa<br>monoisotópica do<br>resíduo (Da) |
|-----------------|-------------------------|---------------------------|-------------------------------------------|
| Ácido aspártico | D                       | Asp                       | 115.026                                   |
| Ácido glutâmico | E                       | Glu                       | 129.042                                   |
| Alanina         | A                       | Ala                       | 71.037                                    |
| Arginina        | R                       | Arg                       | 156.101                                   |
| Asparagina      | N                       | Asp                       | 114.042                                   |
| Cisteína        | C                       | Cys                       | 103.009                                   |
| Fenilalanina    | F                       | Phe                       | 147.068                                   |
| Glicina         | G                       | Gly                       | 57.021                                    |
| Glutamina       | Q                       | Gln                       | 128.058                                   |
| Histidina       | H                       | His                       | 137.058                                   |
| Isoleucina      | I                       | Iso                       | 113.084                                   |
| Leucina         | L                       | Leu                       | 113.084                                   |
| Lisina          | K                       | Lys                       | 128.094                                   |
| Metionina       | M                       | Met                       | 131.040                                   |
| Prolina         | P                       | Pro                       | 97.052                                    |
| Serina          | S                       | Ser                       | 87.032                                    |
| Tirosina        | Y                       | Tyr                       | 163.063                                   |
| Treonina        | T                       | Thr                       | 101.047                                   |
| Triptofano      | W                       | Trp                       | 186.079                                   |
| Valina          | V                       | Val                       | 99.068                                    |

## ABREVIACÕES

AMP – peptídeos antimicrobianos, do inglês *antimicrobial peptides*.

At - *Arabidopsis thaliana*, nome científico de uma espécie vegetal modelo.

bp – pares de base, do inglês *base pairs*

°C – graus Celsius

Cc – *Coffea canephora*, nome científico de uma das espécies de café

CT – calcitonina

Da – Dalton

DNA – ácido desoxiribonucleico, do inglês *deoxyribonucleic acid*

DS 01 – dermaseptina 01

DTT – ditioneitol, do inglês *dithiothreitol*

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético, do inglês *Ethylenediamine tetraacetic acid*

ESI – Ionização por Eletro-Spray, do inglês *Electron Spray Ionization*

g - grama

Gr - *Gossypium raymondii*, nome científico de uma das espécies de algodão

GST – glutationa-S-transferase

h - hora

HPLC – cromatografia líquida de alta eficiência, do inglês *High Performance Liquid Chromatography*

IMAC – Cromatografia de Afinidade por Metal Imobilizado, do inglês *Immobilized Metal Affinity Chromatography*

IPTG - isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo

k - quilo, 10<sup>3</sup>

LB – Luria-Bertani, meio de cultura

MALDI – Dessorção/ ionização a laser assistida por matriz, do inglês *Matrix Assisted Laser Desorption/ Ionization*

mAU – mili unidades arbitrárias, do inglês *milli arbitrary units*

MIC – concentração inibitória mínima, do inglês *minimal inhibitory concentration*

min. - minutos

MS – Espectrometria de Massa, do inglês *Mass Spectrometry*

mV – milivolt, unidade de potencial elétrico

m/z – razão massa/carga, do inglês *mass to charge ratio*

O.D.<sub>600</sub> – densidade óptica a 600 nm, do inglês *optic density*

PAI – Peptídeos Antimicrobianos Intragênicos

PCR – reação em cadeia da polimerase, do inglês *Polymerase Chain Reaction*

PMSF - fluoreto de fenilmetilsulfonila, do inglês *phenylmethylsulfonyl fluoride*. Inibidor de protease.

p/v – peso/volume

Q – Analisador do tipo Quadrupolo, do inglês *Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometer*

SDS-PAGE – eletroforese em gel de poliacrilamida de dodecil-sulfato de sódio, do inglês *sodium dodecyl-sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*

SPPS - Síntese de Peptídeos em Fase Sólida, do inglês *Solid Phase Peptide Synthesis*

TAE – tampão tris-acetato-EDTA

Tc - *Theobroma cacao*, nome científico do cacau.

TFA – ácido trifluoracético, do inglês *trifluoroacetic acid*

TOF – Analisador por Tempo de Voo, do inglês *Time of Flight*

V – volt, unidade de potencial elétrico

v/v – volume/volume

$\alpha$ -ciano – ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico, do inglês  *$\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid*



## ÍNDICE DE FIGURAS

### CAPÍTULO I

|                                                                                                      |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1.</b> Mecanismo de ação dos peptídeos antimicrobianos.....                                | 33 |
| <b>Figura 2.</b> Plantas de interesse para a agricultura brasileira.....                             | 42 |
| <b>Figura 3.</b> Representação em <i>Helix Wheel</i> dos peptídeos antimicrobianos intragênicos..... | 45 |
| <b>Figura 4.</b> Representação esquemática das proteínas quiméricas produzidas.....                  | 46 |
| <b>Figura 5.</b> Representação em <i>Helix Wheel</i> dos peptídeos intragênicos do café.....         | 47 |
| <b>Figura 6.</b> Representação esquemática da clonagem dos genes das proteínas quiméricas.....       | 52 |
| <b>Figura 7.</b> Representação esquemática dos vetores de expressão.....                             | 53 |
| <b>Figura 8.</b> Fluxograma das etapas de purificação testadas.....                                  | 59 |
| <b>Figura 9.</b> Gel de agarose da digestão dos vetores pET-24a, pKan_Gr01 e pKan_Tc02.....          | 62 |
| <b>Figura 10.</b> Gel de agarose da digestão dos vetores pET-24a, pKan_Cc00 e pKan_Cc11.....         | 62 |
| <b>Figura 11.</b> PCR para confirmação dos transformantes de pET_Gr01.....                           | 63 |
| <b>Figura 12.</b> PCR para confirmação dos transformantes de pET_Tc02.....                           | 64 |
| <b>Figura 13.</b> PCR para confirmação dos transformantes de pET_Cc00.....                           | 64 |
| <b>Figura 14.</b> PCR para confirmação dos transformantes de pET_Cc11.....                           | 64 |
| <b>Figura 15.</b> Digestão de pET-24a_Gr01 e pET-24a_Tc02.....                                       | 65 |
| <b>Figura 16.</b> Gráfico com as curvas que representam as cinéticas de <i>E. coli</i> (KRX).....    | 68 |
| <b>Figura 17.</b> Gel SDS-PAGE das frações da indução de Gr01 em <i>E. coli</i> (KRX).....           | 70 |
| <b>Figura 18.</b> Western blot das frações da indução de Gr01 em <i>E. coli</i> (KRX).....           | 70 |
| <b>Figura 19.</b> Gel SDS-PAGE das frações da indução de Tc02 em <i>E. coli</i> (KRX).....           | 71 |
| <b>Figura 20.</b> Western blot das frações da indução de Tc02 em <i>E. coli</i> (KRX).....           | 71 |
| <b>Figura 21.</b> Gel SDS-PAGE das frações da indução de Cc11 em <i>E. coli</i> (KRX).....           | 72 |
| <b>Figura 22.</b> Géis SDS-PAGE das amostras de GST-Gr01 purificadas.....                            | 73 |
| <b>Figura 23.</b> Cromatograma da quimera GST_Gr01.....                                              | 75 |
| <b>Figura 24.</b> Cromatograma do peptídeo Cc00.....                                                 | 75 |
| <b>Figura 25.</b> Espectro MS da fração 16 da amostra GST_Gr01.....                                  | 76 |
| <b>Figura 26.</b> Espectro MS da amostra GST_Gr01 clivada com o Fator Xa.....                        | 77 |
| <b>Figura 27.</b> Espectro MS da amostra GST_Gr01 tripsinizada.....                                  | 78 |
| <b>Figura 28.</b> Sequência do íon $[M + H]^+ = 1.711,93 \text{ Da}$ .....                           | 79 |
| <b>Figura 29.</b> Espectro de fragmentação do íon $[M + H]^+ = 2.326,04 \text{ Da}$ .....            | 80 |
| <b>Figura 30.</b> Espectro de fragmentação do íon $[M + H]^+ = 2.229,27 \text{ Da}$ .....            | 80 |

|                                                                                  |    |
|----------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 31.</b> Espectro de fragmentação do íon $[M + H]^+ = 1.711,93$ Da..... | 81 |
| <b>Figura 32.</b> Espectro de fragmentação do íon $[M + H]^+ = 1.516,92$ Da..... | 81 |
| <b>Figura 33.</b> Espectro de fragmentação do íon $[M + H]^+ = 1.149,76$ Da..... | 82 |
| <b>Figura 34.</b> Espectro de fragmentação do íon $[M + H]^+ = 1.138,61$ Da..... | 82 |
| <b>Figura 35.</b> Espectro MS de Cc00.....                                       | 83 |
| <b>Figura 36.</b> Espectro MS de Cc00 ampliado.....                              | 83 |
| <b>Figura 37.</b> Espectro de fragmentação do íon $[M+H]^+ = 2.344,15$ .....     | 84 |
| <b>Figura 38.</b> Espectro MS da digestão trípica de Cc00.....                   | 85 |
| <b>Figura 39.</b> Identificação do fragmento 6.231,97 Da.....                    | 85 |

## CAPÍTULO II

|                                                                                                       |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Figura 1.</b> Organismo produtor e sequência da DS 01.....                                         | 110 |
| <b>Figura 2.</b> Estrutura do Fator- $\alpha$ .....                                                   | 113 |
| <b>Figura 3.</b> Vetores de expressão para CT e DS 01.....                                            | 115 |
| <b>Figura 4.</b> Gel de agarose dos vetores pUCIDT_CT e pUCIDT_DS01.....                              | 122 |
| <b>Figura 5.</b> Gel de agarose dos cassetes de expressão liberados.....                              | 123 |
| <b>Figura 6.</b> Gel de agarose dos vetores linearizados.....                                         | 123 |
| <b>Figura 7.</b> PCR para confirmação da integração do vetor pK-CT-ld.....                            | 124 |
| <b>Figura 8.</b> PCR para confirmação da integração do vetor pK-DS01-ld.....                          | 124 |
| <b>Figura 9.</b> PCR para confirmação da integração do vetor pPICZ $\alpha$ A_DS01.....               | 125 |
| <b>Figura 10.</b> Culturas de <i>K. phaffii</i> em meio com metanol.....                              | 126 |
| <b>Figura 11.</b> Gráfico com as curvas que representam as cinéticas de <i>K. phaffii</i> (X-33)..... | 127 |
| <b>Figura 12.</b> Cromatograma da DS 01 sintética.....                                                | 128 |
| <b>Figura 13.</b> Espectro MS da DS 01s purificada $[M + H]^+ = 2793,885$ Da.....                     | 128 |
| <b>Figura 14.</b> Espectro de fragmentação da DS0 01s $[M + H]^+ = 2793,907$ Da.....                  | 129 |
| <b>Figura 15.</b> Teste preliminar de atividade inibitória mínima (MIC).....                          | 130 |
| <b>Figura 16.</b> Diferenças na composição das membranas entre bactérias.....                         | 133 |

## ÍNDICE DE TABELAS

### CAPÍTULO I

|                                                                                                                                     |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabela 1.</b> Meios de obtenção de peptídeos antimicrobianos.....                                                                | 39 |
| <b>Tabela 2.</b> Parâmetros físico-químicos usados pelo Kamal.....                                                                  | 44 |
| <b>Tabela 3.</b> Peptídeos bioativos encriptados.....                                                                               | 48 |
| <b>Tabela 4.</b> Sequência das proteínas quiméricas.....                                                                            | 49 |
| <b>Tabela 5.</b> Informações sobre as enzimas de restrição.....                                                                     | 53 |
| <b>Tabela 6.</b> Oligonucleotídeos.....                                                                                             | 53 |
| <b>Tabela 7.</b> Valores de O.D. <sub>600</sub> da cultura de Gr01.....                                                             | 66 |
| <b>Tabela 8.</b> Valores de O.D. <sub>600</sub> da cultura de Tc02.....                                                             | 67 |
| <b>Tabela 9.</b> Valores de O.D. <sub>600</sub> da cultura de Cc11.....                                                             | 67 |
| <b>Tabela 10.</b> Valores de O.D. <sub>600</sub> das culturas crescidas durante a noite.....                                        | 68 |
| <b>Tabela 11.</b> Massa das células das culturas induzidas.....                                                                     | 69 |
| <b>Tabela 12.</b> Íons provenientes da digestão de GST-Gr01 parcial sequenciados dentre os fragmentos preditos usando o Expasy..... | 79 |
| <b>Tabela 13.</b> Predição dos fragmentos esperados para a digestão de Cc00.....                                                    | 84 |
| <b>Tabela 14.</b> Concentração inibitória mínima ( $\mu$ M) dos peptídeos.....                                                      | 88 |

### CAPÍTULO II

|                                                                 |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Tabela 1.</b> Informações sobre as enzimas de restrição..... | 115 |
| <b>Tabela 2.</b> Oligonucleotídeos.....                         | 116 |

## RESUMO

As proteínas podem conter sequências internas de peptídeos com atividades biológicas que variam desde ação antioxidante à anti-inflamatória e opioide. Os peptídeos provenientes de sequências internas de proteínas com atividades semelhantes aos antimicrobianos (PAM), presentes em várias espécies, têm sido sistematicamente investigados, devido ao seu amplo espectro de ação contra fungos e bactérias, principalmente. Desse fato experimental incontestado, surgiu então o conceito de Peptídeos Intragênicos (PI), peptídeos antimicrobianos, ou com outras atividades biológicas que estavam “encriptados” em sequências tipicamente reconhecidas como tão-somente codificadoras de proteínas detentoras das mais variadas funções biológicas no genoma de inúmeros seres vivos. Um trabalho anterior de nosso grupo validou a ação de seis dos PI antimicrobianos (Gr01, Gr02, Tc01, Tc02, At01 e At04) usados nessa pesquisa e encontrados nos genomas do cacau (*Theobroma cacao*), algodão (*Gossypium raimondii*) e *Arabidopsis thaliana*. Eles foram identificados usando o Kamal, software que faz buscas em bancos de sequências de proteína por padrões de sequências de aminoácidos que apresentem características físico-químicas compatíveis com a atividade biológica de interesse. A hipótese do presente estudo é de que seria possível “reencriptar” esses peptídeos em uma forma gênica diferente daquelas nas quais eles foram encontrados e remodelá-los numa nova forma de estruturas proteicas quiméricas para que, possivelmente, sua atividade biológica fosse silenciada temporariamente e, com isso, possibilitasse uma estratégia para expressão heteróloga em *Escherichia coli*. Ademais, foram produzidos de forma recombinante dois peptídeos encriptados provenientes do genoma do café (*Coffea canephora*): Cc00 e Cc11, ambos putativamente bioativos para outra atividade de interesse do grupo. Surpreendentemente, Cc11 mostrou atividade antimicrobiana. Neste trabalho, foram produzidas e detectadas por Western Blot duas quimeras antimicrobianas contendo esses peptídeos. A quimera GST\_Gr01 foi parcialmente produzida, purificada e sequenciada. Como validação do sistema de expressão, o peptídeo não antimicrobiano Cc00 foi produzido e parcialmente sequenciado por MALDI-TOF/MS. Verificou-se que o peptídeo foi completamente processado e integralmente expresso, apresentando os resíduos correspondentes ao encontrado no genoma e a massa molecular predita. Ademais, em *Komagataella phaffii*, outro modelo de trabalho, foi observado inibição do crescimento da levedura induzida para expressão do PAM de anfíbio DS 01. Um ensaio de MIC preliminar demonstrou a susceptibilidade de *K. phaffii* à DS 01.

## ABSTRACT

Proteins may contain internal peptide sequences within then presenting biological activities ranging from antioxidant to anti-inflammatory, and opioid action. Peptides originating from internal protein sequences with antimicrobial-like activities (AMP), present in several species, have been systematically investigated due to their broad spectrum of action against fungi and bacteria, mainly. This indisputable experimental fact gave rise to the concept of Intragenic Peptides (IP), antimicrobial peptides, or peptides with other biological activities that were “encrypted” in sequences typically recognized as encoding simply proteins with the most varied biological functions in the genome of numerous living beings. A previous work carried by our group validated the action of six of the antimicrobial PI (Gr01, Gr02, Tc01, Tc02, At01, and At04) used in this research, and found in the genomes of cocoa (*Theobroma cacao*), cotton (*Gossypium raimondii*), and *Arabidopsis thaliana*. They were found using Kamal software that searches protein sequence banks for amino acid sequence patterns that present physicochemical characteristics compatible with the biological activity of interest. The hypothesis of the present study is that it would be possible to “re-encrypt” these peptides in a different gene form from those in which they were found, and remodel them into a new form of chimeric protein structures. Therefore, their biological activity could possibly be temporarily silenced, enabling so a strategy for heterologous expression in *Escherichia coli*. Furthermore, two encrypted peptides from the coffee genome (*Coffea canephora*) were recombinantly produced: Cc00 and Cc11, both putatively bioactive for another activity of interest to the group. Surprisingly, Cc11 showed antimicrobial activity. In this work, two antimicrobial chimeras containing these peptides were produced, and detected by Western Blot. The chimera GST\_Gr01 was partially produced, purified, and sequenced. As a validation of the expression system, the non-antimicrobial peptide Cc00 was produced and partially sequenced by MALDI-TOF/MS. It was verified that the peptide was completely processed and fully expressed, presenting the residues corresponding to those found in the genome and the predicted molecular mass. Furthermore, in *Komogataella phaffii*, another working model, inhibition of yeast growth induced for expression of amphibian AMP DS 01 was observed. A preliminary MIC assay demonstrated the susceptibility of *K. phaffii* to DS 01.

## PREFÁCIO

A ciência é o estudo dos fenômenos pelas suas causas. Os peptídeos antimicrobianos membranoativos são sequências de resíduos de aminoácidos capazes de se estruturarem em uma alfa-hélice anfifílica em meios apolares e comprometer a integridade de membranas celulares de microrganismos. Estas macromoléculas estão presentes em plantas, anfíbios, insetos, mamíferos e mesmo os próprios microrganismos como bactérias e fungos. Entre outros aspectos, têm sido investigadas as causas dos mecanismos da ação antimicrobiana dos PAM e quais elementos compõem a essência destas macromoléculas, isto é, os resíduos de aminoácido necessários para sua atividade, sua estrutura e a ordem em que se apresentam, além de sua interação com o microrganismo vetor de expressão.

O desenvolvimento da biotecnologia permitiu a expressão heteróloga de diversas proteínas. Além disso, novos peptídeos antimicrobianos foram descobertos encriptados em sequências internas das proteínas dos seres vivos, sendo este conhecimento somado ao dos peptídeos antimicrobianos fisiologicamente produzidos. Outrossim, se tornou possível o desenho de proteínas quiméricas com múltiplos domínios para a sua produção, purificação, entrega e ação biológica. No presente trabalho, foram produzidas proteínas quiméricas contendo peptídeos antimicrobianos originalmente encriptados em proteínas de plantas com diferentes bioatividades. Também buscou-se expressar um peptídeo antimicrobiano encontrado na secreção cutânea de um anfíbio usando uma via de processamento de levedura. O fenômeno da produção destas macromoléculas foi investigado através de diferentes experimentos.

O primeiro capítulo trata da expressão de três quimeras antimicrobianas e dois peptídeos putativamente bioativos recombinantes em *Escherichia coli*, que foram inspirados em peptídeos encriptados em genomas de plantas. Os peptídeos antimicrobianos encontrados no cacau, algodão e *Arabidopsis thaliana* foram “re-encriptados” nas quimeras. As proteínas quiméricas recombinantes apresentaram atividade antimicrobiana potente. O sistema de produção testado foi validado pela expressão integral de um dos peptídeos encontrados no café.

O segundo capítulo explora a produção do peptídeo antimicrobiano dermaseptina 01, a DS 01, originalmente produzida por um anfíbio do Cerrado, em *Komagataella phaffii* (*Pichia pastoris*). A construção desenhada contém quatro módulos gênicos da DS 01 separados por sítios de clivagem, inspirados na via de processamento do fator alfa de leveduras. Observou-se a resposta da levedura à produção do PAM sob dois promotores, um constitutivo e um induzível. Em ambos os casos, o produto heterólogo demonstrou atividade antimicrobiana.

## CAPÍTULO I

### Expressão heteróloga em *Escherichia coli* de proteínas quimérica contendo peptídeos antimicrobianos de origem intragênica de genomas de plantas

#### 1. INTRODUÇÃO

##### 1.1 Ato, potência e peptídeos bioativos encriptados

Aristóteles, um dos maiores filósofos que a humanidade conheceu, nasceu em Estagira, atual Grécia, e viveu entre 384 e 322 a.C. Ele apresentou os conceitos de ato e de potência em suas célebres obras a “Física” e a “Metafísica”. Para melhor compreender tais conceitos, é importante saber que *matéria*, por definição, tudo aquilo que ocupa lugar no espaço, é um dos componentes da *substância*. Substância, em Aristóteles, é tudo aquilo que é composto por *matéria* e *forma*. Forma, por sua vez, é um ente metafísico que ao se associar à matéria caracteriza um dado ser, definindo os limites da matéria, conferindo-lhe propriedades específicas e, portanto, identidade. O conceito de potência aristotélico pode ser definido como as possibilidades (graus de liberdade) de mudanças ainda por acontecer que um dado ente está sujeito. Em outras palavras, o conjunto de um possível devir daquele ser atualizado por meio de um ou mais atos, sejam estes intrínsecos ou extrínsecos ao próprio ser. Pode-se ainda dizer que potência é o ponto de partida do movimento de mudança que acontece em algo, o anúncio de que o alvo da ação pode ser algo diferente do que era inicialmente. Assim, a potência é cronologicamente anterior ao ato. Por sua vez, o ato é anterior ontologicamente à potência porque aquele é a causa final, ou o *telos*, da potência. Como escreveu o filósofo em sua “Metafísica”, não é necessário que toda potência se torne ato. Algo pode ter potências que permanecem como tal. Por exemplo: imagine-se um bloco de mármore. Este pode ser trabalhado pelo homem para que se torne uma estátua, uma roda ou degraus de uma escadaria. Assim, um bloco de mármore, como matéria-prima, tem potências para assumir os formatos de cada um desses objetos, mas não se tornará todos ao mesmo tempo.

Ainda com relação ao exemplo do bloco de mármore. Foi visto que seria pouco provável que ele fosse transformado em algo além de um dos objetos que o escultor tivesse em mente, digamos, uma estátua. Note-se que aqui há intencionalidade. Caso o homem decidisse por fazer um novo trabalho e, a partir da estátua, esculpisse uma roda, diríamos que as potências do bloco de mármore foram atualizadas para um outro ente com propriedades diferentes das do trabalho anterior e, portanto, adquiriu uma nova identidade. Há casos em que o objeto em questão pode ter suas potências atualizadas continuamente. Com relação à definição de ato, trata-se do estado

concreto de algo, o que é, o que se tornou. Pode-se dizer que o ato é a concretização da potência. Voltemos ao bloco de mármore. Ele era, em ato, um bloco de mármore, digamos, retangular. Após ser trabalhado pelo escultor, suas potências foram atualizadas e ele foi transformado em uma estátua, de modo que é, em ato, uma estátua. A potência não tem substância, de modo que não apresenta matéria, mas o ato sim.

Que relação pode haver, porém, entre esses conceitos de filosofia clássica e a bioquímica? Especialmente, como as noções de matéria e forma, potência e ato são aplicadas às moléculas? Pensemos: um mesmo conjunto de quinze aminoácidos têm diversas potências, mas se ordenados de modo a formar um peptídeo, uma sequência de resíduos de aminoácido unidos por ligações, chamadas ligações peptídicas, torna-se em ato um único peptídeo ou proteína. Um dado peptídeo encerra propriedades físico-químicas próprias e diferentes das que teria caso fosse constituído por outra sequência, o que o tornaria mesmo um outro ente. A cada sequência diferente analisada, a macromolécula apresenta atos e potências particulares. No caso de um peptídeo: estruturação em  $\alpha$ -hélice, em estrutura- $\beta$  ou aleatória, ganho, perda ou mudança de atividade biológica. Em suma, a mesma matéria, os resíduos de aminoácido, podem ser arranjados de diferentes maneiras cada uma das quais constituindo um peptídeo único que pode assumir uma estrutura definida e propriedades testáveis.

Compreendidos esses conceitos, os peptídeos bioativos encriptados são sequências de peptídeos presentes em sequências maiores e que podem apresentar uma determinada atividade se produzidos em sua forma final ou quando liberados de dentro destas estruturas proteicas para se tornarem, então, o ente intencionado. Os peptídeos bioativos encriptados podem ser disponibilizados por lise com proteases, como diversos grupos já demonstraram (Santos *et al.*, 2023; Silva *et al.*, 2017; Zioudrou, 1979). O material explorado para se encontrar novos peptídeos é o próprio conteúdo proteico dos seres vivos.

É possível realizar buscas em bancos de dados de proteínas por peptídeos usando parâmetros definidos como carga líquida total e hidrofobicidade para encontrar peptídeos com a atividade antimicrobiana. Mesmo genomas sequenciados podem ser indiretamente usados como base de buscas, porquanto é possível buscar por peptídeos bioativos encriptados em proteínas conhecidas e teóricas a partir da tradução para proteínas feita a partir da sequência de ácidos nucleicos. Isso já foi demonstrado pelo nosso grupo, que encontrou peptídeos com atividade antimicrobiana em genomas de diferentes plantas (Ramada, 2016). Os peptídeos encriptados usados naquele trabalho foram descobertos na sequência de proteínas como

citocromo e de proteínas teóricas (Brand *et al.*, 2018; Ramada *et al.*, 2017). Outros estudos também descobriram peptídeos bioencapsulados na lactoferrina, lisozima, trombina, dentre outras proteínas (Bellamy *et al.*, 1992; Ibrahim *et al.*, 2011; Papareddy *et al.*, 2010, Pizzo *et al.*, 2018). O peptídeo antimicrobiano buforina, por exemplo, é um fragmento liberado das histonas H2A de anfíbios do gênero Bufo (Park *et al.*, 1996). Dentro de sua sequência, a proteína original possui um ou mais peptídeos bioativos em potencial e, uma vez identificada e conhecida a forma destes, os mesmos podem então ser produzidos em sua forma final e terem sua atividade biológica verificada. Porém, na atividade científica sempre surgem novas perguntas, dentre elas: é possível tornar novamente o ato uma potência?

## 1.2. Peptídeos antimicrobianos

Os peptídeos antimicrobianos (PAM) são sequências peptídicas curtas, de até 100 resíduos de aminoácido, capazes de provocar a morte celular ou inibir o crescimento de microrganismos (Wang *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2019). Em sua maioria, são moléculas catiônicas, básicas e com elevado conteúdo de resíduos de lisina e de glicina (Agrillo *et al.*, 2023; Pirtskhalava *et al.*, 2021). No caso de PAM membranolíticos, eles agem ao interagirem com as membranas fosfolipídicas das células, o que compromete sua integridade e provoca a morte celular. Em geral, os PAM possuem amplo espectro de ação, sendo ativos contra bactérias, fungos e protozoários (Bahar & Rem, 2013; Tossi *et al.*, 2000). Para os peptídeos membranolíticos, não há um alvo celular específico. Por essa razão, acredita-se que os PAM podem causar menos eventos de resistência que os antibióticos tradicionais (Chen & Jiang, 2023; Zasloff, 2002). Contudo, mudanças na carga da superfície dos microrganismos, alterações na composição de LPS e o aumento na produção de enzimas proteolíticas tem sido observados como mecanismos para adaptação aos PAM (Brodgen, 2005; Travkova *et al.*, 2017; Yeaman & Yount, 2003). Essas moléculas são encontradas nas mais diversas classes de seres vivos: bactérias, fungos, plantas, insetos, peixes, anfíbios, aves e mamíferos, estando presentes de forma ubíqua na natureza (Hancock & Diamond, 2000; Zhao *et al.*, 2013).

A história da descoberta e pesquisa de moléculas antimicrobianas passou por diversas etapas. A primeira proteína antimicrobiana a ser descoberta foi a lisozima (Fleming, 1922). Nessa mesma época, também ocorreu a descoberta de diversos agentes antimicrobianos não-ribossômicos (Wang *et al.*, 2016). O primeiro peptídeo antimicrobiano a ser descoberto foi a gramicidina, descoberta em 1939. A segunda etapa foi caracterizada pela descoberta de diversos peptídeos antimicrobianos que vieram a ser amplamente estudados, como as magaininas,

cecropinas, defensinas, lactoferrina do leite, catelicidinas e melitinas (Wang *et al.*, 2016; Zasloff, 1987). A terceira época de descoberta dos PAM começou com a expansão das ciências genômicas e o avanço no estudo das proteínas.

Os peptídeos antimicrobianos podem ser classificados de vários modos, de acordo com seu organismo de origem, pela sua estrutura terciária e por seu modo de ação. Os PAM podem assumir diversas estruturas, como  $\alpha$ -hélices, estruturas- $\beta$  ou uma estrutura em loop (Bahar & Rem, 2013). No caso da classe de peptídeos antimicrobianos  $\alpha$ -helicoidais, estes são anfifílicos, possuindo um lado da hélice populada majoritariamente por resíduos de aminoácido polares carregados positivamente e a outra metade por resíduos apolares. Há também peptídeos antimicrobianos aniônicos. Os peptídeos  $\alpha$ -helicoidais adquirem sua estrutura ao interagirem com membranas bacterianas, mas em água possuem estrutura aleatória (Blotnick *et al.*, 2017; Dathe & Wieprecht, 1999).

Os seres vivos possuem PAM como parte da sua imunidade inata (Hancock, 2001). Essas moléculas podem ser produzidas tanto constitutivamente como em resposta a infecções ou ferimentos (Blotnick *et al.*, 2017). É possível tomar por exemplo os anfíbios, que, como explicita o próprio nome da classe, Amphibia, deriva do grego, da junção do prefixo  $\alpha\mu\phi$  (*amphi*) que significa “dois”, “ambos” e  $\beta\iota\omicron\varsigma$  (*bios*), “vida”. Isso porque esses animais vivem na água e no ambiente terrestre. Os anfíbios possuem pele úmida e bastante exposta para a realização de trocas gasosas. Os peptídeos antimicrobianos são uma peça fundamental para evitar a proliferação de microrganismos e infecções nesse cenário (Ladram & Nicholas, 2016). Há evidências de que os PAM facilitam a ação das toxinas de alguns animais (Raaymakers *et al.*, 2017). Os peptídeos, não apenas antimicrobianos, mas também outros, como hormônios peptídicos, em geral são produzidos com como pré-pró-proteínas que sofrem processamento nas células, liberando o peptídeo final ativo (Pierre *et al.*, 2000; Shinnar *et al.*, 2003). Para além da atividade antimicrobiana, os AMP também possuem atividades imunomodulatórias como anti-inflamatórias, neutralizantes de LPS, e angiogênicas (Brand *et al.*, 2019; Javed *et al.*, 2024; Taniguchi *et al.*, 2017).

### **1.3. Mecanismos de ação dos peptídeos antimicrobianos membrano-ativos**

Alguns peptídeos antimicrobianos comprometem a integridade da membrana celular enquanto outros agem em alvos intracelulares. Os que agem dentro da célula, atuam impedindo a síntese proteica, de DNA, de RNA, da parede celular ou o ainda o dobramento de proteínas mediado por chaperonas (Jenssen *et al.*, 2006; Nicholas, 2009). Os PAM membranolíticos, por

serem em geral positivamente carregados, atuam nas membranas negativamente carregadas dos microrganismos. Eles costumam não afetar as membranas dos animais, que apresentam concentrações diferentes de colesterol (Yeaman & Yount, 2003). Há uma hipótese de que tal classe de moléculas não possuía atividade antimicrobiana como função primária quando surgiu (Fahmy *et al.*, 2023). Até o momento, não é conhecido o exato mecanismo pelo qual os peptídeos antimicrobianos membranolíticos interagem com a membrana celular e comprometem sua integridade. No entanto, alguns modelos foram propostos, mas todos carecem de evidências mais robustas que correspondam à realidade. Apesar disso, todos eles parecem concordar que como requisito mínimo, é importante que haja uma estruturação total ou parcialmente anfifílica da cadeia polipeptídica, carga líquida positiva para que o peptídeo possa se inserir na membrana fosfolipídica. Sabe-se que existe um limite mínimo de extensão dos PAM, ou seja, são necessários ao menos seis ou sete resíduos de aminoácido para que haja a formação de dois passos de uma hélice anfifílica (Bahar & Rem, 2013). Os modelos mais difundidos até o momento são apresentados a seguir. Os modelos barril e poro toroidal preveem a formação de poros na membrana durante a ação dos PAM, ao passo que o modelo semelhante ao carpete apresenta um mecanismo de comprometimento da integridade da membrana não mediado por poros, mas pelo englobamento de trechos da membrana.

### **Modelo Semelhante ao Carpete (Carpet-Like Model)**

Neste modelo, os peptídeos interagiriam com a região hidrofílica dos fosfolídeos de membrana, chamados de grupamento cabeça. O início da interação se iniciaria a partir de peptídeos individuais ou de oligômeros destes. Os PAM ficariam orientados perpendicularmente à membrana e em uma posição semelhante a objetos deitados sobre um carpete (**Figura 1.a.**). Os peptídeos, ao atingirem determinada concentração seriam adsorvidos pela membrana. Eles se reorientariam e voltariam à face hidrofóbica da hélice para a cadeia apolar dos lipídeos e a face hidrofílica para o grupamento cabeça, com a qual interagiriam durante todo o processo. Os peptídeos promoveriam uma tensão na membrana que causaria o seu rompimento (Shai, 2002). A ruptura total seria devido à curvatura exacerbada provocada na membrana e poderia ser precedida pela formação de poros transientes, devido à translocação de peptídeos da face externa para a face interna da membrana celular. O trabalho de Papo e colaboradores (2002) traz imagens de microscopia que corroboram esse modelo nas espécies de bactérias *E. coli* e *Pseudomonas aeruginosa* tratadas com peptídeos antimicrobianos  $\alpha$ -helicoidais. Chen e colaboradores (2023) demonstraram a alta probabilidade de o peptídeo sintético pepD2M agir segundo esse modelo em *E. coli*.

### **Modelo Semelhante ao Detergente (Detergent-Like Model)**

Como o próprio nome do modelo anuncia, os AMP desestruturariam a membrana fosfolipídica dissolvendo os fosfolípidos de um modo semelhante a moléculas detergentes (Bechinger & Lohner, 2006; Chen *et al.*, 2023). Os próprios peptídeos formariam micelas entre si (Bechinger & Lohner, 2006). A ação dos PAM aqui começa na intercalação destes com a bicamada lipídica (Bechinger & Lohner, 2006). A partir do momento que são dissolvidos em micelas peptídicas, os componentes fosfolipídicos não comporiam mais a membrana celular. Além da perda da barreira lipídica em si, a desintegração da membrana celular também abarcaria a perda do gradiente eletroquímico transmembrana e a perda dos componentes citoplasmáticos (Bechinger & Lohner, 2006; Brand, 2007). Um caso interessante desse modelo é o da warnericina RK, peptídeo ativo contra o gênero *Legionella*. Foi mostrado que a bactéria *L. pneumophila* é pelo menos dez vezes mais sensível a detergentes que *E. coli*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella typhimurium* e que o peptídeo atuaria nela por esse modelo (Verdon *et al.*, 2009).

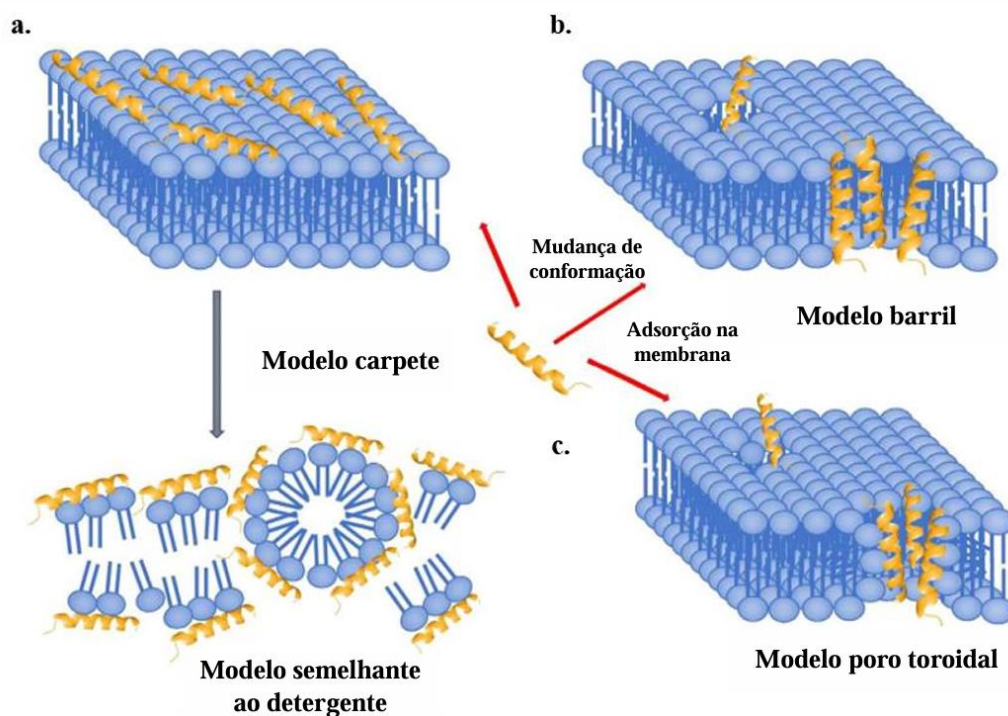
### **Modelo Barril (Barrel-Stave Model)**

Neste modelo é proposto que os peptídeos antimicrobianos  $\alpha$ -helicoidais interagiriam com a membrana e entre eles próprios e se inseririam na parte mais interna bicamada fosfolipídica, formando canais ou poros. Para que ocorra a inserção do peptídeo na membrana, há o requisito que seja hidrofóbico, sendo sua interação inicial mediada por ligações eletrostáticas (Brodgen, 2005). O lado hidrofóbico da hélice ficaria em contato com as cadeias carbônicas internas dos lípidos de membrana, enquanto o lado hidrofílico da hélice estaria voltado para o interior do poro (Shai, 2002), como mostrado na **figura 1.b**. Por esse canal, com formato de barril e formado por peptídeos, haveria o influxo de soluções aquosas, e provavelmente o efluxo de citoplasma para fora da célula. As interações predominantes entre os PAM e a membrana celular são regidas pelas interações hidrofóbicas (Shai, 2002). O poro formado cresceria mediante o recrutamento de novos monômeros, que passariam a integrá-lo, aumentando o seu diâmetro, de modo que haveria o pré-requisito que os peptídeos se associem no estado ligado à membrana (Brand, 2007; Shai, 2002).

### **Modelo do Poro Toroidal (Toroidal Pore Model)**

A diferença desse modelo para o anterior é que o grupamento cabeça dos fosfolípidos seria a única parte da membrana lipídica que interagiria com os PAM ao longo de todo o processo de formação do poro, mesmo durante a inserção do peptídeo na membrana. Ao se

inserir na membrana celular, os peptídeos antimicrobianos induziriam a curvatura contínua das monocamadas lipídicas ao longo do poro (Brodgen, 2005). A interação com o peptídeo provocaria uma expansão na face externa da membrana e uma contração na interna. Ademais, ocorreria o chamado achatamento de membrana, em que haveria a aproximação das extremidades dos fosfolipídeos (Omardien *et al.*, 2018). A migração de lipídeos entre as camadas (“lipid flip-flop”) também é importante para esse modo de ação, que foi estudada com um fragmento do peptídeo não integralmente  $\alpha$ -helicoidal sticholisina II (Mesa-Galloso *et al.*, 2019). Desse modo, há uma resposta da membrana, que é expressa como uma mudança conformacional, à interação com o PAM. Há a formação de poros por esses peptídeos, porém mais “frouxos” que o modelo barril e intercalados aos grupos cabeça dos fosfolipídeos (Nguyen *et al.*, 2011). Desse modo, o núcleo do canal aquoso seria revestido pelos grupamentos cabeça dos fosfolipídeos e pelos peptídeos alinhados ao poro (Brodgen, 2005). A curvatura lipídica, como visto na **figura 1.c.**, conecta os dois lados da membrana. A face polar da hélice dos peptídeos antimicrobianos fica voltada para o grupamento cabeça dos fosfolipídeos, que é polar (Brodgen, 2005).



**Figura 1. Mecanismo de ação dos peptídeos antimicrobianos.** Desenho esquemático dos mecanismos de ação propostos para peptídeos antimicrobianos  $\alpha$ -helicoidais membranoativos. Imagem adaptada de Huan *et al.* (2020).

### Modelo Shai-Matsuzaki-Huang (SMH)

Esse modelo coloca em destaque a resposta da membrana celular à interação com o peptídeo antimicrobiano  $\alpha$ -helicoidal, que promoveria o deslocamento de lipídeos, a alteração na estrutura da membrana e mesmo a entrada de peptídeos na célula, que em certos casos possuiriam inclusive alvos intracelulares. (Zasloff, 2002). A depender de como se estabelece a estrutura do poro, a ação do peptídeo poderia acontecer pelo modo proposto pelo modelo do poro toroidal ou pelo modelo semelhante ao carpete (Bobone *et al.*, 2012). O próprio mecanismo de permeabilização seria dependente da composição lipídica da célula-alvo (Huang, 2006; Matsuzaki *et al.*, 1998). Segundo Matsuzaki e colaboradores (1991), as interações eletrostáticas definem a afinidade entre os peptídeos e a membrana, ao passo que a fluidez da membrana determina a atividade de perturbação desta pelo peptídeo. Os peptídeos, sob uma concentração limiar para a formação dos poros, se ligariam de forma paralela à membrana e promoveriam a sua curvatura e gerariam ondulação (Huang, 2006). Após atingir uma determinada concentração, ocorreria a reorientação dos peptídeos e transição para poros, também chamados de buracos de minhoca (*wormholes*), estáveis (Huang, 2006). Bobone e colaboradores (2012) ponderaram, com base em evidências, que não é possível discernir o tipo de poro formado por um PAM com base unicamente na curvatura intrínseca nem da espessura da membrana.

#### **1.4. Expressão heteróloga de proteínas e de peptídeos antimicrobianos**

O trabalho dos cientistas Jaques Monod e François Jacob mostrou o funcionamento do sistema Operon lac e os fundamentos da regulação da expressão gênica em bactérias (Jacob & Monod, 1961). A partir dessa descoberta, e ainda mais após os anos 1970 com o desenvolvimento da engenharia genética, abriu-se um mundo de possibilidades para se explorar a produção de proteínas, advindas de muitos seres vivos e com as mais variadas funções, nos microrganismos. Em 1973, Cohen e colaboradores publicaram o desenvolvimento do primeiro plasmídeo recombinante. Mais adiante, a produção de proteínas recombinantes tornou-se possível também em plantas e mesmo em animais. Entretanto, não se deve esquecer as limitações técnicas e sobretudo as questões éticas envolvidas na pesquisa em biologia molecular. Foram realizadas conferências para discutir as implicações éticas do DNA recombinante, como a Gordon Research Conference on Nucleic Acids (1973) e a Asilomar Conference (1975). Entre publicações de alerta à comunidade científica, está a “Potential Biohazards of Recombinant DNA Molecules”. Antes desses eventos, na conclusão de seu artigo de 1961, Monod e Jacob afirmaram que a vida é possível devido à expressão ou não de determinadas potencialidades, isto é, da expressão ou não de determinados genes por certas

células. Ou seja, há uma ordenação nos acontecimentos genéticos, que mantém a homeostase e permite o desenvolvimento da vida biológica. Isto posto, começam a surgir várias e interessantes perguntas, dentre elas: como são escolhidas as “potências” genéticas que se tornarão “atos” proteicos? Será que genes de proteínas tóxicas poderiam ser reconhecidos pelos microrganismos e, nesse caso, como mecanismos internos impediriam sua expressão?

Para serem estudados com relação à sua estrutura, composição e o modo de ação, os peptídeos antimicrobianos devem ser obtidos em quantidades razoáveis, o que pode ser possível por meio da expressão heteróloga (Parachin *et al.*, 2012). A síntese livre de células, ou *cell-free*, é uma alternativa para se produzir PAM e outras moléculas tóxicas, como venenos animais (Rivera-de-Torre *et al.*, 2022). Nesta abordagem, extratos de bactérias ou de outros organismos com os componentes essenciais à síntese proteica, como ribossomos, RNA polimerases, ATP e aminoácidos, são incubados e a informação genética presente no plasmídeo é traduzida. Contudo, esse método apresenta baixo rendimento e ainda é de alto custo (Rivera-de-Torre *et al.*, 2022). A produção de proteínas e de peptídeos via expressão heteróloga tem sido cada vez mais procurada como alternativa frente a outras formas de obtenção de PAM, como a extração de fontes nativas e a síntese química (Roca-Pinilla *et al.*, 2022).

A extração de fontes nativas muitas vezes não é suficiente para se obter a quantidade desejada de peptídeos antimicrobianos, porquanto pequenas concentrações são encontradas na maioria dos organismos que os produzem (Parachin *et al.*, 2012). Para além, a extração requerer a coleta ou sacrifício dos indivíduos produtores, o que pode ser laborioso, dispensável, e nem sempre resultar em peptídeos com alto grau de pureza, o que é importante para sua atividade (Deng *et al.*, 2017). No que concerne às interações com o ambiente, é possível induzir RNA mensageiros (mRNA) que carregam sequências codificantes de diferentes peptídeos antimicrobianos a partir de mudanças na dieta. Um exemplo disso é o caso da larva da mosca soldado negro *Hermetia illucens* que, ao ser alimentada com uma dieta com maior quantidade de proteína, apresentou maiores níveis de expressão de PAM, assim como uma maior diversidade de PAM ao ser alimentada com uma dieta com certa carga de bactérias (Vogel *et al.*, 2018). Assim, é possível reconhecer que as moléculas produzidas por um organismo estão sujeitas a muitas variáveis, como a sua própria nutrição.

A síntese química de peptídeos pode ser feita em fase líquida (LPPS) ou fase sólida (SPPS). Uma vantagem dessa técnica é a possibilidade de se adicionar à cadeia peptídica aminoácidos raros. É possível ainda adicionar D-aminoácidos para evitar degradação

proteolítica e o reconhecimento pelo sistema imune (Deo *et al.*, 2022). Por outro lado, a síntese química de peptídeos usa reagentes caros e poluentes, além de ser um processo laborioso e de certo risco para a saúde humana. Um fator limitante dessa metodologia é a produção de alguns peptídeos glicosilados, fosforilados ou *N*-metilados e a incorporação dos aminoácidos histidina, cisteína e asparagina à cadeia nascente (Pedersen *et al.*, 2012). Outrossim, há a limitação na produção de cadeias muito longas de resíduos de aminoácido, mas há a possibilidade de se contornar essa questão fusionando as cadeias com a técnica de Ligação Química Nativa, *Native Chemical Ligation* (NCL) (Deo *et al.*, 2022; Rohden *et al.*, 2021).

A expressão heteróloga de peptídeos antimicrobianos é, por outro lado, em geral mais rápida e barata (Li, 2012; Parachin *et al.*, 2012). Além disso, a produção heteróloga de PAM permite explorar e estudar novos peptídeos antimicrobianos, seja por meio da produção de análogos dos PAM já descobertos ou ao se criarem peptídeos completamente novos (Piers *et al.*, 1993). Por fim, a produção recombinante gera maiores quantidades de peptídeos com relação a outras formas de produção, embora ainda sejam relativamente baixas. Há fatores chave a serem considerados ao se optar pela expressão heteróloga de peptídeos antimicrobianos, dentre eles o organismo de expressão e a proteína de fusão para purificação (Parachin *et al.*, 2012; Wibowo e Zhao, 2019). As vantagens e desvantagens a serem consideradas para cada forma de produção de PAM estão sumarizados na **Tabela 1**.

O vetor de expressão mais utilizado para a expressão de PAM é a bactéria Gram-negativa *Escherichia coli* (Parachin *et al.*, 2012). Depois das bactérias, o sistema de expressão mais utilizado são as leveduras, que é abordado no segundo capítulo dessa dissertação. O sistema de expressão recombinante em *E. coli* apresenta como vantagem ser um organismo de genética muito bem conhecida, possuir muitos plasmídeos já construídos, linhagens e indutores comercialmente disponíveis e ser de rápido crescimento (Li *et al.*, 2023). Por outro lado, a bactéria *Bacillus subtilis* é menos propensa a formar corpos de inclusão e não possui LPS, porquanto se trata de uma bactéria Gram-positiva, porém possui menor eficiência de transformação (Deo *et al.*, 2022; Li *et al.*, 2023). Para aumentar a eficiência da expressão heteróloga, recomenda-se a otimização dos códons do gene da proteína recombinante de acordo com os tRNA de preferência do organismo (Pouresmaeil & Azizi-Dargahlou, 2023). Os códons que codificam o resíduo de arginina, frequentes nos PAM, impactam a expressão heteróloga em *E. coli* (McNulty *et al.*, 2003).

Em casos em que o peptídeo antimicrobiano em questão é ativo contra o microrganismo vetor de expressão, como o caso dos peptídeos produzidos nesse trabalho, faz-se necessário o uso de estratégias que anulem a atividade antimicrobiana enquanto o peptídeo é produzido até que ele atinja a quantidade desejada para purificação ou seja entregue ao alvo (Parachin *et al.*, 2012). Dentre essas estratégias, se encontra a largamente empregada substituição de alguns resíduos de aminoácido, para criar novos PAM; a ligação dos PAM heterólogos a proteínas carreadoras maiores como a GST (Glutathione-S-Transferase) e a GFP (*Green Fluorescent Protein*) (López-Cano *et al.*, 2022) e a produção de quimeras de fragmentos de dois PAM diferentes, o que pode mudar sua especificidade e eficácia (Roca-Pinilla *et al.*, 2022).

Outros aspectos importantes a se considerar são a solubilidade e a localização da proteína expressa. Especificamente em *E. coli*, a formação proposital de corpos de inclusão da proteína recombinante é uma estratégia empregada (Li, 2012). Isso por se tratar de agregados da proteína recombinante praticamente pura, por ser uma estrutura que esconde as proteínas recombinantes da ação de proteases intracelulares e por poderem ser facilmente purificados (Deo *et al.*, 2022; Li, 2012). Algumas proteínas de fusão são utilizadas para possibilitar esse fenômeno de agregação. Outras proteínas como a GST, ao contrário, em geral aumentam a solubilidade das proteínas recombinantes.

Dentre as proteínas de fusão e tags de purificação encontra-se a GST, a tiorredoxina A, a cauda de resíduos de histitina de tamanho variável (HisTag) e o pequeno modificador relacionado à ubiquitina (SUMO) (Kim *et al.*, 2019). A tiorredoxina e a SUMO necessitam de uma tag adicional de purificação ou demandam métodos mais elaborados para o mesmo fim, como a cromatografia líquida de alta eficiência. Já a HisTag é uma tag de purificação bastante eficiente, mas não é uma proteína de fusão e possui pequena massa, não agindo como estabilizador e inibidor provável do antimicrobiano. Por outro lado, a GSTag pode ser utilizada tanto como proteína de fusão quanto tag de purificação, pois há colunas de afinidade pela glutathione para esse fim. Não apenas a fusão, mas a ciclização de PAM pode protegê-los contra a ação de proteases (Lourenço *et al.*, 2023). A clivagem das proteínas de fusão pode ser feita utilizando agentes químicos ou enzimas, que, em geral, levam a rendimentos mais baixos (Piers *et al.*, 1993).

Entretanto, o sistema de expressão em procariotos possui limitações, como por exemplo não realizar a maioria das modificações pós-traducionais como a glicosilação e a formação de pontes dissulfeto (McElwain *et al.*, 2022). A agregação de peptídeos na forma de corpos de

inclusão, quando não intencional, pode ser outro problema a ser superado para possibilitar a purificação. Por fim, há a reticência de usar *E. coli* para a produção de fármacos por ela ser fonte de endotoxinas, LPS, altamente pró-inflamatórias, que geram resposta pirogênica e até mesmo choque séptico (Mamat *et al.*, 2015). Já foram desenvolvidas algumas ferramentas para superar as limitações desse sistema de expressão. Um exemplo é a linhagem de *E. coli* SHuffle, que apresenta um estado redox que a torna capaz de formar as pontes dissulfeto das proteínas no citoplasma, o que normalmente ocorreria apenas no periplasma (Lobstein *et al.*, 2012). Alguns exemplos de proteínas antimicrobianas recombinantes produzidas são a gloverina proveniente da mariposa *Galleria mellonella* (GmGlv) expressa em células de *Drosophyla melanogaster* linhagem S2, capaz de agir na membrana e nos lipopolissacarídeos bacterianos (Zitzmann *et al.*, 2017), e, em *E. coli*, a defencina Lc-def, original da lentilha *Lens culinaris*, que apresenta 47 resíduos de aminoácido (Shenkarev *et al.*, 2014). A Lc-def é ativa contra fungos, mas não contra bactérias Gram-positivas nem Gram-negativas.

**Tabela 1. Meios de obtenção de peptídeos antimicrobianos.** Características relevantes a serem consideradas para escolha do meio de obtenção de peptídeos antimicrobianos.

Referências: Deo *et al.*, 2022; Roca-Pinilla *et al.*, 2022.

| Sistema de produção                                                                                 | Vantagens                                                                                                                                                                                                                                           | Desvantagens                                                                                                                                                                                                                                     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Obtenção da fonte nativa (organismo que produz o peptídeo antimicrobiano em condições fisiológicas) | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Indução por resposta imune;</li> <li>• Obtenção do PAM nativo;</li> <li>• Sem citotoxicidade.</li> </ul>                                                                                                   | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Ativação por clivagem proteolítica;</li> <li>• Produção tecido-específica;</li> <li>• Baixo rendimento.</li> </ul>                                                                                      |
| Síntese química de peptídeos em fase sólida                                                         | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Não é necessário o uso de proteases na produção;</li> <li>• Processo estabelecido na indústria.</li> <li>• Atividade comparável ou superior às fontes nativas;</li> <li>• Maior grau de pureza.</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Alto custo;</li> <li>• Reagentes tóxicos;</li> <li>• Peptídeos limitados a cadeias curtas e com restrição de modificações pós-traducionais (PTM) e aminoácidos pouco comuns.</li> </ul>                 |
| Expressão heteróloga em bactérias                                                                   | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Altos níveis de expressão;</li> <li>• Baixo custo;</li> <li>• Método bem estabelecido;</li> <li>• Crescimento rápido</li> </ul>                                                                            | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Peptídeos recombinantes propensos à degradação proteolítica;</li> <li>• Contaminação por endotoxinas;</li> <li>• Não realiza a maioria das PTM;</li> </ul>                                              |
| Expressão heteróloga em fungos                                                                      | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Realiza PTM;</li> <li>• Secreção eficiente;</li> <li>• Altos níveis de expressão;</li> <li>• Baixo custo.</li> </ul>                                                                                       | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Produção por fermentação;</li> <li>• Pode ocorrer hiperglicosilação;</li> <li>• Crescimento mais lento que bactérias;</li> <li>• Célula difícil de lisar caso o peptídeo não seja secretado.</li> </ul> |
| Expressão heteróloga em plantas                                                                     | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Produção em larga escala;</li> <li>• Baixo custo;</li> <li>• Realiza PTM.</li> </ul>                                                                                                                       | <ul style="list-style-type: none"> <li>• As modificações genéticas são mais difíceis;</li> <li>• Longo tempo de crescimento;</li> <li>• Dificuldade de purificação;</li> <li>• Baixa produção e baixa estabilidade.</li> </ul>                   |

## 1.5. Peptídeos antimicrobianos encriptados

Os peptídeos antimicrobianos intragênicos são sequências de resíduos de aminoácidos com características físico-químicas de um peptídeo antimicrobiano contidas em sequências maiores ou, em outras palavras, fragmentos internos de sequências de nucleotídeos, com potencial de serem peptídeos antimicrobianos, presentes nas sequências de proteínas maiores. Algumas dessas proteínas são expressas em condições fisiológicas em seus organismos de origem e outras são hipotéticas e sua atividade que, caso possuam, não é necessariamente antimicrobiana (Brand *et al.*, 2012). Enquanto contidos nas proteínas maiores, os peptídeos encriptados contribuem para a estruturação e, podem contribuir para a função biológica desta proteína. De acordo com o pensamento aristotélico, podemos dizer que determinadas sequências peptídicas encriptadas no genoma com as características de PAM listadas acima são peptídeos antimicrobianos em potência. Sua atualidade decorreria da existência da sua forma final, ou seja, serem produzidos por diversas formas como por exemplo expressão nativa, heteróloga ou síntese química, como visto.

Muitos peptídeos antimicrobianos e hormônios são produzidos como pré-pró-proteínas e são então completamente processados para apresentarem a atividade nativa. Cada vez mais peptídeos antimicrobianos têm sido descobertos em fragmentos de proteínas maiores (Nguyen *et al.*, 2011). Dentre os peptídeos antimicrobianos liberados de proteínas maiores estão a lactoferricina e a lactoferrampina, derivados da lactoferrina, e peptídeos derivados da caseína, da mioglobina, lisozima, hemoglobina e histonas (Lueangsakulthai *et al.*, 2017, Nguyen *et al.*, 2011). Uma importante contribuição foi a proposição do conceito de “intragenia”, isto é, a descoberta de sequências codificadoras de peptídeos ou de proteínas de interesse em um organismo e sua expressão no próprio ser vivo, sem a necessidade de genes exógenos. Um exemplo é a descoberta de peptídeos antimicrobianos no genoma de *Arabidopsis thaliana* e sua posterior expressão na mesma espécie vegetal (Nóbrega, 2017). Essa abordagem continua a empregar peptídeos antimicrobianos encriptados, mas não cria plantas transgênicas, uma vez que a sequência genética teve sua gênese na própria planta (Brand *et al.*, 2012).

Existem vários bancos de dados para os peptídeos antimicrobianos naturais e sintéticos já descobertos como o Antimicrobial Peptide Database 3 (APD3) (Wang *et al.*, 2016), o Collection of Antimicrobial Database (CAMP) (Waghu *et al.*, 2014), o Data Repository of Antimicrobial Peptides (DRAMP) (Fan *et al.*, 2016) e o Linking Antimicrobial Database (LAMP) (Zhao *et al.*, 2013). O software utilizado para a busca dos PAI usados nesse trabalho

é o Kamal (<https://av.cenargen.embrapa.br/Kamal/>), desenvolvido por pesquisadores do Laboratório de Espectrometria de Massa (LEM), da EMBRAPA CENARGEN. O nome do software é uma referência a um dos primeiros instrumentos de navegação inventados, usado para determinar a latitude. O software guia a busca por peptídeos desconhecidos no genoma, conforme parâmetros estabelecidos.

O Kamal realiza uma varredura nos genomas em busca de peptídeos antimicrobianos utilizando uma janela de valores aceitáveis para parâmetros que caracterizam essas macromoléculas como número de resíduos, carga líquida total, massa molecular e escala de hidrofobicidade, listados na **tabela 2**. Quanto a esses parâmetros, mais que a helicidade, a carga líquida total e o comprimento são importantes para a atividade dos PAM. Uma busca no Antimicrobial Peptide Database 3 (APD3), mostrou que cerca a maioria dos PAM ativos possuem entre 21 e 30 resíduos, aproximadamente o tamanho dos PAM parametrizados pelo Kamal e que aproximadamente 90% possuem comprimento inferior a 50 resíduos de aminoácido (Wang *et al.*, 2016).

### 1.6. Peptídeos antimicrobianos recombinantes e a agricultura

Um dos nomes que hoje é amplamente utilizado para se referir a bactérias e a leveduras usadas na produção de proteínas recombinantes é “fábrica celular” ou “*cell factories*”, em inglês. Entretanto, deve-se ter cautela ao usar esse termo, pois o controle que se é possível ter sobre essas formas de vida é menor e mais imprevisível do que pensamos. A escala de complexidade se torna ainda maior quando se pensa na produção de proteínas recombinantes em plantas e em células de insetos e de mamíferos. Mais ainda, quando o fim último dessa produção, não importa em qual plataforma seja, é a manutenção da saúde e da alimentação humanas. Não obstante, há crescentes esforços para se produzir peptídeos antimicrobianos em plantas de interesse agrícola para obtenção de PAM puros para outras aplicações e, ou tão somente, defender a produção contra patógenos comuns.

A cultura do algodão (*Gossypium raymondii*), planta da família Malvaceae é de grande relevância para a economia brasileira (**Figura 2. a.**). Segundo a Associação Brasileira dos Produtores de Algodão (Abrapa), foram exportadas 1.618.194 toneladas de algodão em 2023, que gerou uma receita de US\$ 3.073.809.164,00. A árvore do cacau (*Theobroma cacao*) é bastante comum no sul da Bahia e também pertence à família Malvaceae (**Figura 2. b.**). De acordo com a Associação Nacional das Indústrias Processadoras de Cacau (AIPC), foram exportadas 455 toneladas de amêndoas de cacau e 41.542 toneladas de chocolate no ano de

2023. A planta *Arabidopsis thaliana*, família Brassicaceae, é um dos modelos vegetais mais utilizados em laboratório para estudos genéticos, tendo sido a primeira planta a ter o seu genoma sequenciado. O café é uma das bebidas mais apreciadas e seus grãos um dos produtos agrícolas mais valorizados e negociados no mundo. É dessas plantas que vem a inspiração dos peptídeos encriptados estudados no presente trabalho.



**Figura 2. Plantas de interesse para a agricultura brasileira. a.** Cultura de algodão. **b.** Indivíduo da espécie do cacau. Fotografias feitas pela autora da dissertação.

Com relação ao uso de plantas para a expressão heteróloga de PAM, embora ainda representem uma pequena parcela dos organismos de expressão, elas vêm sendo cada vez mais empregadas com essa finalidade (Parachin *et al.*, 2012). As plantas, que são vetores de expressão de peptídeos antimicrobianos para a sua própria defesa, possuem como vantagem não haver necessidade de purificar o peptídeo, uma vez que ele é produzido na própria planta. Os PAM naturalmente produzidos por plantas são de origem ribossômica e há a possibilidade de desenvolver plantas transgênicas que expressem esses peptídeos e as tornem total ou parcialmente resistentes a fitopatógenos (Montesinos, 2007). Ademais, não é necessário nem mesmo que a planta seja transgênica, uma vez que foi formulado o conceito de “intragenia”. A planta seria então transformada com o seu próprio material genético para produzir peptídeos antimicrobianos cuja sequência se encontra no seu genoma (Ramada *et al.*, 2017).

Um exemplo de peptídeo recombinante de planta expresso em *E. coli* é a snekina-1 (Kuddus *et al.*, 2017), também expressa pelo mesmo grupo em *Pichia pastoris* em 2016. Esse

peptídeo é ativo contra bactérias e fungos fitopatogênicos. Uma defensina do milho, MzDef, foi expressa com sucesso ligada a GST pelo grupo de Al Kashgry e colaboradores (2020). Em *E. coli* também foi expresso o peptídeo antifúngico Ace-AMP1, originado da cebola (*Allium cepa*), fusionado à tiorredoxina (Wu *et al.*, 2011). Usando as próprias plantas como vetor de expressão também já foram produzidas a cecropina A no arroz usando a oleosina 18, uma proteína de reserva, como carreadora (Montesinos *et al.*, 2016). A cecropina produzida no arroz foi capaz de conferir resistência da planta ao fungo *Magnaporthe grisea* (Coca *et al.*, 2006). Usando a mesma planta, foram produzidos peptídeos antimicrobianos derivados de outro PAM, BP100, usando expressão regulada (Company *et al.*, 2014).

## 2. ESTRATÉGIA

“*Molecular Peptide Tailoring* (MT)” ou “alfaiataria molecular de peptídeos” é o desenho de cadeias polipeptídicas a partir da junção de diversos módulos, isto é, sequências gênicas de diferentes origens. Cada módulo pode apresentar uma ou mais funções ou atividades e ser unido a outros para uma determinada finalidade. Atividade catalítica ou sítio de clivagem, inspirados em sequências de diferentes organismos podem ser atributos dos módulos. A proteína de fusão Glutathione-S-Transferase (GST) pode, por exemplo, estar unida a uma proteína funcional originada de um ser vivo diferente do que codifica naturalmente aquela GST, que por sua vez pode ainda ser fusionada a uma proteína agregadora inspirada em um terceiro organismo. Há módulos que podem ser inclusos no desenho de uma proteína com o objetivo de possibilitar a entrega em determinado local-alvo. Os biofármacos, por exemplo, possuem módulos resistentes à degradação proteolítica para preservar a integridade da quimera, que contém sequências peptídicas de potencial bioativo. Os pesquisadores, inspirados em peptídeos antimicrobianos e outros peptídeos penetradores de células (CPP), são capazes de criar novos peptídeos para entrega intracelular de biofármacos (Feng *et al.*, 2023).

Há alguns anos o nosso grupo vem mostrando a eficácia de buscas dirigidas usando parâmetros acurados em genomas de plantas e de animais (Brand *et al.*, 2012; Brand *et al.*, 2019; Ramada *et al.*, 2017). Os peptídeos antimicrobianos intragênicos usados neste trabalho já foram produzidos por síntese química em fase sólida por Ramada (Ramada *et al.*, 2016), que, junto a colaboradores, buscou peptídeos antimicrobianos intragênicos (PAI) nos genomas do algodão (*Gossypium raimondii*), da planta modelo de estudos genéticos *Arabidopsis thaliana*, do cacau (*Theobroma cacao*), da laranja-doce (*Citrus sinensis*) e do milho (*Zea mays*) usando o Kamal e encontraram vários candidatos. No seu trabalho, esses PAI tiveram sua atividade

antimicrobiana comprovada e quantificada por ensaios de MIC contra diversos microrganismos bacterianos e fúngicos, dentre os quais espécies patogênicas para seres humanos e outras para plantas de relevância agrícola.

**Tabela 2. Parâmetros físico-químicos usados pelo Kamal.** Parâmetros físico-químicos aplicados pelo Kamal à busca dos peptídeos antimicrobianos intragênicos produzidos nesse trabalho. Tabela retirada de Ramada (2016).

| Parâmetros físico-químicos                          | Janela                         |
|-----------------------------------------------------|--------------------------------|
| Número de resíduos                                  | 16-22 aa                       |
| Filtro por resíduos                                 | C e P*                         |
| Carga líquida                                       | +1 até +5                      |
| Massa Molecular (Da)                                | 1400 até 4000                  |
| Hidrofobicidade escala TM (Zhao & London, 2006)     | - 0,485 até 0,516              |
| Momento Hidrofóbico escala TM (Zhao & London, 2006) | 0,516 até 1,267                |
| Agregação (Conchillo-Sole et al., 2007)             | -10 até +55                    |
| Ponto Isoelétrico (Bjellqvist et al., 1993)         | 9 até 13                       |
| Janela de hidrofobicidade (Kyte & Doolittle, 1982)  | Max 1 até 3    Min -2 até -0,5 |

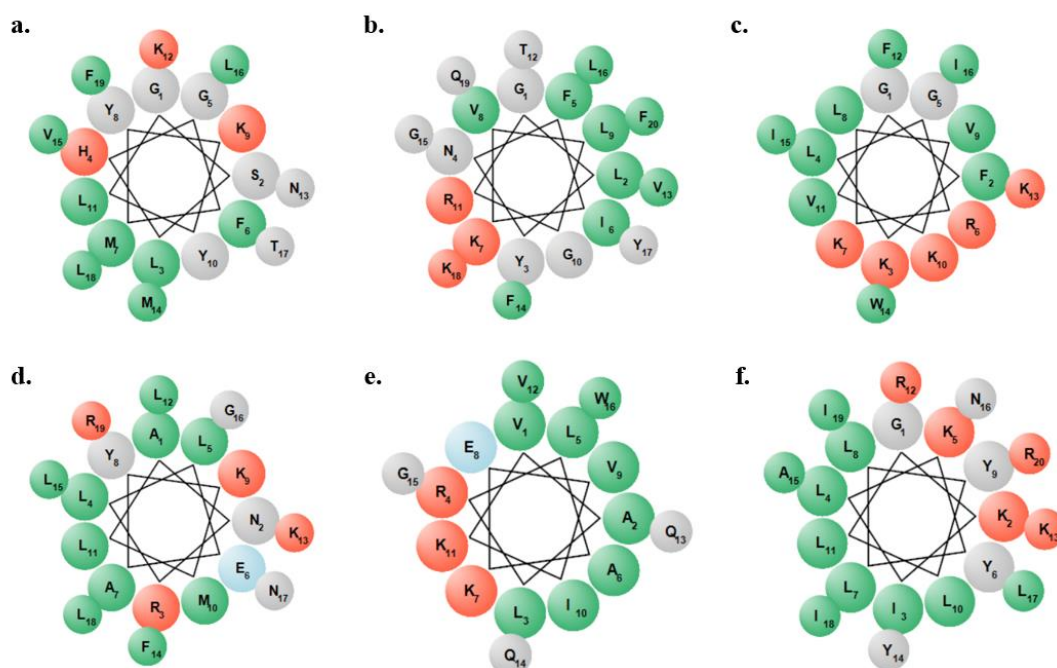
\* Exclui peptídeos com resíduos de cisteína (C) ou prolina (P). Tal filtro foi utilizado pela baixa representatividade desses resíduos nas sequências de AMP utilizadas como arquétipos para a obtenção dos parâmetros físico-químicos.

A hipótese de trabalho é que peptídeos intragênicos poderiam ser liberados de proteínas quiméricas desenhadas por *Molecular Peptide Tailoring*. A atividade dos PI não seria apresentada necessariamente nas proteínas até sua liberação. O presente modelo de trabalho é de peptídeos antimicrobianos encriptados. As proteínas quiméricas representam, portanto, uma nova estratégia para o carregamento e expressão de proteínas e peptídeos tóxicos para o vetor de expressão. Outrossim, o sistema apresentado também pode, ao menos teoricamente, ser usado para a entrega ou “*delivery*” de fármacos, pois, convém que os PI empregados nas quimeras não apresentem a atividade que lhes é própria, e que também não sejam degradados até que cheguem ao sítio-alvo.

Tendo-se compreendido o conceito de peptídeos antimicrobianos encriptados e as possibilidades de sua alfaiataria molecular, vislumbrou-se uma metodologia de ordenamento estrutural de um ou mais peptídeos bioativos encriptados “re-encriptando-os” novamente, mas em uma proteína inédita que poderia ser produzida via expressão heteróloga em bactérias. Para tanto, neste trabalho foram montadas e expressas três proteínas quiméricas e dois peptídeos recombinantes. Cada uma das quimeras contém, em suas sequências primárias resultantes, três peptídeos antimicrobianos intragênicos já avaliados por MIC e potentes contra diversos microrganismos (Ramada, 2016; Ramada *et al.*, 2017). Quanto à atividade hemolítica, dentre

os PAI analisados, todos possuem atividade hemolítica igual ou superior a 64  $\mu$ M, sendo esta quantidade 12 vezes maior que a necessária para atividade antibacteriana (Ramada *et al.*, 2017). Esses PAM estão estruturados nas quimeras intercalados por sítios de clivagem proteolítica para a serina protease Glu-C para seu futuro processamento e liberação na forma de suas respectivas sequências originais. A cauda de histidina para purificação (HisTag) e a proteína de fusão, útil também para a purificação, a glutathione-S-transferase (GST), ambas localizadas na região N-terminal, ficam ligadas às proteínas quimérica por meio de um sítio de clivagem para o fator Xa.

Os peptídeos usados nas sequências quiméricas Gr01 e Gr02 foram encontrados encriptados no genoma do algodão (*Gossypium raymondii*). Nota-se que o código dos peptídeos é formado pelas iniciais do gênero e do epíteto específico que compõem o nome científico da espécie de origem. Os peptídeos Tc01 e Tc02 foram encontrados encriptados nas sequências gênicas do cacau (*Theobroma cacao*). Por fim, os peptídeos At01 e At04 foram descobertos no genoma da planta modelo *Arabidopsis thaliana*. A projeção da  $\alpha$ -hélice anfifílica (*Helix wheel*) de cada uma dessas moléculas está ilustrada na **figura 3**.



**Figura 3. Representação em *Helix Wheel* dos peptídeos antimicrobianos intragênicos. a. At01, b. At04, c. Gr01, d. Gr02, e. Tc01 e f. Tc02, respectivamente. Os resíduos de aminoácido representados em verde são apolares alifáticos, em cinza são os polares não carregados, vermelho os polares carregados positivamente e em azul os carregados negativamente. Imagem gerada pelo software Kamal. Adaptada de Ramada *et al.* (2017).**

A primeira quimera, que foi nomeada Gr01, é constituída dos peptídeos Gr01, At04 e Tc01, nessa ordem, da região N para a região C-terminal da proteína. A segunda quimera, nomeada Tc02, é composta pelos peptídeos Tc02, Gr02 e At01, nessa ordem, também da região N para a região C-terminal. A primeira e a segunda quimeras possuem uma cauda de dez resíduos de histidina para purificação, um espaçador (*linker*) e um sítio de clivagem para o Fator Xa (**Figura 4**). A terceira quimera é composta pelos mesmos peptídeos que compõem a primeira quimera, mas, ao invés da cauda de histidinas, ela é fusionada à proteína GST, de modo que foi nomeada **GST\_Gr01**. Estes peptídeos foram escolhidos por apresentarem diferentes valores de MIC contra variados microrganismos e foram organizados de modo a cada peptídeo antimicrobiano encriptado ter sido inspirado em uma espécie de planta diferente dos demais peptídeos que compõem a mesma quimera (Ramada *et al.*, 2017).

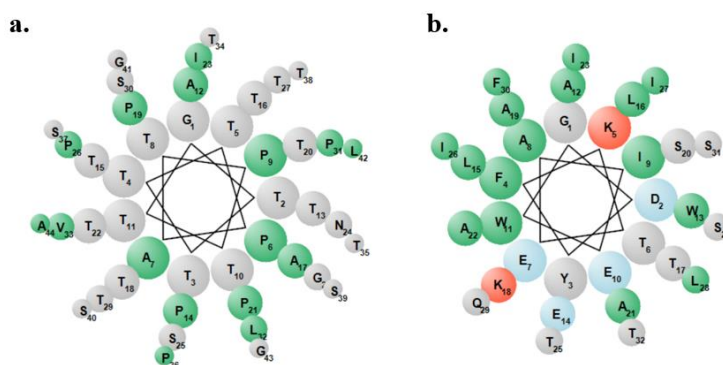
Neste mesmo trabalho foram montados e expressos, paralelamente, dois peptídeos intragênicos encontrados no genoma do café (*Coffea canephora*): Cc00 e Cc11. As projeções dos novos peptídeos do café estão representadas na **Figura 5**. Eles foram encontrados pelo Kamal usando parâmetros de busca diferentes, para outra atividade biológica de interesse do grupo. Cada sequência foi fusionada à uma cauda de histidina N-terminal para possibilitar a detecção e purificação dos peptídeos recombinantes. As sequências, informações sobre proteína de origem, número de resíduos e massa monoisotópica esperada dos peptídeos são mostradas na **Tabela 3**. As informações das proteínas quiméricas são mostradas na **Tabela 4**.



**Figura 4. Representação esquemática das proteínas quiméricas produzidas.** As quimeras são dotadas uma cauda N-terminal para purificação, que pode ser composta de resíduos de histidina (HisTag) ou pela glutathione-S-transferase (GST). Após as *tags* há um sítio de restrição para proteases do vírus do tabaco (TEV). Segue-se a essas regiões o sítio de clivagem do Fator Xa, e a sequência dos genes dos peptídeos antimicrobianos separados entre si por cinco ou seis resíduos de aminoácido para permitir a posterior liberação destes peptídeos.

Os peptídeos que foram anteriormente produzidos por síntese química têm suas massas monoisotópicas, como já mencionado, mostradas na **Tabela 3**, pois apenas o produto esperado deve ser produzido através da síntese química em fase sólida. Em contrapartida, optou-se por expressar a massa esperada das quimeras como massa média, porquanto as bactérias produzem as proteínas quiméricas com vários processamentos, o objetivado e outros, de diferentes

tamanhos, gerando proteoformas. Desse modo, o que é visto nos espectros de massa é uma distribuição aproximadamente normal, não um pacote de íons.



**Figura 5. Representação em Helix Wheel dos peptídeos intragênicos do café (*Coffea canephora*). a. Cc00 e b. Cc11. Os resíduos de aminoácido representados em verde são apolares alifáticos; em cinza, são os polares não carregados. Em vermelho, encontram-se os polares carregados positivamente e em azul os carregados negativamente. Imagem gerada pelo software Kamal.**

Um grande limitante da expressão heteróloga de peptídeos, assim como o seu emprego como fármaco é a sua suscetibilidade à degradação. Os peptídeos antimicrobianos são especialmente propensos à degradação (Nguyen *et al.*, 2010). Um aspecto a se superar é a expressão heteróloga baixas quantidades de peptídeos e proteínas antimicrobianas, sobretudo quando essas são tóxicas para a célula hospedeira (Roca-Pinilla *et al.*, 2022). Assim, o presente trabalho emprega estratégias para se buscar contornar essas questões. O primeiro passo para se compreender os efeitos das proteínas quiméricas e peptídeos recombinantes é observar o fenômeno da sua produção. As quimeras apresentadas foram desenhadas para serem testadas em sua forma final e para liberarem cada peptídeo individual que as compõem. Assim, a proposta inicial do projeto seria isolar as construções inteiras, retirar sua *tag* por meio de uma clivagem com o fator Xa e então realizar um ensaio antimicrobiano com a quimera. Em um segundo momento, cada um dos peptídeos encriptados seria liberado e purificado realizando-se outra digestão, com a serina protease Glu-C, e os PAM poderiam ser usados em ensaios de MIC de forma isolada ou sinergicamente. Para a construção GST\_Gr01, o sítio de TEV foi usado porque a enzima que o cliva, a protease do vírus do tabaco, não é inibida por altas concentrações de ureia (Li, 2012), um dos componentes das soluções de lise. O sistema bacteriano foi escolhido por ser um sistema de alta produção de proteínas de proteínas heterólogas e, também, pelos produtos recombinantes não necessitarem de modificações pós-traducionais. Quanto ao vetor de expressão, foi escolhido o plasmídeo pET devido a possibilidade de um fino controle da expressão e altos níveis de tradução (Deo *et al.*, 2022).

**Tabela 3. Peptídeos bioativos encriptados.** Peptídeos bioativos encriptados empregados nesse trabalho e sua proteína e organismo de origem. Modificado de Ramada *et al.* (2017).

| Nome do peptídeo | Proteína fonte                                                           | Organismo                   | Sequência do peptídeo                                                            | Número de resíduos | Massa Monoisotópica [M+H] <sup>+</sup> |
|------------------|--------------------------------------------------------------------------|-----------------------------|----------------------------------------------------------------------------------|--------------------|----------------------------------------|
| At01             | Citocromo P450, família 87, subfamília A, polipeptídeo 2                 | <i>Arabidopsis thaliana</i> | GSLHGFMYKYLKNMVLTLF                                                              | 19                 | 2.261,17 Da                            |
| At04             | YELLOW STRIPE like                                                       | <i>Arabidopsis thaliana</i> | GLYNFIKVLGRTVFGLYKQF                                                             | 20                 | 2.362,32 Da                            |
| Gr01             | PREDIÇÃO: proteína não caracterizada LOC105765114                        | <i>Gossypium raymondii</i>  | GFKLGRKLVKVFkWII                                                                 | 16                 | 1.931,22 Da                            |
| Gr02             | Proteína hipotética B456_004G254100                                      | <i>Gossypium raymondii</i>  | ANRLLEAYKMLLKFLGNLR                                                              | 19                 | 2.262,30 Da                            |
| Tc01             | Embrião defectivo 1381 isoforma 2                                        | <i>Theobroma cacao</i>      | VALRLAKEVIKVQQGW                                                                 | 16                 | 1.837,09 Da                            |
| Tc02             | Repetição ARM superfamília proteica, isoforma putativa 1                 | <i>Theobroma cacao</i>      | GKILKYLLYLLRKYANLIIR                                                             | 20                 | 2.463,54 Da                            |
| Cc00             | Proteína semelhante a endo13betaglucosidase glucano putativa Cc00_g02580 | <i>Coffea canephora</i>     | GTTTTPATPTTATPTTATPTPTINSPTGTS<br>PLVTTPTSTSSGLGAGGFNNGLGPSGTN<br>QDMSEAAGRVLLAK | 71                 | 6.756,34 Da                            |
| Cc11             | proteína não caracterizada putativa Cc11_g00070                          | <i>Coffea canephora</i>     | GDYFKTEAIEWAWELLTKASAAISTIIL<br>QFST                                             | 32                 | 3.603,86 Da                            |

**Tabela 4. Sequência das proteínas quiméricas.** Sequência das proteínas quiméricas expressas nesse trabalho e dos peptídeos que as compõem.

| Nome da proteína quimérica | Peptídeos que a compõe | Sequência da Proteína                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | Massa Média [M+H] <sup>+</sup> |
|----------------------------|------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------|
| Gr01                       | Gr01; At04; Tc01       | MHHHHHHHHHHSSGHIEGRGFKLGRKLVKVFVKWIIRDKKERGLYNFIKVLGRTVFGLYK<br>QFGKDEKVALRLAKEVIKVQQGW                                                                                                                                                                                                                                  | 9.796,50 Da                    |
| Tc02                       | Tc02; Gr02; At01       | MHHHHHHHHHHSSGHIEGRGKILKYLLYLLRKYANLIIRDKKERANRLLEAYKMLLKFL<br>GNLRGKDEKGS LHGFMYKYLKNMVLTLF                                                                                                                                                                                                                             | 10.497,42 Da                   |
| GST_Gr01                   | Gr01; At04; Tc01       | MSPILGYWKIKGLVQPTRLLEYLEEKYEEHLYERDEGDKWRNKKFELGLEFPNLPYYID<br>GDVKLTQSMALIRYIADKHNMLGGCPKERAISMLEGAVLDIRYGVSRIAYSKDFETLKVD<br>FLSKLPEMLKMFEDRLCHKTYLNGDHVTHPDFMLYDALDVVLYMDPMCLDAFPKLVCF<br>KKRIEAIQIDKYLKSSKYIAWPLQGWQATFGGGDHPPKSGGGGGENLYFQAIEGRGFKL<br>GRKLVKVFVKWIIRDKKERGLYNFIKVLGRTVFGLYKQFGKDEKVALRLAKEVIKVQQGW | 34.644,494 Da                  |
| Cc00                       | Apenas Cc00            | MHHHHHHHHHHSSGHIEGRGTTTTPATPTTATPTTATPTPTINSPTGTSPLVTTPTSTSSGLG<br>AGGFNNGLGPSGTNQDMSEAAGRVLAK                                                                                                                                                                                                                           | 9.086,85 Da                    |
| Cc11                       | Apenas Cc11            | MHHHHHHHHHHSSGHIEGRGDYFKTEAIEWAWELLTKASAAISTHILQFST                                                                                                                                                                                                                                                                      | 5.932,57 Da                    |

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo geral

- Testar a estratégia de *molecular peptide tailoring* e observar se há atividade antimicrobiana nas proteínas quiméricas expressas.

#### 3.2. Objetivos específicos

- Construir os plasmídeos de expressão pET-24a\_Gr01, pET-24a\_Tc02, pET-24a\_Cc00 e pET-24a\_Cc11;
- Expressar as proteínas quiméricas Gr01, Tc02 e GST\_Gr01 e os peptídeos Cc00 e Cc11 em *E. coli* e detectá-los;
- Purificar e sequenciar pelo menos uma das construções.

### 4. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 4.1. Linhagens bacterianas

A linhagem bacteriana usada para a etapa de clonagem foi a *Escherichia coli* (DH5 $\alpha$ ) comprada da *New England Biolabs* (NEB). Seu genótipo possui as seguintes características: *fhuA2 $\Delta$ (argF-lacZ)U169 phoA glnV44  $\Phi$ 80 $\Delta$ (lacZ)M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17*. A expressão heteróloga foi realizada na linhagem de *E. coli* (KRX) (Promega). Genótipo: [F' *traD36  $\Delta$ ompP proA<sup>+</sup>B<sup>+</sup> lacIq  $\Delta$ (lacZ)M15]  $\Delta$ ompT endA1 recA1 gyrA96 (Nal<sup>r</sup>) *thi-1 hsdR17 (r<sub>k</sub><sup>-</sup>, m<sub>k</sub><sup>+</sup>) e14<sup>-</sup> (McrA<sup>-</sup>), relA1, supE44,  $\Delta$ (lac-proAB),  $\Delta$ (rhaBAD)::T7 RNA polymerase*.*

#### 4.2. Vetores, enzimas de restrição e primers

Os vetores de clonagem utilizados foram os vetores pMG, sintetizados pela empresa MacroGen, contendo os genes de interesse com otimização do uso de códons para o genoma da *E. coli*, para digestão e clonagem. O vetor pET-24a, que contém um gene de resistência ao antibiótico canamicina (Kan), foi usado como vetor de expressão. O gene da alfa-amilase foi retirado e em seu lugar foram inseridos os genes das proteínas quiméricas e peptídeos, como esquematizado na **Figura 6**. Os vetores de expressão contendo os genes de interesse foram chamados de pET\_Gr01, pET\_Tc02, pET\_Cc00 e pET\_Cc11. As enzimas de restrição usadas para a clonagem foram a NdeI e XhoI (**Tabela 5**) Já quimera GST\_Gr01 foi clonada previamente pelo grupo usando Gibson Assembly no vetor pFN2, que contém um gene de resistência à ampicilina (Amp), para remoção da HisTag N-terminal proveniente dos vetores

pMG resultando no vetor pFN2\_GST\_Gr01 (**Figura 7**). A sequência dos primers para verificação da inserção dos genes no vetor pET está na **Tabela 6**.

### **4.3. Soluções**

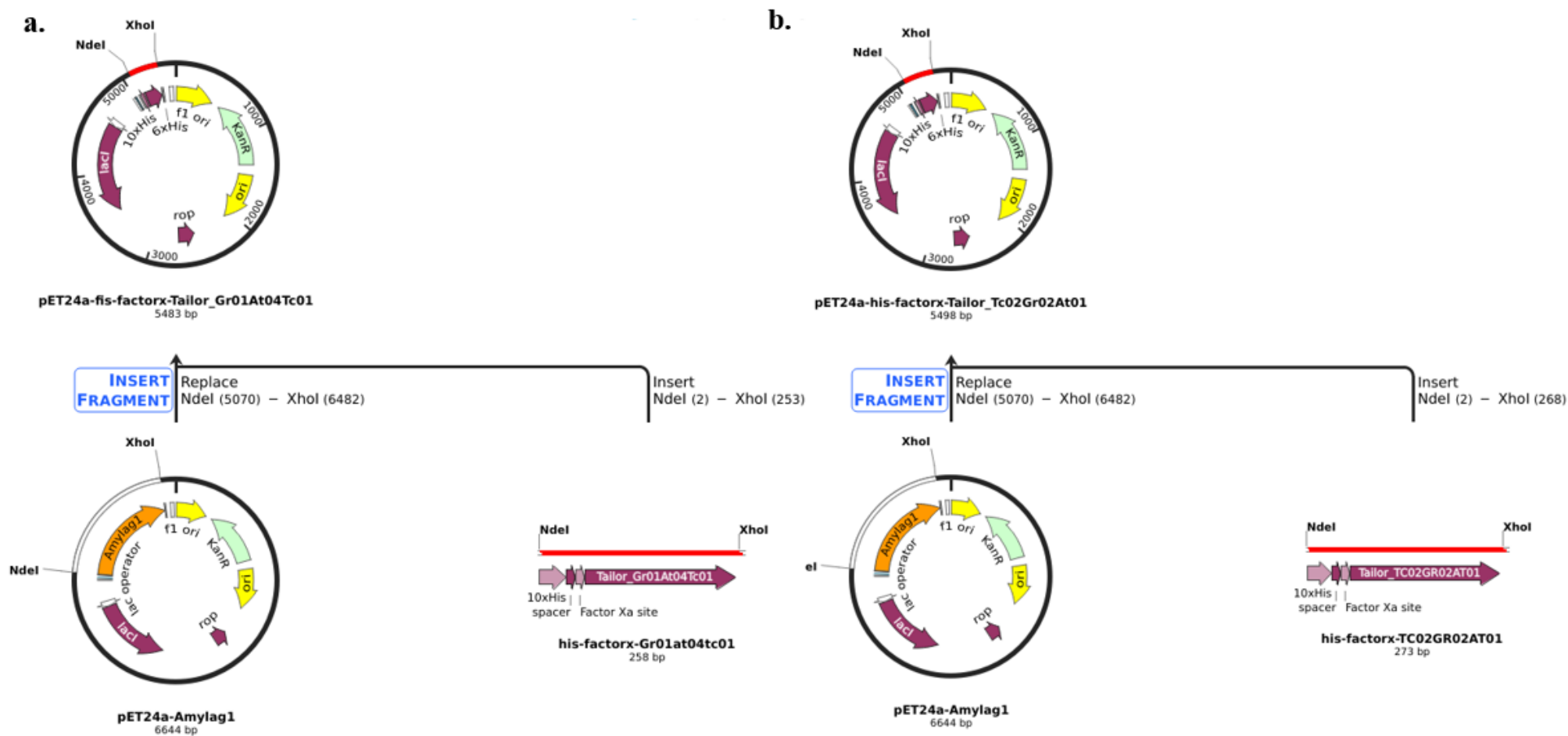
As soluções utilizadas neste trabalho, incluindo os meios de cultura estão listados na seção “Anexos”.

### **4.4. Transformação bacteriana por choque térmico**

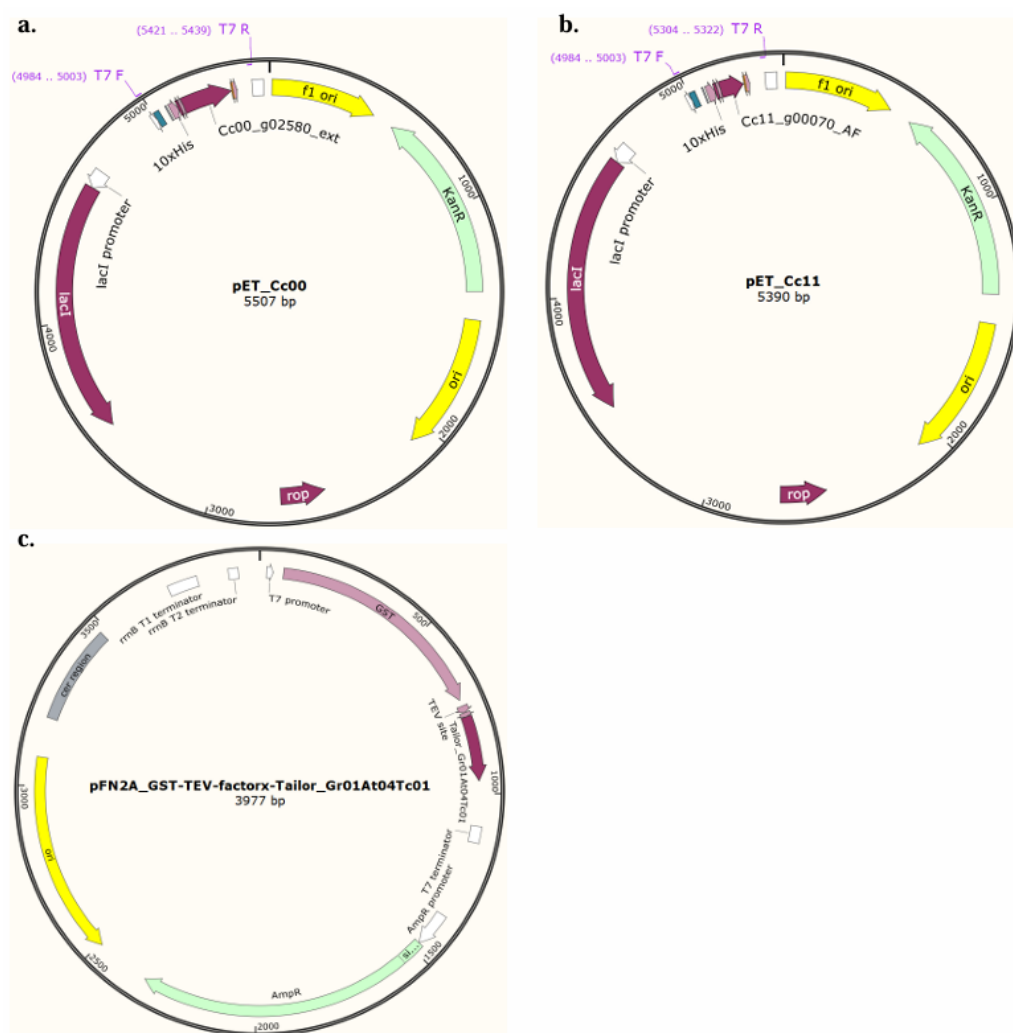
Alíquotas de 50  $\mu\text{L}$  de *E. coli* DH5 $\alpha$  foram transformadas com 0,5  $\mu\text{L}$  de cada plasmídeo. Após a adição do DNA plasmidial, as células foram incubadas no gelo por 5 a 10 min. Passado esse tempo, as células foram submetidas a choque térmico em banho maria a 42°C por 30 s e imediatamente incubadas no gelo por 2 min. Então, 950  $\mu\text{L}$  de meio SOC foram adicionados ao tubo contendo as células transformadas e deixadas a 37°C sob agitação de 150 rpm para recuperação. Um volume total de 100  $\mu\text{L}$  células transformadas foram plaqueadas em meio LB ágar suplementados com 50  $\mu\text{g/mL}$  de Canamicina ou 100  $\mu\text{g/mL}$  de Ampicilina de acordo com a marca de seleção do plasmídeo. As placas foram crescidas em estufa a 34°C durante a noite.

### **4.5. Cultura celular**

Colônias isoladas foram coletadas a partir das placas de transformação de meio LB ágar, inoculadas com palitos de dente ou ponteiras autoclavadas em 5 mL de LB meio líquido suplementado com antibiótico e crescidas durante a noite em sob agitação de 200 rpm e a 37°C, como pré-inóculo. A concentração dos antibióticos foi a mesma utilizada nas placas. O inóculo era feito adicionando um volume de pré-inóculo correspondente a 1% do volume da cultura em meio LB. Exemplo, para um volume final de 100mL de cultura (meio LB + células), 1 mL de pré-inóculo era adicionado a 99 mL de meio LB, para 200 mL, 2 mL. O inóculo foi crescido nas mesmas condições que o pré-inóculo, apenas com variação na temperatura, como descrito no item 4.12. deste capítulo.



**Figura 6. Representação esquemática da clonagem dos genes das proteínas quiméricas. a.** O gene da quimera Gr01 é clonado no vetor pET-24a em lugar do gene da alfa-amilase, o vetor de expressão. **b.** O gene da quimera Tc02 é clonado no vetor pET-24a em lugar do gene da alfa-amilase, o vetor de expressão. Imagem gerada pelo software SnapGene.



**Figura 7. Representação esquemática dos vetores de expressão.** a. pET\_Cc00; b. pET\_Cc11 e c. pFN2\_GST\_Gr01. Imagem gerada pelo software SnapGene.

**Tabela 5. Informações sobre as enzimas de restrição.** Código, nome, sítio de clivagem e tampão de reação das enzimas de restrição utilizadas neste trabalho.

| Código | Enzima | Sítio de clivagem | Tampão |
|--------|--------|-------------------|--------|
| ER0581 | NdeI   | CA↓TATG           | Tango  |
| ER0695 | XhoI   | C↓TCGAG           | Tango  |

**Tabela 6. Oligonucleotídeos.** Nome e sequência de nucleotídeos dos primers utilizados nesse trabalho e a sua finalidade.

| Primers | Sequência 5'-3'         | Finalidade                                                          |
|---------|-------------------------|---------------------------------------------------------------------|
| T7 F    | 5'-TAATACGACTCACTATAGGG | Confirmação da presença do gene de interesse no vetor de expressão. |

---

#### 4.6. Extração de DNA plasmidial

Foram utilizados 3 mL das culturas bacterianas em meio líquido para cada extração de DNA plasmidial em pequena escala (Miniprep). O procedimento foi realizado de acordo com as instruções do kit Pure Yield™ Plasmid Miniprep System (Promega). O DNA plasmidial extraído da Miniprep foi quantificado com um espectrofotômetro Nanodrop Lite Plus (Thermo Scientific).

#### 4.7. Digestão dos plasmídeos com enzimas de restrição

O DNA plasmidial foi digerido com as enzimas de restrição NdeI e XhoI em Tampão Tango durante aproximadamente 3 h a 37°C.

#### 4.8. Eletroforese de DNA em gel de agarose

A separação e visualização dos fragmentos de DNA foi realizada em géis de agarose. O peso de agarose em gramas correspondente a 1% do volume do gel (p/v) era adicionado a tampão TAE. A mistura foi aquecida para solubilização e, após breve esfriamento, SYBR Safe (1 µL/10 mL de tampão TAE) era adicionado para permitir a visualização do DNA. A mistura era então dispensada em camas para solidificação e moldagem do gel. Após as digestões, as amostras eram aplicadas nos poços. Os géis foram resolvidos por aproximadamente 30min. a 100V. O marcador utilizado foi o 1Kb (Promega). O resultado da corrida foi visualizado com um fotodocumentador Molecular Imager Gel Doc XR (Biorad) no software ImageLab (Biorad). As bandas correspondentes aos genes de interesse e ao arcabouço dos vetores de expressão foram extraídas do gel com o kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) segundo as instruções do fabricante e quantificadas.

#### 4.9. Ligação

A ligação entre os genes e os arcabouços dos vetores de expressão aconteceu durante a noite à temperatura ambiente. A enzima usada foi a T4 DNA Ligase (Ref: EL0014, ThermoFisher) e com o seu respectivo tampão de ligação. Aliquotas de 50 µL de *Escherichia coli* (KRX) foram transformadas com 2 µL de ligação da construção pET\_Gr01, pET\_Tc02, pET\_Cc00, pET\_Cc11 e pFN2\_GST\_Gr01. Após a transformação das bactérias com o vetor

de expressão, diferentes clones, isto é, as diferentes colônias que cresciam na placa eram separadamente crescidas em 5 mL de meio LB. Parte desse material foi usado para extração de DNA para sequenciamento e parte foi armazenado a -80°C em glicerol 20% como estoque.

#### **4.10. Sequenciamento dos plasmídeos de expressão**

Antes dos experimentos de indução, os plasmídeos foram extraídos por miniprep, liofilizados e enviados para sequenciamento pelo método de Sanger na empresa ACTGene Análises Moleculares (Rio Grande do Sul - RS, Brasil).

#### **4.11. PCR de colônia**

Uma pequena parte de cada colônia foi dissolvida em 20 µL de água. A partir dessa diluição, 4 µL foram utilizados como amostra de DNA para a reação de PCR. Para uma reação de volume final de 20 µL, foram adicionados 100 pmoles de *forward primer*, 100 pmoles de *reverse primer*, 0,5 µL de dNTP (2mM), 5 µL de tampão *GoTaq 5X Buffer* (Promega) e 0,1 µL da Taq Polimerase *GoTaq* (Promega). O tamanho dos amplicons, preditos pelo software SnapGene, foi verificado por eletroforese em gel de agarose.

#### **4.12. Indução da expressão heteróloga das proteínas e peptídeos**

Após a realização do inóculo, o mesmo era crescido a 200 rpm, a 37 °C até que atingisse uma O.D.<sub>600</sub> de 0.5. Para as culturas de indução realizadas um único dia, era adicionado o indutor nessa etapa e a cultura crescidas nas mesmas condições por 3 a 4 h. Para as culturas cuja indução foi realizada durante a noite, ao atingir a O.D.<sub>600</sub> de 0.4, as mesmas eram levadas para um agitador a 28 °C até que atingissem uma O.D.<sub>600</sub> entre 0.5-0.6. Neste ponto, o indutor era adicionado e as células cresciam durante a noite a 28°C sob as mesmas condições de agitação. A expressão foi induzida pela adição de ramnose para uma concentração final 0.1% e de IPTG para concentração final 1 mM. O plasmídeo pFN2\_GST\_Gr01 foi induzido apenas com ramnose.

#### **4.13. Cinética de crescimento**

A cada 30 min., 1 mL da cultura era coletado e colocado em cubetas. Imediatamente, para evitar o efeito da decantação das células sobre a leitura, a sua densidade óptica a 600 nm era medida. As leituras foram feitas em um espectrofotômetro UV-visível (UV-1900i, Shimadzu, Japão). Antes da leitura de cada amostra, uma leitura de meio LB com antibiótico e sem células era realizada como branco. Os gráficos com as curvas que representam as cinéticas das culturas

de *E. coli* induzidas foram plotadas usando a linguagem Python no Software Visual Studio Code (VS Code).

#### **4.14. Determinação do peso da cultura celular**

Ao final do período de indução, todo o volume de cultura celular foi centrifugado a 9.000 rpm, 4°C por 5 min em tubos falcon previamente pesados. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e os tubos com os *pellets* foram novamente pesados. O peso de cada *pellet*, calculado subtraindo-se o peso dos tubos entre a segunda e a primeira pesagens, foi anotado. Os *pellets* foram congelados em nitrogênio líquido e armazenados em freezer a -20°C até o momento de uso.

#### **4.15. Eletroforese de proteínas por SDS-PAGE**

A expressão foi inicialmente analisada por gel de poliacrilamida de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) de acordo com Sambrook e colaboradores (2001). As alíquotas de 1 mL foram centrifugadas a 4.000 rpm por 3 minutos, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* dissolvido em 50µL de tampão de lise e congelado. Antes da aplicação no gel, tampão de corrida 4X foi adicionado às amostras, as quais foram fervidas a 95°C por 5min. Após essa etapa as amostras foram centrifugadas a 15.000 rpm e o sobrenadante foi aplicado nos poços. O gel de SDS foi corrido a 100V por aproximadamente 2 h30. Para análise da indução de GST\_Gr01 foi feito um gel de 12% de poliacrilamida, para Gr01, Tc02 e Cc00 de 15% e para Cc11 de 17,5%.

#### **4.16. Western Blot**

As proteínas foram transferidas para uma membrana de PVDF (Whatman) em um transferidor para Western Blot semi-seco (semi-dry) por 20 min. a 25 V e 550 mA. As membranas foram bloqueadas durante 1h com TBST contendo 5% de albumina de clara de ovo de galinha. Também por 1 h, a membrana foi incubada em TBST contendo 1% de albumina de clara de ovo de galinha e o anticorpo anti-His de coelho conjugado a fosfatase alcalina, diluído na proporção 1:5.000. As membranas foram lavadas três vezes em TBST, cada lavagem com duração de 10min., e então reveladas usando 2 mL de uma solução pronta de NBT/BCIP.

#### **4.17. Cromatografia de afinidade**

As amostras foram dissolvidas em tampão salino adequado à coluna na qual seriam purificadas. O material das induções das quimeras Gr01, Tc02, Cc00 e Cc11 foi dissolvido em tampão de lise (fosfato 20 mM, NaCl 500 mM, imidazol 20 mM e cloridrato de guanidina 6

M) com o auxílio de um vórtex. O material de lise foi centrifugado a 9000 rpm por 5 min. a 4°C. O sobrenadante foi purificado por cromatografia de afinidade por íon metálico (IMAC) e o *pellet* descartado. As amostras foram passadas por uma coluna com resina de níquel (Ni<sup>2+</sup>) HisTrap HP de 1 mL (Cytiva) e eluídas com 5 mL de tampão salino com 500 mM de imidazol, de acordo com as instruções do fabricante. O material da indução de GST\_Gr01 foi solubilizado em tampão e fosfato 20mM com inibidor de protease PMSF a 1mM. A lise foi realizada com a adição de lisozima às amostras, a uma concentração final de 0,1 mg/ mL, que foram deixadas sob leve agitação por 30 min. DNase foi adicionada às amostras, a uma concentração final de 0,05 mg/ mL, também mantidas sob leve agitação, por 10 min., para reduzir a viscosidade dos extratos a serem passados pela coluna. Após a lise, a amostra foi centrifugada do mesmo modo descrito para as demais amostras deste tópico. O sobrenadante foi purificado em uma coluna GSTrap HP de 1mL (Cytiva) e eluído com 5mL tampão salino de Tris-HCl 50 mM (pH 8.0) com 10 mM de glutatona reduzida, preparado no momento da eluição devido à sensibilidade da glutatona. As amostras das proteínas purificadas foram diretamente passadas por uma coluna SPE Strata C18-T (Phenomenex) e eluídas com 1,5 mL de acetonitrila a 95% e liofilizadas.

#### 4.18. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)

As cromatografias líquidas de alta eficiência de fase reversa (HPLC) deste trabalho foram realizadas com monitoramento das amostras nos comprimentos de 216 e 280 nm, para detecção de ligações peptídicas e de anéis aromáticos, respectivamente. Do mesmo modo, os solventes usados, A e B, correspondem respectivamente água e acetonitrila acrescidos de 0,1% de TFA (v/v). Diferentes tampões de lise e estratégias de purificação foram testadas para as proteínas e estão esquematizadas na **Figura 8**.

Os *pellets* das culturas das quimeras Gr01 e de Tc02 foram dissolvidos em tampão fosfato 20 mM com 6 M de guanidina e lisadas com o auxílio de um vórtex. Os lisados foram centrifugados a 9.000 rpm por 5 min. a 4°C. Todo volume de sobrenadante das amostras foi aplicado em uma coluna preparativa preenchida com resina Baker Bond ligada a um sistema de HPLC preparativo de fase reversa (Shimadzu) durante um gradiente isocrático a 5% de solvente B com fluxo de 10mL.min<sup>-1</sup>. As amostras foram eluídas isocraticamente com concentrações de 20, 60 e 95% de acetonitrila e liofilizadas.

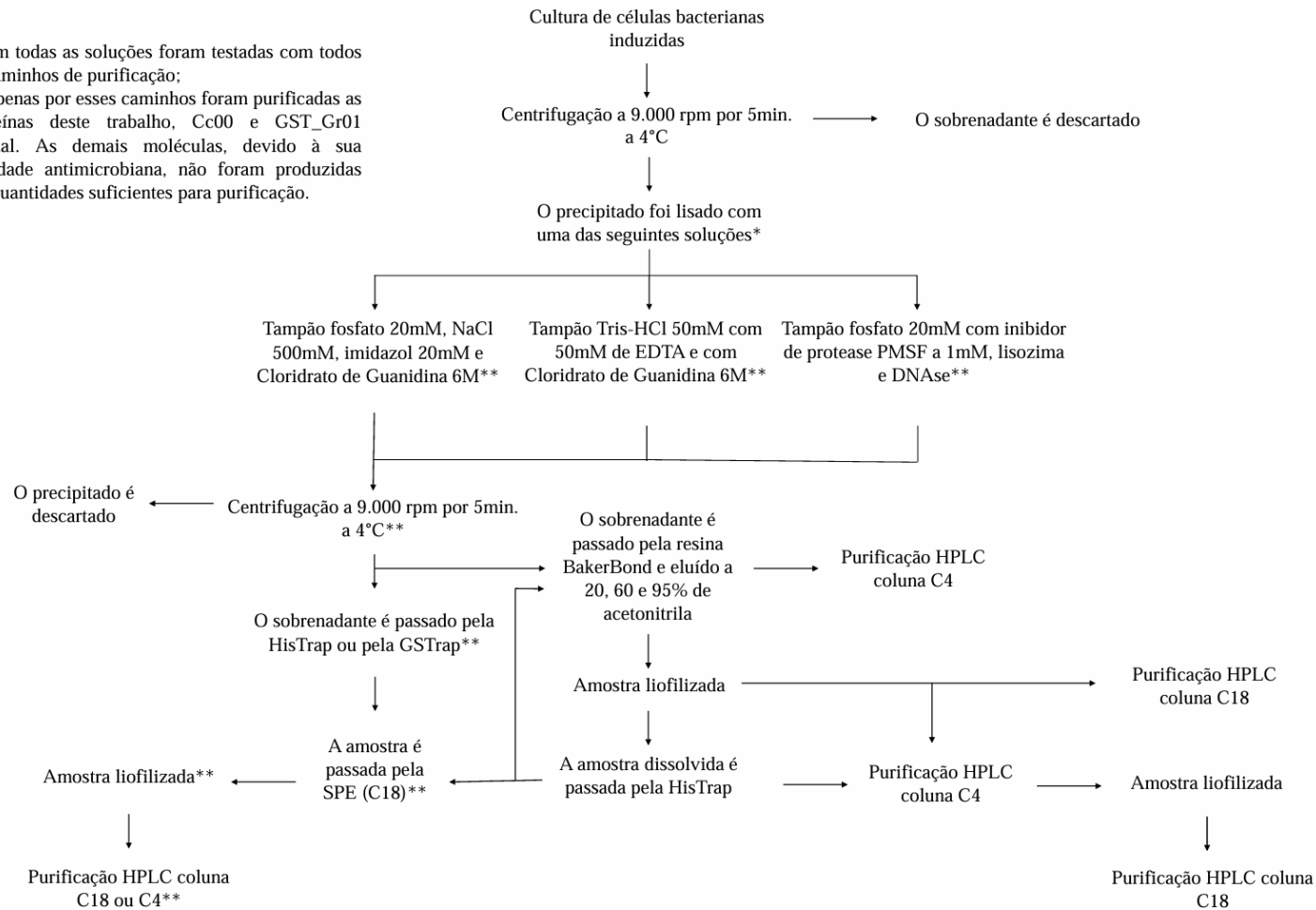
O material seco foi dissolvido em água e analisado por corridas realizadas com as colunas analíticas C4 de 250 x 4,6 mm (Vydac 214TP) e C18 de 250 x 4,6 mm (Dionex

218TP54). As análises cromatográficas foram realizadas utilizando o método padrão do laboratório adequado a cada tipo de coluna que, neste caso, obedece a seguinte configuração: nos primeiros 5min. são perfetos com 5% de solvente B, de 5 min. a 40 min. há um gradiente de 5 a 95% de solvente B. Assim, a rampa é de 35 min. Por fim, de 40 aos 45min. de análise a concentração de B permanece constante em 95%, perfazendo um tempo total de corrida de 45min. O fluxo na coluna C4 foi de 1 mL.min<sup>-1</sup> e na C18 de 1,5 mL.min<sup>-1</sup>. As cromatografias realizadas com outros métodos serão indicadas quando referidas. O tempo de retenção de cada pico cromatográfico de interesse foi anotado e as frações coletadas manualmente e liofilizadas para análise por espectrometria de massa.

O peptídeo Cc00 foi purificado com a coluna C18 utilizando a metodologia de análise cromatográfica padrão descrita. As corridas cromatográficas foram analisadas no software LC Solution (Shimadzu) e os dados exportados em arquivos ASCII (.txt). Os valores foram normalizados. Os cromatogramas foram plotados graficamente com o software GraphPad Prism. As amostras de DNA e de proteínas deste trabalho, quando necessário, foram congeladas em nitrogênio líquido e liofilizadas em um rotoevaporador (LABCONCO). Quando o volume individual de cada amostra excedia 2 mL, a secagem era feita em um liofilizador LIOTOP (LABCONCO).

### Fluxograma das etapas de purificação testadas

\*Nem todas as soluções foram testadas com todos os caminhos de purificação;  
 \*\*Apenas por esses caminhos foram purificadas as proteínas deste trabalho, Cc00 e GST\_Gr01 parcial. As demais moléculas, devido à sua atividade antimicrobiana, não foram produzidas em quantidades suficientes para purificação.



**Figura 8. Fluxograma das etapas de purificação testadas.** Fluxograma das etapas de purificação testadas para as diferentes proteínas produzidas neste trabalho.

#### 4.19. Redução, alquilação e digestão com tripsina (tripsinização)

As amostras foram dissolvidas em  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  a 50mM e acrescidas de DTT para uma concentração final de 100 mM. A reação foi incubada a 60 °C por 30 min. Após esse período, à reação foi acrescida iodacetamida a uma concentração final de 300 mM e a reação foi deixada por 30 min. no escuro. Então, foram adicionados 5µg de tripsina *Gold Sequencing Grade* (Promega) à reação, que foi incubada durante 24 h a 37 °C. A reação foi armazenada a -20 °C. Para as amostras de gel SDS-PAGE, a banda de interesse foi cortada usando uma lâmina de bisturi. A banda foi então transferida para um eppendorf, descorada com 500 µL de acetonitrila 100% e incubada por aproximadamente 4 h. Após esse período, a solução descorante foi substituída por 300 µL de acetonitrila. A amostra foi incubada durante 5 min. a temperatura ambiente sob agitação. A acetonitrila foi retirada do tubo e a amostra seca no rotoevaporador. Em seguida, a amostra foi incubada a 56 °C por 1 h em 50 µL de DTT a 10 mM diluída em 100mM de  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ . Após esse período, a solução foi substituída por 50µL de 55mM de iodacetamida também preparada em 100 mM de  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  e incubada ao abrigo da luz por 45min. Foram realizadas duas lavagens de 10min. em tampão base  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ . O material foi incubado com acetonitrila como descrito acima e seco no rotoevaporador. A amostra foi reidratada com 50 µL de 650 ng de tripsina *Gold Sequencing Grade* (Promega) em 50 mM de  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  por 45 min. no gelo. O sobrenadante foi então trocado pela mesma solução sem a tripsina e incubado *overnight* a 37 °C. A reação foi armazenada a -20 °C.

#### 4.20. Digestão com outras enzimas

Após a redução e alquilação, uma amostra de GST\_Gr01 foi digerida com a endoproteinase LysN, em tampão de bicarbonato de amônio, na razão 1:75 de protease-proteína a ser digerida. A reação aconteceu a 37 °C por 24 h. Outra amostra de GST\_Gr01 foi dissolvida em Tris-HCl (pH 8.3) na concentração final de 20 mM e digerida com Fator Xa a 25 °C durante a noite.

#### 4.21. Análise das proteínas por Espectrometria de Massa

As amostras foram dissolvidas em água e misturadas com matriz de ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico ( $\alpha$ -CHCA) na proporção de 3:1. A matriz foi preparada com 10mg.mL<sup>-1</sup> de  $\alpha$ -ciano era preparada com 50% (v/v) de acetonitrila e água na mesma proporção e 0,3% de TFA. Um volume de 0,8 µL de mistura amostra-matriz foi cristalizada por poço em uma placa alvo para análise por MALDI-TOF/MS. As amostras foram analisadas em um espectrômetro de massa do tipo MALDI-TOF/TOF UltrafleXtreme (Bruker Daltonics, Alemanha) no modo

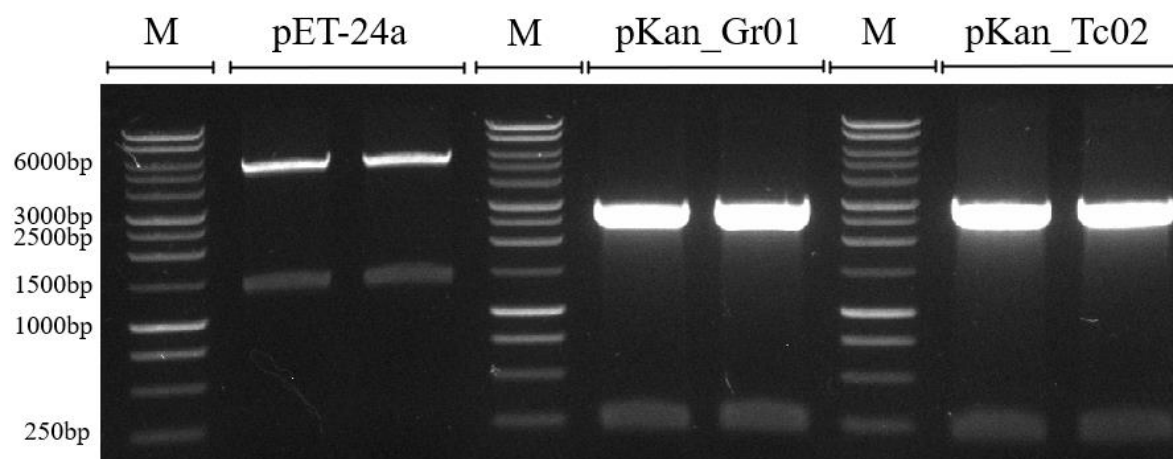
linear e no modo refletido, para obtenção dos espectros de MS. A fragmentação das amostras para aquisição dos espectros de MS/MS e o sequenciamento *de novo* foi feita no modo LIFT. Antes das análises, a máquina era calibrada com duas soluções calibrantes padrão, uma de peptídeos (Peptide Calibration Standard, Bruker Daltonics) e outra de proteínas (Protein Calibration Standard, Bruker Daltonics), plaqueadas na proporção 1:9. Os espectros de massa foram analisados e processados no software FlexAnalysis (Bruker Daltonics). Também foi realizada calibração externa próxima (*close external calibration*) para a obtenção de espectros de massa mais acurada para o peptídeo Cc00 purificado. A amostra de Cc00 tripsinizada também foi analisada em um espectrômetro do tipo ESI-QTOF. Para tanto, a amostra foi injetada em um HPLC (Shimadzu) acoplado a um no espectrômetro de massa microTOF-Q II (Bruker Daltonics). Os dados foram analisados e processados no software Compass DataAnalysis (Bruker Daltonics).

## 5. RESULTADOS

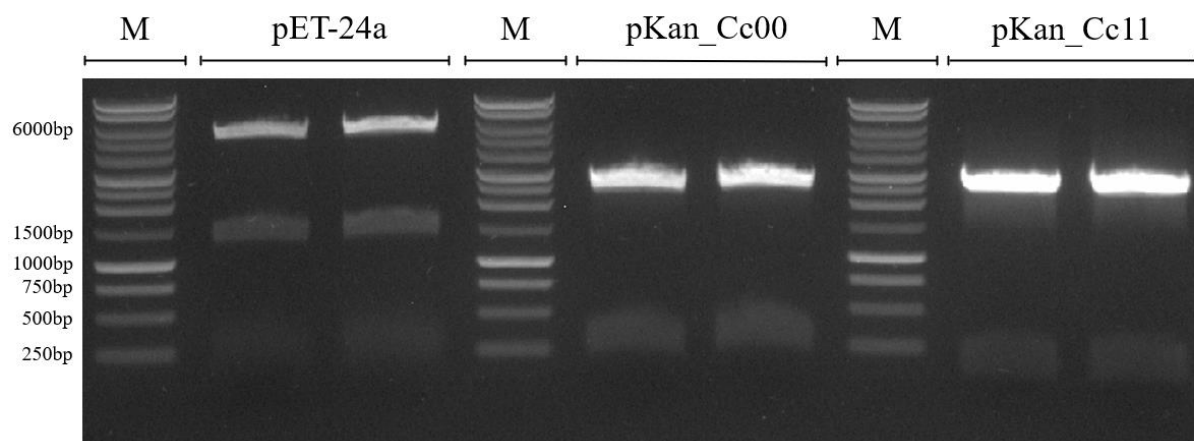
### 5.1. Construção dos plasmídeos de expressão

As células de *E. coli* usadas na etapa de clonagem foram transformadas e crescidas para isolamento dos plasmídeos contendo os genes de interesse desse trabalho. Após a extração do DNA plasmidial dos vetores de síntese, a concentração dos plasmídeos foi mensurada. O plasmídeo pET-24a-amilag estava a 57,1 ng/μL, pMG-Kan\_Gr01 a 223,9 ng/μL, pMG-Kan\_Tc02 a 243,3 ng/μL, pMG-Kan\_Cc00 a 214,5 ng/μL e pMG-Kan\_Cc11 a 458,3 ng/μL.

Como é possível observar na **Figura 9**, o vetor pET-24a\_amilag foi completamente digerido por NdeI e XhoI liberando o fragmento correspondente ao gene da alfa-amilase. Do mesmo modo, os plasmídeos pMG-Kan\_Gr01 e pMG-Kan\_Tc02 também liberaram os fragmentos dos genes da quimera Gr01 e da quimera Tc02. O mesmo processo foi repetido mais adiante no trabalho para os vetores pMG-Kan\_Cc00 e pMG-Kan\_Cc11, ocorrendo a liberação dos genes das construções Cc00 e Cc11, respectivamente, mostrado na **Figura 10**.



**Figura 9. Gel da digestão dos vetores pET-24a, pKan\_Gr01 e pKan\_Tc02.** Gel de agarose 1% da digestão dos vetores pET-24a, pKan\_Gr01 e pKan\_Tc02 com as enzimas de restrição NdeI e XhoI durante 2h a 37°C. Marcador 1Kb (Promega). Volume de marcador aplicado: 5 µL; volume de amostra aplicada: 25µL.



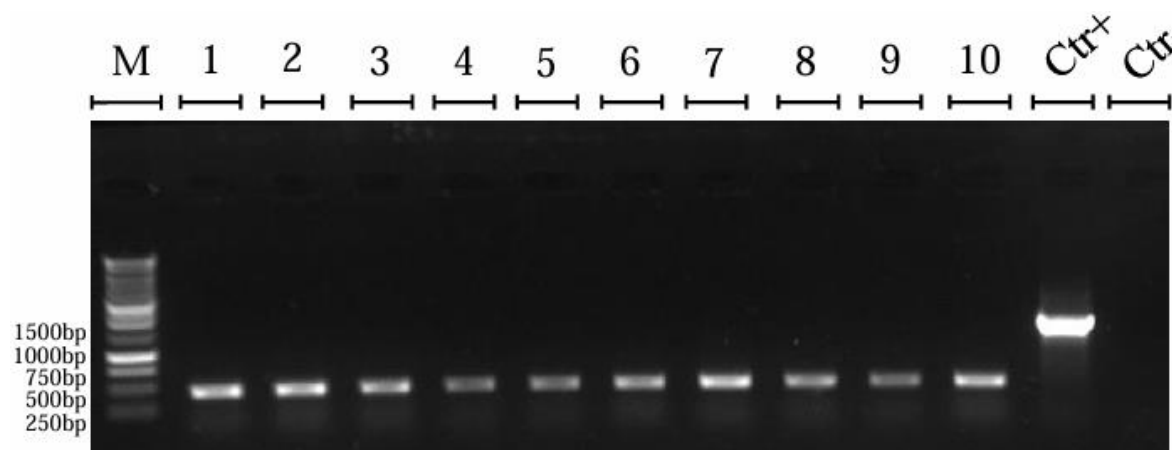
**Figura 10. Gel de agarose da digestão dos vetores pET-24a, pKan\_Cc00 e pKan\_Cc11.** Gel de agarose 1% da digestão dos vetores pET-24a, pKan\_Cc00 e pKan\_Cc11 com as enzimas de restrição NdeI e XhoI durante 2 h a 37°C. Marcador 1Kb (Promega). Volume de marcador aplicado: 5 µL; volume de amostra aplicada: 25 µL.

## 5.2. Confirmação dos transformantes por PCR de colônia

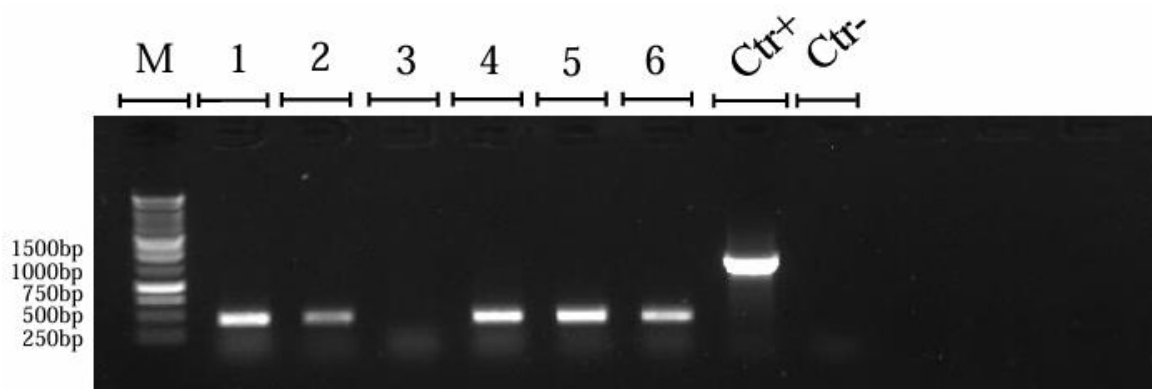
O arcabouço do vetor pET-24a e cada um dos fragmentos genéticos foram extraídos do gel. Cada gene foi ligado ao vetor pET com sucesso, passando a constituir os vetores de expressão. As bactérias de expressão *E. coli* (KRX) foram transformadas com esses vetores e plaqueadas em meio seletivo. Algo que chamou a atenção foi o número reduzido de colônias das quimeras antimicrobianas que apareceram nas placas em comparação com outras construções já realizadas no laboratório (dados não mostrados). Foram realizadas PCR com dez colônias de cada construção, exceto para a quimera Tc02, para qual foram obtidas apenas seis colônias, a fim de verificar quais geraram o amplicon de tamanho esperado para cada construção plasmidial. Todos os clones da quimera Gr01 apresentaram amplicon conforme a

expectativa, correspondente a 433bp (**Figura 11**). Já para a quimera Tc02, cinco dos seis clones avaliados apresentaram o produto da amplificação no tamanho esperado, equivalente a 448 bp (**Figura 12**). Para a construção de Cc00, metade dos clones testados foram positivos, como se verifica na **Figura 13**, com amplicon com 457 bp de extensão. Finalmente, nove dos dez clones avaliados da construção Cc11 apresentaram resultados positivos, com primers de 340 bp (**Figura 14**).

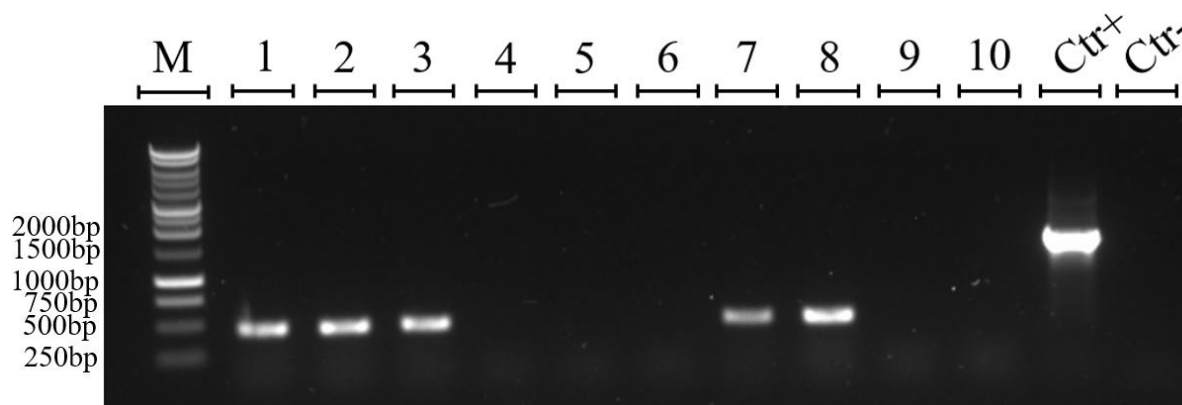
Mesmo diante do resultado das PCR, alguns clones positivos foram enviados para sequenciamento por Sanger. Essa escolha se deve ao fato de, mesmo quando o amplicon da construção apresenta, à primeira vista, o tamanho correto, pode haver mutações que alteram resíduos de aminoácido. Essas mutações, em maior ou menor medida, comprometem a integridade da proteína recombinante e, podem até mesmo alterar sua atividade. Há a possibilidade de ocorrer ainda mutações que retiram ou adicionam novos resíduos e, em casos mais graves, retiram a sequência de sua fase de leitura ribossômica, de modo que ou a proteína não é produzida ou há a produção de algo diferente do esperado. Todos esses eventos não são visíveis por eletroforese de DNA. Para expressão heteróloga das proteínas quiméricas, foram escolhidas colônias transformadas com plasmídeos que não apresentaram mutações relevantes para a atividade do produto final nos resultados do sequenciamento.



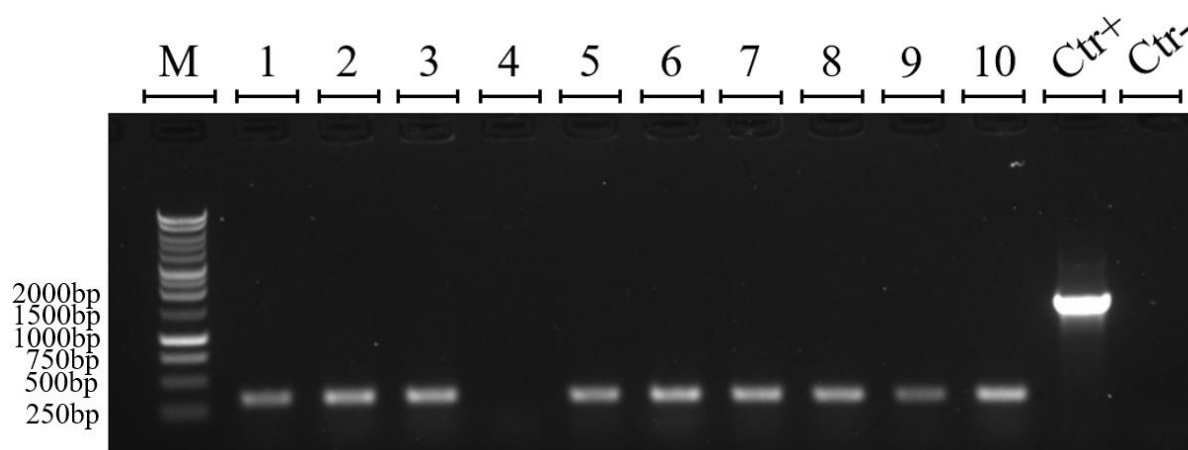
**Figura 11. PCR para confirmação dos transformantes de pET\_Gr01.** Gel de agarose 1% dos produtos da PCR para confirmação das colônias de pET\_Gr01 transformantes. M. Marcador 1Kb (Promega); 1 a 10. Clones de pET\_Gr01 de 1 a 10; Ctr+. Controle positivo da PCR com o vetor pET-24a; Ctr-. Controle negativo da PCR, a reação sem DNA. Volume de marcador aplicado: 5 µL.



**Figura 12. PCR para confirmação dos transformantes de pET\_Tc02.** Gel de agarose 1% dos produtos da PCR para confirmação das colônias de pET\_Tc02 transformantes. M. Marcador 1Kb (Promega); 1 a 6. Clones de pET\_Tc02 de 1 a 6; Ctr+. Controle positivo da PCR com o vetor pET-24a; Ctr-. Controle negativo da PCR, a reação sem DNA. Volume de marcador aplicado: 5  $\mu$ L.



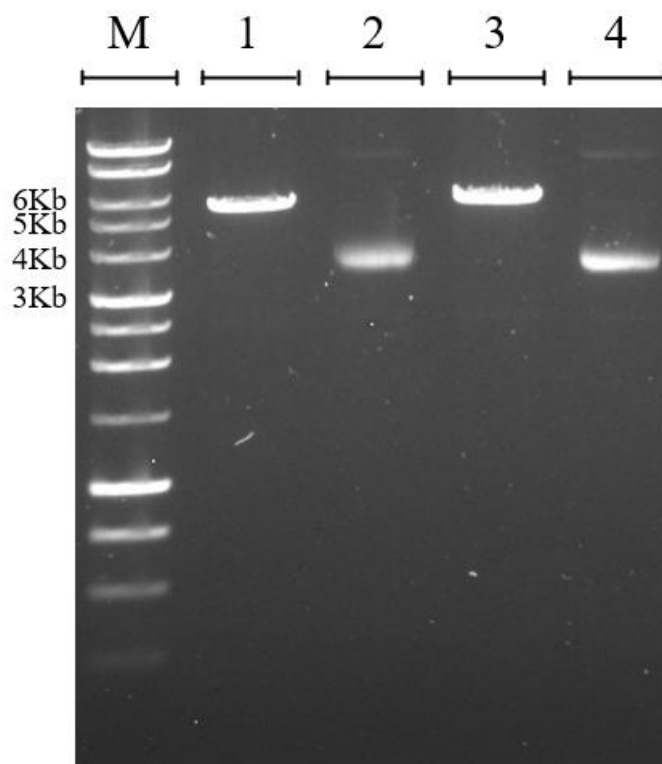
**Figura 13. PCR para confirmação dos transformantes de pET\_Cc00.** Gel de agarose 1% dos produtos da PCR do vetor de expressão pET\_Cc00 com os *forward* e *reverse primers* para o promotor T7. Marcador 1Kb (Promega). M: Marcador 1Kb (Promega); 1-10: clones de 1 a 10; Ctr+: pET-24a; Ctr-: mix de PCR. Volume de marcador e de amostras aplicados: 5  $\mu$ L.



**Figura 14. PCR para confirmação dos transformantes de pET\_Cc11.** Gel de agarose 1% dos produtos da PCR do vetor de expressão pET\_Cc11 com os *forward* e *reverse primers* para o promotor T7. Marcador 1Kb (Promega). M: Marcador 1Kb (Promega); 1-10: clones de 1 a 10; Ctr+: pET-24a; Ctr-: mix de PCR. Volume de marcador e de amostras aplicados: 5  $\mu$ L.

### 5.3. Confirmação dos transformantes por digestão com enzimas de restrição

Mais uma estratégia para a confirmação da integridade dos vetores de expressão foi a digestão destes com a enzima de restrição XhoI. A inserção bem sucedida dos genes das quimeras faz com que o vetor pET, que as abarca, volte a possuir o sítio de restrição para essa enzima. Isso não ocorreria caso o vetor de expressão, por qualquer motivo, houvesse simplesmente se religado sem a inserção do gene. Essa verificação foi realizada apenas com os vetores pET\_Gr01 e pET\_Tc02 cujo resultado se vê na **Figura 15**.



**Figura 15. Digestão de pET-24a\_Gr01 e pET-24a\_Tc02.** Digestão de pET-24a\_Gr01 e pET-24a\_Tc02 com XhoI para verificação da transformação. Os vetores linearizados são bandas de tamanho entre 5 e 6Kb. Caso fosse o vetor da amilase fechada, ele teria cerca de 6500bp. M: Marcador 1Kb (Promega); 1: pET-24a\_Gr01 linearizado; 2: pET-24a\_Gr01 intacto; 3: pET-24a\_Tc02 linearizado e 4: pET-24a\_Gr01 intacto.

### 5.4. Cinética de crescimento

Foram realizadas diversas tentativas de purificação dos produtos de expressão das quimeras Gr01 e Tc02, como descrito na **Figura 8** da metodologia. Diferentes tampões de lise, colunas cromatográficas e tempos de indução da cultura foram testados. As amostras purificadas por IMAC, as três frações eluídas a 20, 60 e 95% de acetonitrila da Baker Bond e posteriores purificações por HPLC foram analisadas por espectrometria de massa. Contudo, em

todas as frações analisadas não foi detectado o produto da expressão heteróloga. Em suma, as proteínas quiméricas foram produzidas, pois estas foram detectadas mais à frente, mas não foi possível purificá-las.

Não ter sido possível purificar as quimeras contendo os peptídeos antimicrobianos foi a primeira evidência de que a encriptação proposta não “silenciou” a sua atividade. Deste modo, foram realizados ensaios de cinética de crescimento bacteriano. O propósito desse experimento era verificar a evolução ao longo do tempo da densidade das culturas de bactérias transformadas e induzidas em comparação com as culturas não induzidas. Foi observado que as culturas produtoras das quimeras antimicrobianas Gr01 e Tc02 apresentaram uma inibição em seu crescimento comparando-se às bactérias não induzidas transformadas após ambas serem transformadas com os mesmos vetores. Os valores máximos da O.D.<sub>600</sub> das culturas de Gr01 e Tc02 induzidas são inferiores a 60% dos valores máximos de suas respectivas culturas-controle. Este resultado, embora não pré-determinado, poderia ser esperado para as quimeras Gr01 e Tc02, sabidamente compostas por peptídeos antimicrobianos. Surpreendentemente, o peptídeo Cc11, que não se sabia ser antimicrobiano, também apresentou atividade antimicrobiana contra seu vetor de expressão. As bactérias induzidas cresciam em densidade em alguns momentos e em outros diminuía. Já as bactérias das culturas-controle aumentaram sua densidade a cada medição, conforme esperado. Foi verificado que a proteína quimérica Gr01 comprometeu mais o crescimento da célula de expressão que Tc02 (**Tabelas 7 e 8 e Figuras 16**). Outrossim, Cc11 parece ter uma ação antimicrobiana intermediária entre Gr01 e Tc02 (**Tabela 9 e Figura 16**).

**Tabela 7. Valores de O.D.<sub>600</sub> da cultura de Gr01.** Valores de O.D.<sub>600</sub> do crescimento de *E. coli* (KRX) durante a indução da proteína quimérica Gr01 medidos a cada 30 min. por 3h.

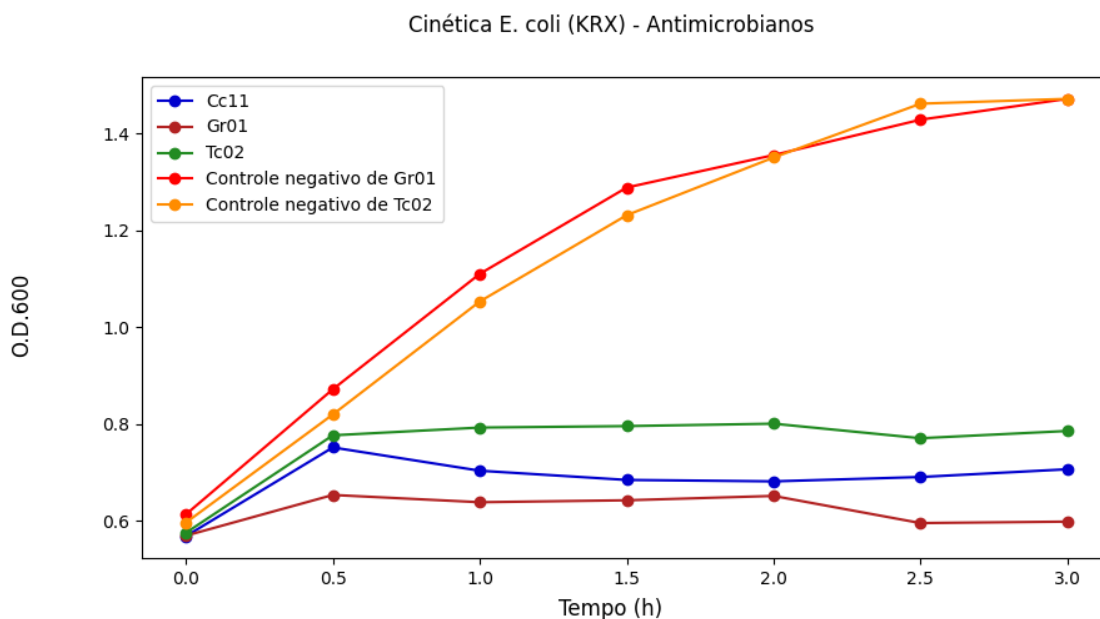
| Tempo     | <i>E. coli</i> KRX transformada<br>com pET-Gr01 induzida<br>para a expressão de Gr01 | <i>E. coli</i> KRX transformada<br>com pET-Gr01 não induzida |
|-----------|--------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------|
| 0 h       | 0,570                                                                                | 0,614                                                        |
| 30 min.   | 0,654                                                                                | 0,872                                                        |
| 1 h       | 0,639                                                                                | 1,110                                                        |
| 1h30 min. | 0,643                                                                                | 1,288                                                        |
| 2 h       | 0,652                                                                                | 1,355                                                        |
| 2h30 min. | 0,596                                                                                | 1,428                                                        |
| 3 h       | 0,599                                                                                | 1,471                                                        |

**Tabela 8. Valores de O.D.<sub>600</sub> da cultura de Tc02.** Valores de O.D.<sub>600</sub> do crescimento de *E. coli* (KRX) durante a indução da proteína quimérica Tc02 medidos a cada 30 min. por 3h.

| Tempo     | <i>E. coli</i> KRX transformada com pET-Tc02 induzida para a expressão de Tc02 | <i>E. coli</i> KRX transformada com pET-Tc02 não induzida |
|-----------|--------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|
| 0 h       | 0,576                                                                          | 0,597                                                     |
| 30 min.   | 0,777                                                                          | 0,820                                                     |
| 1h        | 0,793                                                                          | 1,053                                                     |
| 1h30min.  | 0,796                                                                          | 1,231                                                     |
| 2h        | 0,801                                                                          | 1,350                                                     |
| 2h30 min. | 0,771                                                                          | 1,461                                                     |
| 3h        | 0,786                                                                          | 1,471                                                     |

**Tabela 9. Valores de O.D.<sub>600</sub> da cultura de Cc11.** Valores de O.D.<sub>600</sub> do crescimento de *E. coli* (KRX) durante a indução da proteína quimérica Cc11 medidos a cada 30 min. por 3h.

| Tempo    | <i>E. coli</i> KRX transformada com pET-Cc11 induzida para a expressão de Cc11 |
|----------|--------------------------------------------------------------------------------|
| 0h       | 0,569                                                                          |
| 30min.   | 0,752                                                                          |
| 1h       | 0,704                                                                          |
| 1h30min. | 0,685                                                                          |
| 2h       | 0,682                                                                          |
| 2h30min. | 0,691                                                                          |
| 3h       | 0,707                                                                          |



**Figura 16.** Gráfico com as curvas que representam as cinéticas de *E. coli* (KRX). Gráfico com as curvas que representam as cinéticas de *E. coli* (KRX) após a indução da expressão das proteínas quiméricas Gr01, Tc02, da construção Cc11 com IPTG e ramnose e de seus controles não induzidos a 200rpm, 37°C durante 3h.

Não foi realizado um experimento de cinética para GST\_Gr01, mas fez-se medições da O.D.<sub>600</sub> da cultura induzida durante a noite e a massa celular também foi menor que os controles (**Tabela 10**). Deste modo, a quimera fusionada à GST também parece apresentar atividade antimicrobiana, embora de maneira mais branda. Ademais, foram comparadas as massas das células controle e coletadas com a massa celular das culturas induzidas por 4h e durante a noite (**Tabelas 11.**) A massa de células da cultura-controle é maior, em valores brutos, que a massa de qualquer uma das culturas induzidas.

**Tabela 10.** Valores de O.D.<sub>600</sub> das culturas crescidas durante a noite. O.D.<sub>600</sub> das culturas de Gr01, Tc02 e GST\_Gr01 após indução durante a noite (*overnight*).

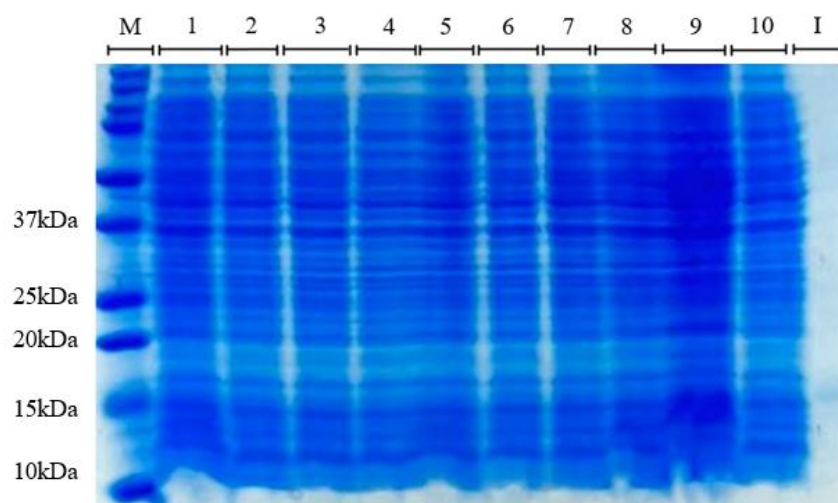
| Cultura  | O.D. <sub>600</sub> |
|----------|---------------------|
| Gr01     | 0,404               |
| Tc02     | 0,600               |
| GST_Gr01 | 0,935               |

**Tabela 11. Massa das células das culturas induzidas.** Massa celular, em miligramas, de culturas de 100mL após o período de indução de 3h.

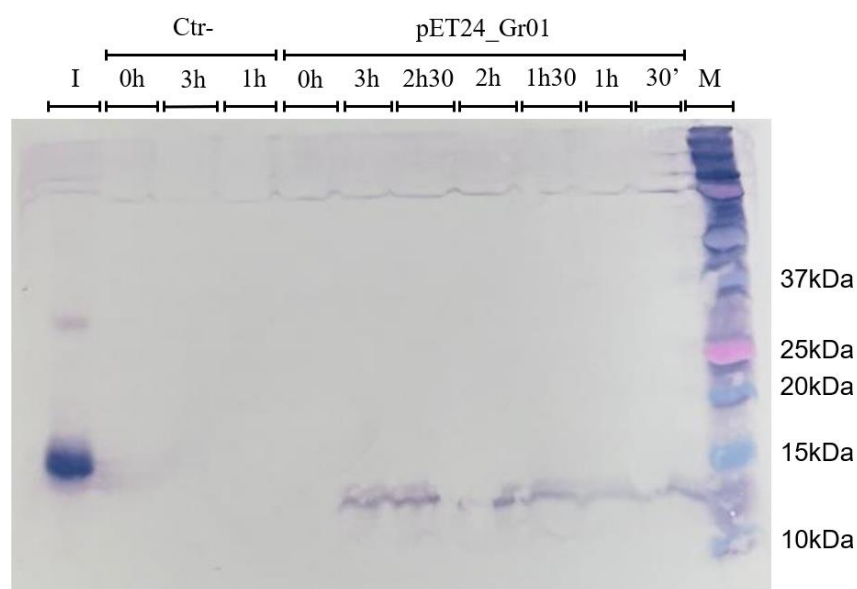
| Cultura                                  | Massa celular (mg) |
|------------------------------------------|--------------------|
| Gr01 induzida                            | 480                |
| GST_Gr01 induzida                        | 480                |
| Tc02 induzida                            | 570                |
| Controle negativo<br>(Tc02 não induzida) | 840                |

### 5.5. Detecção das proteínas

Após os experimentos de cinética de crescimento bacteriano, buscou-se a detecção das proteínas quiméricas produzidas. Ciente de que, devido à grande morte celular observada decorrente da ação antimicrobiana, seria provável encontrar uma baixa concentração de proteínas heterólogas na cultura, foram coletadas frações da cultura a cada 30 minutos de crescimento após a indução. No mesmo momento em que as culturas eram retiradas para mensuração fotométrica, eram separadas as alíquotas para o teste de detecção. As frações, tão logo coletadas, eram congeladas para evitar degradação das amostras que seriam usadas nos géis SDS-PAGE e para os Western Blot. Como é possível verificar nas **Figuras 17, 19 e 21**, não ocorreu degradação das proteínas, pois as bandas do gel não estão arrastadas, mas bem distribuídas por este meio. Entretanto, não foram visualmente detectadas nos géis corados com *Coomassie Blue* as proteínas e peptídeos recombinantes nos estratos brutos. Os peptídeos visíveis no estrato bruto são os controles positivos purificados, que são o peptídeo análogo à insulina do anfíbio *Phyllomedusa azurea*, parte de outro projeto do grupo, e o peptídeo Cc00, deste projeto, ambos purificados anteriormente. O que foi possível observar nos Western Blot é que há bandas de maior intensidade de peptídeos (**Figuras 18 e 20**). Para a quimera Gr01, as frações 5 e 6 aplicadas, correspondentes a três horas e duas horas e meia de indução, respectivamente, apresentaram maior intensidade. Já para a quimera Tc02, o pico de intensidade foi observado nas frações 7 e 8, que correspondem a duas horas e uma hora e meia de indução.

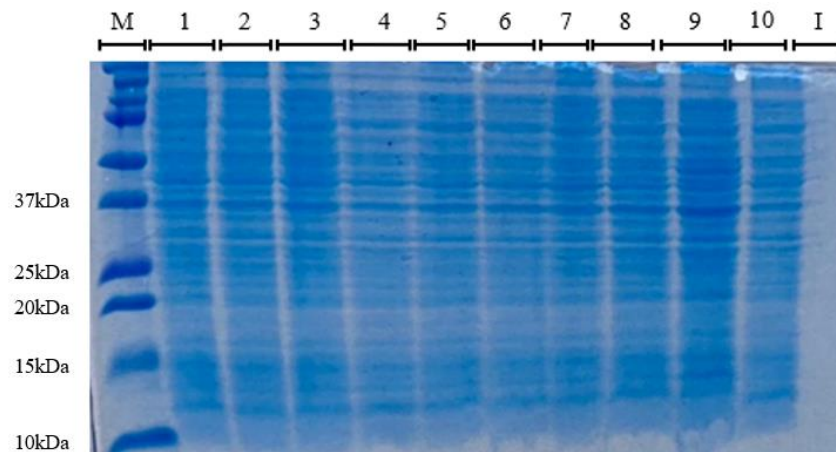


**Figura 17. Gel SDS-PAGE das frações da indução de Gr01 em *E. coli* (KRX).** Gel SDS-PAGE 15% das frações coletadas da indução de *E. coli* (KRX) transformada com pET-24a\_Gr01. I: 4  $\mu$ L de controle com peptídeo recombinante semelhante à insulina de *Phyllomedusa azurea* com cauda de histidina; 1 a 10: 15  $\mu$ L; 1. 0h de expressão da *E. coli* (KRX) controle transformada com pET\_Gr01; 2. 3h de crescimento do controle negativo; 3. 1h de crescimento do controle negativo; 4. 0h de expressão da *E. coli* induzida com IPTG e ramnose; 5. 3h de indução da *E. coli* (KRX) pET-24a\_Gr01; 6. 2h30 de indução da *E. coli* (KRX) pET-24a\_Gr01; 7. 2h de indução da *E. coli* (KRX) pET-24a\_Gr01; 8. 1h30 de indução da *E. coli* (KRX) pET-24a\_Gr01; 9. 1h de indução da *E. coli* (KRX) pET-24a\_Gr01; 10. 30min. de indução da *E. coli* (KRX) pET-24a\_Gr01 M: 5 $\mu$ L Marcador Precision Plus Protein™ Dual Color Standards.

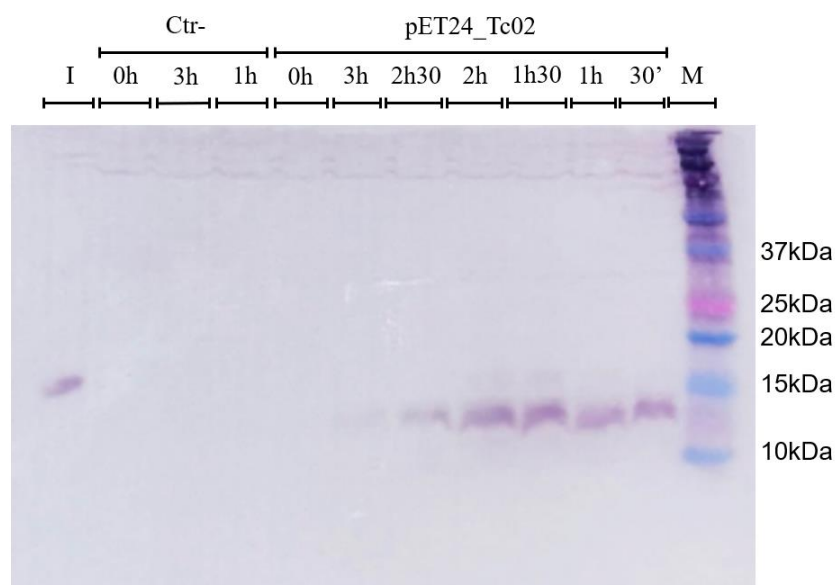


**Figura 18. Western blot das frações da indução de Gr01 em *E. coli* (KRX).** Western blot das frações coletadas da indução de *E. coli* (KRX) transformada com pET-24a\_Gr01. I: 4  $\mu$ L de controle negativo com peptídeo recombinante semelhante à insulina de *Phyllomedusa azurea* com cauda de histidina; 1 a 10: 15  $\mu$ L; 1. 0h de expressão da *E. coli* (KRX) controle transformada com pET\_Gr01; 2. 3h de crescimento do controle negativo; 3. 1h de crescimento do controle negativo; 4. 0h de expressão da *E. coli* induzida com IPTG e ramnose; 5. 3h de

indução da *E. coli* (KRX) pET-24a\_Gr01; 6. 2h30 de indução da *E. coli* (KRX) pET-24a\_Gr01; 7. 2h de indução da *E. coli* (KRX) pET-24a\_Gr01; 8. 1h30 de indução da *E. coli* (KRX) pET-24a\_Gr01; 9. 1h de indução da *E. coli* (KRX) pET-24a\_Gr01; 10. 30min. de indução da *E. coli* (KRX) pET-24a\_Gr01 M: 5  $\mu$ L Marcador Precision Plus Protein™ Dual Color Standards.

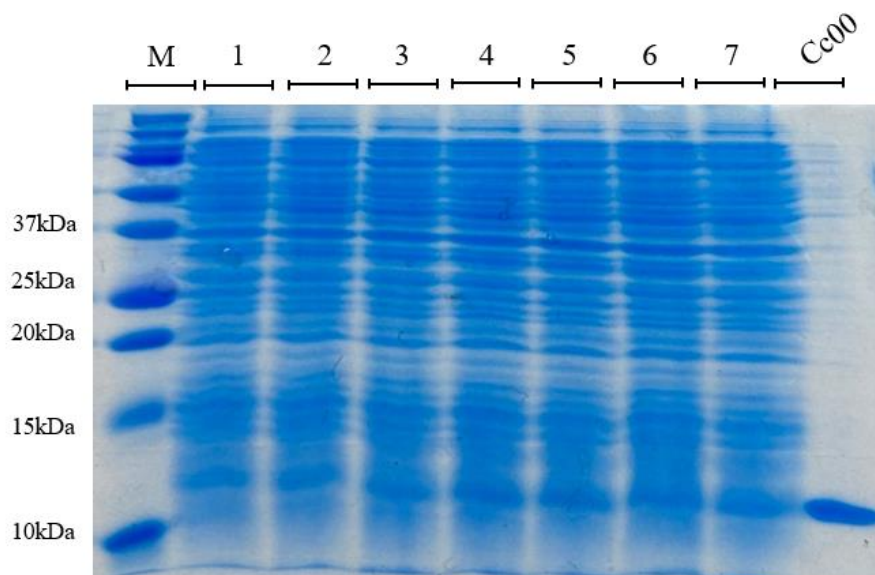


**Figura 19. Gel SDS-PAGE das frações da indução de Tc02 em *E. coli* (KRX).** Gel SDS-PAGE 15% das frações coletadas da indução de *E. coli* (KRX) transformada com pET\_Tc02. I: 4  $\mu$ L de controle com peptídeo recombinante semelhante à insulina de *Phyllomedusa azurea* com cauda de histidina; 1 a 10: 15  $\mu$ L; 1. 0h de expressão da *E. coli* (KRX) controle transformada com pET\_Tc02; 2. 3h de crescimento do controle negativo; 3. 1h de crescimento do controle negativo; 4. 0h de expressão da *E. coli* induzida com IPTG e ramnose; 5. 3h de indução da *E. coli* (KRX) pET\_Tc02; 6. 2h30 de indução da *E. coli* (KRX) pET\_Tc02; 7. 2h de indução da *E. coli* (KRX) pET\_Tc02; 8. 1h30 de indução da *E. coli* (KRX) pET\_Tc02; 9. 1h de indução da *E. coli* (KRX) pET\_Tc02; 10. 30min. de indução da *E. coli* (KRX) pET\_Tc02 M: 5  $\mu$ L Marcador Precision Plus Protein™ Dual Color Standards.



**Figura 20. Western blot das frações da indução de Tc02 em *E. coli* (KRX).** Western blot das frações coletadas da indução de *E. coli* (KRX) transformada com pET-24a\_Tc02. I: 4  $\mu$ L de controle negativo com peptídeo

recombinante semelhante à insulina de *Phyllomedusa azurea* com cauda de histidina; 1 a 10: 15 µL; 1. 0h de expressão da *E. coli* (KRX) controle transformada com pET-Tc02; 2. 3h de crescimento do controle negativo; 3. 1h de crescimento do controle negativo; 4. 0h de expressão da *E. coli* induzida com IPTG e ramnose; 5. 3h de indução da *E. coli* (KRX) pET-24a\_Tc02; 6. 2h30 de indução da *E. coli* (KRX) pET-24a\_Tc02; 7. 2h de indução da *E. coli* (KRX) pET-24a\_Tc02; 8. 1h30 de indução da *E. coli* (KRX) pET-24a\_Tc02; 9. 1h de indução da *E. coli* (KRX) pET-24a\_Tc02; 10. 30min. de indução da *E. coli* (KRX) pET-24a\_Tc02 M: 5 µL Marcador Precision Plus Protein™ Dual Color Standards.

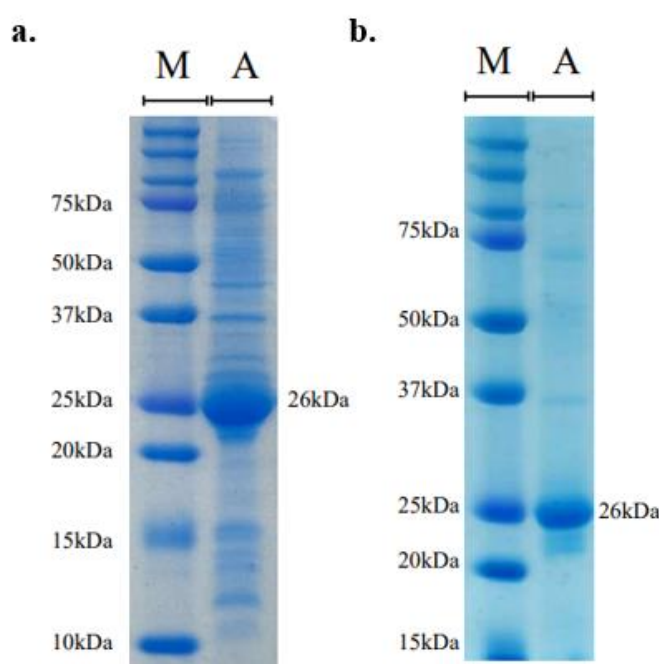


**Figura 21. Gel SDS-PAGE das frações da indução de Cc11 em *E. coli* (KRX).** Gel SDS-PAGE 17,5% das frações coletadas da indução de *E. coli* (KRX) transformada com pET\_Cc11. Cc00: 5 µL de controle com peptídeo recombinante Cc00 com cauda de histidina; 1 a 10: 15 µL; 1. 0h de expressão da *E. coli* (KRX) controle transformada com pET\_Cc11; 2. 3h de crescimento do controle negativo; 3. 1h de crescimento do controle negativo; 4. 0h de expressão da *E. coli* induzida com IPTG e ramnose; 5. 3h de indução da *E. coli* (KRX) pET\_Cc11; 6. 2h30 de indução da *E. coli* (KRX) pET\_Cc11; 7. 2h de indução da *E. coli* (KRX) pET\_Cc11; 8. 1h30 de indução da *E. coli* (KRX) pET\_Cc11; 9. 1h de indução da *E. coli* (KRX) pET\_Cc11; 10. 30min. de indução da *E. coli* (KRX) pET\_Cc11 M: 5 µL Marcador Precision Plus Protein™ Dual Color Standards.

## 5.6. Purificação das proteínas recombinantes

Foram realizadas induções das construções Gr01 e Tc02, tanto em uma cultura de 100 mL, quanto duas culturas de 200 mL, para acúmulo de material. Como dito anteriormente, após essas sucessivas tentativas de purificação, não conseguimos obter uma quantidade suficiente de material nas frações eluídas das colunas C18 para identificação por espectrometria de massa. Paralelamente, foi testada a síntese da quimera Gr01 usando um Kit de síntese *Cell-free* (Promega), mas a proteína não foi detectada e havia contaminantes (dado não mostrado).

Nesse momento, optou-se pela expressão da quimera GST\_Gr01, para verificar se a proteína de fusão inibiria a atividade antimicrobiana e aumentaria a estabilidade do produto proteico. Não havia anticorpos no laboratório para a detecção dessa proteína. Contudo, foi realizada a purificação dessa amostra usando a GStrap e a SPE. Um íon correspondente a aproximadamente 26 kDa, a massa da GST, foi detectado por espectrometria de massa. Desse modo, foram feitos dois géis SDS-PAGE a 15 e 12% de poliacrilamida com a amostra após a purificação (**Figura 22**). Observou-se em ambos o mesmo que visto no espectro de massa: uma banda de aproximadamente 26 kDa. Cada gel foi feito com o mesmo produto de expressão, mas de induções feitas em dias diferentes.

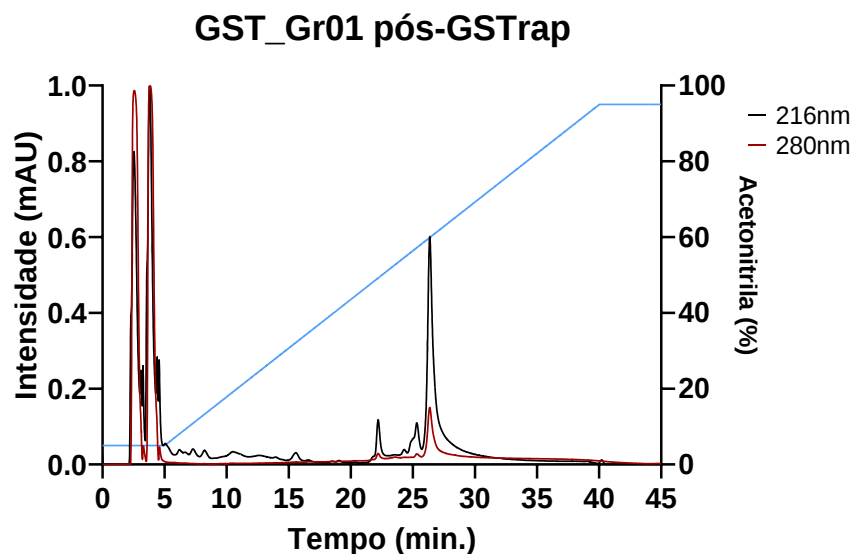


**Figura 22. Géis SDS-PAGE das amostras de GST-Gr01 purificadas.** Géis SDS-PAGE da amostra de GST-Gr01 após a purificação nas colunas GStrap e SPE. **a.** Gel de acrilamida 15%. **b.** Gel de acrilamida 12%. **M.** Marcador Precision Plus Protein™ Dual Color Standards.

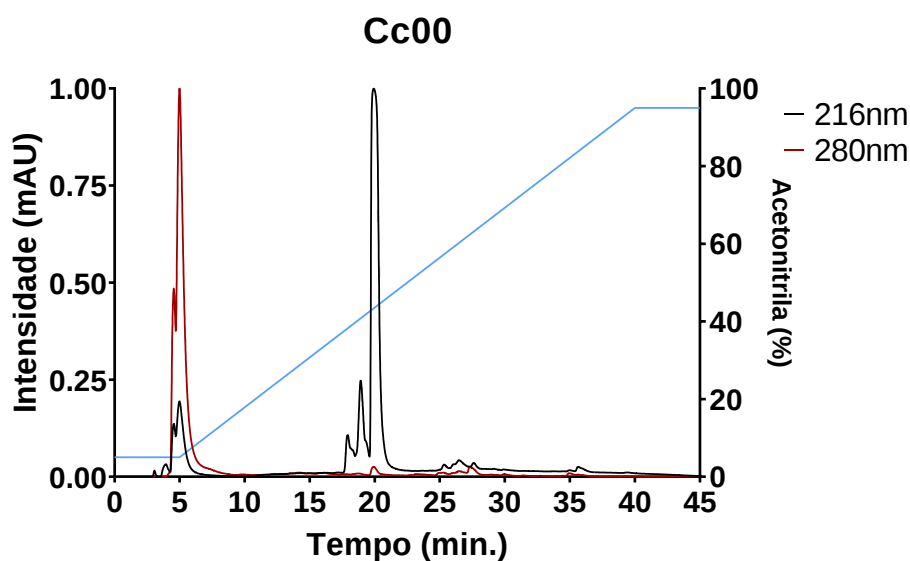
As evidências apontam para um produto recombinante produzido de forma parcial ou mesmo produzido de forma íntegra e então degradado. Para melhor investigar esse material, retirar contaminantes e certificar de que não há uma pequena fração de produto integralmente produzido, a amostra foi purificada em uma coluna C4. Cada fração foi coletada, ainda que uma baixa intensidade tenha sido observada. A fração correspondente ao pico majoritário foi a fração 16. O cromatograma está ilustrado na **Figura 23**. A fração 16 foi analisada por espectrometria de massa e a presença do íon de 26 kDa confirmado. A fração 16, correspondente à quimera GST-Gr01 parcial, foi digerida com Fator Xa na tentativa de liberar

alguma parte do peptídeo que poderia ter sido produzida e estar ligada a GST. Uma amostra do produto da digestão foi analisada por MALDI-TOF/MS e não se verificou íon algum correspondente à massa esperada da quimera sem a GSTag. Ainda, havia contaminação de íons pertencentes ao Fator Xa, que curiosamente se apresentavam mais intensos que os íons da própria amostra. Finalmente, os produtos da digestão foram submetidos a cromatografia, mas nenhuma das frações correspondia a produtos recombinantes (dados não mostrados).

Quanto ao peptídeo Cc00, após as purificações na coluna HisTrap e SPE, a presença do peptídeo foi confirmada por espectrometria de massa. Para retirar qualquer outra proteína bacteriana que ainda possa ter permanecido na amostra e para a obtenção do peptídeo Cc00 ainda mais puro para a realização de digestões enzimáticas, purificou-se a amostra em uma coluna C18. A fração majoritária também correspondia à Cc00, foi coletada e está ilustrada na **Figura 24**.



**Figura 23. Cromatograma da quimera GST\_Gr01.** Cromatograma da quimera parcial GST\_Gr01 purificada por HPLC de fase reversa em uma coluna C4 (Vydac) em uma corrida com um gradiente de acetonitrila de 5 a 95% de acetonitrila com 0,1% de TFA.

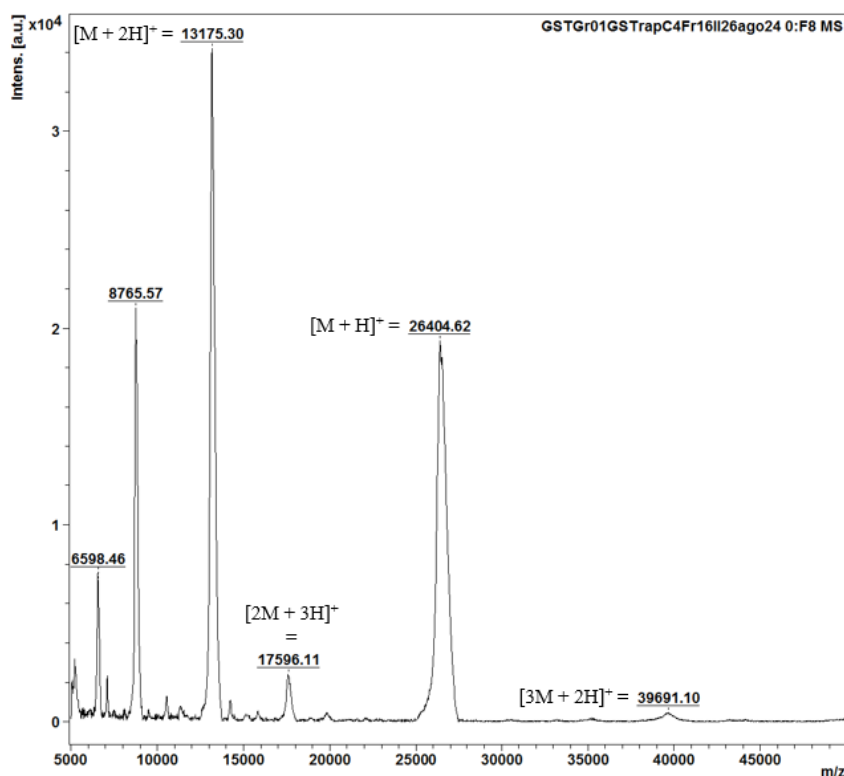


**Figura 24. Cromatograma do peptídeo Cc00.** Cromatograma do peptídeo Cc00 purificado por HPLC de fase reversa em uma coluna C18 (Vydac) em uma corrida com um gradiente de acetonitrila de 5 a 95% de acetonitrila com 0,1% de TFA.

### 5.7. Caracterização das proteínas recombinantes

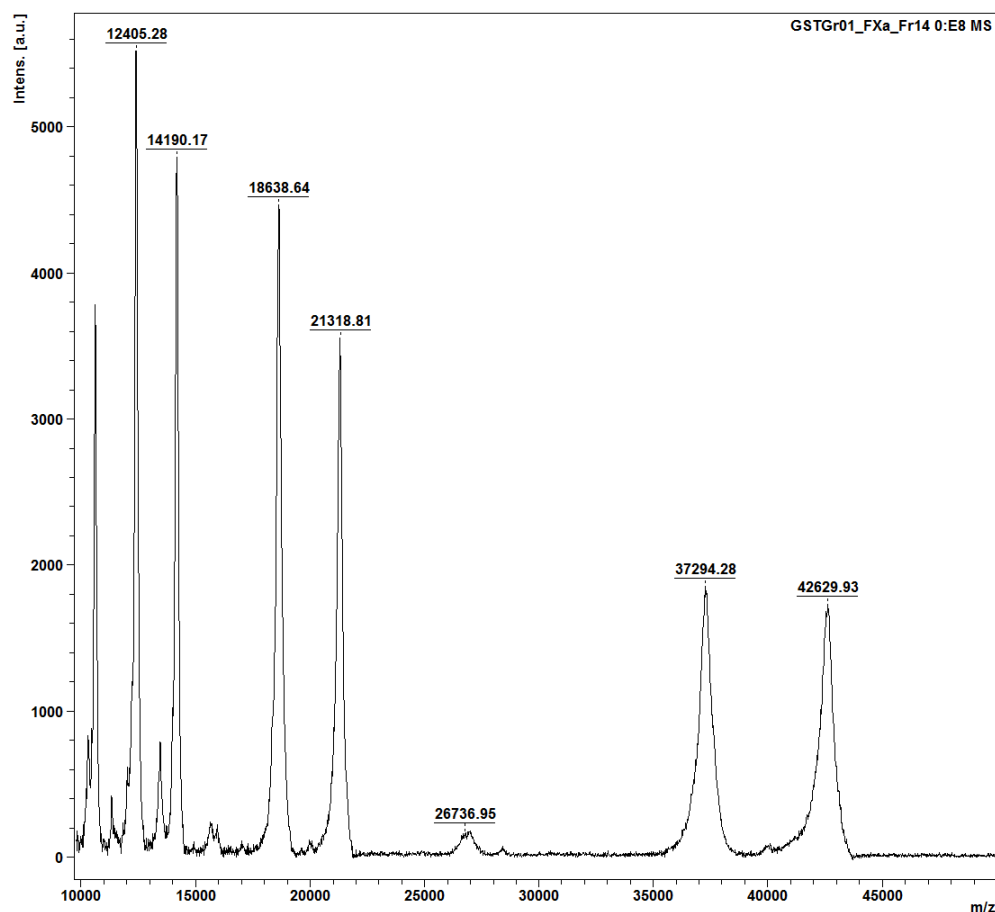
A **Figura 25** corresponde ao espectro de massa da fração 16 da cromatografia do produto da expressão da quimera GST\_Gr01 purificada nas colunas GSTrap, SPE e C4. Há a presença do íon monocarregado esperado, correspondente à proteína GST, de 26 kDa. Também é possível notar que a amostra está relativamente pura, pois há o íon dupla carga com razão massa sobre carga ( $m/z$ ) de aproximadamente 13,1 kDa. A presença de impurezas pode suprimir a ionização

da amostra. Também foi detectado outro íon de tripla carga de m/z correspondente à aproximadamente 8,7 kDa.



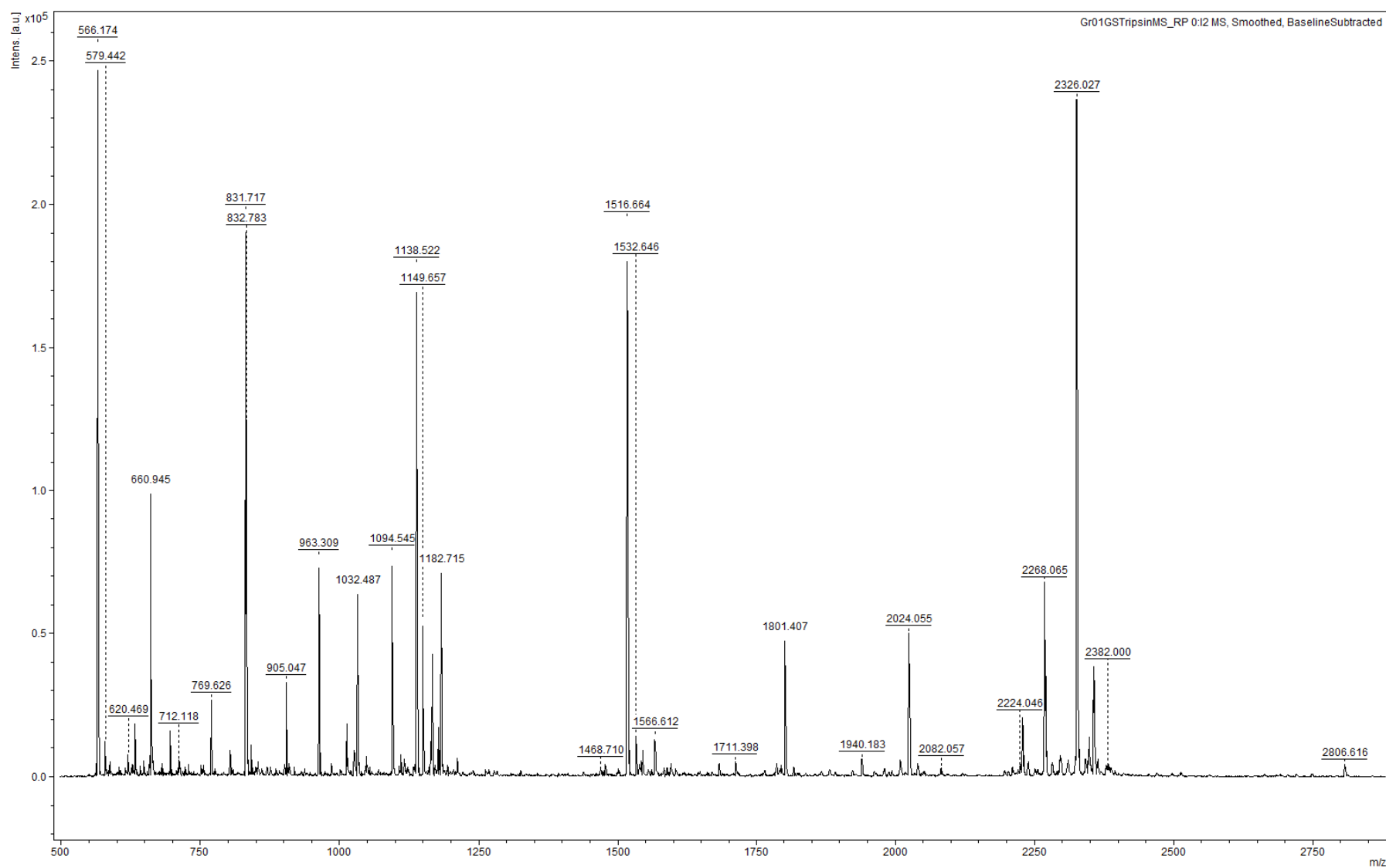
**Figura 25. Espectro MS da fração 16 da amostra GST\_Gr01.** Espectro de massa MALDI-TOF/MS em modo linear da fração 16 da amostra GST-Gr01 purificada na GSTrap, SPE e C4.

Após a realização da digestão da GST-Gr01 parcial com o Fator Xa, foi observado no espectro de massa mostrado na **Figura 26**, que a GST foi bem digerida, pois há consistente diminuição na intensidade do íon de 26.000. Entretanto, há vários íons contaminantes que provavelmente são provenientes do Fator Xa, inclusive a própria enzima íntegra cuja massa molecular teórica é de aproximadamente 43kDa. Além disso, nenhum íon de massa correspondente à quimera sem a GSTag nem íons de peptídeos em baixa massa passíveis de fragmentação foram observados.



**Figura 26. Espectro MS da amostra GST\_Gr01 clivada com o Fator Xa.** Espectro de massa MALDI-TOF/MS em modo linear da amostra GST-Gr01 purificada e clivada com o Fator Xa.

Para confirmar que o íon de 26kDa era de fato a GSTag produzida a partir do plasmídeo e para tentar se obter também fragmentos da parte do linker e da parte antimicrobiana da quimera, foi realizada digestão triptica da amostra GST\_Gr01. A fração 16 da corrida na coluna C4 da amostra GST\_Gr01, purificada na GSTrap e na SPE, foi reduzida, alquilada e digerida com tripsina. O espectro de massa com os fragmentos da digestão triptica é mostrado na **Figura 27**. A sequência completa da quimera GST\_Gr01 foi submetida ao ExPASyPeptide para predição dos fragmentos teóricos da digestão triptica. Os fragmentos preditos que foram identificados e sequenciados estão listados na **Tabela 12**.



**Figura 27. Espectro MS da amostra GST\_Gr01 tripsinizada.** Espectro de massa MALDI-TOF/MS em modo linear da amostra GST-Gr01 tripsinizada.

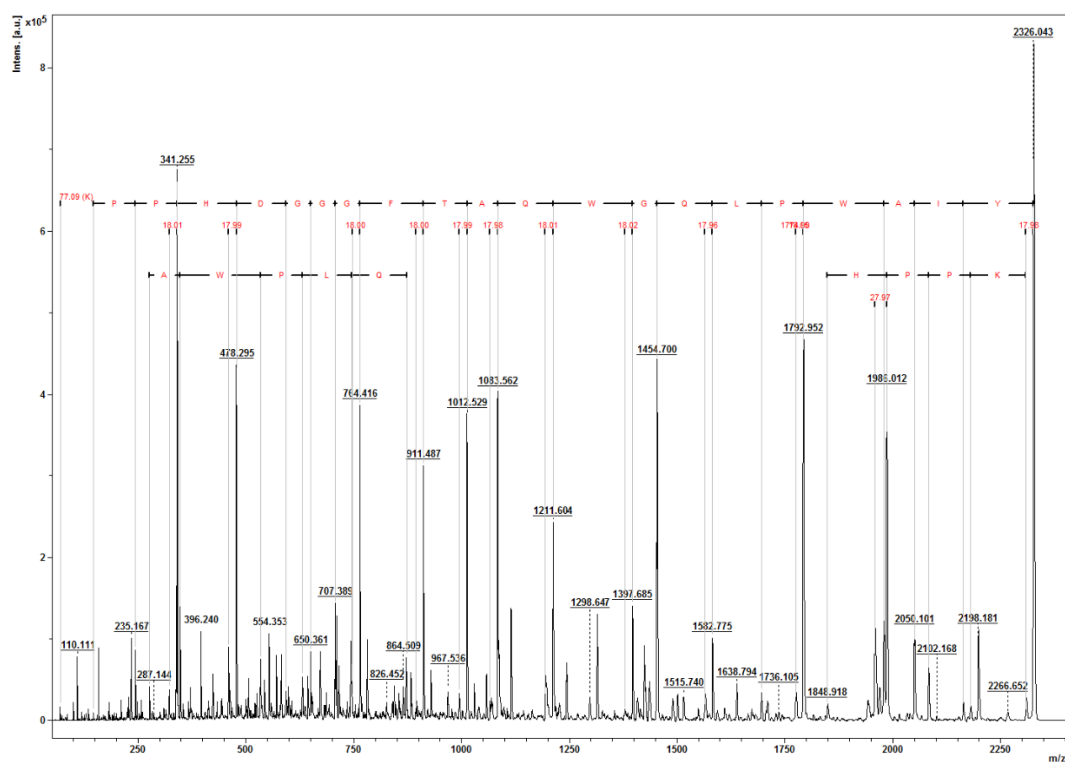
**Tabela 12.** Íons provenientes da digestão de GST-Gr01 parcial sequenciados dentre os fragmentos preditos usando o ExPASy. \*Fragmento que contém a sequência do *linker* e do sítio do Fator Xa, localizada entre a GST e o primeiro peptídeo antimicrobiano da quimera.

| [M + H] <sup>+</sup> do íon teórico<br>predito para a digestão<br>tríptica | [M + H] <sup>+</sup> do íon encontrado<br>experimentalmente | Sequência de resíduos de<br>aminoácido do fragmento |
|----------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|
| 1.138,516 Da                                                               | 1.138,617 Da                                                | YEEHLYER                                            |
| 1.149,640 Da                                                               | 1.149,746 Da                                                | LLLEYLEEK                                           |
| 1.516,803 Da                                                               | 1.516,924 Da                                                | AEISMLEGAVLDIR                                      |
| *1.711,803 Da                                                              | 1.711,936 Da                                                | SGGGGGENLYFQAIEGR                                   |
| 2.229,111 Da                                                               | 2.229,280 Da                                                | FELGLEFPNLPYYIDGDVK                                 |
| 2.326,140 Da                                                               | 2.326,027 Da                                                | YIAWPLQGWQATFGGGDHPK                                |

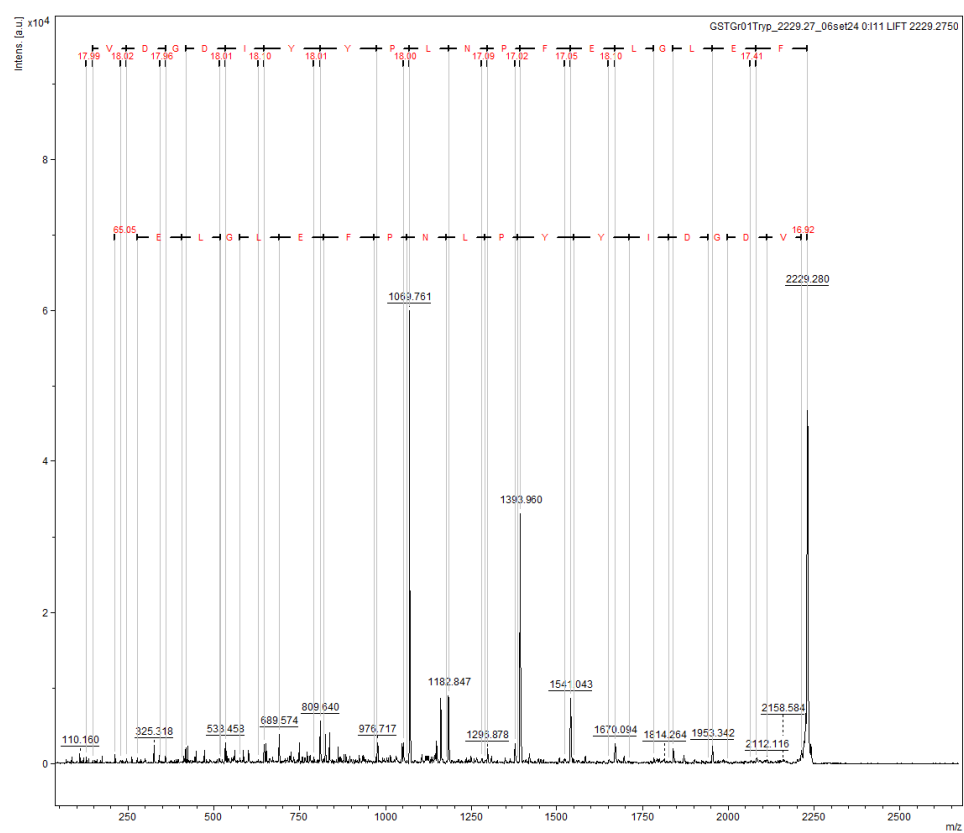
Todos os íons sequenciados correspondem a fragmentos da glutathione-S-transferase, à exceção do íon  $[M + H]^+ = 1.711,80$  Da. Este é um íon-chave, porquanto corresponde a uma parte a mais da construção heteróloga. Isso significa que a tradução foi além da GST e alcançou a produção de outra parte da quimera. A sequência de resíduos de aminoácido do íon  $[M + H]^+ = 1.711,80$  Da, SGGGGGENLYFQAIEGR, corresponde exatamente à sequência do *linker*, ao sítio de clivagem TEV e ao sítio do Fator Xa (**Figura 28**). Não foi encontrado fragmento algum que contivesse as sequências dos peptídeos antimicrobianos. Os espectros de sequenciamento desses íons são mostrados nas **Imagens de 29 a 34**. GST\_Gr01 também foi digerida com a protease LysN, mas a eficiência de digestão foi muito baixa e não resultou em fragmentos sequenciáveis.



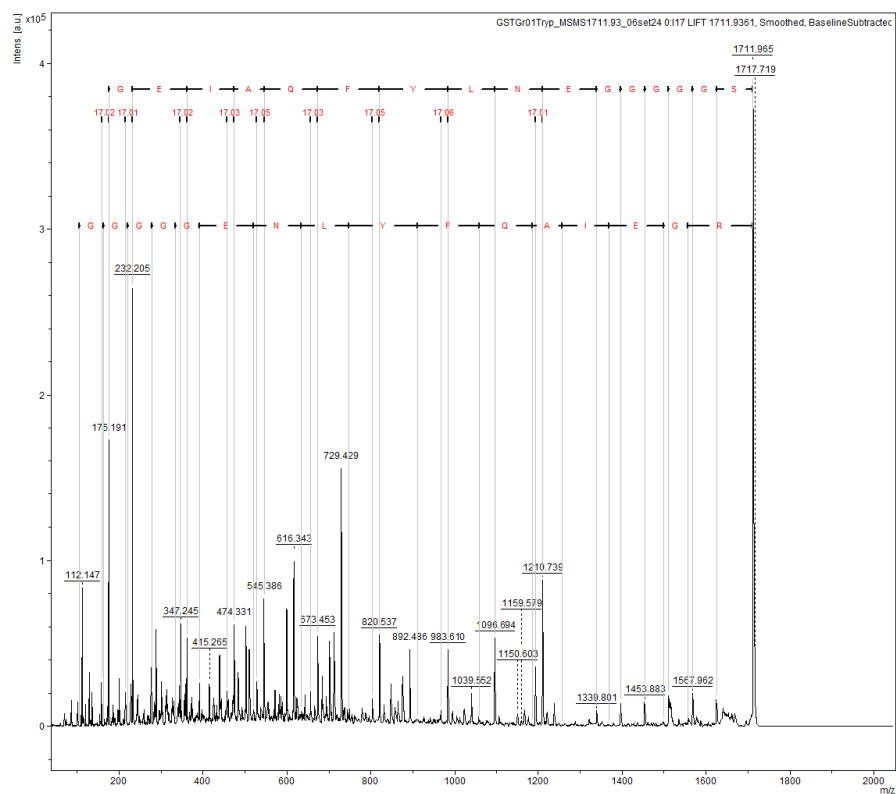
**Figura 28.** Sequência do íon  $[M + H]^+ = 1.711,93$  Da. Sequência do íon  $[M + H]^+ = 1.711,93$  Da com representação dos sítios de clivagem. Sua sequência corresponde às sequências integrais do *linker*, do sítio de clivagem TEV e do sítio de clivagem do Fator Xa da quimera GST\_Gr01.



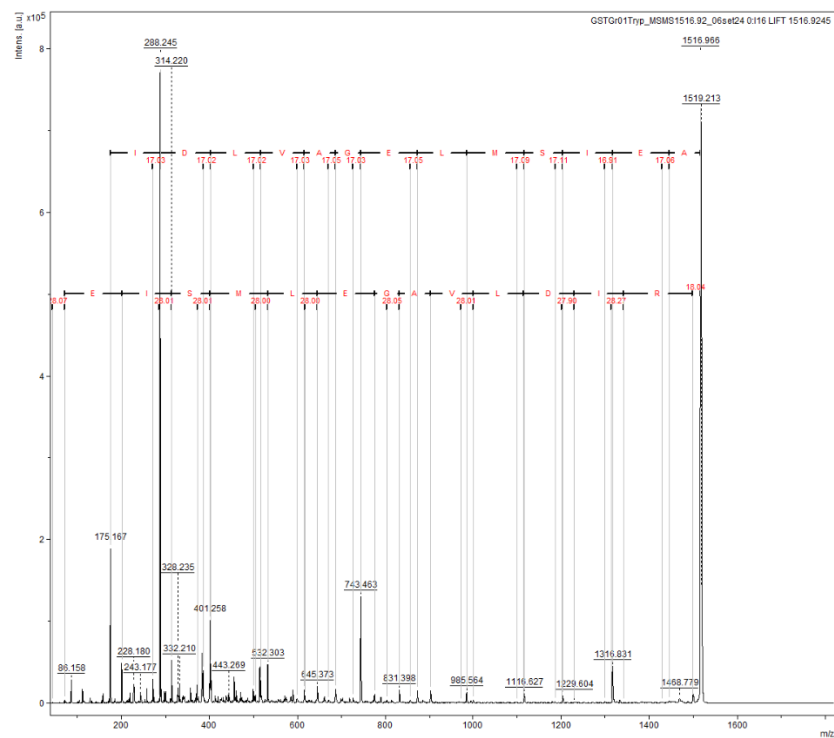
**Figura 29. Espectro de fragmentação do íon  $[M + H]^+ = 2.326,04$  Da.** Espectro de fragmentação MALDI-TOF/TOF em modo LIFT do íon  $[M + H]^+ = 2.326,04$  Da, proveniente da proteína GST\_Gr01.



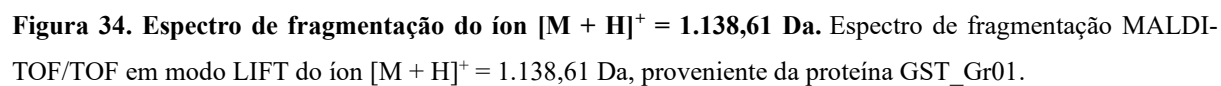
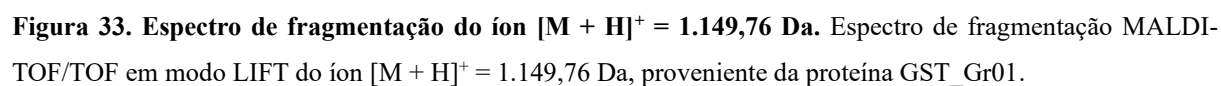
**Figura 30. Espectro de fragmentação do íon  $[M + H]^+ = 2.229,27$  Da.** Espectro de fragmentação MALDI-TOF/TOF em modo LIFT do íon  $[M + H]^+ = 2.229,27$  Da, proveniente da proteína GST\_Gr01.



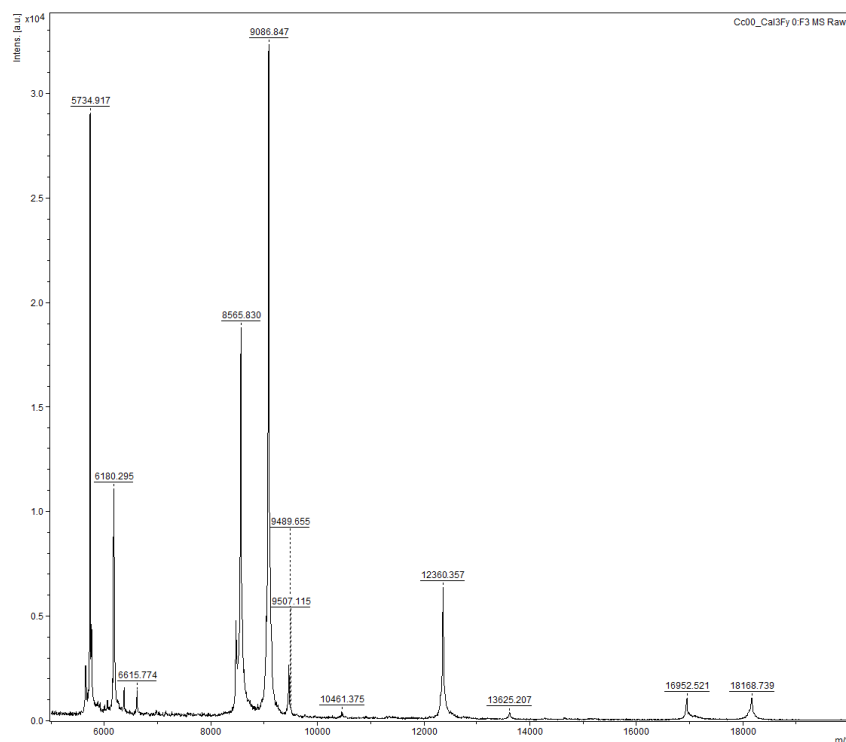
**Figura 31. Espectro de fragmentação do íon  $[M + H]^+ = 1.711,93$  Da.** Espectro de fragmentação MALDI-TOF/TOF modo LIFT do íon  $[M + H]^+ = 1.711,93$  Da, proveniente da proteína GST Gr01.



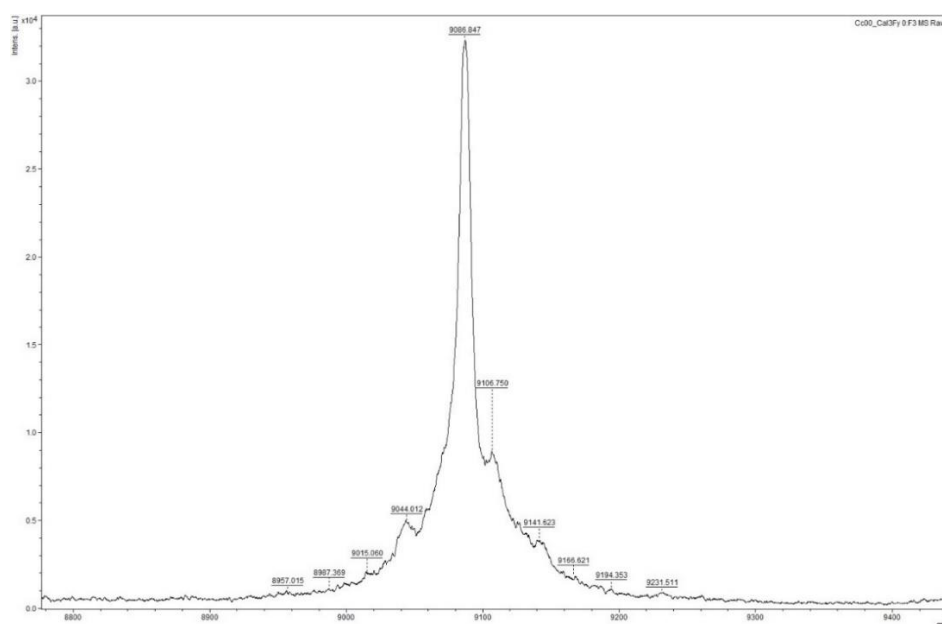
**Figura 32. Espectro de fragmentação do íon  $[M + H]^+ = 1.516,92$  Da.** Espectro de fragmentação MALDI-TOF/TOF em modo LIFT do íon  $[M + H]^+ = 1.516,92$  Da, proveniente da proteína GST Gr01.



O peptídeo putativamente bioativo encriptado do café Cc00 foi produzido de forma integral e completamente processado. Tão logo foi purificado da coluna HisTrap e da SPE, o íon correspondente à massa média predita do peptídeo Cc00, equivalente a  $[M + H]^+ = 9.086,84$  Da foi observado no espectro MS (**Figuras 35**). A **Figura 36** amplia o íon correspondente a Cc00 e revela a existência de proteoformas.



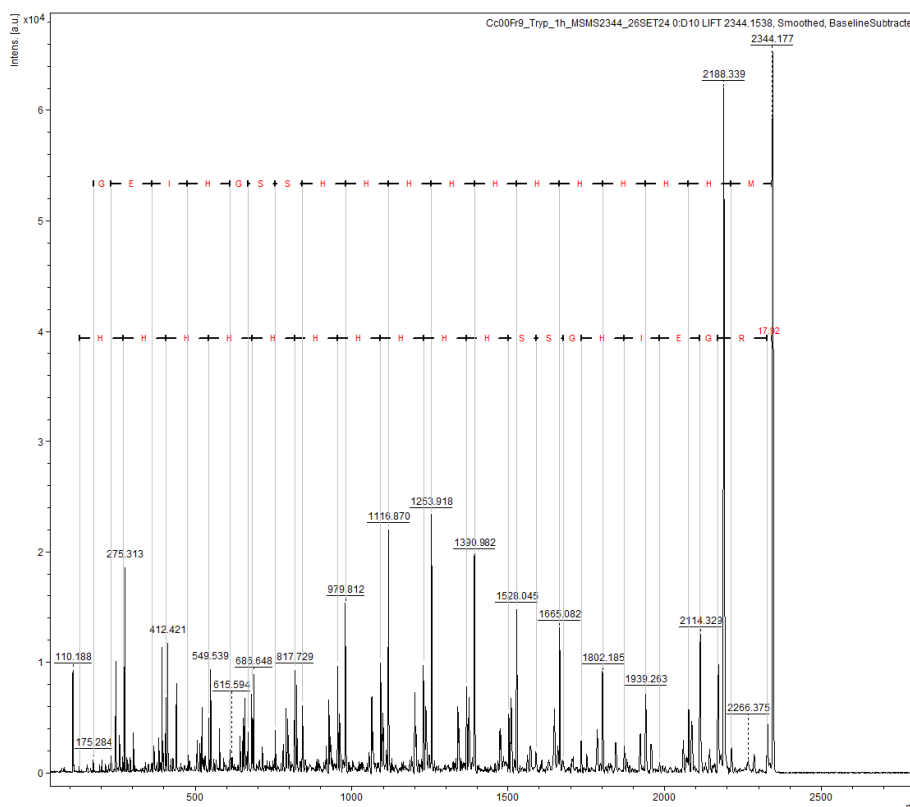
**Figura 35. Espectro MS de Cc00.** Espectro de massa MALDI-TOF/MS em modo linear de Cc00 após purificação nas colunas HisTrap e SPE.

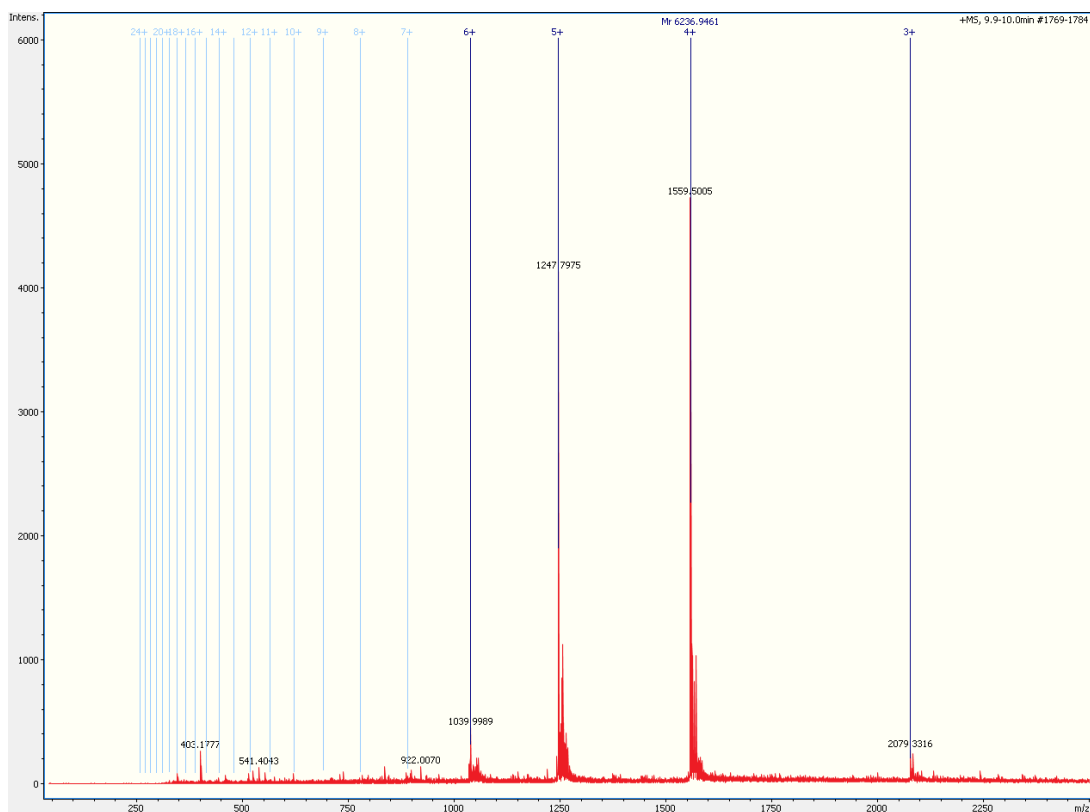


**Figura 36. Espectro MS de Cc00 ampliado.** Espectro de massa MALDI-TOF/MS em modo linear de Cc00 após purificação nas colunas HisTrap e SPE.

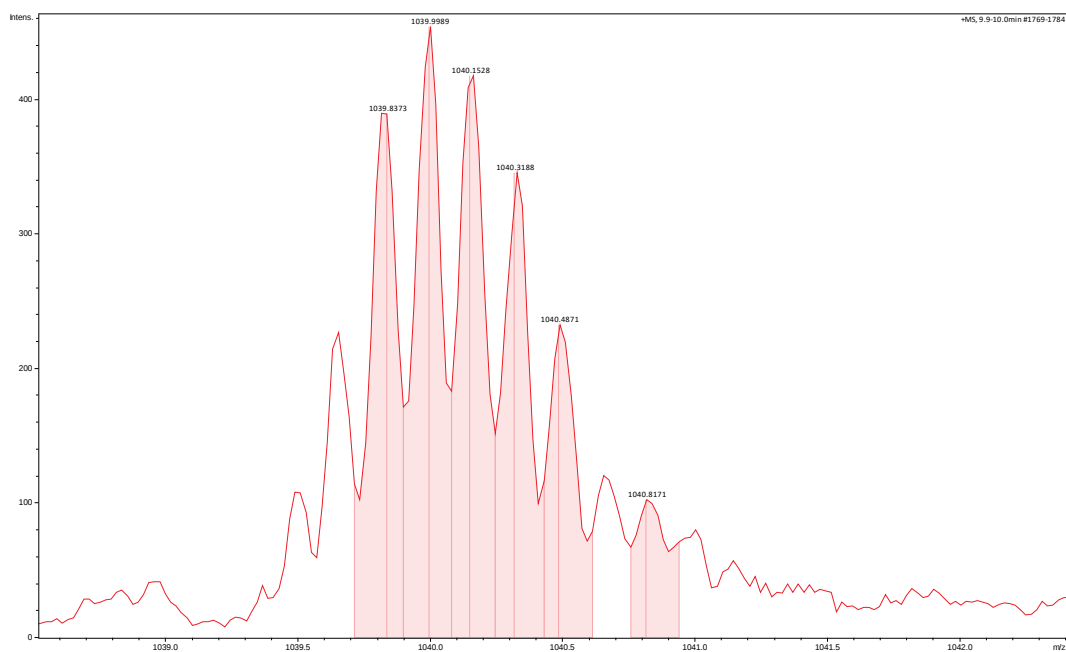
O mesmo processo de redução, alquilação e digestão trípica foi realizado com o peptídeo Cc00, após ser purificado na HisTrap, na SPE e na coluna C18. A **Tabela 13** lista os fragmentos esperados como produto da digestão trípica também preditos pelo ExPASy. O fragmento de  $[M + H]^+ = 2.344,17$  Da foi identificado e sequenciado por MALDI-TOF/TOF/MS, a sequência de resíduos de aminoácido encontrada corresponde exatamente ao fragmento predito, abarcando a cauda de dez resíduos de histidina e outros resíduos adicionais (**Figura 37**). Os demais íons não foram encontrados por MALDI-TOF/MS. O fragmento de 6.231,97 Da foi detectado por ESI-Q-TOF/MS como um íon de sêxtupla carga,  $[M + 6H]^+ = 1.039,49$  Da, mostrado na **Figura 38** e ampliado na **Figura 39**. Os demais íons não foram encontrados usando a fonte de ionização por eletrospray.

| mass      | position | #MC | artif.modification(s)<br>(/findmod/findmod_masses.html#Others) | modifications<br>(/findmod/findmod_masses.html) | peptide sequence                                                                 |
|-----------|----------|-----|----------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------|
| 6231.9745 | 20-85    | 0   |                                                                |                                                 | GTTTTTPATPTTATPTTATPT<br>PTINSPTGTSPLVTTPTSTSS<br>GLGAGGFNNGLGPSGTNQDN<br>SEAAGR |
| 2344.0411 | 1-19     | 0   |                                                                |                                                 | MHHHHHHHHHHSSGHIEGR                                                              |
| 543.3864  | 86-90    | 0   |                                                                |                                                 | VLLAK                                                                            |





**Figura 38. Espectro MS da digestão trípica de Cc00.** Espectro de massa ESI/MS da digestão trípica de Cc00. Identificação do fragmento 6231,974 Da no microTOF-Q, representado pelo íon  $[M + 6H]^+ = 1.039,49$  Da.



**Figura 39. Identificação do fragmento 6.231,974 Da.** Identificação do fragmento 6.231,974 Da por microTOF-Q, apresentado aqui pelo íon  $[M + 6H]^+ = 1.039,49$  Da.

## 6. DISCUSSÃO

A inibição do crescimento e morte celular das culturas induzidas observado nos experimentos de cinética de crescimento durante a expressão das quimeras sugere fortemente uma possível ação antimicrobiana potente das mesmas ou dos peptídeos At01, Gr01, Gr02 e Tc01, que podem ter sido liberados das quimeras devido à ação de proteases bacterianas. A própria ação sinérgica entre PAM pode torná-los mais eficientes (Capparelli *et al.*, 2009, Wu *et al.*, 2014, Xiang *et al.*, 2017) e isso talvez seja uma das explicações mais plausíveis para os resultados observados neste estudo. A ação antimicrobiana das quimeras já era esperada, porquanto os peptídeos antimicrobianos que as compõem são de fato bioativos (Ramada *et al.*, 2017). Quando se observam os dados de MIC para *E. coli* relativos aos peptídeos individuais obtidos por síntese química por Ramada e colaboradores (Ramada *et al.*, 2017), vê-se que Gr01 demonstra uma atividade antimicrobiana superior à de Tc02, com MIC de 0,5µM e de 10,67µM, respectivamente (**Tabela 14**). À exceção dos peptídeos At04 e Tc02, todos os demais possuem ação contra *E. coli* (Ramada *et al.*, 2017). Ademais, híbridos de peptídeos antimicrobianos já foram produzidos. Por exemplo, a expressão de uma proteína híbrida da melitina e da LL-37 fusionada a SUMO obteve um bom rendimento em *E. coli* (Wu *et al.*, 2014).

Até mesmo a intensidade da ação antimicrobiana condiz com os resultados encontrados por Ramada e colaboradores (2017), pois a quimera Gr01 causou maior inibição do aumento da densidade das culturas de *E. coli* ao longo do tempo que a quimera Tc02. Na tabela 14, é possível ver que o valor de MIC de Gr01 é inferior aos valores de Tc02, At01 e Gr02, que compõem a quimera Tc02. Os peptídeos At04 e Tc01, que também constituem a quimera Gr01 não demonstraram ação contra *E. coli*. Deste modo, apenas Gr01 deve ter contribuído para a atividade antimicrobiana. Na construção Tc02, At01 apresentaram ambos um MIC de 64 µM e Gr02 de 4 µM. Provavelmente este último sendo o maior contribuinte para a morte celular. Neste caso, poderia se concluir que um peptídeo com valor de MIC baixo, Gr01, pode ter contribuição superior para a morte celular que a ação sinérgica dos peptídeos Tc02, Gr02 e At01 da outra quimera. Uma peculiaridade estrutural importante de ser mencionada é que os peptídeos testados por Ramada e colaboradores possuem uma alfa amidação na região C-terminal do peptídeo. Essa modificação está presente naturalmente em diversos peptídeos  $\alpha$ -helicoidais e contribui para sua estabilidade e atividade, mas em peptídeos antimicrobianos, a sua presença não é essencial para a sua atividade (Nguyen *et al.*, 2010). Os peptídeos

encriptados nas quimeras produzidas nesse trabalho não possuem essa modificação pós-traducional (PTM), mas essa ausência não comprometeu a atividade dos peptídeos.

Foram obtidas evidências de que as proteínas quiméricas produzidas, ou os fragmentos liberados por proteólise das quimeras, possuem atividade antimicrobiana. Assim, ainda não é possível discernir se os PAM tiveram sua atividade silenciada em alguma medida, quando expressos no interior das quimeras. Contudo, proteínas quiméricas contendo domínios de outros peptídeos antimicrobianos já foram produzidas por alfaiataria molecular, como por exemplo uma proteína que continha a alfa-defensina 5 e a fosfolipase A2 humanas e que formava corpos de inclusão (Roca-Pinilla *et al.*, 2020). Essa estratégia preveniu tanto a ação tóxica da proteína para a bactéria de expressão como a degradação do produto recombinante por proteases intracelulares. Uma das contribuições do presente trabalho é mostrar evidências de que esses peptídeos, validados quando produzidos por SPPS, são antimicrobianos também quando recombinantes. Isso foi demonstrado por meio dos ensaios de cinética e por comparação da massa celular entre os controles não induzidos e culturas induzidas para a produção das quimeras.

A linhagem bacteriana *E. coli* (KRX) foi escolhida para a expressão heteróloga por possuir eficiente controle dos níveis de expressão de genes regulados pelo promotor T7, antes da adição do indutor. Isso porque a linhagem contém uma cópia da T7 RNA Polimerase controlada pelo promotor de ramnose (rhaBAD). Desse modo, antes da adição do indutor, quase não há o efeito de vazamento (*leaking*) das proteínas recombinantes. Caso isso acontecesse, poderiam ser vistas ainda menos colônias nas placas de transformação e talvez até mesmo o crescimento em meio líquido para a indução poderia ser comprometido. Evitar a expressão basal é essencial quando se expressam proteínas que podem ser tóxicas para a célula, de modo que o controle da expressão é imperativo para o sucesso da produção do PAM (Deo *et al.*, 2022). Ademais, essa linhagem possui maior rendimento de proteínas recombinantes que linhagens derivadas de BL21(DE3) (Hartnett *et al.*, 2006).

A forte inibição do crescimento observada pode ser resultado de uma reação em cadeia. As proteínas antimicrobianas quiméricas ou os peptídeos antimicrobianos liberados pela clivagem das proteínas quiméricas ou ambos, não o sabemos, poderiam estar agindo em duas frentes. Durante sua produção, de dentro para fora, os peptídeos lisariam a membrana e talvez atuariam em alvos intracelulares. Ainda, quando liberados por lise da célula produtora,

**Tabela 14. Concentração inibitória mínima (μM) dos peptídeos.** Concentração inibitória mínima (μM) dos peptídeos utilizados para a construção das proteínas quiméricas.

Adaptada de Ramada *et al.*, 2017.

| Peptídeos | Concentração Inibitória Mínima (μM ± SD) |                               |                          |                        |                              |                           |                                               |                               |
|-----------|------------------------------------------|-------------------------------|--------------------------|------------------------|------------------------------|---------------------------|-----------------------------------------------|-------------------------------|
|           | <i>Escherichia coli</i>                  | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | <i>Bacillus subtilis</i> | <i>Bacillus cereus</i> | <i>Staphylococcus aureus</i> | <i>Erwinia carotovora</i> | <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>Tabaci</i> | <i>Xanthomonas campestris</i> |
| At01      | 64.0 ± 0.0                               | 32.0 ± 0.0                    | 16.0 ± 0.0               | 128.0 ± 0.3            | 16.0 ± 0.0                   | 256.0 ± 0.0               | 16.0 ± 0.0                                    | 128.0 ± 0.0                   |
| At04      | N/A                                      | N/A                           | 256.0 ± 0.0              | N/A                    | 16.0 ± 0.0                   | N/A                       | N/A                                           | N/A                           |
| Gr01      | 0.5                                      | 3.33 ± 1.15                   | 1.0                      | 1.0                    | 0.83 ± 0.29                  | 0.5                       | 1.0                                           | 1.0                           |
| Gr02      | 4.0                                      | 32.0                          | 1.0                      | 4.0                    | 1.0                          | 1.0                       | 2.0                                           | 4.0                           |
| Tc01      | N/A                                      | N/A                           | N/A                      | N/A                    | N/A                          | N/A                       | N/A                                           | N/A                           |
| Tc02      | 10.67 ± 4.61                             | 16.0                          | 4.0                      | 13.33 ± 4.61           | 8.0                          | 16.0                      | 4.0                                           | 16.0                          |
| DS01      | 1.0                                      | 2.0                           | 1.0                      | 16.0                   | 8.0                          | 0.5                       | 1.0                                           | 0.5                           |

agiriam de fora para dentro nas membranas das células circunvizinhas, como um peptídeo antimicrobiano nativo. Deve-se ponderar, contudo, que a eficiência de ação dos antimicrobianos que estão no meio intra e extracelulares provavelmente são diferentes, visto que a composição da solução onde os PAM estão altera a sua estruturação (Brodgen, 2005). A ação antimicrobiana talvez houvesse sido impedida caso as quimeras formassem corpos de inclusão. Um trabalho bastante esclarecedor é o de Roca-Pinilla e colaboradores, onde são produzidas proteínas-multidomínio. Uma delas, a JAMF1, continha a alfa-defensina humana 5 (HD5), o domínio de ligação bacteriano gelsolina e o peptídeo antimicrobiano sPLA<sub>2</sub> flanqueados por domínios de agregação. Houve uma redução notória na O.D.<sub>600</sub>, indicando maior morte celular, nas proteínas sem os domínios de agregação em relação às proteínas que os possuíam (Roca-Pinilla *et al.*, 2021).

Desse modo, parece haver uma reação em cadeia na qual as células são lisadas e cada vez mais PAM são liberados no meio de cultura. Pelos dados observados nos experimentos de cinética, esse efeito parece ser constante, mas não cumulativo. Isto porquanto a inibição do crescimento persistiu durante as três horas monitoradas em comparação com a cultura controle, indicando morte celular, mas não havia um decréscimo grande na densidade. Embora houvesse uma redução na O.D.<sub>600</sub> em comparação com a última medição em determinados momentos do ensaio de cinética de crescimento, também era observado seu aumento em outros. Assim, ao mesmo tempo que várias células morriam, novas eram produzidas por divisão celular. Pode-se supor também que, ao passo que eram produzidos novos PAM, os anteriormente produzidos eram degradados pela ação de proteases. Peptídeos antimicrobianos são facilmente hidrolisados por proteases, que são comumente produzidas por bactérias. Se as quimeras Gr01 e Tc02 foram identificadas no lisado por Western Blot, mas não obtidas purificadas e em quantidade suficiente para identificá-las por espectrometria de massa, um método mais sensível, é razoável pensar que tenha ocorrido degradação ou outra perda ao longo do processamento da amostra, sendo cumulativo a cada etapa adicional de purificação. Uma cecropina A com calda de histidina foi expressa em *E. coli* com um rendimento de fusão igual a 4,85µg/mg de células secas, mas um baixo rendimento, de 0,41µg/mg de peptídeo puro após clivagem da HisTag e grau de pureza também baixo para aplicação industrial, igual a 92,1% (Wang *et al.*, 2018).

Outro fator importante a ser considerado é a toxicidade do indutor de expressão IPTG. O trabalho de Greenshields e colaboradores (2008) buscou expressar o peptídeo antimicrobiano hepicidina de salmão com sequência peptídica simples e com a sequência fusionada à HisTag. Eles observaram que células não induzidas ou células induzidas com baixas concentrações de

IPTG cresciam a uma densidade bem maior que as células tratadas com concentrações mais altas, mas ainda usuais de IPTG. O peptídeo induzido em sequência simples não foi encontrado no meio, enquanto que o peptídeo ligado a HisTag foi expresso, tendo sido isolado de corpos de inclusão. O peptídeo chegou a um rendimento de 30mg/ L, após a purificação. Nesse caso, eles usaram uma HisTag e um sítio de clivagem TEV entre ambos. Interessante notar que na expressão de GST\_Gr01 foi usado apenas ramnose como indutor, enquanto que nas quimeras Gr01 e Tc02 usou-se IPTG e ramnose. Atribui-se a maior parte do efeito de inibição do crescimento aos antimicrobianos, mas se pode acreditar certo efeito inibitório também ao IPTG.

Uma diferença experimental, que não se pode ser desconsiderada, é que a cultura da quimera GST\_Gr01 foi crescida em meio com ampicilina e as culturas das quimeras Gr01 e Tc02 foram crescidas em um meio com canamicina. Embora ambos os antibióticos sejam bactericidas, sendo eficientes contra bactérias sem o gene de resistência, a ampicilina age inibindo o último estágio de síntese da parede celular, enquanto a canamicina liga-se à subunidade 30S do ribossomo, comprometendo a síntese proteica. Outra possibilidade para aumentar a quantidade de proteínas expressas poderia ser começar a indução das bactérias com uma O.D.<sub>600</sub> maior, como fizeram Pane e colaboradores (2015).

Surpreendentemente, as bactérias transformadas produziram a cauda de glutathione-S-transferase, mas não foi identificado conteúdo algum da parte antimicrobiana das quimeras. Ainda mais, se encontrou a sequência *linker* entre a GST e o primeiro PAM. Talvez, possa haver algum mecanismo genético que reconheça a toxicidade dos genes e os editem para que sejam parcialmente produzidos ou mesmo impeça a sua expressão. Não se sabe se esse mecanismo ocorre no momento da transcrição, reconhecendo o próprio DNA ou RNA recém sintetizado como potencial codificador de uma molécula tóxica, ou se a regulação ocorre durante a tradução do RNA em proteína. Também tentamos realizar a síntese *cell-free* da quimera Gr01, mas nenhum produto foi obtido. Um efeito de inibição de síntese no sistema *cell-free*, também com extrato bacteriano, pelo peptídeo pirrocoricina foi verificado por Taniguchi e colaboradores (2016) na etapa de tradução. Talvez algo semelhante tenha ocorrido aqui. Pode ser que a síntese tenha gerado algum produto não detectável que tenha inibido a continuação da síntese antes que mais material fosse produzido. O gasto de energia metabólica com essas etapas, caso existam, poderia contribuir para os efeitos observados sobre o crescimento bacteriano. Essas hipóteses também são válidas para as outras quimeras aqui estudadas. Com a detecção do produto recombinante, cai por terra a sugestão de que o plasmídeo tenha sido expelido pela bactéria. Embora não seja membranolítico, é interessante a descoberta de que o

derivado da apidaecina, Api137, é capaz de se ligar aos ribossomos de *E. coli* e capturar os fatores de liberação 1 e 2, restringindo sua disponibilidade na célula para agir na tradução de outros peptídeos e proteínas e impedindo a maquinaria de síntese proteica (Florin *et al.*, 2017).

Pode ser, ainda, que todo o produto gênico tenha sido produzido, GST fusionada à quimera, e que o restante da quimera tenha sido degradado antes da purificação. A mesma cecropina A que foi citada por ter sido expressa com HisTag em *E. coli*, também foi produzida na bactéria por fusão com o peptídeo ELK16, que forma corpos de inclusão e pode ter evitado a ação de proteases (Pane *et al.*, 2015, Wang *et al.*, 2018). Outro grupo conseguiu produzir o PAM derivado da trombina, GKY20, fusionado a uma pequena ribonuclease do anfíbio *Rana pipiens*, a onconase, que também forma corpos de inclusão (Pane *et al.*, 2015). Nesse mesmo estudo, foi mostrada a ação da quimera com a onconase e do peptídeo sozinho contra *E. coli*. Desse modo, a ação da quimera foi silenciada por estar em corpos de inclusão. Há um resíduo de arginina entre o *linker* e o primeiro PAM da quimera GST\_Gr01. Ao longo da quimera há ainda ao menos 17 resíduos de arginina e de lisina somados, típicos de PAM, alvo para proteases. Com relação ao íon  $[M + H]^+ = 1.711,93$ . O último resíduo do sítio do Fator Xa é um resíduo de arginina, resíduo que possibilita a clivagem da ligação peptídica pela tripsina, de modo que esse fragmento não poderia se estender a sequência antimicrobiana, a menos que a tripsina não houvesse cortado aquele sítio por algum motivo, o que não foi visto.

Caso tenham sido produzidos, os fragmentos antimicrobianos seriam muito pequenos para serem detectados. Di Somma e colaboradores conseguiram produzir a defensina encriptada C-15867 de *Hermetia illucens* fusionada à GST. Eles identificaram por SDS-PAGE tanto a presença da fusão completa com o antimicrobiano como também outra banda correspondente apenas à massa molecular da GST. Eles atribuíram a presença da banda correspondente à GST a uma possível clivagem da fusão ou à parada da tradução da sequência na junção entre a proteína de fusão e seu parceiro (Di Somma *et al.*, 2022). O mesmo grupo conseguiu obter a defensina pura após clivar a GST com a trombina. Moon *et al.* (2006) expressaram uma catelicidina LL-37 recombinante também fusionada a GST em *E. coli*. Eles adicionalmente utilizaram um sítio TEV e, após a clivagem e purificação por HPLC, obtiveram um rendimento de 0,3mg/L. Uma das possíveis explicações para esse rendimento é a degradação durante a indução e o processamento, devido a proteases bacterianas e a perda de material.

Entretanto, há casos em que a proteína de fusão é suficiente para silenciar a atividade do PAM. Por exemplo, a fusão entre a tiorredoxina e a pediocina A (PA-1) não é tóxica para a bactéria, mas, a partir da clivagem com enteroquinase, PA-1 passa a ser ativa (Beaulieu *et al.*, 2007). Modificações simples podem ser cruciais. Montigny e colaboradores (2004) conseguiram expressar peptídeos transmembrânicos do vírus da hepatite C, tóxicos para a célula, ao fusioná-los à GST e acrescentar os resíduos de asparagina e prolina anteriormente a sequência do peptídeo. A inibição, mas não anulação, do efeito tóxico se deu provavelmente pela formação de agregados proteolíticos. Outro parceiro de fusão insolúvel que possibilitou a expressão do PAM LAH4 é o domínio de dobramento da histona (*histone fold domain*) do fator de transcrição humano TAF12 (Vidovic *et al.*, 2009). Essa fusão, assim como as quimeras Gr01, Tc02 e GST\_Gr01, foi expressa com 1 mM de IPTG a partir de 0,5-0,6 de O.D.<sub>600</sub>. Outra explicação é algum mecanismo genético na bactéria que tenha editado o plasmídeo.

Neste trabalho, também foi induzida a expressão heteróloga dos peptídeos Cc00 e Cc11, peptídeos intragênicos derivados do café. Surpreendentemente, Cc11 apresentou ação antimicrobiana, pois ele foi buscado pelo Kamal usando parâmetros para outra atividade biológica. Contudo, ele não foi detectado por Western blot, espectrometria de massa ou outro método de detecção, de modo que ainda não se pode afirmar com maior grau de certeza que ele foi produzido. Uma possível explicação para que o peptídeo Cc11 não tenha sido identificado por Western blot como Gr01 e Tc02 é o fato de sua sequência ser mais curta. É possível que o menor tamanho do peptídeo tenha tornado mais difícil a interação entre o anticorpo anti-HisTag e o peptídeo. Mesmo tendo-se corrido um gel de agarose com maior concentração, é possível que não tenha sido suficiente para separar e conter a molécula no gel. Esse aspecto pode ser somado ao fato de Cc11 possuir dois resíduos de lisina ao longo da sequência, que o torna também um peptídeo susceptível à degradação por proteases bacterianas.

Talvez Cc11 fosse protegido da degradação caso fosse direcionado para corpos de inclusão. Isso foi feito com o peptídeo PFWRIRIRR, fusionado à cetoesteróide isomerase, produzido em bactéria, mesmo com resíduos de arginina no meio de sua sequência (Zorko *et al.*, 2009). Assim, os fragmentos da digestão de Cc11 seriam pequenos demais para serem detectados no gel SDS-PAGE, por espectrometria de massa e para interagirem com o anticorpo, embora pentâmeros de resíduos de aminoácido já tenham sido detectados (Lucchese *et al.*, 2007). Se por um lado, a estratégia de formar corpos de inclusão com o produto recombinante facilita a purificação, o oposto, gerar antimicrobianos recombinantes solúveis também funciona. Isso foi testado com o PAM pexiganan, análogo da magainina, fusionado ao

polipeptídeo surfactante DAMP4 (Zhao *et al.*, 2014). Entretanto, a ação antimicrobiana vista nas culturas de Cc11 induzidas foi superior até mesmo à quimera Tc02. Esse dado aponta para a expressão do peptídeo Cc11 cujo efeito não seria explicado tão somente pela ação inibitória do indutor IPTG. O peptídeo cC1a-c originado de *Coffea canephora* já foi descrito como um peptídeo capaz de penetrar as células e possuir parte da sua estrutura anfipática, embora tenha carga negativa (Tam *et al.*, 2023). Entretanto, são necessárias novas tentativas de identificação de Cc11 para confirmar a expressão heteróloga da molécula. Ainda, seja por produção recombinante ou por síntese química, é importante que esse PAI seja purificado para a realização de ensaio de MIC que confirme sua atividade como peptídeo antimicrobiano.

O peptídeo Cc00, o outro peptídeo intragênico encontrado no genoma do café, foi expresso e purificado. Logo após a purificação do lisado celular na HisTrap e na SPE, Cc00 já foi detectado por espectrometria de massa com a massa média predita. A expressão e obtenção de Cc00 íntegro foi de fundamental importância para o presente trabalho, na medida em que essa molécula funcionou como um controle positivo do sistema, uma comprovação que o sistema de expressão é uma plataforma funcional, capaz de produzir peptídeos maduros. O vetor de expressão, pET, o microorganismo produtor *E. coli* (KRX), e o indutor, IPTG, foram os mesmos usados na expressão das quimeras. Deste modo, as diferenças de comportamento entre as moléculas podem ser atribuídas com maior confiança a aspectos estruturais e de bioatividade das mesmas e não a variações das condições de expressão.

O peptídeo Cc00, o outro peptídeo intragênico encontrado no genoma do café, foi expresso e purificado. Logo após a purificação do lisado celular na HisTrap e na SPE, Cc00 já foi detectado por espectrometria de massa com a massa média predita. A expressão e obtenção de Cc00 íntegro foi de fundamental importância para o presente trabalho, na medida em que essa molécula funcionou como um controle positivo do sistema, uma comprovação que o sistema de expressão é uma plataforma funcional, capaz de produzir peptídeos maduros. O vetor de expressão, pET, o microorganismo produtor *E. coli* (KRX), e o indutor, IPTG, foram os mesmos usados na expressão das quimeras. Deste modo, as diferenças de comportamento entre as moléculas podem ser atribuídas com maior confiança a aspectos estruturais e de bioatividade das mesmas e não a variações das condições de expressão.

Foi necessário usar o processo de calibração proximal externa para identificação de Cc00 devido ao fato de a amostra ser produto de expressão heteróloga, pois pode haver isoformas e é necessário garantir a integridade do produto final. Neste método de calibração, a

amostra e o calibrante são plaqueadas em posições próximas, mas não misturadas, de modo que ambas experimentem condições semelhantes nos momentos da ionização e detecção, o que garante medidas de massa mais acuradas. A bactéria acaba por produzir diferentes proteoformas. Vários peptídeos de maior ou menor tamanho são produzidos, devido a erros de processamento. Ademais, alguns dos peptídeos produzidos podem ser degradados por proteases. Assim, o que se vê no espectro de massa não é uma distribuição monoisotópica, mas uma distribuição aproximadamente normal. Não foi observada uma ação antimicrobiana para esse peptídeo. De fato, a cultura induzida para Cc00 apresentou valores de densidade inferiores comparados aos das culturas-controle não induzidas de Gr01 e de Tc02. Diferença que pode ser explicada pela ação inibidora de crescimento do IPTG ou da energia metabólica gasta para a produção do PAI, mas não PAM, recombinante. Isso era esperado visto que os parâmetros de busca do Kamal foram modificados para buscar peptídeos com outra atividade biológica de interesse do nosso grupo, resultando na sequência de Cc00. Embora já tenha sido obtido material puro de Cc00, os testes de atividade biológica e de estrutura secundária, como por exemplo dicroísmo circular, não foram realizados devido às restrições temporais de entrega desse manuscrito.

A obtenção da massa média calculada para o peptídeo Cc00 já apontava para a integridade da sua sequência. Após a digestão triptica do produto da expressão purificado, foi possível sequenciar o fragmento de  $[M + H]^+ = 2.344,15$  Da por MALDI-TOF/TOF/MS e verificar que a sequência desse fragmento estava íntegra. Por ESI-Q-TOF/MS foi possível identificar outro íon importante,  $[M + 6H]^+ = 1.039,49$  Da, equivalente ao fragmento predito de 6.231,974 Da. A diferença de carga e de íons encontrados em máquinas distintas se deve ao fato de as fontes de ionização serem diferentes. A fonte de ionização MALDI favorece a geração de íons de carga simples e dupla, enquanto que a ionização por eletrospray favorece a geração de íons de múltiplas cargas, além de os detectores possuírem sensibilidades distintas. A comparação do trabalho com Cc11 e C00 mostra a diferença entre se trabalhar com um peptídeo bioativo antimicrobiano e um peptídeo putativamente bioativo para outra atividade, originados do mesmo genoma.

## 7. CONCLUSÃO

Neste trabalho, foi possível detectar a produção, ao menos parcial, das quimeras de peptídeos antimicrobianos Gr01, Tc02 e GST\_Gr01. Isso demonstra, mais uma vez, a forte ação antimicrobiana desses peptídeos encriptados, agora validados também quando produzidos por

expressão heteróloga. Com os resultados expostos, também há evidência de que o peptídeo Cc11 possua atividade antimicrobiana. Por fim, foi produzido e purificado o peptídeo Cc00 completamente processado.

É possível realizar outros estudos para investigar o mecanismo de reconhecimento molecular das sequências antimicrobianas. Existe a possibilidade de que esse mecanismo de reconhecimento e edição de material genético potencialmente tóxico seja universal, embora com diferenças mais ou menos sutis, entre diferentes organismos. Outra abordagem válida trata da possibilidade de se testar novos arcabouços de encriptação de peptídeos antimicrobianos, que permitam de fato silenciar sua atividade.

Ao se observar o que parece ser inicialmente uma atividade antimicrobiana de Cc11, propõe-se novas tentativas de produção, detecção e purificação desta molécula. Uma proposta é tentar realizar a síntese química em fase sólida de Cc11 e, após sua purificação, realizar testes de MIC em diferentes microrganismos patogênicos. O peptídeo Cc00 foi integralmente produzido e purificado. Sugere-se a realização de experimentos de dicroísmo circular, para avaliar sua estrutura secundária, dentre outros experimentos estruturais e testes de sua atividade biológica.

Finalmente, através desse trabalho foram produzidas novas quimeras e peptídeos encriptados e foi demonstrado o funcionamento de um eficiente sistema de produção destes últimos em *E. coli*. Esse sistema de expressão pode ser usado para o estudo de diversos outros peptídeos, inclusive os intragênicos, expressos na forma nativa ou mesmo moléculas completamente novas, na condição de se buscar conhecer, de querer saber a verdade e de se contemplar a realidade do funcionamento do sistema mencionado.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Associação Brasileira dos Produtores de Algodão (Abrapa). Disponível em: <https://app.powerbi.com/view?r=eyJrIjozMzlmMzNiMjltMjg4Mi00NWVhYzQtMWVlMmI4OGQ5YjU0IiwidCI6IjRhMDk1OGIzLTg4MWQzNDNmYS05NTU1LTlwaODQ1MzdhYWZkMyJ9> Acesso em: 15/11/2024.

Associação Nacional das Indústrias Processadoras de Cacau (ANIP). Disponível em: <https://aipc.com.br/estatisticas/exportacao/> Acesso em: 15/11/2024.

AGRILLO, B.; PORRITIELLO, A.; GRATINO, L.; BALESTRIERI, M.; PROROGA, Y. T.; MANCUSI, A.; COZZI, L.; VICENZA, T.; DARDANO, P.; MIRANDA, B.; ESCRIBÁ, P. V.; GOGLIETTINO, M.; PALMIERI, G. Antimicrobial activity, membrane interaction and structural features of short arginine-rich antimicrobial peptides. **Front. Microbiol.**, 5; 14:1244325. 2023.

AL KASHGRY, N. A. T.; ABULREESH, H. H.; EL-SHEIKH, I. A.; ALMAROAI, Y. A.; SALEM, R.; MOHAMED, I.; WALY, F. R.; OSMAN, G.; MOHAMED, M. S. M. Utilization of a recombinant defensin from Maize (*Zea mays* L.) as a potential antimicrobial peptide. **AMB Express.**, 25; 10(1):208. 2020.

ARISTÓTELES. *Metaphysics*.

ARISTÓTELES. *Physics*.

BAHAR, A. A.; REN, D. Antimicrobial peptides. **Pharmaceuticals (Basel)**, 28; 6(12):1543-75. 2013.

BEAULIEU, L.; TOLKATCHEV, D.; JETTÉ, J. F.; GROLEAU, D.; SUBIRADE, M. Production of active pediocin PA-1 in *Escherichia coli* using a thioredoxin gene fusion expression approach: cloning, expression, purification, and characterization. **Can J Microbiol.**, 53(11):1246-58. 2007.

BECHINGER, B.; LOHNER, K. Detergent-like actions of linear amphipathic cationic antimicrobial peptides. **Biochim Biophys Acta.**, 1758(9):1529-39. 2006.

BELLAMY, W.; TAKASE, M.; WAKABAYASHI, H.; KAWASE, K.; TOMITA, M. Antibacterial spectrum of lactoferricin B, a potent bactericidal peptide derived from the N-terminal region of bovine lactoferrin. **J Appl Bacteriol.**, 73(6):472-9. 1992.

BLOTNICK, E.; SOL, A.; BACHRACH, G.; MUHLRAD, A. Interactions of histatin-3 and histatin-5 with actin. **BMC Biochem.**, 6; 18(1):3. 2017.

BOBONE, S.; ROVERSI, D.; GIORDANO, L.; DE ZOTTI, M.; FORMAGGIO, F.; TONIOLO, C.; PARK, Y.; STELLA, L. The lipid dependence of antimicrobial peptide activity is an unreliable experimental test for different pore models. **Biochemistry**, 21; 51(51):10124-6. 2012.

BRAND, G. D. **Estratégias para a prospecção e predição de peptídeos bioativos**. Tese (Doutorado em Biologia Animal). Universidade de Brasília, Brasília, Brasil. 2007.

BRAND, G. D.; MAGALHÃES, M. T. Q.; TINOCO, M. L. P.; ARAGÃO, F. J. L.; NICOLI, J.; KELLY, S. M.; COOPER, A.; BLOCH, C. Probing protein sequences as sources for encrypted antimicrobial peptides. **PLoS One**, 7:e45848. 2012.

BRAND, G. D.; RAMADA, M. H. S.; GENARO-MATTOS, T. C.; BLOCH, C. Towards an experimental classification system for membrane active peptides. **Sci Rep.**, 19;8(1):1194. 2018.

BRAND, G. D.; RAMADA, M. H. S.; MANICKCHAND, J. R.; CORREA, R.; RIBEIRO, D. J. S.; SANTOS, M. A.; VASCONCELOS, A. G.; ABRÃO, F. Y.; PRATES, M. V.; MURAD, A. M.; CARDOZO, F. J. L.; LEITE, J. R. S. A.; MAGALHÃES, K. G.; OLIVEIRA, A. L.; BLOCH, C. Intragenic antimicrobial peptides (IAPs) from human proteins with potent antimicrobial and anti-inflammatory activity. **PLoS One**, 6; 14(8): e0220656. 2019.

Brogden, K. A. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? **Nat Rev Microbiol.**, 3 (3):238-50. 2005.

CAPPARELLI, R.; ROMANELLI, A; IANNACCONE, M; NOCERINO, N; RIPA, R; PENSATO, S; PEDONE, C; IANNELLI, D. Synergistic antibacterial and anti-inflammatory activity of temporin A and modified temporin B in vivo. **PLoS One**, 28; 4(9):e7191. 2009.

CHEN, E. H.; WANG, C. H.; LIAO, Y. T.; CHAN, F. Y.; KANAOKA, Y.; UCHIIHASHI, T.; KATO, K.; LAI, L.; CHANG, Y. W.; HO, M. C.; CHEN, R. P. Visualizing the membrane disruption action of antimicrobial peptides by cryo-electron tomography. **Nat Commun.**, 6; 14(1):5464. 2023.

CHEN, N.; JIANG, C. Antimicrobial peptides: Structure, mechanism, and modification. **Eur J Med Chem.**, 255:115377. Epub 20. 2023.

COCA, M.; PEÑAS, G; GÓMEZ, J; CAMPO, S; BORTOLOTTI, C; MESSEGUER, J; SEGUNDO, B. S. Enhanced resistance to the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae* conferred by expression of a cecropin A gene in transgenic rice. **Planta**, 223(3): 392-406. 2006.

COHEN, S. N.; CHANG, A. C.; BOYER, H. W.; HELLING, R. B. Construction of biologically functional bacterial plasmids in vitro. **Proc Natl Acad Sci U. S. A.**, 70(11): 3240-4. 1973.

COMPANY, N.; NADAL, A.; RUIZ, C.; PLA, M. Production of phytotoxic cationic  $\alpha$ -helical antimicrobial peptides in plant cells using inducible promoters. **PLoS One**, 11; 9(11):e109990. 2014.

DATHE, M.; WIEPRECHT, T. Structural features of helical antimicrobial peptides: their potential to modulate activity on model membranes and biological cells. **Biochim Biophys Acta**, 15; 1462 (1-2):71-87. 1999.

DENG, T.; G. E. H.; HE, H.; LIU, Y.; ZHAI, C.; FENG, L.; YI, L. The heterologous expression strategies of antimicrobial peptides in microbial systems. **Protein Expr Purif.**, 140:52-59. 2017.

DEO, S.; TURTON, K. L.; KAINTH, T.; KUMAR, A.; WIEDEN, H. J. Strategies for improving antimicrobial peptide production. **Biotechnol Adv.**, 59:107968. 2022.

- DI SOMMA, A.; MORETTA, A.; CANÉ, C.; SCIEUZO, C.; SALVIA, R.; FALABELLA, P.; DUILIO, A. Structural and Functional Characterization of a Novel Recombinant Antimicrobial Peptide from *Hermetia illucens*. **Curr Issues Mol Biol.**, 44(1): 1-13. 2021.
- FAHMY, L.; ALI, Y. M.; SEILLY, D.; MCCOY, R.; OWENS, R. M.; PIPAN, M.; CHRISTIE, G.; GRANT, A. J. An attacin antimicrobial peptide, Hill\_BB\_C10074, from *Hermetia illucens* with anti-*Pseudomonas aeruginosa* activity. **BMC Microbiol.**, 23(1):378. 2023.
- FAN, L.; SUN, J.; ZHOU, M.; ZHOU, J.; LAO, X.; ZHENG, H.; XU, H. DRAMP: a comprehensive data repository of antimicrobial peptides. **Sci Rep.**, 6: 24482. 2016.
- FENG, X.; CHANG, R.; ZHU, H.; YANG, Y.; JI, Y.; LIU, D.; QIN, H.; YIN, J.; RONG, H. Engineering Proteins for Cell Entry. **Mol Pharm.**, 20(10): 4868-4882. 2023.
- FLEMING, A. On a Remarkable Bacteriolytic Element Found in Tissues and Secretions. **Proceedings of the Royal Society of London**, Series B, 93, 306-317. 1922.
- FLORIN, T.; MARACCI, C.; GRAF, M.; KARKI, P.; KLEPACKI, D.; BERNINGHAUSEN, O.; BECKMANN, R.; VÁZQUEZ-LASLOP, N.; WILSON, D. N.; RODNINA, M. V.; MANKIN, A. S. An antimicrobial peptide that inhibits translation by trapping release factors on the ribosome. **Nat Struct Mol Biol.**, 24(9):752-757. 2017.
- GREENSHIELDS, A. L.; KNICKLE, L. C.; SYVITSKI, R.; DOUGLAS, S. E. Strategies for recombinant expression of small, highly disulphide-bonded, cationic antimicrobial peptides. **Protein Pept Lett.**, 15(9):985-94. 2008.
- HANCOCK, R. E. Cationic peptides: effectors in innate immunity and novel antimicrobials. **Lancet Infect Dis.**, 1(3): 156-64. 2001.
- HANCOCK, R. E.; DIAMOND, G. The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defences. **Trends Microbiol.**, 8(9):402-10. 2000.
- HARTNETT, J. H.; GRACYALNY, M. S. J.; SLATER, M. R. The single step (KRX) competent cells: Efficient cloning and high protein yields. **Promega Notes**, 94:27-30. 2006.
- HÖNG, K.; AUSTERLITZ, T.; BOHLMANN, T.; BOHLMANN, H. The thionin family of antimicrobial peptides. **PLoS One**, 16(7): e0254549. 2021.
- HUAN, Y.; KONG, Q.; MOU, H.; YI, H. Antimicrobial Peptides: Classification, Design, Application and Research Progress in Multiple Fields. **Front Microbiol.**, 16; 11:582779. 2020.
- HUANG, H. W. Molecular mechanism of antimicrobial peptides: the origin of cooperativity. **Biochim Biophys Acta**, 1758(9):1292-302. 2006.
- IBRAHIM, H. R.; IMAZATO, K.; ONO, H. Human lysozyme possesses novel antimicrobial peptides within its N-terminal domain that target bacterial respiration. **J Agric Food Chem.**, 28; 59(18):10336-45. 2011.
- JACOB, F.; MONOD, J. Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. **J Mol Biol.**, 3:318-56. 1961.

- JAVED, A.; OEDAIRADJSINGH, T.; LUDWIG, I. S.; WOOD, T. M.; MARTIN, N. I.; BROERE, F.; WEINGARTH, M. H.; VELDHUIZEN, E. J. A. Antimicrobial and immunomodulatory activities of porcine cathelicidin Protegrin-1. **Mol Immunol.**, 173:100-109. 2024.
- JENSSEN, H.; HAMILL, P.; HANCOCK, R. E. Peptide antimicrobial agents. **Clin Microbiol Rev.**, 19(3): 491-511. 2006.
- KIM, D. S.; KIM, S. W.; SONG, J. M.; KIM, S. Y.; KWON, K. C. A new prokaryotic expression vector for the expression of antimicrobial peptide abaecin using SUMO fusion tag. **BMC Biotechnol.**, 19(1): 13. 2019.
- KUDDUS, M. R.; RUMI, F.; TSUTSUMI, M.; TAKAHASHI, R.; YAMANO, M.; KAMIYA, M.; KIKUKAWA, T.; DEMURA, M.; AIZAWA, T. Expression, purification and characterization of the recombinant cysteine-rich antimicrobial peptide snakin-1 in *Pichia pastoris*. **Protein Expr Purif.**, 122:15-22. 2016.
- KUDDUS, M. R.; YAMANO, M.; RUMI, F.; KIKUKAWA, T.; DEMURA, M.; AIZAWA, T. Enhanced expression of cysteine-rich antimicrobial peptide snakin-1 in *Escherichia coli* using an aggregation-prone protein coexpression system. **Biotechnol Prog.**, 33(6): 1520-1528. 2017.
- LADRAM, A.; NICOLAS, P. Antimicrobial peptides from frog skin: biodiversity and therapeutic promises. **Front Biosci.**, (Landmark Ed). 21(7):1341-71. 2016.
- LI, Y. Recombinant production of antimicrobial peptides in *Escherichia coli*: a review. **Protein Expr Purif.**, 82(1):252. 2012.
- LOBSTEIN, J.; EMRICH, C. A.; JEANS, C.; FAULKNER, M.; RIGGS, P.; BERKMEN, M. SHuffle, a novel *Escherichia coli* protein expression strain capable of correctly folding disulfide bonded proteins in its cytoplasm. **Microb Cell Fact.**, 11:56. 2012.
- LÓPEZ-CANO, A.; MARTÍNEZ-MIGUEL, M.; GUASCH, J.; RATERA, I.; ARÍS, A.; GARCIA-FRUITÓS, E. Exploring the impact of the recombinant *Escherichia coli* strain on defensins antimicrobial activity: BL21 versus Origami strain. **Microb Cell Fact.**, 21(1):77. 2022.
- LOURENÇO, A. L. P.; RIOS, T. B.; DA SILVA, A. P.; FRANCO, O. L.; RAMADA, M. H. S. Peptide Stapling Applied to Antimicrobial Peptides. **Antibiotics**, (Basel) 12(9):1400. 2023.
- LUCCHESI, G.; STUFANO, A.; TROST, B.; KUSALIK, A.; KANDUC, D. Peptidology: short amino acid modules in cell biology and immunology. **Amino Acids**, 33(4):703-7. 2007.
- LUEANGSAKULTHAI, J.; JANGPROMMA, N.; TEMSIRIPONG, T.; MCKENDRICK, J. E.; KHUNKITTI, W.; MADDOCKS, S. E.; KLAYNONGSRUANG, S. A novel antibacterial peptide derived from *Crocodylus siamensis* haemoglobin hydrolysate induces membrane permeabilization causing iron dysregulation, oxidative stress and bacterial death. **J Appl Microbiol.**, 123(4): 819-831. 2017.
- MAMAT, U.; WILKE, K.; BRAMHILL, D.; SCHROMM, A. B.; LINDNER, B.; KOHL, T. A.; CORCHERO, J. L.; VILLAVERDE, A.; SCHAFFER, L.; HEAD, S. R.; SOUVIGNIER, C.; MEREDITH, T. C.; WOODARD, R. W. Detoxifying *Escherichia coli* for endotoxin-free production of recombinant proteins. **Microb Cell Fact.**, 14:57. 2015.

MCELWAIN, L.; PHAIR, K.; KEALEY, C.; BRADY, D. Current trends in biopharmaceuticals production in *Escherichia coli*. **Biotechnol Lett.**, 44(8):917-931. 2022.

MATSUZAKI, K.; HARADA, M.; FUNAKOSHI, S.; FUJII, N.; MIYAJIMA, K. Physicochemical determinants for the interactions of magainins 1 and 2 with acidic lipid bilayers. **Biochim Biophys Acta**, 1063(1):162-70. 1991.

MATSUZAKI, K.; SUGISHITA, K.; ISHIBE, N.; UEHA, M.; NAKATA, S.; MIYAJIMA, K.; EPAND, R. M. Relationship of membrane curvature to the formation of pores by magainin 2. **Biochemistry**, 37(34):11856-63. 1998.

MCNULTY, D. E.; CLAFFEE, B. A.; HUDDLESTON, M. J.; PORTER, M. L.; CAVNAR, K. M.; KANE, J. F. Mistranslational errors associated with the rare arginine codon CGG in *Escherichia coli*. **Protein Expr Purif. Sep**;37(1):264. 2003.

MESA-GALLOSO, H.; VALIENTE, P. A.; VALDÉS-TRESANCO, M. E.; EPAND, R. F.; LANIO, M. E.; EPAND, R. M.; ALVAREZ, C.; TIELEMAN, D. P.; ROS, U. Membrane Remodeling by the Lytic Fragment of SticholysinII: Implications for the Toroidal Pore Model. **Biophys J.**, 117(9): 1563-1576. 2019.

MONTESINOS E. Antimicrobial peptides and plant disease control. **FEMS Microbiol Lett.**, 270(1):1-11. 2007.

MONTESINOS, L.; BUNDÓ, M.; IZQUIERDO, E.; CAMPO, S.; BADOSA, E.; ROSSIGNOL, M.; MONTESINOS, E.; SAN SEGUNDO, B.; COCA, M. Production of Biologically Active Cecropin A Peptide in Rice Seed Oil Bodies. **PLoS One**, 11(1):e0146919. 2016.

MONTIGNY, C.; PENIN, F.; LETHIAS, C.; FALSON, P. Overcoming the toxicity of membrane peptide expression in bacteria by upstream insertion of Asp-Pro sequence. **Biochim Biophys Acta**, 1660(1-2):53-65. 2004.

MOON, J.Y.; HENZLER-WILDMAN, K. A.; RAMAMOORTHY, A. Expression and purification of a recombinant LL-37 from *Escherichia coli*. **Biochim Biophys Acta**, 1758(9): 1351-8. 2006.

NGUYEN, L. T.; HANEY, E. F.; VOGEL, H. J. The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action. **Trends Biotechnol.**, 29(9): 464-72. 2011.

NGUYEN, L. T.; CHAU, J. K.; PERRY, N. A.; DE BOER, L.; ZAAT, S. A.; VOGEL, H. J. Serum stabilities of short tryptophan- and arginine-rich antimicrobial peptide analogs. **PLoS One**, 5(9):e12684. 2010.

NICOLAS, P. Multifunctional host defense peptides: intracellular-targeting antimicrobial peptides. **FEBS J.**, 276(22):6483-96. 2009.

NÓBREGA, M. M. **Desenho, caracterização e encriptação de peptídeos bioativos como estratégia para o processo de entrega e otimização do perfil de atividade.** Tese (Doutorado em Biologia Molecular). Universidade de Brasília, Brasília, Brasil. 2017.

OMARDIEN, S.; DRIJFHOUT, J. W.; VAZ, F. M.; WENZEL, M.; HAMOEN, L. W.; ZAAT, S. A. J.; BRUL, S. Bactericidal activity of amphipathic cationic antimicrobial peptides involves

altering the membrane fluidity when interacting with the phospholipid bilayer. **Biochim Biophys Acta Biomembr.**, 1860(11):2404-2415. 2018.

PANE, K.; DURANTE, L.; PIZZO, E.; VARCAMONTI, M.; ZANFARDINO, A.; SGAMBATI, V.; DI MARO, A.; CARPENTIERI, A.; IZZO, V.; DI DONATO, A.; CAFARO, V.; NOTOMISTA, E. Rational Design of a Carrier Protein for the Production of Recombinant Toxic Peptides in Escherichia coli. **PLoS One**, 11(1):e0146552. 2016.

PAPAREDDY, P.; RYDENGÅRD, V.; PASUPULETI, M.; WALSE, B.; MÖRGELIN, M.; CHALUPKA, A.; MALMSTEN, M.; SCHMIDTCHEN, A. Proteolysis of human thrombin generates novel host defense peptides. **PLoS Pathog.**, 6(4): e1000857. 2010.

PAPO, N.; OREN, Z.; PAG, U.; SAHL, H. G.; SHAI, Y. The consequence of sequence alteration of an amphipathic alpha-helical antimicrobial peptide and its diastereomers. **J Biol Chem.**, 277(37): 33913-21. 2002.

PARACHIN, N. S.; MULDER, K. C.; VIANA, A. A.; DIAS, S. C.; FRANCO, O. L. Expression systems for heterologous production of antimicrobial peptides. **Peptides**, 38(2):446-56. 2012.

PARK, C. B.; KIM, M. S.; KIM, S. C. A novel antimicrobial peptide from Bufo bufo gargarizans. **Biochem Biophys Res Commun.**, 218(1):408-13. 1996.

PEDERSEN, S. L.; TOFTENG, A. P.; MALIK, L.; JENSEN, K. J. Microwave heating in solid-phase peptide synthesis. **Chem Soc Rev.**, 41(5): 1826-44. 2012.

PIERRE, T. N.; SEON, A. A.; AMICHE, M.; NICOLAS, P. Phylloxin, a novel peptide antibiotic of the dermaseptin family of antimicrobial/opioid peptide precursors. **Eur J Biochem.**, 267(2):370-8. 2000.

PIERS, K. L.; BROWN, M. H.; HANCOCK, R. E. Recombinant DNA procedures for producing small antimicrobial cationic peptides in bacteria. **Gene**, 134(1):7-13. 1993.

PIRTSKHALAVA, M.; VISHNEPOLSKY, B.; GRIGOLAVA, M.; MANAGADZE, G. Physicochemical Features and Peculiarities of Interaction of AMP with the Membrane. **Pharmaceuticals**, (Basel) 14(5): 471. 2021.

PIZZO, E.; CAFARO, V.; DI DONATO, A.; NOTOMISTA, E. Cryptic Antimicrobial Peptides: Identification Methods and Current Knowledge of their Immunomodulatory Properties. **Curr Pharm Des.**, 24(10):1054-1066. 2018.

Potential biohazards of recombinant DNA molecules. **Proc Natl Acad Sci U. S. A.**, 71(7): 2593-4. 1974.

POURESMAEIL, M.; AZIZI-DARGAHLLOU, S. Factors involved in heterologous expression of proteins in E. coli host. **Arch Microbiol.**, 205(5):212. 2023.

RAAYMAKERS, C.; VERBRUGGHE, E.; HERNOT, S.; HELLEBUYCK, T.; BETTI, C.; PELEMAN, C.; CLAEYS, M.; BERT, W.; CAVELIERS, V.; BALLEET, S.; MARTEL, A.; PASMANS, F.; ROELANTS, K. Antimicrobial peptides in frog poisons constitute a molecular toxin delivery system against predators. **Nat Commun.**, 8, 1495. 2017.

RAMADA, M. H. S. **Explorando genomas: a busca por peptídeos antimicrobianos intragênicos**. Tese (Doutorado em Biologia Molecular). Universidade de Brasília, Brasília, Brasil. 2016.

RAMADA, M. H. S.; BRAND, G. D.; ABRÃO, F. Y.; OLIVEIRA, M.; CARDOZO, F. J. L.; GALBIERI, R.; GRAMACHO, K. P.; PRATES, M. V.; BLOCH, C. Encrypted Antimicrobial Peptides from Plant Proteins. **Scientific Rep.**, 7: 13263. 2017.

RIVERA-DE-TORRE, E.; RIMBAULT, C.; JENKINS, T. P.; SØRENSEN, C. V.; DAMSBO, A.; SAEZ, N. J.; DUHOO, Y.; HACKNEY, C. M.; ELLGAARD, L.; LAUSTSEN, A. H. Strategies for Heterologous Expression, Synthesis, and Purification of Animal Venom Toxins. **Front. Bioeng. Biotechnol.**, 9: 811905. 2022.

ROCA-PINILLA, R.; HOLANI, R.; LÓPEZ-CANO, A.; SAUBI, C.; BALTA-FOIX, R.; COBO, E. R.; GARCIA-FRUITÓS, E.; ARÍS, A. Sequence edition of single domains modulates the final immune and antimicrobial potential of a new generation of multidomain recombinant proteins. **Sci Rep.**, 11(1): 23798. 2021.

ROCA-PINILLA, R.; LISOWSKI, L.; ARÍS, A.; GARCIA-FRUITÓS, E. The future of recombinant host defense peptides. **Microb Cell Fact.**, 21(1): 267. 2022.

ROCA-PINILLA, R.; LÓPEZ-CANO, A.; SAUBI, C.; GARCIA-FRUITÓS, E.; ARÍS, A. A new generation of recombinant polypeptides combines multiple protein domains for effective antimicrobial activity. **Microb Cell Fact.**, 19(1): 122. 2020.

ROHDEN, F.; HOHEISEL, J. D.; WIEDEN, H. J. Through the looking glass: milestones on the road towards mirroring life. **Trends Biochem Sci.**, 46(11): 931-943. 2021.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. Molecular cloning: a laboratory manual. **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, USA, 2nd ed. New York. 1989.

SANTOS, M. A.; SILVA, F. L.; LIRA, B. O. V.; CARDOZO, F. J. L.; VASCONCELOS, A. G.; ARAUJO, A. R.; MURAD, A. M.; GARAY, A. V.; FREITAS, S. M.; LEITE, J. R. A.; BLOCH, C.; RAMADA, M. H. S.; DE OLIVEIRA, A. L.; BRAND, G. D. Probing human proteins for short encrypted antimicrobial peptides reveals Hs10, a peptide with selective activity for gram-negative bacteria. **Biochim Biophys Acta - Gen Subj.** 1867(1):130265. 2023.

SHAI, Y. Mode of action of membrane active antimicrobial peptides. **Biopolymers**, 66(4):236-48. 2002.

SHENKAREV, Z. O.; GIZATULLINA, A. K.; FINKINA, E. I.; ALEKSEEVA, E. A.; BALANDIN, S. V.; MINEEV, K. S.; ARSENIYEV, A. S.; OVCHINNIKOVA, T. V. Heterologous expression and solution structure of defensin from lentil *Lens culinaris*, **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Volume 451, Issue 2, Pages 252-257. 2014.

SHINNAR, A. E.; BUTLER, K. L.; PARK, H. J. Cathelicidin family of antimicrobial peptides: proteolytic processing and protease resistance. **Bioorg Chem.**, 31(6):425-36. 2003.

SILVA, C. C. F.; MENEZES, M. C.; PALOMINO, M.; OLIVEIRA, A. K.; IWAI, L. K.; FARIA, M.; PORTARO, F. V. Peptides derived from plasma proteins released by bothropsin, a metalloprotease present in the Bothrops jararaca venom. **Toxicon**, 137:65-72. 2017.

- TAM, J. P.; HUANG, J.; LOO, S.; LI, Y.; KAM, A. Ginsentide-like Coffeetides Isolated from Coffee Waste Are Cell-Penetrating and Metal-Binding Microproteins. **Molecules**, 28, 6556. 2023.
- TANIGUCHI, M.; KAWABE, J.; TOYODA, R.; NAMAIE, T.; OCHIAI, A.; SAITOH, E.; TANAKA, T. Cationic peptides from peptic hydrolysates of rice endosperm protein exhibit antimicrobial, LPS-neutralizing, and angiogenic activities. **Peptides**, 97:70-78. 2017.
- TANIGUCHI, M.; OCHIAI, A.; KONDO, H.; FUKUDA, S.; ISHIYAMA, Y.; SAITOH, E.; KATO, T.; TANAKA, T. Pyrrocoricin, a proline-rich antimicrobial peptide derived from insect, inhibits the translation process in the cell-free *Escherichia coli* protein synthesis system. **J Biosci Bioeng.**, 121(5):591-8. 2016.
- TRAVKOVA, O. G.; MOEHWALD, H.; BREZESINSKI, G. The interaction of antimicrobial peptides with membranes. **Adv Colloid Interface Sci.**, 247:521-532. 2017.
- TOSSI, A.; SANDRI, L.; GIANGASPERO, A. Amphipathic, alpha-helical antimicrobial peptides. **Biopolymers**, 55(1):4-30. 2000.
- VERDON, J.; FALGE, M.; MAIER, E.; BRUHN, H.; STEINERT, M.; FABER, C.; BENZ, R.; HÉCHARD, Y. Detergent-like activity and alpha-helical structure of warnericin RK, an anti-*Legionella* peptide. **Biophys J.**, 97(7):1933-40. 2009.
- VIDOVIC, V.; PRONGIDI-FIX, L.; BECHINGER, B.; WERTEN, S. Production and isotope labeling of antimicrobial peptides in *Escherichia coli* by means of a novel fusion partner that enables high-yield insoluble expression and fast purification. **J Pept Sci.**, 15(4):278-84. 2009.
- VOGEL, H.; MÜLLER, A.; HECKEL, D. G.; GUTZEIT, H.; VILCINSKAS, A. Nutritional immunology: diversification and diet-dependent expression of antimicrobial peptides in the black soldier fly *Hermetia illucens*. **Dev Comp Immunol.**, 78:141–8. 2018.
- WAGHU, F. H.; GOPI, L.; BARAI, R. S.; RAMTEKE, P.; NIZAMI, B.; IDICULA-THOMAS, S. CAMP: Collection of sequences and structures of antimicrobial peptides. **Nucleic Acids Res.**, 42(Database issue): D1154-8. 2014.
- WANG, G.; LI, X.; WANG, Z. APD3: The antimicrobial peptide database as a tool for research and education. **Nucleic Acids Res.**, 44(D1), D1087-D1093. 2016.
- WANG, M.; ZHENG, K.; LIN, J.; HUANG, M.; MA, Y.; LI, S.; LUO, X.; WANG, J. Rapid and efficient production of cecropin A antibacterial peptide in *Escherichia coli* by fusion with a self-aggregating protein. **BMC Biotechnol.**, 18(1): 62. 2018.
- WIBOWO, D.; ZHAO, C. X. Recent achievements and perspectives for large-scale recombinant production of antimicrobial peptides. **Appl Microbiol Biotechnol.**, 103(2): 659-671. 2019.
- WU, R.; WANG, Q.; ZHENG, Z.; ZHAO, L.; SHANG, Y.; WEI, X.; LIAO, X.; ZHANG, R. Design, characterization and expression of a novel hybrid peptides melittin (1-13)-LL37 (17-30). **Mol Biol Rep.**, 41(7):4163-9. 2014.

WU, Y.; HE, Y.; GE, X. Functional characterization of the recombinant antimicrobial peptide Trx-Ace-AMP1 and its application on the control of tomato early blight disease. **Appl Microbiol Biotechnol.**, 90(4):1303-10. 2011.

XIANG, J.; ZHOU, M.; WU, Y.; CHEN, T.; SHAW, C.; WANG, L. The synergistic antimicrobial effects of novel bombinin and bombinin H peptides from the skin secretion of *Bombina orientalis*. **Biosci Rep.**, 37(5): BSR20170967. 2017.

YEAMAN, M. R.; YOUNT, N. Y. Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. **Pharmacol Rev.**, 55(1):27-55. 2003.

ZASLOFF, M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. **Nature**, Vol. 45. 2002.

ZASLOFF, M. Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the U. S. A.**, 84: 5449-5453. 1987.

ZHANG, D.; HE, Y.; YE, Y.; MA, Y.; ZHANG, P.; ZHU, H.; XU, N.; LIANG, S. Little Antimicrobial Peptides with Big Therapeutic Roles. **Protein Pept Lett.**, 26(8):564-578. 2019.

ZHAO, C. X.; DWYER, M. D.; YU, A. L.; WU, Y.; FANG, S.; MIDDELBERG, A. P. A simple and low-cost platform technology for producing pexiganan antimicrobial peptide in *E. coli*. **Biotechnol Bioeng.**, 112(5):957-64. 2015.

ZHAO, X.; WU, H.; LU, H.; LI, G.; HUANG, Q. LAMP: A Database Linking Antimicrobial Peptides. **PLoS ONE**, 8(6): e66557. 2013.

ZIOUDROU, C.; STREATY, R. A.; KLEE, W. A. Opioid peptides derived from food proteins. The exorphins. **J Biol Chem.**, 254(7): 2446-9. 1979.

ZITZMANN, J.; WEIDNER, T.; CZERMAK, P. Optimized expression of the antimicrobial protein Gloverin from *Galleria mellonella* using stably transformed *Drosophila melanogaster* S2 cells. **Cytotechnology**, 69(2): 371-389. 2017.

ZORKO, M.; JAPELJ, B.; HAFNER-BRATKOVIC, I.; JERALA, R. Expression, purification and structural studies of a short antimicrobial peptide. **Biochim Biophys Acta.**, 1788(2): 314-23. 2009.

## CAPÍTULO II

### Expressão do peptídeo antimicrobiano DS 01 em *Komagataella phaffii* usando a via de processamento do fator- $\alpha$

#### 1. INTRODUÇÃO

##### 1.1. Expressão heteróloga de peptídeos em leveduras

As proteínas são macromoléculas com uma forma determinada por uma sequência de resíduos de aminoácido, cada uma portadora de características físico-químicas distintas, como carga líquida, massa molecular e hidrofobicidade (Stollar & Smith, 2020). Não apenas essas propriedades individuais de cada resíduo, mas a ordem em que eles estão organizados e a maneira como interagem entre si são determinantes para a estrutura proteica e, finalmente, sua função (Drewniak-Świtalska *et al.*, 2021; Jumper *et al.*, 2021; Stollar & Smith, 2020). Pode-se dizer que elas integram a causa material dos corpos biológicos (Aristóteles). As proteínas e peptídeos apresentam as mais diversas funções na natureza. Dentre suas finalidades estão a manutenção da estrutura dos seres vivos (proteínas estruturais), como o colágeno, e a catálise de reações químicas (enzimas), além da função de armazenamento de energia (proteínas de reserva) e de transporte de elementos necessários à vida, como a hemoglobina, que transporta o oxigênio, por exemplo (Nelson & Cox, 2017).

As proteínas são naturalmente sintetizadas a partir de moléculas de mRNA nos ribossomos de cada célula, constituindo a sua causa eficiente, a conversão de resíduos de aminoácido nas macromoléculas em questão (de Marco, 2025). Os seres humanos necessitam de proteínas em sua dieta. Há, inclusive, os aminoácidos essenciais, que o corpo humano não é capaz de produzir. Para além da alimentação, as proteínas também são empregadas como fármacos e em outras indústrias, como a têxtil e na produção de detergentes (Ahmad *et al.*, 2022; Chandra *et al.*, 2020). Após conhecer mais sobre as proteínas e peptídeos e suas diferentes bioatividades, o homem passou a investigar novas estratégias para a sua obtenção. Os peptídeos podem ser obtidos por isolamento de fontes nativas e através de estratégias artificiais de produção, por exemplo por síntese química e pela expressão heteróloga (Parachin *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2022).

A obtenção de peptídeos de fontes nativas consiste no isolamento dos peptídeos que se pretende obter a partir de um organismo no qual esses são fisiologicamente produzidos, como a insulina do fígado de porcos ou peptídeos da pele de anfíbios, assunto já explorado no capítulo

anterior. Quanto à produção de peptídeos sintéticos, produzidos a partir de reações químicas que não as realizadas fisiologicamente, há diferentes formas de produção, sendo a mais comum a síntese química em fase sólida (SPPS). O primeiro processo é apresenta baixa eficiência enquanto o segundo utiliza reagentes tóxicos (Deo *et al.*, 2022). A síntese química utiliza diversos reagentes altamente tóxicos. Há ainda um método de ligação química nativa (NCL), que liga peptídeos sintéticos entre si ou eles a peptídeos recombinantes por reações químicas não naturais (Fiore *et al.*, 2021). Esse método possibilita a produção de peptídeos longos e com modificações pós-traducionais específicas, mas não soluciona os problemas de eficiência, custo e riscos à saúde humana e ambientais da SPPS.

O terceiro processo para a obtenção de peptídeos consiste na sinergia entre razão humana e o trabalho intrínseco executado pelos organismos: a síntese proteica ribossômica de DNA exógeno, ou simplesmente expressão heteróloga. Isso pode ser feito de diferentes maneiras e de forma temporária (transiente) ou permanente por meio de técnicas de clonagem gênica e de engenharia genética. A expressão heteróloga de peptídeos, muito embora utilizada de forma massiva na indústria farmacêutica, para a produção de medicamentos e nas indústrias alimentícia e têxtil, encontra diversos desafios. Um deles é a degradação dos peptídeos recombinantes devido à falta de estabilidade e exposição a ação de proteases (Deo *et al.*, 2022; Lamer *et al.*, 2022). Dentre as estratégias para aumentar a produção de PAM estão a expressão multimérica, a fusão com proteínas de expressão e a hibridização de peptídeos (Deo *et al.*, 2022). Cada sistema de expressão possui peculiaridades que podem ser racionalmente ponderadas quando da escolha do organismo de expressão para determinada proteína que se tem a finalidade de produzir. Como visto no capítulo precedente, as bactérias são de rápido crescimento, sendo a *E. coli* muito bem conhecida e com sistema de expressão estabelecido.

Os fungos, por seu turno, apresentam grande importância na produção de alimentos e de medicamentos desde os tempos antigos aos dias atuais, contemplados com os avanços da biotecnologia (SHU, 2007). Os usos mais primitivos consistiam no uso desses microrganismos para a produção de pães, queijos, e bebidas alcoólicas. Ao longo da história, o homem investigou e desenvolveu ferramentas para se beneficiar dos produtos produzidos pelos membros do reino Fungi, a exemplo de notáveis estudos de Louis Pasteur sobre a fermentação (Pasteur, 1864). Tais produtos incluem antibióticos, álcoois, enzimas, ácidos orgânicos e diversos fármacos. As leveduras são fungos unicelulares, sendo que a primeira levedura a ser amplamente reconhecida como benéfica para a espécie humana e ter o seu genoma codificado foi *Saccharomyces cerevisiae*, a levedura fermentativa do pão. Atualmente, junto à *S.*

*cerevisiae*, outras leveduras ganharam grande destaque na área da engenharia genética, como *Pichia pastoris*, *Kluyveromyces lactis*, *Yarrowia lipolytica* (Gomes *et al.*, 2018). Uma grande vantagem das leveduras frente às bactérias é a capacidade de secreção das proteínas para o meio de cultura, o que reduz, facilita e barateia as etapas e purificação.

As leveduras têm se destacado como sistema recombinante devido a possuírem características semelhantes às das bactérias, como rápido crescimento e prescindirem de meio com nutrientes diversos. Ao mesmo tempo, elas são capazes de realizar a maioria das modificações pós-traducionais. As PTM mais comuns em leveduras são *N*-glicosilação, *O*-glicosilação, amidação, hidroxilação, metilação, acetilação e sulfonação (Gomes *et al.*, 2018). A levedura *S. cerevisiae* tem sido historicamente a mais utilizada para expressão heteróloga, com genoma bem conhecido. Ela possui tanto promotores constitutivos (*ADHI*, *GAPDH*, *PGK1*, *TEF* e *ENO*) quanto induzíveis (*GALI-10*, *CUP1*, *ADH2*). Um aspecto negativo de *S. cerevisiae* é apresentar o efeito *Crabtree*, isto é, em altas concentrações de glicose, produzir etanol por fermentação ao invés de gerar energia pela respiração celular. Ademais, *S. cerevisiae* tem sido cada vez mais substituída por *K. phaffii*, *Crabtree* negativa e produtora eficiente de produtos recombinantes. A fermentação prejudica a produção heteróloga de proteínas, porquanto pode gerar alguns subprodutos tóxicos para o microrganismo, além de ser uma via menos eficiente de produção de energia. Quanto a expressão heteróloga de peptídeos antimicrobianos em fungos, já foram produzidos alguns, como a hispidalina, a defensina do abacate, a PAF102 em *K. phaffii* (Meng *et al.*, 2017; Meng *et al.*, 2019; Popa *et al.*, 2019) e uma cecropina em *S. cerevisiae* (Xia *et al.*, 2013).

### **1.2. *Komagataella phaffii* (*Pichia pastoris*)**

A levedura originalmente classificada como *Pichia pastoris*, e então renomeada *Komagataella phaffii*, é uma levedura metilotrófica, isto é, capaz de utilizar metanol como fonte de carbono e amplamente utilizada como plataforma de expressão de proteínas heterólogas (Kurtzman, 2009). Na segunda metade da década de 1960, havia grande interesse na produção de proteínas que servissem como aditivos de ração animal (*feedstock*) usando *P. pastoris*. Esse ambiente foi possibilitado pelo baixo preço do metanol à época. A empresa Phillips Petroleum, Bartlesville, Oklahoma, desenvolveu diversos protocolos para cultura de *Pichia* em metanol (Kalidas, 2000). O aumento do preço do metanol com a crise do petróleo nos anos 1970, somado ao barateamento da soja, então a principal matéria-prima, fez o interesse na produção de matéria bruta utilizando *Pichia* reduzir drasticamente. Alguns anos depois, na

década de 80, o Salk Institute Biotechnology/ Industrial Associates (SIBIA), La Jolla, California, desenvolveu o sistema *Pichia* para a expressão de proteínas heterólogas e disponibilizou o seu acesso para laboratórios acadêmicos de pesquisa.

Há diversas características que tornaram o sistema de expressão em *Pichia* bastante popular, dentre elas o rápido crescimento, e a capacidade de alcançar altas densidades celulares. Há ainda a secreção de poucas proteínas endógenas, o que facilita a purificação. A possibilidade de se usar diversas fontes de carbono como metanol, glicose e glicerol. Outra vantagem é que *K. phaffii* é um organismo que possui STATUS GRAS (*Generally Recognized as Safe*), isto é, um organismo seguro para saúde humana e para o meio ambiente, assim como *E. coli*. Outrossim, *K. phaffii* é uma excelente secretora de proteínas. Um dos sinais de secreção mais utilizados para a expressão de proteínas em *Pichia* é o peptídeo sinal do fator  $\alpha$ , fator alfa de acasalamento de leveduras ( $\alpha$ -MF), o qual é um hormônio peptídeo produzido na forma de um pré-pró peptídeo. Assim como em bactérias, a otimização dos códons de acordo com a preferência genética de *Pichia* (*codon usage*), aumenta os níveis de expressão heteróloga. De maneira prática, aumentar o número de cópias do gene levou a maiores níveis de expressão de lisozima em *Pichia* (Yi, 2020).

Os promotores são definidos como sequências de DNA em que proteínas como a RNA polimerase podem se ligar e iniciar o processo de transcrição de genes, localizados a jusante do promotor, em moléculas de RNA mensageiro. Existem dois tipos de promotores: os constitutivos, que são expressos a todo o momento, e os promotores induzíveis, que devem ser induzidos por um agente indutor, porém como pré-requisito devem estar livres de inibidores. A levedura *K. phaffii* possui alguns promotores finamente regulados como os promotores para os genes da enzima álcool oxidase 1 (*AOX1*) e álcool oxidase 2 (*AOX2*). Esses promotores são fortes e ativos quando há a presença da molécula de metanol, porquanto a álcool oxidase é a primeira enzima da via de degradação do metanol. Promotores induzíveis são apropriados para a produção de moléculas tóxicas (Parachin *et al.*, 2012). Os promotores constitutivos mais utilizados em *K. phaffii* são o *PGK*, *GAP*, *TEF* e *YPT1*. Dentre os promotores induzíveis, os mais usados são o *AOX1*, *ADH3*, *MOX* e *PTH11*. Outro fator importante a ser considerado é o fenótipo de *K. phaffii* após a inserção do gene no promotor *AOX1*: a levedura pode metabolizar metanol à taxas normais, Mut<sup>+</sup>, ou à uma taxa mais lenta Mut<sup>S</sup>. A diferença está no número de cópias do gene *AOX1* dependendo da forma de integração do plasmídeo no genoma (Gomes *et al.*, 2018). O fenótipo Mut<sup>-</sup> descreve uma levedura com os genes *AOX* deletados, incapaz de metabolizar metanol.

A partir do momento em que a levedura é transformada, é necessário um método de seleção de clones que permita ao pesquisador distinguir os indivíduos que receberam a informação genética exógena, dos que não a receberam. Para isso, há dois diferentes tipos das chamadas marcas de seleção, a saber: as marcas de resistência a antibióticos e as marcas auxotróficas (Weiss *et al.*, 2024). As marcas de resistência a antibióticos são genes que produzem moléculas que conferem resistência às células contra o antibiótico utilizado no meio de cultura. No caso da zeocina, por exemplo, o gene que confere resistência é o *Sh ble*.

A auxotrofia consiste no comprometimento da integridade da sequência de um gene responsável por codificar alguma biomolécula componente de uma dada via biossintética (Kaplan *et al.*, 2024). Há diferentes marcas auxotróficas bem estabelecidas para arginina (*ARG1* e *ARG2*), histidina (*HIS1*, *HIS2*, *HIS5*) e uracila (*URA5*). A linhagem M12 de *K. phaffii* possui uma mutação no gene *LEU2*, envolvido na via biossintética do aminoácido leucina. No presente trabalho, foram utilizados vetores com a marca de seleção *leu2-d*, isso é, que continham a informação genética para o reestabelecimento da via biossintética de produção da leucina. Essa marca de seleção foi desenvolvida em *K. phaffii* por Betancur e colaboradores (2017). O alelo *leu2-d* contém apenas 29 pares de base do promotor da leucina de *S. cerevisiae*. Consequentemente, as células transformadas com esse método de seleção tendem a possuir múltiplas cópias desse gene para compensarem o alelo defectivo, o que se torna vantajoso para a expressão do gene heterólogo de interesse (Betancur *et al.*, 2017). A levedura *K. phaffii* apresenta como grande vantagem a capacidade de secretar eficientemente proteínas recombinantes, o que facilita a purificação, além de realizar vários tipos de MPT. Trata-se de uma plataforma de uso simples, barata e de fácil escalonamento. Por ser uma levedura fermentativa, *S. cerevisiae* converte parte da sua fonte carbônica em etanol, o que leva a uma menor biomassa e menor rendimento de proteínas heterólogas. Essa perda fermentativa não ocorre em *K. phaffii*, permitindo que a levedura atinja altas densidades celulares (Ergün *et al.*, 2021). Quanto a glicosilação, *K. phaffii* adiciona menos resíduos de manose que *S. cerevisiae*, incorrendo em eventos menos frequentes de hiperglicosilação (Bretthauer & Castillo, 1999).

### **1.3. Dermaseptina (DS 01)**

As dermaseptinas são uma superfamília de PAM presentes na secreção cutânea de rãs do gênero *Phyllomedusa*. Elas constituem o principal componente de defesa da pele destes anuros contra patógenos, integrando sua imunidade inata (Bartels *et al.*, 2019; Kastin, 2013). As dermaseptinas são moléculas policatiônicas que variam de 21 a 34 resíduos de aminoácido.

Essa classe de moléculas assume estruturação  $\alpha$ -helicoidal anfifílica quando em contato com determinadas membranas lipídicas e têm a capacidade de desestruturá-las, causando por fim o extravasamento do citosol, que resulta em morte celular. Elas são moléculas conservadas, apresentam de três a seis resíduos de lisina e um resíduo de triptofano na terceira posição, contado a partir do N-terminal (Bartels *et al.*, 2019). Na conformação  $\alpha$ -helicoidal, os resíduos hidrofóbicos se localizam de um lado da hélice e, na face oposta, os resíduos polares catiônicos (Bartels *et al.*, 2019). Em meios aquosos, as dermaseptinas se desestruturam de forma reversível.

a. 

110

polares carregados positivamente e em azul os carregados negativamente. Imagem gerada pelo software Kamal. Adaptada de Brand *et al.* (2002).

#### 1.4. Calcitonina

A calcitonina é um hormônio peptídico responsável pela redução dos níveis de cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) circulante. Esse efeito advém da inibição da atividade dos osteoclastos, células que liberam o cálcio dos ossos e o disponibilizam na corrente sanguínea (Copp *et al.*, 1992; Felsenfeld & Levine, 2015). Nos peixes, a calcitonina é secretada pelas glândulas ultimofaríngeas, análogas à tireoide (Sekiguchi, 2022). Em seres humanos, a calcitonina é produzida pelas células C ou células parafoliculares localizadas na tireoide. A calcitonina é sintetizada na forma de um pró-peptídeo e então processada (Kiriakopoulos *et al.*, 2022). Na indústria farmacêutica, a calcitonina é produzida tanto por síntese química quanto pela tecnologia do DNA recombinante. Neste estudo, o gene da calcitonina foi utilizado como controle negativo de reconhecimento da atividade antimicrobiana contra levedura.

A calcitonina humana foi descrita e purificada pela primeira vez por Copp e colaboradores em 1962 e a calcitonina de salmão foi descrita por O'Dor e colaboradores em 1969, também com a participação de Copp. A sequência genética da calcitonina utilizada no presente trabalho é a que se segue: CSNLSTCVLGKLSQELHKLQTYPRTNTGSGTPG-NH<sub>2</sub>, proveniente do salmão (*Oncorhynchus keta*). Ela possui 33 resíduos de aminoácido e apresenta uma ligação dissulfeto. O resíduo adicional de glicina se justifica pela molécula não sofrer alfa amidação na região C-terminal durante a produção heteróloga em *Pichia*. O trabalho de O'Dor, em 1969, foi o primeiro a caracterizar quimicamente uma calcitonina não proveniente de mamíferos. A calcitonina de salmão é 100 vezes mais potente que a calcitonina humana (Cruz, 1989), enquanto que a calcitonina de porcos é apenas duas vezes mais potente que a humana. Sabe-se que a calcitonina de salmão interage com membranas lipídicas e forma estruturas semelhantes a poros (Diociaiuti *et al.*, 2006).

## 2. ESTRATÉGIA

A instabilidade dos peptídeos gerados por engenharia genética é geralmente uma consequência do pequeno tamanho dessas moléculas quando produzidos na forma de monômeros, isto é, de sequências simples. Nos seres vivos, os peptídeos são frequentemente sintetizados a partir de moléculas precursoras consideravelmente mais longas, as quais sofrem processamentos proteolítico e modificações pós-traducionais para gerar um ou mais peptídeos maduros. No caso da expressão recombinante, uma estratégia comumente empregada para

preservar a estabilidade dos peptídeos é a expressão modular de genes, iguais ou diferentes, que são clivados pelo próprio microrganismo ou posteriormente, após a sua produção. No segundo caso, é necessário que ocorra o processamento proteolítico da proteína precursora *in vitro* para a liberação do peptídeo recombinante, uma etapa que encarece o bioprocesso ou ainda é possível utilizar a própria maquinaria proteolítica da célula hospedeira para o mesmo propósito.

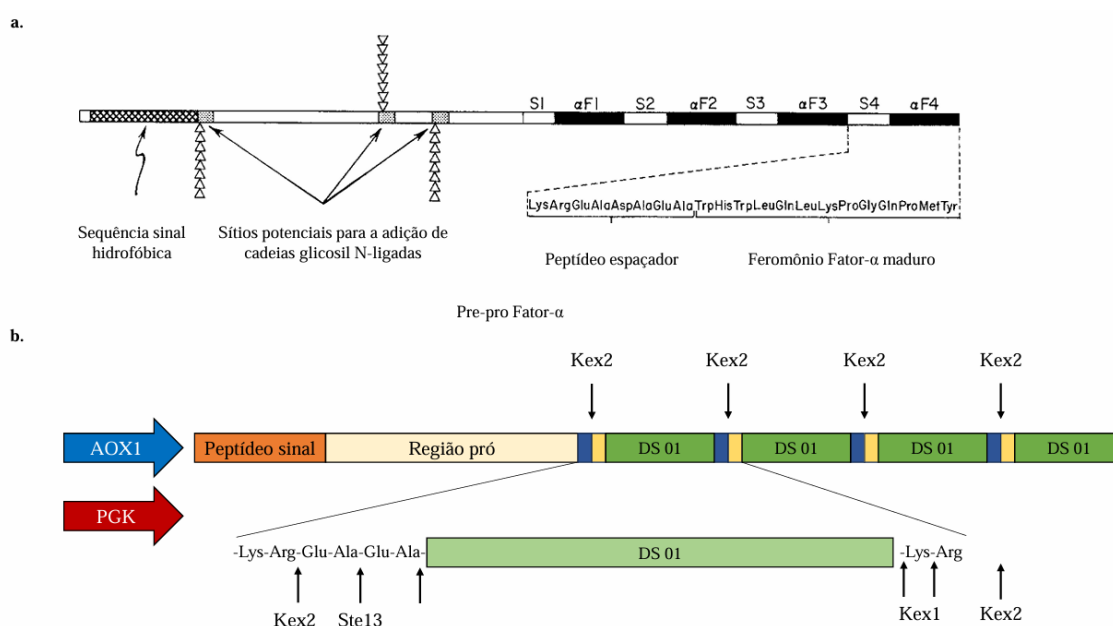
Como visto, proteínas carreadoras podem ser fusionadas ao peptídeo ou à proteína recombinante de modo a promover uma melhora significativa dos níveis de expressão dela. Por exemplo, a dermaseptina S4 (DS4) foi expressa em *E. coli* fusionada a GST por Song e colaboradores (2014). Originalmente isolada da pele de *Phyllomedusa salvagei*, a DS4 também se trata de um PAM  $\alpha$ -helicoidal anfipático. Em 2015, o grupo de Yu expressou o PAM cecropina B (CB) fusionado a GST em *K. phaffii* com o rendimento de 2,2 g/L. Eles também demonstraram que a atividade antibacteriana da CB recombinante era a mesma da molécula nativa.

Objetivando-se obter peptídeos maduros, ou seja, completamente processados, foi montada uma estratégia que utiliza a maquinaria da própria célula para executar o processamento e secreção dos peptídeos recombinantes para o meio extracelular. A estratégia foi inspirada na via de secreção do fator  $\alpha$  de acasalamento de leveduras, bem descrito em *S. cerevisiae* e presente em *K. phaffii* (Kurjan & Herskowitz, 1982; Brake *et al.*, 1984). O fator  $\alpha$  é um hormônio peptídico de 13 resíduos de aminoácido, em sua forma madura, naturalmente produzido em *S. cerevisiae* e *K. phaffii* na forma de uma pré-pró-proteína contendo quatro módulos gênicos. Ela possui um peptídeo sinal de secreção e sítios de clivagem que flanqueiam cada módulo para o processamento pelas enzimas Kex1, Kex2 e Ste13. Uma peptidase sinal remove o peptídeo sinal, seguido da ação da endopeptidase kexina (Kex2), que remove a região pro. A dipeptidil aminopeptidase Ste13 remove o dipeptídeo Glu-Ala e a carboxipeptidase B like (Kex1) cliva os sítios de lisina e de arginina da região C-terminal (**Figura 2. a.**).

O gene MF $\alpha$ 1 codifica para um precursor de 165 resíduos de aminoácido contendo 4 repetições em sequência (*in tandem*) do fator  $\alpha$ . O fator  $\alpha$  é o sinal de secreção mais utilizado em leveduras. A **Figura 2** ilustra os sítios de clivagem para o processamento do fator  $\alpha$  e como eles são mantidos no cassete de expressão da DS 01 e da calcitonina. Embora a região líder do precursor do fator  $\alpha$  tenha sido extensivamente utilizada como sinal de secreção na produção de proteínas heterólogas em leveduras, até onde se sabe, o sistema completo de processamento

do precursor nunca foi devidamente aproveitado para a produção recombinante de peptídeos. Curiosamente, já foi formulada uma hipótese de semelhança entre a via de processamento do MF $\alpha$  e da melitina (Kreil *et al.*, 1980).

As quatro sequências gênicas do fator  $\alpha$  foram substituídas pelos peptídeos DS 01 e calcitonina (**Figura 2. b.**). Em especial, o módulo gênico da DS 01 foi clonado em dois vetores de expressão: um sob regulação do promotor *PGK* e o outro sob regulação do promotor *AOX1*. Esperava-se que os peptídeos fossem produzidos e completamente processados gerando peptídeos maduros ao se introduzir, no genoma de *K. phaffii*, um plasmídio com os quatro módulos peptídicos separados pelos sítios de clivagem da via de processamento do fator  $\alpha$ . A transcrição de quatro mRNA por vez ao invés de um também poderia acarretar um aumento na produção de seu respectivo peptídeo no mesmo intervalo de tempo e, portanto, da eficiência do processo. As evidências obtidas com essa estratégia poderiam corroborar a hipótese do capítulo anterior. A hipótese é que seria possível “silenciar” a atividade antimicrobiana do peptídeo durante o seu processo de produção, devido ao gene se encontrar um módulo gênico. Entretanto, caso ocorra o reconhecimento do gene ou o processamento do peptídeo, como parece ser ocorrido, espera-se aqui que a atividade da DS 01 não seja inibida.



**Figura 2. Estrutura do Fator- $\alpha$ .** **a.** representação esquemática dos elementos que compõem o sistema de produção do Fator- $\alpha$  nativo, incluindo a sequência sinal, a região pró e os quatro módulos do Fator- $\alpha$  espaçados por sítios de clivagem. Adaptado de Julius *et al.* (1983); **b.** representação esquemática do sistema de heterólogo com o promotor, peptídeo sinal, região pró, as quatro repetições da sequência da DS 01 ou da calcitonina e os elementos para secreção e processamento do cassete de expressão de peptídeos indicando os sítios de clivagem proteolíticos para Kex1, Kex2 e Ste13.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo geral

- Produzir e observar se há atividade antimicrobiana da DS 01 recombinante produzida em *Komogataella phaffii* usando a via de processamento do fator  $\alpha$ .

#### 3.2. Objetivos específicos

- Construir vetores de expressão contendo um cassete de expressão gênico dos peptídeos de interesse formado por quatro repetições modulares de seus genes;
- Transformar a levedura *K. phaffii* com os vetores de expressão, identificar e isolar os clones produtores dos peptídeos;
- Testar a atividade da DS 01 contra *K. phaffii*.

### 4. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 4.1. Microrganismos

Bactérias

Para a etapa de clonagem, foi utilizada a linhagem de *Escherichia coli* XL10-gold (Agilent Technologies, EUA): Tetr  $\Delta$ (mcrA)183 $\Delta$ (mcrCB hsdSMR- mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte [F'proAB lacIqZ $\Delta$ M15 Tn10 (Tet<sup>r</sup>) Amy Cam<sup>r</sup>].

Leveduras

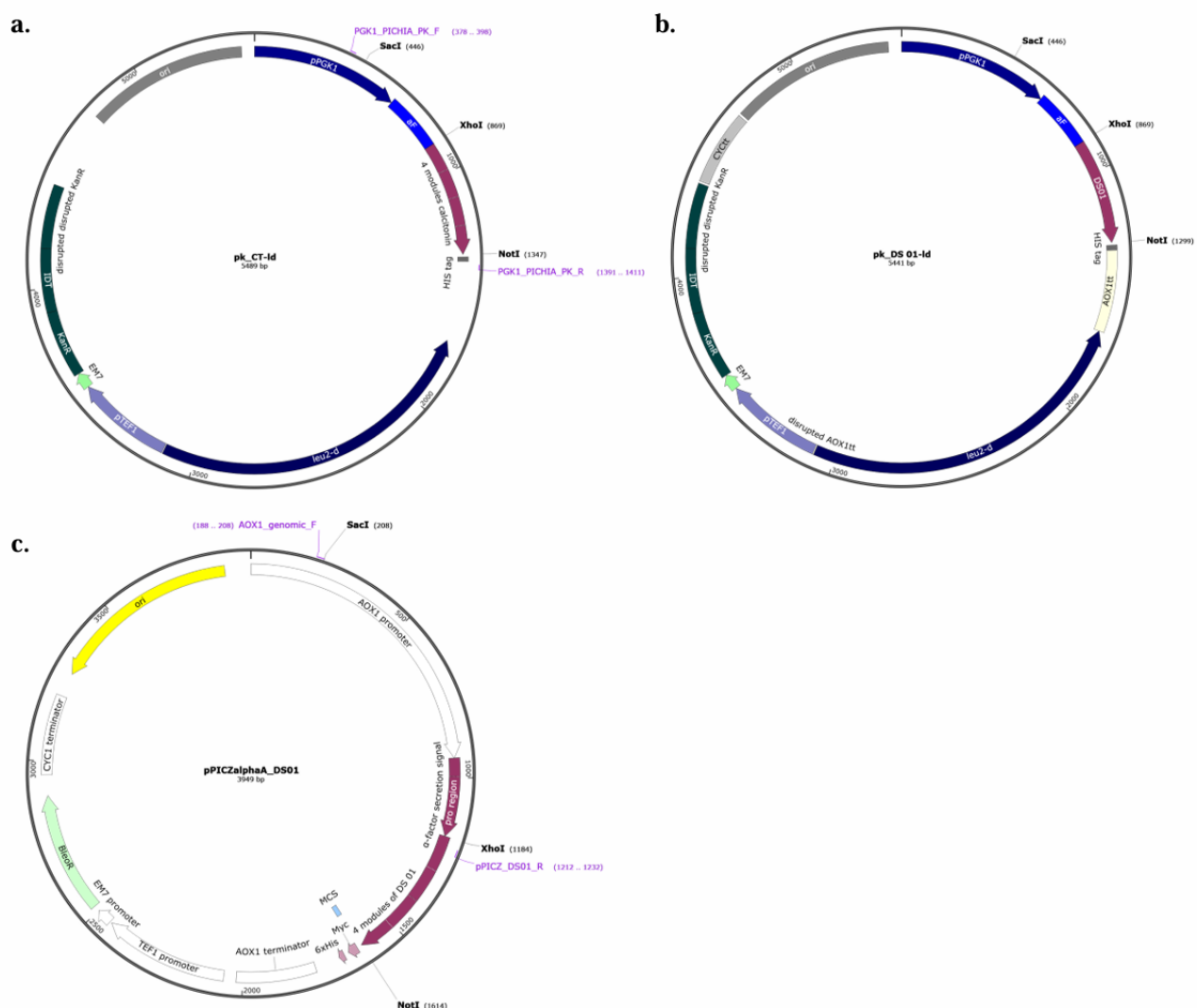
*K.phaffii* X-33: *his4::HIS4* (derivada da linhagem GS115) (Invitrogen, EUA)

*K. phaffii* M12: *leu2* (derivada da linhagem X-33) (Betancur *et al.*, 2017)

#### 4.2. Vetores, enzimas de restrição e primers

O módulo gênico da calcitonina foi clonado no vetor de expressão constitutivo pK-ld, que possui o promotor da fosfogliceratoquinase (PGK) e a marca de seleção auxotrófica para leucina, de onde “ld”, constituindo o vetor pK\_CT-ld (**Figura 3**). O módulo gênico da DS 01 foi clonado no mesmo vetor, constituindo o plasmídeo pK\_DS01-ld, assim como no plasmídeo pPICZ $\alpha$ A, que está sob o promotor AOXI e contém a marca de seleção para a zeocina, formando o plasmídeo pPICZ $\alpha$ \_DS01. As enzimas de restrição usadas para a clonagem foram NotI e XhoI e para a linearização do plasmídeo para a transformação, SacI (**Tabela 1**). As

sequências dos primers usados para a confirmação do sítio de integração dos genes no genoma da levedura estão listados na **Tabela 2**.



**Figura 3. Vetores de expressão para CT e DS 01. a. pK\_CT-ld; b. pK\_DS01-ld e c. pPICZ $\alpha$ \_DS01.** Imagem gerada pelo software SnapGene.

**Tabela 1. Informações sobre as enzimas de restrição.** Código, nome, sítio de clivagem e tampão de reação das enzimas de restrição utilizadas neste trabalho.

| Código         | Enzima | Sítio de clivagem      | Tampão                  |
|----------------|--------|------------------------|-------------------------|
| R0189          | NotI   | GC <sup>+</sup> GGCCGC | NEB Buffer r3.1         |
| 10 703 788 001 | XhoI   | C <sup>+</sup> TCGAG   | NEB Buffer r3.1         |
| R0156          | SacI   | GAGCT <sup>+</sup> C   | NEB Buffer<br>rCutSmart |

**Tabela 2. Oligonucleotídeos.** Nome e sequência de nucleotídeos dos primers utilizados nesse trabalho e a sua finalidade.

| Primers          | Sequência 5'-3'          | Finalidade                                                   |
|------------------|--------------------------|--------------------------------------------------------------|
| PGK1_PICHIA_PK_F | 5'-TCTCATCCATGAGTGAGTCCT | Confirmação sítio de integração DS 01 e CT com promotor PGK1 |
| PGK1_PICHIA_PK_R | 5'-CTGAGGAACAGTCATGTCTAA | Confirmação sítio de integração DS 01 e CT com promotor PGK1 |
| AOX1_genomic_F   | 5-TTATTGGGCTTGATTGGAGCT  | Confirmação sítio de integração DS 01 com promotor AOX1      |
| pPICZ_DS01_R     | 5'-TCTGGGTAATCGTTGACCACA | Confirmação sítio de integração DS 01 com promotor AOX1      |

#### 4.3. Síntese química em fase sólida (SPPS)

A síntese química em fase sólida da dermaseptina (DS 01) foi realizada em um sintetizador automático de peptídeos Prelude (Protein Technologies, Inc), segundo a instrução do fabricante. A resina usada foi a Rink, que permite possibilita a síntese de peptídeos amidados na região C-terminal.

#### 4.4. Purificação da DS 01 s por HPLC

Inicialmente, o material bruto proveniente da síntese foi dissolvido em água a 1mg/mL e centrifugado a 15.000 rpm durante 30min. Um volume de 500 µL de sobrenadante foi aplicado, a cada análise cromatográfica, em uma coluna *Phenomenex* Jupiter 10 µm C18 (250 x 21.20 mm) equilibrada com 95% de solvente A (Água deionizada + 0,1% de TFA). A corrida foi iniciada com 5% de solvente B (Acetonitrila + 0,1% de TFA) durante 5min., seguido de um gradiente de solvente B de 5 a 95% em 30 min. e então mais 5 min. de solvente B a 95%. O fluxo foi de 10 mL/min. A eluição dos compostos foi monitorada em 215 e 280nm, capazes de detectar ligações peptídicas e anéis ressonantes, respectivamente. A coleta das frações foi realizada manualmente. A purificação do peptídeo foi realizada em coluna semi-preparativa Jupiter 4µ Proteo 90A (250 x 10.00 mm). A corrida isocrática foi realizada com 33% de acetonitrila. O fluxo foi de 2,5 mL/min. Por fim, realizou-se uma corrida em coluna analítica Aeris WIDEPOR 3.6µ x 8 C18 (250 x 4.60mm) com o mesmo gradiente de 5 a 95% de solvente B e fluxo de 1mL/min. para confirmar o grau de pureza do peptídeo purificado. Os cromatogramas e dados brutos foram exportados no Software LabSolutions.

#### 4.5. Análise da DS 01 s por Espectrometria de Massa

As frações correspondentes ao peptídeo de interesse foram secas e dissolvidas em água deionizada. As amostras foram misturadas em matriz de  $\alpha$ -ciano na proporção de 1:9 e cristalizadas em uma placa alvo (Bruker Daltonics). Após a evaporação do solvente, os espectros de massa foram adquiridos em um espectrômetro de massa do tipo MALDI-TOF/TOF UltrafleXtreme (Bruker Daltonics, Alemanha) em modo linear positivo na faixa de massa de 700 a 3.500 Da. A calibração do equipamento foi feita com a solução calibrante de peptídeos (Peptide Calibration Standard, Bruker Daltonics). Após aquisição do espectro no modo linear positivo, o espectro de massa do íon parental e dos íons filhos foi adquirido no modo LIFT. Procedeu-se com o sequenciamento *de novo* do peptídeo utilizando-se o software Flex Analysis (Bruker Daltonics). As imagens dos cromatogramas foram produzidas com o Software GraphPrism.

#### 4.6. Ensaio de Concentração Inibitória Mínima (MIC)

Em uma placa de 96 poços, foram colocados 50  $\mu$ L de meio RPMI em todos os poços a serem testados, a exceção dos poços da primeira e da última colunas da placa. A última coluna contém 100  $\mu$ L de meio e é a coluna controle de esterilidade do meio. Um volume de 100  $\mu$ L da solução da molécula, com o dobro da concentração máxima a ser testada, é homogeneizado no primeiro poço. Em seguida, 100  $\mu$ L do primeiro poço são homogeneizados no poço subsequente. As diluições prosseguem até o décimo poço. A cada poço, a concentração torna-se a metade da concentração do poço anterior. No décimo poço, foram retirados 50  $\mu$ L para que ele contenha o mesmo volume que os anteriores. Preparou-se uma suspensão de células de *K. phaffii* a  $5 \times 10^3$  células/mL. Em cada poço, foram adicionados 50  $\mu$ L da suspensão, de modo que a concentração inicial do experimento fosse de  $2,5 \times 10^3$  células/mL. As células foram contadas em uma câmara de Neubauer usando um microscópio óptico. O décimo primeiro poço contém apenas meio RPMI e as leveduras, sendo o poço de controle de crescimento do organismo. Utilizou-se o antifúngico anfotericina B como controle positivo de ação antimicrobiana. Os testes de atividade inibitória mínima (MIC) foram realizados na Universidade Católica de Brasília (UCB), *Campus* de Taguatinga. As células foram cultivadas na placa a 37°C em um espectrofotômetro. Como controle positivo, usou-se a droga fungicida anfotericina B (de Ghellinck *et al.*, 2015). As leituras foram realizadas em um comprimento de onda de 600nm a cada duas horas durante 70h.

#### 4.7. Transformação de bactérias por choque térmico

Uma alíquota de *Escherichia coli* (XL 10 – Gold) contendo 100 µL de células em um tubo Eppendorf foi retirada do freezer -80°C e incubada com 1 µL de DNA plasmidial a 1,37 µg/µL no gelo durante 30 min. Após esse período, as células foram submetidas a um choque térmico a 42°C por 90s e, imediatamente, 900 µL de meio LB sem antibiótico foram adicionados ao tubo. As células foram mantidas em recuperação durante 1h a 37°C. As células foram centrifugadas a 4.000 rpm por 4 min. Um volume de 800 µL do sobrenadante foi retirado do tubo e descartado, o *pellet* foi ressuspensão em 200 µL de meio LB e plaqueado em meio LB ágar contendo 100 µg/mL de ampicilina.

#### 4.8. Cultura de células

Colônias bacterianas isoladas foram inoculadas em 5 mL de meio LB com 50 µg/mL de ampicilina e cultivadas sob agitação de 200 rpm, a 37°C *overnight* em frascos de vidro. Nos casos em que se desejava obter maiores concentrações de DNA, 1 mL da cultura de 5 mL, estabelecida como pré-inóculo, foi inoculada em 99 mL de meio LB com 50 µg/mL, totalizando 100 mL de cultura, cultivada nas mesmas condições descritas no capítulo anterior.

Para as colônias de leveduras, estas foram transferidas da placa de transformação para outra placa com um *grid* de papel numerado para distinção das colônias. Para cada colônia para a qual se desejava realizar um teste, a mesma era inoculada em meio mínimo líquido, e crescida a 28 °C a 200 rpm pelo tempo conveniente a cada teste.

#### 4.9. Extração de DNA plasmidial

Foram realizadas extração do DNA plasmidial em pequena escala (Miniprep) da seguinte forma: após o crescimento acima descrito, cerca de 3 mL do conteúdo dos tubos de 5 mL foi centrifugado em tubos de 1,5 mL a 1.400 rpm durante 2 min., duas vezes. A extração de DNA foi realizada como descrito em Sambrook *et al.* (1989). O sobrenadante foi descartado. O *pellet* foi dissolvido em 200 µL da solução I acrescidos de 360 µL da solução II. O tubo foi invertido suavemente de modo a promover a homogeneização de seu conteúdo e incubado a temperatura ambiente durante 5min. Então, adicionou-se 300 µL de solução III gelada para parar a reação. O conteúdo foi homogeneizado e incubado no gelo por 5min. Após esse período, procedeu-se à centrifugação a 10.000 g durante 5min. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo, 750 µL de isopropanol foram adicionados, o conteúdo homogeneizado e incubado durante 5min. seguido de centrifugação a 10.000 g durante 5min. O sobrenadante foi descartado

e o conteúdo dissolvido em 200  $\mu$ L de solução I e 110  $\mu$ L de acetato de amônio 7,5M foram adicionados. O conteúdo do tubo foi misturado vigorosamente. Seguiu-se uma centrifugação de 10.000 g por 10min. O sobrenadante foi transferido mais uma vez para um novo tubo e misturado com 750  $\mu$ L de etanol 100% gelado. Centrifugação a 10.000g por 5min. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* lavado com 500  $\mu$ L de etanol 70% gelado, seguido da centrifugação final a 10.000 g por 2min. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* seco a temperatura ambiente. O DNA plasmidial foi dissolvido em 50 $\mu$ L de água deionizada com RNase (10mg/mL). Esse procedimento foi realizado antes do processo de digestão e ligação de plasmídeos. Antes da transformação de leveduras, que requer maiores quantidades de DNA plasmidial, ao menos 10 $\mu$ g, foi realizada a preparação de DNA plasmidial em média escala (Midiprep). Ela foi realizada a partir de 100mL da cultura celular de bactérias crescida durante 18h a partir de 1mL de volume do pré-inóculo. A extração de DNA plasmidial foi feita com o kit Qiagen Plasmid Maxi (Qiagen), de acordo com as instruções do fabricante. A quantificação da concentração do DNA extraído foi realizada com um espectofotômetro NanoDrop One (Thermo Scientific).

#### **4.10. Digestão dos plasmídeos com enzimas de restrição**

A digestão do plasmídeo advindo da síntese química comprado da empresa *Integrated DNA Technologies* (IDT) extraído por kit de Midiprep foi digerido com as enzimas XhoI e NotI *overnight* a 37°C. Para uma reação de 100  $\mu$ L, foi usado 5  $\mu$ L de cada enzima de restrição, 10  $\mu$ L do tampão de reação 10x, o volume de DNA correspondente a pelo menos 10 $\mu$ g e o volume de água necessário para completar o volume de reação. As bandas de interesse foram extraídas em gel de agarose com kit de extração de gel (QIAquick Gel Extraction Kit, *Qiagen*). Os vetores de expressão foram digeridos e extraídos do mesmo modo.

#### **4.11. Ligação**

Os cassetes de expressão e os arcabouços dos vetores de expressão foram ligados em uma reação de ligação com a enzima T4 DNA ligase *overnight* a 4°C. Para um volume de 10  $\mu$ L de reação, usou-se 1 $\mu$ L de tampão da T4 DNA ligase 10x, 0,5  $\mu$ L de vetor, 1  $\mu$ L do inserto, 7  $\mu$ L de água e 0,5  $\mu$ L de T4 DNA ligase.

#### **4.12. Linearização do vetor de expressão**

Os plasmídeos utilizados para a transformação da levedura foram extraídos do vetor bacteriano de clonagem. Ao menos 10  $\mu$ g de cada plasmídeo foi linearizado *overnight* a 37°C

usando a enzima SacI para permitir a integração no genoma de *K. phaffii*. A digestão foi verificada por eletroforese em gel de agarose ao se comparar a amostra linearizada e a não digerida.

#### **4.13. Transformação das leveduras por eletroporação**

Previamente à transformação, os vetores integrativos foram precipitados com 0,3M de acetato de sódio e 2 volumes de etanol gelado. A transformação das leveduras para integração dos vetores no genoma foi realizada por eletroporação segundo o protocolo EasySelect Pichia Expression Kit (Invitrogen, EUA). Uma colônia fresca de *K. phaffii* (M12) descongelada e plaqueada em meio YPD ágar foi inoculada em 20 mL de meio YPD e crescida durante 24h a 28°C a 200rpm. O volume necessário do pré-inóculo para alcançar uma O.D.<sub>600</sub> de 1,3 em aproximadamente 16 h foi adicionado a 100 mL de YPD em um frasco de um litro. A cultura foi mantida a 28°C a 200 rpm durante aproximadamente 16 h até que atingisse a O.D.<sub>600</sub> de 1,3.

Neste momento, todo o volume da cultura foi coletado, dividido em dois *falcons* de 50 mL e centrifugada a 1.500 g, a 4°C por 5 min. O sobrenadante foi então descartado e o *pellet* lavado três vezes com água estéril gelada, sendo primeira lavagem feita com 100 mL de água e as duas subsequentes com 50 mL. Uma quarta lavagem foi feita com 4 mL de sorbitol 1M gelado. Após esta etapa, o precipitado foi ressuspensão em 300 µL de sorbitol. Para cada eletroporação, foram misturados 80µL de células de levedura ressuspensas em sorbitol e 10µg de DNA linearizado em cubetas de eletroporação de 2mm (Bio-rad) e a mistura foi incubada no gelo durante 5 min. O pulso elétrico foi aplicado com um eletroporador configurado com os seguintes parâmetros: 1500 V, 400 Ω e 25 µF. Imediatamente após a aplicação do pulso elétrico, 1 mL de sorbitol gelado foi adicionado às cubetas e as células foram plaqueadas no meio mínimo para seleção dos clones transformantes.

#### **4.14. PCR de colônia**

Uma pequena parte de cada colônia de levedura foi dissolvida em 20 µL de água. A partir dessa diluição, 2 µL foram utilizados para a reação de PCR. Para uma reação de volume final de 20 µL, foram adicionados 0,4 µL de *forward primer*, 0,4 µL de *reverse primer*, 2 µL de dNTP (2 mM), 2 µL de tampão HF e 0,1 µL da Taq. DNA polimerase *Phusion*. O tamanho dos amplicons, previamente simulados pelo software SnapGene foi verificado por gel de agarose.

#### **4.15. Indução da expressão heteróloga dos peptídeos**

As culturas as usadas na expressão por metanol eram crescidas em meio líquido, como descrito, por 24h. Caso atingissem uma O.D.<sub>600</sub> equivalente a 20.0, eram diluídas no meio de indução para iniciarem a indução a uma O.D.<sub>600</sub> de aproximadamente 5.0. A expressão da proteína foi induzida adicionando-se 0,5% de metanol absoluto, em relação ao volume da cultura. A cada 24 h, a cultura era realimentada com a mesma quantidade de metanol.

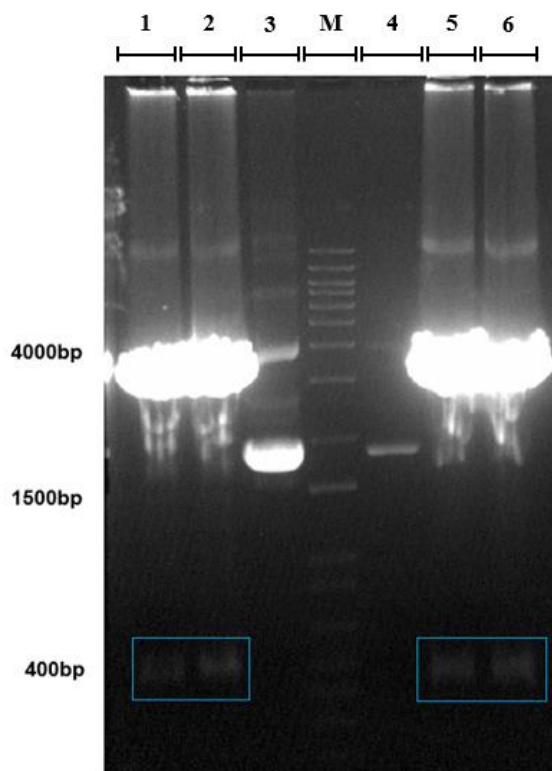
#### **4.16. Cinética de crescimento**

As colônias escolhidas para a expressão dos peptídeos foram inoculadas separadamente em 20mL de meio BMGY em frascos Erlenmeyers de 200 mL, para garantir a oxigenação das células, e crescidas durante 24 h a 28°C e 200rpm. As culturas foram diluídas em 100 mL de meio BMMY, induzidas com metanol e crescidas nas mesmas condições por 96 h. A mensuração da densidade óptica das culturas foi feita a cada 12h e a realimentação com metanol realizada a cada 24 h.

### **5. RESULTADOS**

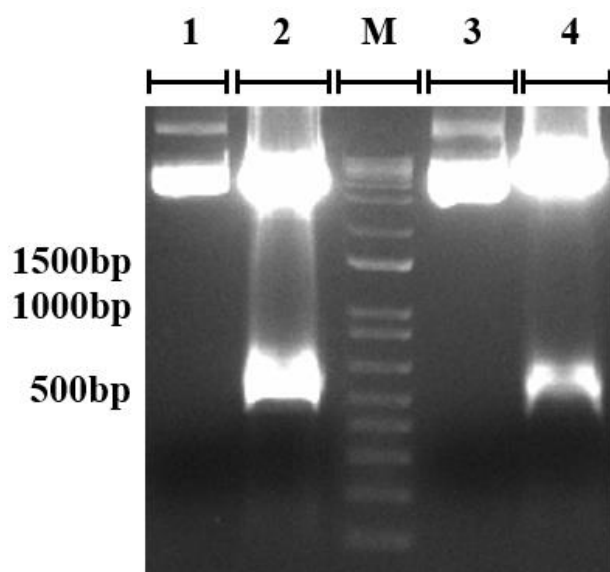
#### **5.1. Construção dos plasmídeos de expressão**

Os plasmídeos de síntese foram digeridos com as enzimas NotI e XhoI, liberando com sucesso os fragmentos correspondentes aos módulos gênicos da calcitonina, de 478 bp, e da dermaseptina, de 430 bp, que podem ser vistos nos retângulos azuis da **Figura 4**. Os módulos gênicos foram extraídos do gel de agarose em quantidades suficientes para permitir a ligação aos plasmídeos de expressão. Contudo, tanto as intensidades das bandas extraídas do gel quanto a suas respectivas concentrações após a purificação foram aquém do esperado. Os fragmentos gênicos foram ligados aos vetores de expressão constitutivo, pK-Id, e induzível, pPICZαA.

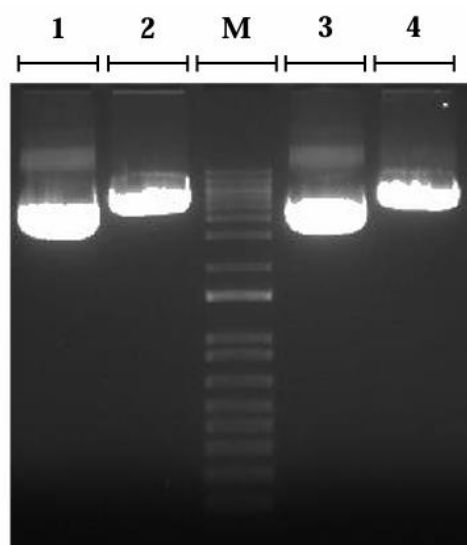


**Figura 4. Gel de agarose dos vetores pUCIDT\_CT e pUCIDT\_DS01.** Gel de agarose dos vetores pUCIDT\_CT e pUCIDT\_DS01 intactos e digeridos com NotI e XhoI. Volume de amostra digerida: 20µL. **1.** e **2.** pUCIDT\_CT digerido; **3.** pUCIDT\_CT intacto; **M.** Marcador 1Kb Plus, **4.** pUCIDT\_DS01 intacto; **5.** e **6.** pUCIDT\_DS01 digerido. Volume aplicado de marcador: 5µL. Os módulos gênicos da calcitonina e da DS 01 estão indicados pelos retângulos azuis.

Após a etapa de clonagem para se obter maiores quantidades dos vetores de expressão eles foram novamente digeridos com NotI e XhoI para averiguar sua integridade. O gel de agarose feito aplicando-se as reações de digestões dos vetores de expressão ilustra a primeira evidência de sua integridade (**Figura 5**). Todos os vetores foram linearizados com sucesso com a enzima SacI para permitir a integração no genoma. A **Figura 6** mostra a linearização dos vetores de expressão constitutiva pK\_CT-IId e pK\_DS01-IId. As linhagens de levedura M12 e X-33 foram transformadas com os vetores constitutivo e induzível, respectivamente. Em ambas as transformações, foi observado um número maior de colônias de nas placas relativas à calcitonina do que as relativas à dermaseptina (dados não mostrados).



**Figura 5. Gel de agarose dos cassetes de expressão liberados.** Gel de agarose 1% para confirmação das construções dos vetores de expressão pK\_DS01-ld e pK\_CT-ld através da digestão com as enzimas de restrição XhoI e NotI para liberação dos cassetes de expressão. 1. pK\_CT-ld intacto, 2. pK\_CT-ld digerido, M. Marcador 1Kb Plus, 3. pK\_DS01-ld intacto e 4. pK\_DS01-ld digerido.

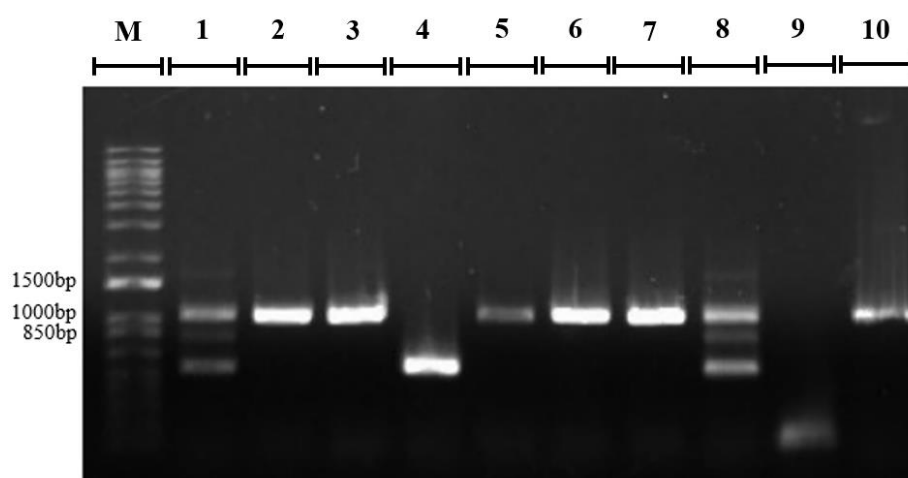


**Figura 6. Gel de agarose dos vetores linearizados.** Gel de agarose 1% da linearização dos vetores de expressão pK\_CT-ld e pK\_DS01-ld com a enzima de restrição SacI para integração no genoma. 1. pK\_CT-ld intacto; 2. pK\_CT-ld digerido; M. Marcador 1kb Plus; 3. Vetor pK\_DS01-ld intacto; 4. Vetor pK\_DS01-ld digerido.

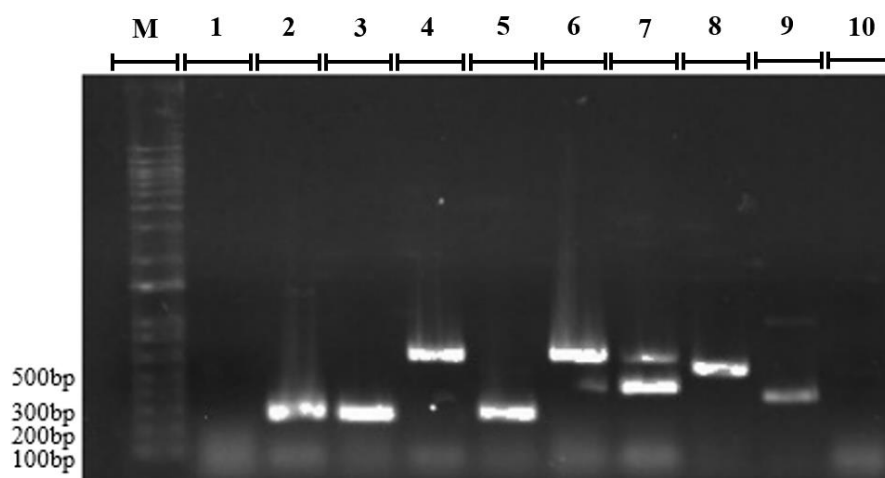
## 5.2. Confirmação dos transformantes por PCR de colônia

Colônias da placa de transformação foram passadas para uma nova placa de crescimento e outra parte das mesmas colônias foi submetida a reações de PCR para verificar a integração dos módulos gênicos no genoma das leveduras. As **Figuras 7 e 8** ilustram os géis de agarose dos produtos das PCR para confirmar o sítio de integração dos módulos gênicos da

calcitonina e da dermaseptina, respectivamente, logo após o promotor constitutivo PGK. O tamanho esperado do amplicon era de 1035 bp, para os transformantes para calcitonina e de 987 bp para os transformantes de dermaseptina. Das dez colônias transformadas para calcitonina, sete apresentaram amplicon de tamanho esperado, mas apenas cinco, os clones 23I, 27I, 50I, 5II e 18II foram considerados transformantes aceitáveis e mais confiáveis para expressão heteróloga, porquanto não apresentaram outras bandas. Causou estranhamento as bandas amplificadas de forma inespecífica nos clones 14I e 26II, pois não há outros pontos de amplificação detectados. O mesmo aconteceu com os amplicons dos clones 15 e 17 de transformantes para a DS 01 e, dos dez clones testados, nenhum foi positivo.

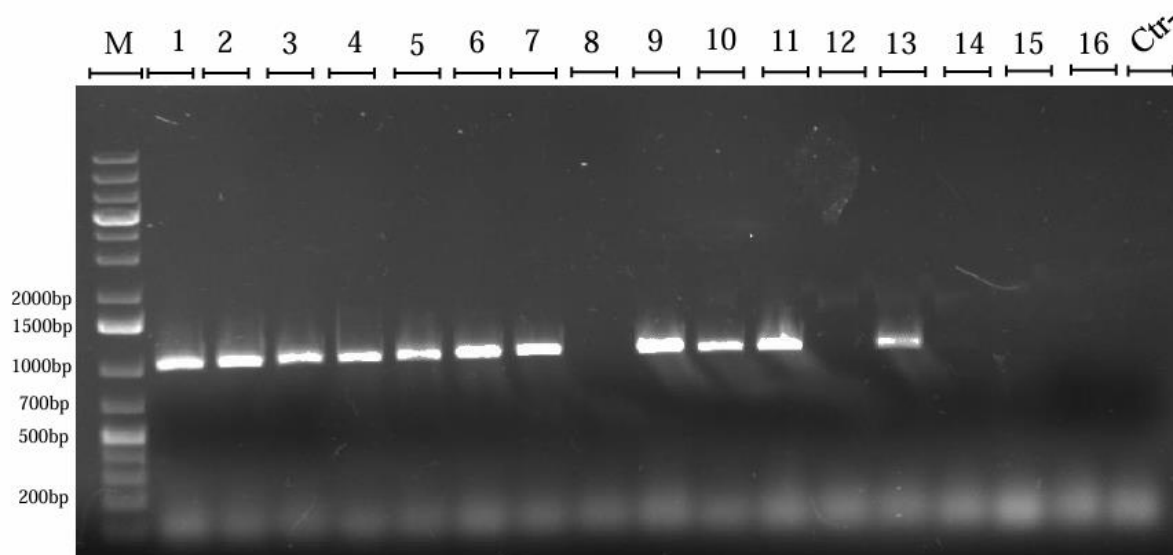


**Figura 7. PCR para confirmação da integração do vetor pK-CT-ld.** PCR de confirmação do sítio de integração do vetor pK-CT-ld no genoma da levedura. M. Marcador 1Kb Plus. 1. Clone 14I; 2. Clone 23I; 3. Clone 27I; 4. Clone 41I; 5. Clone 50I; 6. Clone 5II; 7. Clone 18II; 8. Clone 26II; 9. 41II e 10. Clone 50II.



**Figura 8. PCR para confirmação da integração do vetor pK-DS01-ld.** PCR de confirmação do sítio de integração do vetor pK-DS01-ld no genoma da levedura. M. Marcador 1kb Plus. 1. Clone 2; 2. Clone 5; 3. Clone 6; 4. Clone 7; 5. Clone 9; 6. Clone 10; 7. Clone 15; 8. Clone 16; 9. Clone 17; 10. Clone 18.

Diante das evidências experimentais, que são a ausência de amplicons ou ampliações inespecíficas resultando em amplicons de diferentes tamanhos, suspeitou-se que a dermaseptina fosse um produto tóxico para a levedura e que comprometeria o crescimento das colônias transformadas mesmo em placas, pois sua expressão é constitutiva. Assim, optou-se pela busca de transformantes positivos da DS 01 dentre as colônias transformadas com o vetor induzível. O evidente sucesso da transformação para as colônias que possuem o promotor induzível por metanol, *AOX1*, pode ser observado na **Figura 9**. O amplicon esperado é de 1046 bp. Assim, para pPICZ $\alpha$ \_DS01 foram testadas treze colônias das quais onze são transformantes positivos. Não se observou amplificação inespecífica para essa construção. As colônias de vetor vazio controle pPICZ $\alpha$ A, não foram testadas por PCR para avaliar o sucesso da transformação, apenas por crescimento na placa com zeocina e usadas como controle negativo para as PCR do vetor com o gene da DS 01.

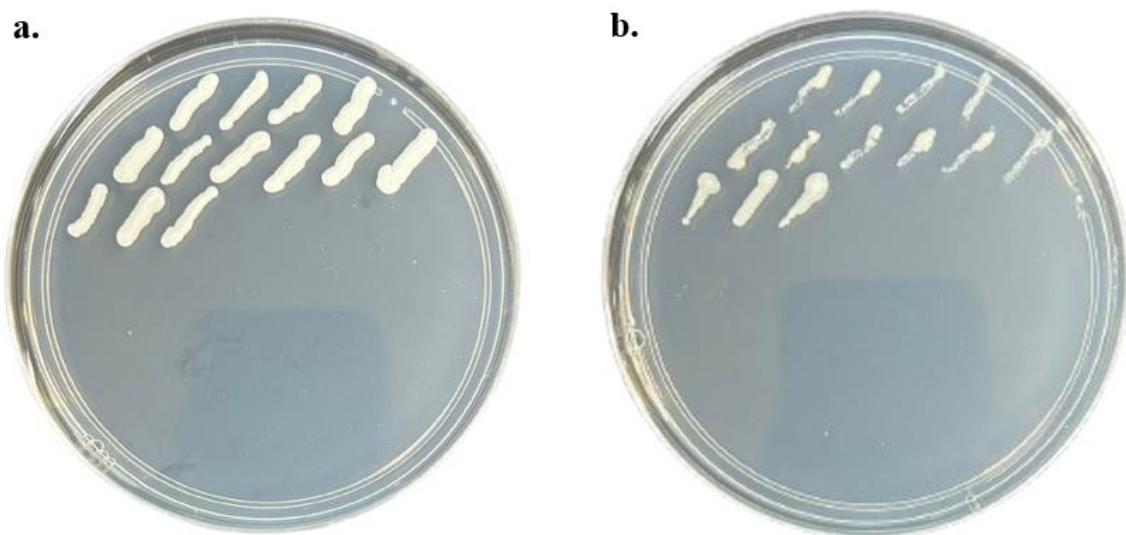


**Figura 9. PCR para confirmação da integração do vetor pPICZ $\alpha$ A\_DS01.** PCR de confirmação do sítio de integração do vetor pPICZ $\alpha$ A\_DS01 no genoma da levedura. **M.** Marcador O'Gene Ruler 1kb Plus; **1. a 13.** Clones de 1 a 13 de *K. phaffii* transformadas com o plasmídeo pPICZ $\alpha$ \_DS01; **14 a 16.** Clones 1 a 3 transformados com o plasmídeo pPICZ $\alpha$ . **Ctr-:** Reação de PCR com todos os componentes, exceto o DNA.

### 5.3. Teste de crescimento diferencial em placas com metanol

Com a finalidade de verificar se a presença do gene da dermaseptina, mesmo sem a produção imediata da DS 01, também prejudicava em alguma medida o crescimento da linhagem X-33 de *K. phaffii*, realizou-se um teste de indução em placa de meio de cultura mínimo (MD) com metanol. Um volume de 100  $\mu$ L de metanol foi pipetado na tampa da placa de petri de meio MD com dez colônias de transformantes de pPICZ $\alpha$ A\_DS01 PCR positivos.

Como controle negativo, três clones transformados com o vetor vazio pPICZ $\alpha$ A, sem o gene, também foram transferidos para a mesma placa. As mesmas colônias foram plaqueadas em meio MD com glicose. A adição de metanol na tampa da placa induz a expressão da DS 01. Os clones de ambas as construções cresceram normalmente, a taxas semelhantes, em meio sem metanol. Contudo, na placa com adição deste álcool, todos os clones cresceram mais lentamente, sendo que os produtores de DS 01 pareciam crescer a taxas ainda menores que os controles (**figura 10**). Esse resultado sugere que a dermaseptina compromete, em alguma medida, o crescimento de *K. phaffii*. Ainda não está claro se foi o peptídeo DS 01 maduro ou o módulo não completamente processado o responsável pela atividade antimicrobiana observada.

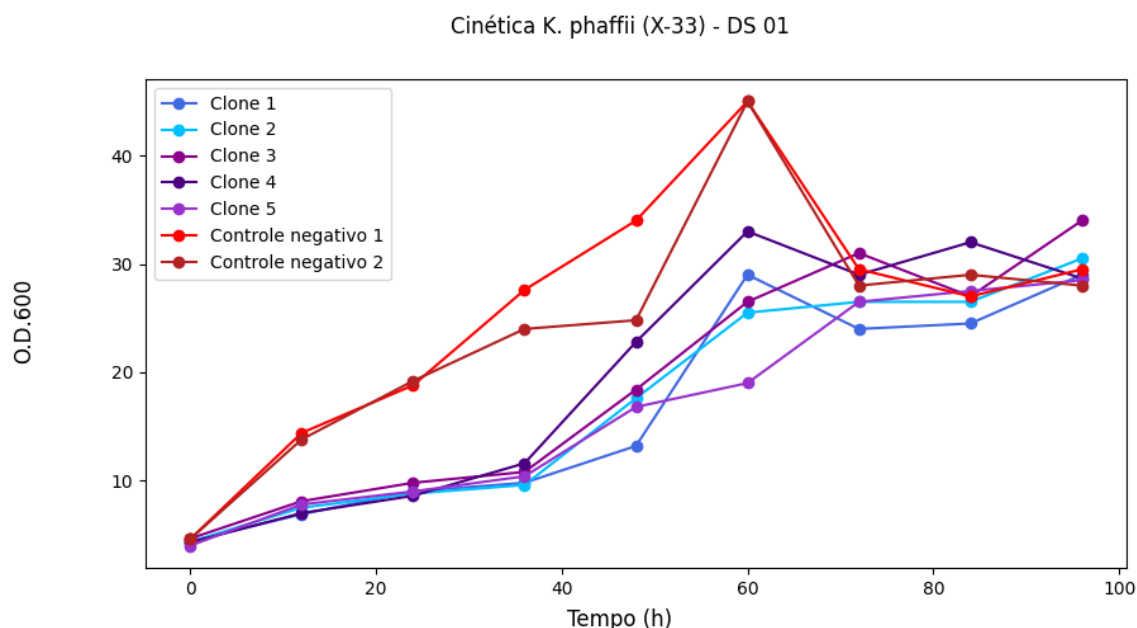


**Figura 10. Culturas de *K. phaffii* em meio com metanol.** a. Placa de meio MD + 1% de glicose, colônias de **1.** a **10.** *Komagataella phaffii* (X-33) transformada com o plasmídeo pPICZ $\alpha$ A\_DS01 e colônias de **11.** a **13.** *K. phaffii* (X-33) transformada com pPICZ $\alpha$ A (vetor vazio). b. Placa de meio MD + metanol 0,5%, mesma ordem de colônias.

#### 5.4. Cinética de crescimento

Buscou-se verificar também se a indução da DS 01 em meio líquido afetava o crescimento da levedura ao longo do tempo de um modo semelhante ao observado em bactérias para as quimeras, consideradas as devidas diferenças entre os sistemas e as condições experimentais, discutidas mais adiante. Cinco colônias PCR positivas para o plasmídeo pPICZ $\alpha$ \_DS01 e dois clones positivos para o plasmídeo pPICZ $\alpha$ \_A, usadas como controle, foram induzidas em meio líquido com metanol. Ao analisar a cinética de crescimento das culturas, é possível observar que até aproximadamente 40h, as culturas com o gene da DS 01 crescem a uma taxa consideravelmente menor que as culturas sem o mesmo gene (**Figura 11**).

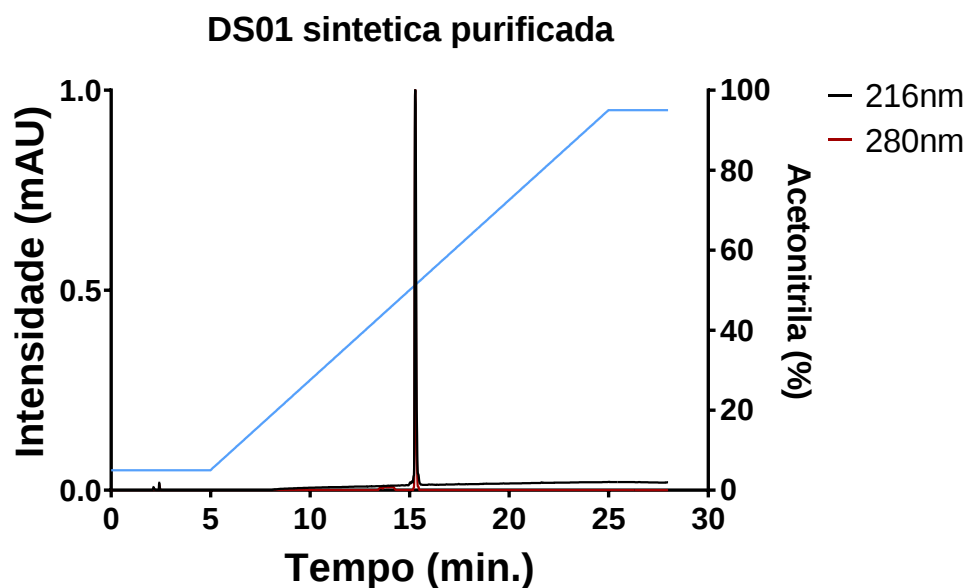
A partir de 40h, as culturas com o gene da DS 01 começam a atingir densidades mais próximas aos controles. O pico de crescimento dos controles ocorre em 60h. Entre 72 e 84h, as culturas apresentaram menor variação em suas densidades em comparação a outros intervalos de tempo do experimento. Não foi possível purificar ou mesmo identificar a presença DS 01, mas tão somente observar a ação antimicrobiana da biomolécula. Desse modo, não é possível dizer se ela foi completamente processada até a forma nativa ou ainda se ela estava ativa na forma de alguma proteína ou peptídeo não completamente processado.



**Figura 11.** Gráfico com as curvas que representam as cinéticas de *K. phaffii* (X-33). Gráfico com as curvas que representam as cinéticas de *Komagataella phaffii* (X-33) após a indução da expressão da DS 01 recombinante com 0,5% de metanol a 200rpm, 30°C durante 96h. Os clones 1 a 5 são as leveduras transformadas com o plasmídeo pPICZaA\_DS01, verificados por PCR e os controles negativos 1 e 2 são as leveduras transformadas com o vetor vazio pPICZaA.

### 5.5. Purificação da DS 01s

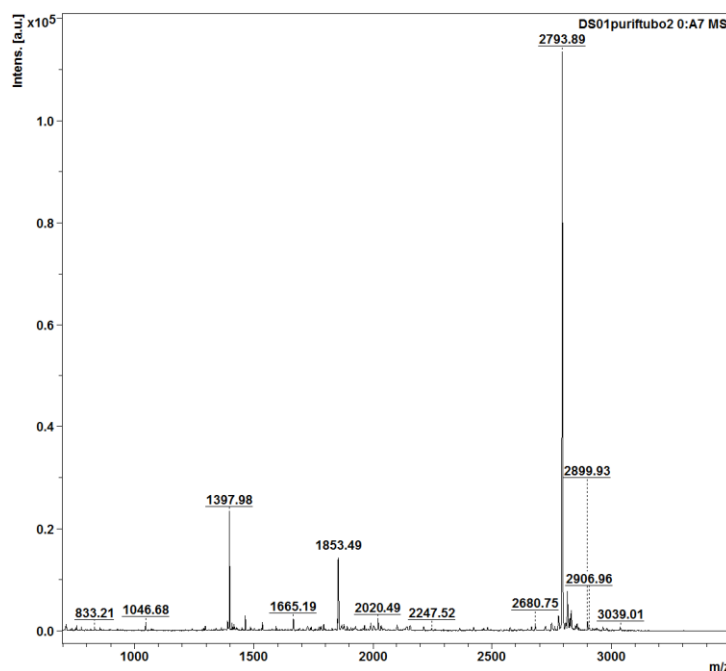
A DS 01 advinda da síntese química (DS 01s) foi purificada em coluna preparativa (dado não mostrado). O grau de pureza da DS 01s foi avaliado como superior a 90% calculando-se a área abaixo da curva do pico cromatográfico correspondente a eluição do próprio peptídeo sintético e sua proporção em comparação com a área abaixo da curva de outros picos do mesmo cromatograma, mostrado na **Figura 12**.



**Figura 12. Cromatograma da DS 01 sintética.** Cromatograma para determinação do grau de pureza da DS 01 sintética obtido por HPLC de fase reversa em coluna analítica C18.

### 5.6. Caracterização da DS01 s

Antes da realização do teste de MIC foi realizado o sequenciamento da DS 01 para confirmação da identidade e integridade da macromolécula. A **Figura 13** mostra o espectro de massa MS da DS 01s, representada pelos íons  $[M + H]^+ = 2793,88$  Da e  $[M + 2H]^+ = 1397,98$  Da. A DS 01s também foi integralmente sequenciada (**Figura 14**).



**Figura 13. Espectro MS da DS 01s purificada  $[M + H]^+ = 2793,885$  Da.** Espectro de massa MALDI-TOF em modo refletido da DS 01s purificada  $[M + H]^+ = 2793,885$  Da.





**Figura 15. Teste preliminar de atividade inibitória mínima (MIC).** Teste preliminar de atividade inibitória mínima (MIC) de DS01 s contra a levedura *Komagataella phaffii* X-33 em meio RPMI. Fileiras A e B para a coluna 1. 128  $\mu$ M de DS 01; 2. 64  $\mu$ M; 3. 32  $\mu$ M; 4. 16  $\mu$ M; 5. 8  $\mu$ M; 6. 4  $\mu$ M; 7. 2  $\mu$ M; 8. 1  $\mu$ M; 9. 0,5  $\mu$ M; 10. 0,25  $\mu$ M. 11. células e meio sem DS 01; 12. meio sem células; C e D; réplica 2 de DS 01; E e F: réplica 3 de DS 01; Colunas: G1 e H1; G4 e H4; G7 e H7: 2,5  $\mu$ M de anfotericina B; G2 e H2; G5 e H5; G8 e H8: 1,25  $\mu$ M de anfotericina B; G3 e H3; G6 e H6; G9 e H9: 0,62  $\mu$ M de anfotericina B.

## 6. DISCUSSÃO

As amplificações por PCR das colônias de expressão constitutiva de DS 01 demonstraram que todos os clones testados não geraram o amplicon de tamanho esperado. É evidente que, de algum modo, o material genético com a sequência da DS 01 foi modificado. Deve haver algum mecanismo que permita que a célula reconheça, no momento da tradução, ou mesmo já na transcrição, uma molécula tóxica em seu genoma. Como resposta a esse reconhecimento, a levedura então reorganizaria o seu material genético de modo a retirar parte da sequência do gene do PAM ou mesmo o gene por inteiro. Em *E. coli*, por exemplo, mesmo uma expressão basal ou vazamento (*leaking*) de uma proteína tóxica para um microrganismo vetor de expressão é suficiente para inibir o seu crescimento (Kimelman *et al.*, 2025; Krela *et al.*, 2019; Wen *et al.*, 2021). A maioria das técnicas de clonagem de proteínas tóxicas desenvolvidas focam em impedir a o vazamento da expressão dessas proteínas (Krela *et al.*, 2019).

A “amplificação inespecífica” pode ser um sinal da edição gênica pela própria levedura. Talvez tenha ocorrido um evento de recombinação na sequência do gene. As PCR das colônias transformadas com o gene da DS 01 sob controle do promotor AOXI apontam para uma regulação realizada em resposta a tradução, pois o gene tóxico permanece no genoma, mas o material não foi alterado como visto nas colônias em que o gene era transcrito sob o controle do promotor PGK. Isso se torna ainda mais evidente quando se considera que o promotor AOXI é mais forte que o PGK. Krela e colaboradores (2019) detectaram mutações em genes tóxicos em *E. coli* transformadas com plasmídeos que não possuíam tais mutações previamente. Há pesquisas que usam da própria ação antimicrobiana dos peptídeos para descobrir novos antimicrobianos. Uma livraria de plasmídeos com genes putativamente antimicrobianos conhecida é induzida, após a sua produção. As populações não antimicrobianas prevalecem e as antimicrobianas são reduzidas ou mesmo eliminadas. Ao final do experimento, a biblioteca é sequenciada e quantitativamente é possível saber quais os plasmídeos que codificaram PAM de fato (Tucker *et al.*, 2018).

O experimento de cinética de crescimento dos clones de levedura induzidos com metanol para a expressão da DS 01 mostrou, nas primeiras 40h, um resultado de inibição de crescimento semelhante ao que foi observado para a cinética de bactérias induzidas para a expressão das quimeras antimicrobianas e para o peptídeo Cc11. Após as 40h, contudo, há uma diminuição da diferença entre os valores de densidade celular dos clones produtores da DS 01

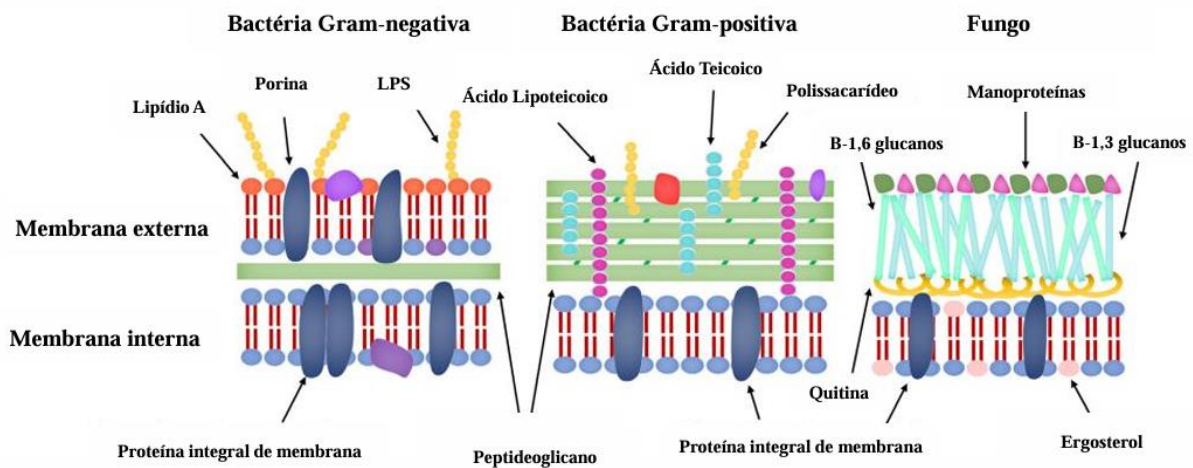
e dos controles negativos. Diferença esta que se torna ainda menor a partir de 72h de indução. Uma possibilidade para explicar este comportamento é o esgotamento mais rápido dos nutrientes do meio de cultura dos controles negativos, que cresceram mais rápido, fazendo-os tenderem a se igualarem aos produtores de DS 01, que ainda não haveriam usado todos os nutrientes do meio. Outra possibilidade é que as leveduras tenham recombinação do material genético ao longo do crescimento, de modo a não mais expressar o produto tóxico. Não há necessariamente complicações adicionais no processo de expressão pelo fato de o cassete de expressão da DS 01 estar montado *in tandem*. Seis cópias da buforina II conjuntamente a magainina já foram expressas em *E. coli*, por exemplo (Lee *et al.*, 1998).

Contudo, a comparação entre os experimentos realizados com bactérias e leveduras deve ser feita com bastante cautela e até certo ponto, porquanto as variáveis de cada experimento são diferentes: a temperatura, o meio de cultura, o indutor, o tempo de indução. Diferentemente do experimento com bactérias, no qual a adição de IPTG e ramnose aconteceu apenas no início da indução, as leveduras foram realimentadas com metanol a cada 24h. Ademais, o tempo de dobra de *K. phaffii* é estimado entre 20 e 30 horas em meio BMMY, enquanto o de *E. coli* é de 20 minutos em meio LB a 37°C (Son & Taylor, 2022).

O ensaio de MIC com a DS 01s contra *K. phaffii* apresentou um MIC de 128 µM. Esperava-se encontrar um valor menor, pois a DS 01 já havia sido testada contra outra levedura, *C. albicans*, e havia apresentado um MIC de 4 µM (Ramada *et al.*, 2017). Apesar de serem ambas leveduras a composição de suas membranas pode possuir algumas diferenças. Contra *E. coli*, a DS 01 apresentou um MIC de 1µM (Ramada *et al.*, 2017). Os diferentes valores de MIC entre microrganismos se deve à variação na composição da parede celular de cada grupo e espécie. As dermaseptinas têm sido compreendidas como atuantes pelo mecanismo de ação semelhante ao carpete. Também há dermaseptinas que atuam em alvos intracelulares (Brodgen, 2005) e a produção recombinante delas propiciaria um acesso mais fácil aos seus alvos.

Os peptídeos antimicrobianos agem na camada de lipopolissacarídeos presente nos microrganismos, mas não são muito efetivos contra a membrana de células eucarióticas, visto que elas apresentam maior teor de colesterol e menor carga aniônica, embora haja exceções. A membrana de células Gram-negativas é composta de polissacarídeos e LPS, ao passo que a de bactérias Gram-positivas contém polissacarídeos, ácidos teicóicos e lipoteicóicos (Brodgen, 2005). As diferenças na composição das membranas lipídicas entre bactérias Gram-negativas, Gram-positivas e fungos pode ser observada na **figura 16**. Há diferenças na afinidade de

peptídeos por diferentes tipos de lipídeos de membrana (Matsuzaki *et al.*, 1991). Os fungos possuem a peculiaridade de possuírem o ergosterol, que é inclusive o alvo da anfotericina B, em sua composição de membrana. Os componentes lipídicos majoritários na membrana de *K. phaffii* são fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilserina (PS) e fosfatidilinositol (PI), sendo que PC corresponde a mais de metade do conteúdo membranar (de Ghellinck *et al.*, 2015). A ação dos PAM não pode ser generalizada, mesmo entre organismos aparentemente semelhantes. *K. phaffii*, por exemplo, possui menor conteúdo de ergosterol que *S. cerevisiae*, embora essa molécula seja abundante em ambas as leveduras (Grillitsch *et al.*, 2014). Outra característica de *K. phaffii* é ser mais rica em fosforilceramidas em relação aos esfingolipídeos neutros (Grillitsch *et al.*, 2014).



**Figura 16. Diferenças na composição das membranas entre bactérias.** Diferenças na composição das membranas entre bactérias Gram-negativas, Gram positivas e de fungos. Imagem adaptada de Huang *et al.* (2020).

Não foi possível verificar, assim como para as quimeras estudadas no capítulo precedente, se o efeito antimicrobiano observado adveio da DS 01 completamente processada ou se do peptídeo ainda aprisionado, mas não silenciado, na estrutura modular. Outrossim, caso a DS 01 esteja madura, não é possível verificar se ela foi processada devido a ação da KEX ou de outras proteases, que podem fazer parte da via de secreção do peptídeo recombinante ou estarem em seu caminho (Hopkins *et al.*, 2014). Uma estratégia que poderia dirimir essa dúvida seria a inclusão de uma cauda de histidinas à uma das sequências gênicas externas da DS 01 no módulo, mas não às internas. Assim, seria possível sequenciar ambos os peptídeos caso eles houvessem sido processados ou digerir o módulo proteico intacto.

Para a calcitonina, por uma questão de limitação de tempo, não foi possível testar a sua expressão por meio de Western Blot. Xavier (2003) obteve resultados positivos para a produção

de calcitonina humana em *P. pastoris*. O mesmo autor expressou a calcitonina humana em *E. coli*. A única pesquisa acadêmica com a produção da calcitonina em *K. phaffii* após o trabalho de Xavier (2003), até onde se sabe, é de Liu e colaboradores (2006), em que o gene da calcitonina foi expresso na linhagem GS115 fusionada ao peptídeo de crescimento osteogênico utilizando o promotor AOX e o plasmídeo pPIC9.

## 7. CONCLUSÃO

A investigação da produção da DS 01 em *K. phaffii*, não apenas com o ensaio de cinética, mas mais ainda pelos resultados observados das PCR de colônias do promotor constitutivo e do induzível trouxe evidências para existência um mecanismo de edição gênica da própria levedura em resposta a genes tóxicos. Algum mecanismo interno de *K. phaffii* parece ser capaz de reconhecer uma sequência que codifica um peptídeo antimicrobiano e então edita, muda a sequência gênica para evitar a perpetuação desse material genético e sua tradução. Há um possível caminho para se estudar esse mecanismo, de recombinação ou outro, tanto em bactérias quanto em leveduras, que atua no reconhecimento e na modificação de sequências de DNA codificadoras de proteínas tóxicas. Esta nova investigação poderia começar por um estudo do mRNA dos microrganismos transformantes. É provável que haja similaridades e diferenças entre os sistemas, pois em bactéria o plasmídeo de expressão se encontra à parte, no citoplasma, enquanto em levedura a parte do vetor com a sequência a ser expressa é integrada no genoma da levedura.

Ademais, é possível se pensar em novas estratégias para tornar possível a expressão, detecção e purificação da DS 01 em *K. phaffii*. Uma possibilidade é testar a expressão com a estratégia da via de processamento do fator  $\alpha$  usando outra molécula não antimicrobiana, já produzida em *K. phaffii*, mas expressa da forma tradicional. Isto poderia ser feito usando o fator de secreção do  $\alpha$ -MF, porém com módulo genético simples, com apenas uma sequência do gene recombinante.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARISTÓTELES. Metaphysics.

AHMAD, A.; RAHAMTULLAH; MISHRA, R. Structural and functional adaptation in extremophilic microbial  $\alpha$ -amylases. **Biophys Rev.** 14 (2):499-515. 2022.

BARTELS, E. J. H.; DEKKER, D.; AMICHE, M. Dermaseptins, Multifunctional Antimicrobial Peptides: A Review of Their Pharmacology, Effectivity, Mechanism of Action, and Possible Future Directions. **Front. Pharmacol.**, 10:1421. 2019.

BETANCUR, M. O.; REIS, V. C. B.; NICOLA, A. M.; DE MARCO, J. L.; MORAES, L. M. P.; TORRES, F. A. G. Multicopy plasmid integration in *Komagataella phaffii* mediated by a defective auxotrophic marker. **Microbial Cell Factories**, v. 16, n. 1, p. 1–11. 2017.

BRAND, G. D.; LEITE, J. R. S. A.; SILVA, L. P.; ALBUQUERQUE, S.; PRATES, M. V.; AZEVEDO, R. B.; CARREGARO, V.; SILVA, J. S.; SÁ, V. C. L.; BRANDÃO, R. A.; BLOCH, C. Dermaseptins from *Phyllomedusa oreades* and *Phyllomedusa distincta* anti-trypanosoma cruzi activity without cytotoxicity to mammalian cells. **The Journal of Biological Chemistry**, Vol. 277, No. 51, pp. 49332-49340. 2002.

BRAKE, A. J.; MERRYWEATHER, J. P.; COIT, D. G.; HEBERLEIN, U. A.; MASIARZ, F. R.; MULLENBACH, G. T.; URDEA, M. S.; VALENZUELA, P.; BARR, P. J. Alpha-factor-directed synthesis and secretion of mature foreign proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. **Proc Natl Acad Sci U. S. A.**, 81(15):4642-6. 1984.

BRETTTHAUER, R. K.; CASTELLINO, F. J. Glycosylation of *Pichia pastoris*-derived proteins. **Biotechnol Appl Biochem.**, 30(3):193-200. 1999.

CASTIGLIONI-MORELLI, M. A.; CRISTINZIANO, P.; PEPE, A.; TEMUSSI, P. A. Conformation-activity relationship of a novel peptide antibiotic: structural characterization of dermaseptin DS01 in media that mimic the membrane environment. **Biopolymers (Peptide Science)**, Vol. 80, 688-696. 2005.

CHANDRA, P.; ENESPA; SINGH, R.; ARORA, P. K. Microbial lipases and their industrial applications: a comprehensive review. **Microb Cell Fact.** 19 (1):169. 2020.

CHIN-HAN, SHU; Chapter 17 - Fungal Fermentation for Medicinal Products, Bioprocessing for Value-Added Products from Renewable Resources. **Elsevier**, P. 447-463. 2007.

COIN, I.; BEYERMANN, M.; BIENERT, M. Solid-phase peptide synthesis: from standard procedures to the synthesis of difficult sequences. **Nat Protoc.**, 2(12):3247-56. 2007.

COPP, D. H.; CAMERON, E. C.; CHENEY, B.; DAVIDSON, A. G. F.; HENZE, K. G. Evidence for calcitonin - a new hormone from the parathyroid that lowers blood calcium. **Endocrinol.**, 70, 638 - 649. 1962.

CRUZ, T. Cálcio, Fósforo, Vitamina D, Paratormônio, Calcitonina e doenças osteometabólicas. **Farmacologia**, ed Guanabara, 3o ed. 1989.

DE GHELLINCK, A.; FRAGNETO, G.; LAUX, V.; HAERTLEIN, M.; JOUHET, J.; SFERRAZZA, M.; WACKLIN, H. Lipid polyunsaturation determines the extent of membrane

structural changes induced by Amphotericin B in *Pichia pastoris* yeast. **Biochim Biophys Acta**, 1848(10 Pt A): 2317-25. 2015

DE MARCO, A. Recent advances in recombinant production of soluble proteins in *E. coli*. **Microb Cell Fact.** 24(1): 21. 2025.

DE MORAES, J.; NASCIMENTO, C.; MIURA, L. M.; LEITE, J. R.; NAKANO, E.; KAWANO, T. Evaluation of the in vitro activity of dermaseptin 01, a cationic antimicrobial peptide, against *Schistosoma mansoni*. **Chem Biodivers.**, 8(3): 548-58. 2011.

DEO, S.; TURTON, K. L.; KAINTH, T.; KUMAR, A.; WIEDEN, H. J. Strategies for improving antimicrobial peptide production. **Biotechnol Adv.**, 59: 107968. 2022.

DIOCIAIUTI, M.; POLZI, L. Z.; VALVO, L.; MALCHIODI-ALBEDI, F.; BOMBELLI, C.; GAUDIANO, M. C. Calcitonin forms oligomeric pore-like structures in lipid membranes. **Biophys J.**, 91(6): 2275-81. 2006.

DREWNIAK-ŚWITALSKA, M.; BARYCZA, B.; RUDZIŃSKA-SZOSTAK, E.; MORAWIAK, P.; BERLICKI, L. Constrained beta-amino acid-containing miniproteins. **Org. Biomol. Chem.**, 19, 4272-4278. 2021.

FELSENFELD, A. J.; LEVINE, B. S. Calcitonin, the forgotten hormone: does it deserve to be forgotten? **Clin Kidney J.** 8 (2):180-7. 2015.

FIORE, K. E.; PHAN, H. A. T.; ROBKIS, D. M.; WALTERS, C. R.; PETERSSON, E. J. Incorporating thioamides into proteins by native chemical ligation. **Methods Enzymol.** 656:295-339. 2021.

GOMES, A. M. V.; CARMO, T. S.; CARVALHO, L. S.; BAHIA, F. M.; PARACHIN, N. S. Comparison of Yeasts as Hosts for Recombinant Protein Production. **Microorganisms**, 6(2):38. 2018.

GRILLITSCH, K.; TARAZONA, P.; KLUG, L.; WRIESSNEGGER, T.; ZELLNIG, G.; LEITNER, E.; FEUSSNER, I.; DAUM, G. Isolation and characterization of the plasma membrane from the yeast *Pichia pastoris*. **Biochim Biophys Acta**, 1838(7):1889-97. 2014.

HE, H.; WU, S.; MEI, M.; NING, J.; LI, C.; MA, L.; ZHANG, G.; YI, L. A Combinational Strategy for Effective Heterologous Production of Functional Human Lysozyme in *Pichia pastoris*. **Front. Bioeng. Biotechnol.**, 8:118. 2020.

HOPKINS, D.; GOMATHINAYAGAM, S.; LYNAUGH, H.; STADHEIM, T. A.; HAMILTON, S. R. Elimination of diaminopeptidase activity in *Pichia pastoris* for therapeutic protein production. **Appl Microbiol Biotechnol.**, 98(6):2573-83. 2014.

HUAN, Y.; KONG, Q.; MOU, H.; YI, H. Antimicrobial Peptides: Classification, Design, Application and Research Progress in Multiple Fields. **Front Microbiol.**, 11:582779. 2020.

JULIUS, D.; BLAIR, L.; BRAKE, A.; SPRAGUE, G.; THORNER, J. Yeast alpha factor is processed from a larger precursor polypeptide: the essential role of a membrane-bound dipeptidyl aminopeptidase. **Cell**, 32(3):839-52. 1983.

JUMPER, J.; EVANS, R.; PRITZEL, A.; GREEN, T.; FIGURNOV, M.; RONNEBERGER, O.; TUNYASUVUNAKOOL, K.; BATES, R.; ŽÍDEK, A.; POTAPENKO, A.; BRIDGLAND, A.;

MEYER, C.; KOHL, S.A.A.; BALLARD, A. J.; COWIE, A.; ROMERA-PAREDES, B.; NIKOLOV, S.; JAIN, R.; ADLER, J.; BACK, T.; PETERSEN, S.; REIMAN, D.; CLANCY, E.; ZIELINSKI, M.; STEINEGGER, M.; PACHOLSKA, M.; BERGHAMMER, T.; BODENSTEIN, S.; SILVER, D.; VINYALS, O.; SENIOR, A. W.; KAVUKCUOGLU, K.; KOHLI, P.; HASSABIS, D. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. **Nature**. 596 (7873): 583-589. 2021.

KALIDAS, C. *Pichia pastoris*. **Encyclopedia of Food Microbiology**, (ROBINSON, R. K.; BATT, C. A.; PATEL, P. D.), Vol. 3, pp. 1686–1692. Academic Press, San Diego. 2000.

KAPLAN, K.; LEVKOVICH, S. A.; DEROWE, Y.; GAZIT, E.; LAOR BAR-YOSEF, D. Mind your marker: the effect of common auxotrophic markers on complex traits in yeast. **FEBS J**. 291 (10):2209-2220. 2024.

KASTIN, A. B. Handbook of Biologically Active Peptides (2nd ed.). 2013.

KIMELMAN, A.; LEVY, A.; SBERRO, H.; KIDRON, S.; LEAVITT, A.; AMITAI, G.; YODER-HIMES, D. R.; WURTZEL, O.; ZHU, Y.; RUBIN, E. M.; SOREK, R. A vast collection of microbial genes that are toxic to bacteria. **Genome Res**. 22 (4):802-9. 2012.

KIRIAKOPOULOS, A.; GIANNAKIS, P.; MENENAKOS, E. Calcitonin: current concepts and differential diagnosis. **Ther Adv Endocrinol Metab**. 13:20420188221099344. 2022.

KREIL, G.; HAIML, L.; SUCHANEK, G. Stepwise cleavage of the pro part of promelittin by dipeptidylpeptidase IV. Evidence for a new type of precursor-product conversion. **Eur J Biochem.**, 111(1):49-58. 1980.

KRELA, R.; POREBA, E.; WEGLEWSKA, M.; SKRZYPCZAK, T.; LESNIEWICZ, K. A novel method for cloning of coding sequences of highly toxic proteins. **Biochim Biophys Acta**, 1863 (3):521-527. 2019.

KURJAN, J.; HERSKOWITZ, I. Structure of a yeast pheromone gene (MF $\alpha$ ): a putative  $\alpha$ -factor precursor contains four tandem copies of mature  $\alpha$ -factor. **Cell**, 39:933-943. 1982.

KURTZMAN C. P. Biotechnological strains of Komagataella (*Pichia*) *pastoris* are Komagataella *phaffii* as determined from multigene sequence analysis. **J Ind Microbiol Biotechnol.**, 36(11): 1435-8. 2009.

LAMER, T.; VAN BELKUM, M. J.; VEDERAS, J. C. Methods for Recombinant Production and Purification of Peptides as SUMO-Peptide-Intein Fusion Proteins to Protect from Degradation. **Curr Protoc**. 2 (10):e571. 2022.

LEE, J.H.; MINN, I.; PARK, C. B.; KIM, S. C. Acidic peptide-mediated expression of the antimicrobial peptide buforin II as tandem repeats in *Escherichia coli*. **Protein Expr Purif.**, 12(1): 53-60. 1998.

LIU, Y.; YANG, X.; HE, X.; PENG, Y.; LI, P.; ZHANG, Y.; MA, Q.; ZHONG, H. Expression of SCT-OGP Fusion Protein and Its Potential Role as Osteoporosis Therapy Drugs. **Chinese Journal of Biotechnology**, 22(4): 539–544. 2006.

MENG, D. M.; ZHAO, J. F.; LING, X.; DAI, H. X.; GUO, Y. J.; GAO, X. F.; DONG, B.; ZHANG, Z. Q.; MENG, X.; FAN, Z. C. Recombinant expression, purification and

antimicrobial activity of a novel antimicrobial peptide PaDef in *Pichia pastoris*. **Protein Expr Purif.**, 130: 90-99. 2017.

MENG, D. M.; LI, W. J.; SHI, L. Y.; LV, Y. J.; SUN, X. Q.; HU, J. C.; FAN, Z. C. Expression, purification and characterization of a recombinant antimicrobial peptide Hispidalin in *Pichia pastoris*. **Protein Expr Purif.**, 160: 19-27. 2019.

NELSON, D. L.; COX, M. M. Lehninger principles of biochemistry (7th ed.). W.H. Freeman. 2017.

O'DOR, R. K.; PARKES, C. O.; COPP, D. H. Amino acid composition of salmon calcitonin. **Canadian Journal of Biochemistry**, 47(8), 823–825. 1969.

PARACHIN, N. S.; MULDER, K. C.; VIANA, A. A.; DIAS, S. C.; FRANCO, O. L. Expression systems for heterologous production of antimicrobial peptides. **Peptides**, 38(2):446-56. 2012.

PASTEUR, L. Mémoire sur la fermentation acétique. **Annales scientifiques de l'École Normale Supérieure**, Série 1, Tome 1, pp. 113-158. 1864.

POPA, C.; SHI, X.; RUIZ, T.; FERRER, P.; COCA, M. Biotechnological Production of the Cell Penetrating Antifungal PAF102 Peptide in *Pichia pastoris*. **Front Microbiol.**, 10:1472. 2019.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. Molecular cloning: a laboratory manual. **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, 2nd ed. New York, USA. 1989.

SEKIGUCHI T. Evolution of calcitonin/calcitonin gene-related peptide family in chordates: Identification of CT/CGRP family peptides in cartilaginous fish genome. **Gen Comp Endocrinol.**, 328:114123. 2022.

SON, M. S.; TAYLOR, R. K. Growth and maintenance of Escherichia coli laboratory strains. **Curr Protoc Microbiol.**, Chapter 5: Unit 5A.4. 2012.

SONG, D.; CHEN, Y.; LI, X.; ZHU, M.; GU, Q. Heterologous expression and purification of dermaseptin S4 fusion in Escherichia coli and recovery of biological activity. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, 44:6, 598-607. 2014.

STOLLAR, E. J.; SMITH, D.P. Uncovering protein structure. **Essays Biochem.** 65(2): 407. 2021.

TUCKER, A. T.; LEONARD, S. P.; DUBOIS, C. D.; KNAUF, G. A.; CUNNINGHAM, A. L.; WILKE, C. O.; TRENT, M. S.; DAVIES, B. W. Discovery of Next-Generation Antimicrobials through Bacterial Self-Screening of Surface-Displayed Peptide Libraries. **Cell**, 172(3):618-628.e13. 2018.

WANG, L.; WANG, N.; ZHANG, W.; CHENG, X.; YAN, Z.; SHAO, G.; WANG, X.; WANG, R.; FU, C. Therapeutic peptides: current applications and future directions. **Signal Transduct Target Ther.** 7 (1):48. 2022.

WEISS, F.; REQUENA-MORENO, G.; PICHLER, C.; VALERO, F.; GLIEDER, A.; GARCIA-ORTEGA, X. Scalable protein production by Komagataella phaffii enabled by ARS plasmids and carbon source-based selection. **Microb Cell Fact.** 23 (1):116. 2024.

WEN, X.; ZHANG, Y.; CHENG, H.; AN, J.; GUO, Y.; WANG, L.; WANG, M. A CRISPR/dCas9-assisted system to clone toxic genes in *Escherichia coli*. **Biochim Biophys Acta**, 1865 (11):129994. 2021.

XAVIER, M. A. S. **Desenvolvimento de tecnologia para produção da calcitonina humana por engenharia genética**. Tese (Doutorado em Biologia Molecular). Universidade de Brasília, Brasília, Brasil. 2003.

XIA, L.; LIU, Z.; MA, J.; SUN, S.; YANG, J.; ZHANG, F. Expression, purification and characterization of cecropin antibacterial peptide from *Bombyx mori* in *Saccharomyces cerevisiae*. **Protein Expr Purif.**, 90(1):47-54. 2013.

XIAO, S.; GAO, Y.; WANG, X.; SHEN, W.; WANG, J.; ZHOU, X.; CAI, M.; ZHANG, Y. Peroxisome-targeted and tandem repeat multimer expressions of human antimicrobial peptide LL37 in *Pichia pastoris*. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, vol. 47, No. 3, 229–235. 2017.

YU, W.; GAO, X. J.; LIU, Y.; WANG, Q. Fusion expression of cecropin B-like antibacterial peptide in *Pichia* GS115 and its antibacterial mechanism. **Biotechnol. Lett.**, Springer. 2015.

## ANEXO

### I. Meios de Cultura

#### Meio Luria-Bertani (Meio LB)

Extrato de levedura.....0,5% (p/v)

Peptona.....1% (p/v)

NaCl.....0,5% (p/v)

pH 7,2. Para meio sólido foi adicionado ágar 2% (p/v)

#### Meio mínimo com glicose (Meio MD com glicose)

YNB com sulfato de amônio.....1,34% (p/v)

Biotina..... $4 \times 10^{-5}\%$  (p/v)

Glicose.....2% (p/v)

Para meio sólido foi adicionado ágar 2% (p/v)

#### Meio mínimo com metanol (Meio MD com metanol)

A mesma receita anterior, a exceção da glicose, que é substituída por metanol 0,5%.

#### Meio YPD

Peptona.....2% (p/v)

Extrato de levedura.....1% (p/v)

Glicose.....2% (p/v)

Para meio sólido foi adicionado ágar 2% (p/v)

#### Meio BMGY

Peptona.....2% (p/v)

Extrato de levedura.....1% (p/v)

Tampão Fosfato de Potássio (pH 6,0).....10% (v/v)

|                   |            |
|-------------------|------------|
| YNB.....          | 10% (v/v)  |
| Biotina 500X..... | 0,2% (v/v) |
| Glicerol.....     | 1% (v/v)   |

### **Meio BMMY**

A mesma receita anterior, a exceção da glicose, que é substituída por metanol 0,5%.

## **II. Soluções para outras finalidades**

### **Extração de DNA Plasmidial**

#### **Solução I**

|                        |       |
|------------------------|-------|
| Tris-HCl (pH 8,0)..... | 1mM   |
| EDTA.....              | 0,1Mm |

#### **Solução II**

|           |         |
|-----------|---------|
| NaOH..... | 0,2M    |
| SDS.....  | 1%(p/v) |

Esta solução deve ser preparada no momento do uso.

#### **Solução III**

|                       |    |
|-----------------------|----|
| Acetato de sódio..... | 3M |
| Ácido acético.....    | 2M |

pH 5,0

### **Eletroforese**

#### **Solução de coloração por Coomassie**

|                        |        |
|------------------------|--------|
| H <sub>2</sub> O.....  | 10 mL  |
| Ácido Fosfórico.....   | 10 mL  |
| Sulfato de Amônio..... | 10 g   |
| Coomassie G-250.....   | 120 mg |

Metanol.....20 mL

Ajustar para 100 mL de água

### **Tampão de corrida (Tris-Glicina/SDS)**

Tris Base.....25mM

Glicina.....190mM

Metanol.....20% (v/v)

Ajustar pH para 8.3

### **Western Blot**

#### **Tampão de transferência (Semi-seca)**

Tris Base.....5,82 g

Glicina.....2,93g

SDS.....0,375 g

Metanol.....200mL

Ajustar o volume para 1 L de água

### **TBST**

Tris a 0,5 M.....6 mL.

NaCl a 5 M.....4,5 mL

Tween 20.....150 µL

Ajustar para 150 mL de água.

### **Lise das células**

#### **Tampão de lise I**

Cloridrato de Guanidina.....6M

Tampão fosfato.....20mM

NaCl.....500mM

Imidazol.....20mM

### **Tampão de lise II**

|                              |      |
|------------------------------|------|
| Cloridrato de Guanidina..... | 6M   |
| Tris-HCl.....                | 50mM |
| EDTA.....                    | 50mM |

### **Tampão de lise III**

|                                |                                        |
|--------------------------------|----------------------------------------|
| Tampão fosfato.....            | 20mM                                   |
| Inibidor de protease PMSF..... | 1mM                                    |
| Lisozima.....                  | ajustado à quantidade de <i>pellet</i> |
| DNAse.....                     | ajustado à quantidade de <i>pellet</i> |

### **Matriz para Espectrometria de Massa**

#### **Matriz de $\alpha$ -ciano**

|                                              |             |
|----------------------------------------------|-------------|
| Ácido $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico..... | 5 mg        |
| Acetonitrila 100%.....                       | 250 $\mu$ L |
| TFA 3%.....                                  | 50 $\mu$ L  |
| Água.....                                    | 200 $\mu$ L |