



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA E EVOLUÇÃO**



Pedro Mendes Laprega

**IDENTIFICAÇÃO E EXPRESSÃO RECOMBINANTE DE UM NOVO PEPTÍDEO DE
POTENCIAL ANTIMICROBIANO DERIVADO DA PROTEÍNA DE
RECONHECIMENTO DE PEPTIDOGLICANOS 3 HUMANA**

**São Carlos
Fevereiro de 2024**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA E EVOLUÇÃO
CURSO DE BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA**

Pedro Mendes Laprega

**IDENTIFICAÇÃO E EXPRESSÃO RECOMBINANTE DE UM NOVO PEPTÍDEO DE
POTENCIAL ANTIMICROBIANO DERIVADO DA PROTEÍNA DE
RECONHECIMENTO DE PEPTIDOGLICANOS 3 HUMANA**

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

Orientadora: Profa. Dra. Maria Cristina da
Silva Pranchevicius

**São Carlos
Fevereiro de 2024**

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente, pelo amor e apoio incondicional constantes, à minha família como um todo, em especial aos meus pais, André e Andrea, meus irmãos, Caio e Maria Clara e aos meus avós Celso, Flávia, Milton e Carmen. Tenho todos vocês em meu coração.

Agradeço também aos amigos que tive o prazer de conhecer ao longo da vida e que puderam me inspirar de diversas formas. Obrigado em especial aos amigos que mais me apoiaram, academicamente ou não..., durante a realização deste trabalho: Afonso, Matheus, Lucas, Eduarda, Karina e Vinicius.

À professora Maria Cristina pela confiança, amizade e orientação que possibilitaram o desenvolvimento deste trabalho.

À Andrea, Daniela e outros membros do LBV pelas contribuições pertinentes e essenciais que puderam proporcionar.

Aos demais colegas de laboratório que puderam contribuir com boas conversas e um ambiente profissional.

Agradeço à FAPESP pelo apoio financeiro, sem o qual o projeto não poderia ter sido realizado.

À banca examinadora pela dedicação de tempo e conhecimento para a avaliação do trabalho.

Marcando o fim de uma etapa muito especial da minha vida, esse trabalho representa para mim uma curadoria imensa de vivências fundamentais para a construção de quem eu sou hoje. Agradeço de coração a todos que de alguma forma contribuíram para isso.

RESUMO

Durante o século XXI a resistência bacteriana a drogas atingiu patamares de grande periculosidade, demonstrando-se necessário o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para o combate desses patógenos. Dentre eles, peptídeos antimicrobianos (AMPs) se mostram candidatos promissores, uma vez que possuem mecanismos de ação muitas vezes distintos de antibióticos convencionais, já que têm como alvo compostos variados da membrana bacteriana, ocasionando em sua disrupção. Ademais, uma vez que possuem características físico-químicas bem descritas, com o avanço de recursos computacionais, foram desenvolvidas várias estratégias *in silico* voltadas para a identificação e *design* desses compostos. Dessa forma, neste estudo, propusemos a identificação de um novo peptídeo de potencial antimicrobiano, por meio de uma mineração computacional do proteoma humano, bem como sua produção de maneira recombinante. Durante nossas análises identificamos um candidato promissor derivado da Proteína de Reconhecimento de Peptidoglicanos 3 (PGLYRP3) e, denominado portanto, AMP-PGLYRP3. Isso porque o AMP identificado foi predito, por meio de análises *in silico*, como um peptídeo catiônico, anfipático e com estrutura de α -hélice, características já bem descritas em peptídeos antimicrobianos. Ademais, o AMP-PGLYRP3 não demonstrou potencial hemolítico, nem alergênico, sugerindo uma possível aplicação terapêutica. O peptídeo foi expresso em sistema baculoviral utilizando a proteína de fusão SUMO3. Com os dados obtidos, o peptídeo deverá ser quanto à sua atividade antimicrobiana através de testes *in vitro*, dando continuidade ao desenvolvimento desse candidato terapêutico.

Palavras-chave: Peptídeo antimicrobiano (AMPs); Proteína de Reconhecimento de Peptidoglicanos 3 (PGLYRP3); Resistência antimicrobiana

ABSTRACT

During the 21st century, bacterial resistance to drugs has reached dangerous levels, necessitating the development of new therapeutic strategies to combat these pathogens. Among them, antimicrobial peptides (AMPs) emerge as promising candidates, as they often have mechanisms of action distinct from conventional antibiotics, targeting various components of the bacterial membrane, leading to its disruption. Furthermore, due to well-described physicochemical characteristics and advances in computational resources, various *in silico* strategies have been developed for the identification and design of these compounds. In this study, we proposed the identification of a new potential antimicrobial peptide through computational mining of the human proteome, followed by its recombinant production. During our analyses, we identified a promising candidate derived from Peptidoglycan Recognition Protein 3 (PGLYRP3), hence named AMP-PGLYRP3. The identified AMP was predicted, through *in silico* analyses, to be a cationic, amphipathic peptide with an alpha-helical structure, characteristics well-described in antimicrobial peptides. Additionally, AMP-PGLYRP3 showed no hemolytic or allergenic potential, suggesting possible therapeutic applications. The peptide was expressed in a baculoviral system using the SUMO3 fusion protein. Finally, *in vitro* tests of the peptide's activity will be conducted to validate the results obtained from our analyses, advancing the development of this therapeutic candidate.

Key words: Antimicrobial peptide (AMP); Peptidoglycan Recognition Protein 3 (PGLYRP3);
Antimicrobial resistance

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Mecanismos de ação de AMPs sobre a membrana	11
Figura 2 - pPicZαA-PGLYRP3	19
Figura 3 - pFastBac1-SUMO3-AMP-PGLYRP3	20
Quadro 1 - Par de primers para a sequência parcial da SUMO3	23
Quadro 2 - Par de primers para a reamplificação da SUMO3	24
Quadro 3 - Par de primers para a amplificação do AMP-PGLYRP3	25
Quadro 4 - Par de primers para a amplificação final da SUMO3	26
Quadro 5 - Par de primers para a amplificação final da SUMO3	28
Figura 4 - Representação gráfica do potencial antimicrobiano de criptídeos da PGLYRP3	31
Quadro 6 - Sequência aminoacídica da PGLYRP3 e do AMP-PGLYRP3	31
Figura 5 - Estrutura Tridimensional do AMP-PGLYRP3	34
Figura 6 - Perfil de expressão da proteína recombinante PGLYRP3 no clone 9	36
Figura 7 - Análise dos clones de Pichia pastoris 1 a 8 em 72 horas de indução	36
Figura 8 - Western Blot dos clones 2, 3, 4 e 9 para análise da expressão da PGLYRP3	37
Figura 9 - Eletroforese de RNA extraído de K562	38
Figura 10 - Eletroforese da PCR da sequência parcial da SUMO3	39
Figura 11 - Eletroforese da PCR para adição de overhangs	40
Figura 12 - PCR de colônia pGEM-T-SUMO3	41
Figura 13 - Alinhamento do sequenciamento com a sequência esperada	42
Figura 14 - Eletroforese da PCR do AMP-PGLYRP3	43
Figura 15 - Eletroforese da PCR de adição de região de homologia	43
Figura 16 - Eletroforese da PCR Overlap	44
Figura 17 - Eletroforese da PCR de colônia do pGEM-T-SUMO3-AMP-PGLYRP3	45
Figura 18 - Alinhamento do sequenciamento com a sequência esperada	45
Figura 19 - Eletroforese das reações de clivagem	46
Figura 20 - PCR de colônia do pFastBac1-SUMO3-AMP-PGLYRP3	47
Figura 21 - PCR de validação da recombinação com o bacmídeo	47
Figura 22 - Representação do bacmídeo recombinante	48
Figura 23 - Análise da expressão do híbrido SUMO3-AMP-PGLYRP3	49

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	7
2. REVISÃO DA LITERATURA	8
2.1. Proteínas de Reconhecimento de Peptidoglicanos	8
2.1.1. Características gerais	8
2.1.2. PGLYRPs em mamíferos	8
2.2. Peptídeos antimicrobianos	10
2.2.1. Propriedades gerais	10
2.2.2. Mecanismo de ação	10
2.2.3. Peptídeos crípticos e modelos de predição <i>in silico</i>	12
2.2.4. Produção de peptídeos antimicrobianos	13
3. OBJETIVO GERAL	16
3.1. Objetivos específicos	16
4. MATERIAIS E MÉTODOS	17
4.1. Análises <i>in silico</i>	17
4.1.1. Triagem de AMPs derivados do proteoma humano	17
4.1.2. Análise de propriedades alergênicas, tóxicas e hemolíticas	17
4.1.3. Predição de atividade antimicrobiana específica	17
4.1.4. Análise de propriedades estruturais e físico-químicas dos peptídeos	18
4.1.5. Delineamento de estratégias de clonagem e purificação	18
4.1.5.1. PGLYRP3	18
4.1.5.2. AMP-PGLYRP3	19
4.2. Expressão recombinante da PGLYRP3 em <i>Pichia pastoris</i>	20
4.2.1. Preparação de <i>Pichia pastoris</i> competentes	20
4.2.2. Transformação de <i>Pichia pastoris</i> X-33	20
4.2.3. Indução da expressão em pequena escala	21
4.2.4. Análises qualitativas	21
4.3. Obtenção da sequência processada da SUMO3	22
4.3.1. Cultura de células da linhagem K-562	22
4.3.2. Extração de RNA e síntese de cDNA	22
4.3.3. Amplificação parcial da SUMO3	23
4.3.4. Amplificação para adição de overhangs de interesse à SUMO3	23
4.3.5. Clonagem em vetor de propagação	24
4.4. Formação do híbrido SUMO3-AMP-PGLYRP3	24
4.4.1. Amplificação do AMP-PGLYRP3	24
4.4.3. Adição da região de homologia à SUMO3+6-His	25
4.4.4. PCR Overlap	26
4.4.5. Clonagem em vetor de propagação e subclonagem em pFastBac1	26
4.4.6. Recombinação do bacmídeo em células <i>E. coli</i> DH10Bac	27

4.5. Expressão recombinante do AMP-PGLYRP3 em ExpiSf9	28
4.5.1. Transfecção e amplificação do estoque viral	28
4.5.2. Purificação e análises qualitativas	29
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
5.1. Análises in silico para obtenção do peptídeo	30
5.2. Expressão heteróloga da PGLYRP3 em Pichia pastoris	35
5.3. Expressão heteróloga do AMP-PGLYRP3 em sistema baculoviral	38
5.3.1. Clonagem e processamento da sequência da proteína de fusão SUMO3 para produção do híbrido SUMO3-AMP-PGLYRP3	38
5.3.2. Clonagem do híbrido em pFastBac1 e geração do bacmídeo	42
5.3.3. Análise da expressão do híbrido SUMO3-AMP-PGLYRP3	48
6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS	51
7. REFERÊNCIAS	52

1. INTRODUÇÃO

Na primeira metade do século XX a descoberta de antibióticos e suas aplicações clínicas marcaram um dos maiores avanços da medicina. Além de eficazes no tratamento de infecções, essas substâncias possibilitaram o desenvolvimento de outros procedimentos clínicos modernos como transplantes de órgão e tratamentos de câncer (HUTCHINGS; TRUMAN; WILKINSON, 2019). No entanto, o vasto e, muitas vezes, inadequado uso desses compostos resultou em um grande avanço da resistência antimicrobiana, a qual emergiu como uma das principais ameaças à saúde pública global no século XXI (MURRAY, 2022).

Estimou-se que, em 2019, as bactérias resistentes a antibióticos tenham sido diretamente responsáveis por 1,27 milhão de mortes e contribuíram com outras 4,95 milhões globalmente (MURRAY, 2022). Somada à grande perda humana e social provocada por esses microrganismos são esperados diversos impactos econômicos considerando extensos gastos na saúde, comprometimento de mão de obra e impactos na pecuária (JONAS *et al.*, 2017). Ademais, agravando consideravelmente o panorama apresentado, nota-se uma tendência mercadológica negativa à produção de novos antibióticos, considerando o baixo potencial lucrativo desses compostos quando comparados a terapias crônicas (PAULIN; BEYER, 2019).

Considerando o contexto apresentado, a Organização Mundial da Saúde (OMS) lançou em 2015 o *Global Action Plan on Antimicrobial Resistance*, o qual apresentava que o problema da resistência antimicrobiana só poderia ser enfrentado com estratégias cobrindo dois principais níveis: vigilância e controle (OMS, 2015). Este, por sua vez, baseia-se em ações preventivas, com foco na redução da disseminação, e de tratamento, baseado em uma redução direta na letalidade desses patógenos com o desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos, como produtos naturais, vacinas e peptídeos antimicrobianos (AMPs) (DUTESCU; HILLIER, 2021).

Considerando que os peptídeos antimicrobianos podem ser uma nova alternativa no combate de bactérias resistentes e candidatos promissores para o desenvolvimento de novas terapias (KOO; SEO, 2019), neste trabalho, foi identificado um novo peptídeo antimicrobiano (AMP-PGLYRP3), derivado da proteína de reconhecimento de peptidoglicanos 3 (PGLYRP3) humana. Adicionalmente, o AMP-PGLYRP3 foi expresso em sistema de expressão células de insetos/baculovírus.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Proteínas de Reconhecimento de Peptidoglicanos

2.1.1. Características gerais

As Proteínas de Reconhecimento de Peptidoglicano (PGLYRPs) são componentes do sistema imunológico inato que reconhecem bactérias e desempenham um papel fundamental na resposta imune antibacteriana (DZIARSKI; GUPTA, 2006). A descoberta inicial de uma PGLYRP em lagartas de seda revelou sua capacidade de reconhecer o peptidoglicano (PGN) bacteriano, desencadeando a ativação da cascata de profenoloxidase, a qual é um mecanismo de defesa importante dos insetos (YOSHIDA; KINOSHITA; ASHIDA, 1996). Subsequentemente, revelou-se a presença de famílias de PGLYRPs em insetos e mamíferos, indicando uma notável conservação evolutiva (KANG *et al.*, 1998).

Todas as PGLYRPs apresentam, no mínimo, um ou ocasionalmente dois domínios de reconhecimento de peptidoglicanos (PGRP), os quais são análogos às amidases tipo 2 encontradas em bacteriófagos e bactérias. Isso sugere a possibilidade de conservação do gene de amidase tipo 2 ao longo da evolução, desde procariotos até eucariotos. No entanto, é importante notar que as PGLYRPs não estão presentes em todas as formas de vida, sendo ausentes em plantas e em metazoários inferiores, como nematóides (DZIARSKI; GUPTA, 2006).

2.1.2. PGLYRPs em mamíferos

Os mamíferos possuem quatro PGLYRPs as quais foram inicialmente denominadas PGRP-S, PGRP-L, PGRP-I α e PGRP-I β (para '*short*', '*long*', ou '*intermediate*', respectivamente), por analogia às PGLYRPs de insetos (LIU *et al.*, 2001). Os nomes para as PGLYRPs humanas foram então modificados pelo Comitê de Nomenclatura de Genes da Organização do Genoma Humano para PGLYRP1, PGLYRP2, PGLYRP3 e PGLYRP4, respectivamente, e essa nomenclatura foi adotada para todas as PGLYRPs em mamíferos. Apesar de todas serem secretadas, são diferencialmente expressas em vários órgãos e também se distinguem estruturalmente (DZIARSKI; GUPTA, 2010). A PGLYRP1 é expressa principalmente nos grânulos de neutrófilos; A PGLYRP2 é expressa constitutivamente no fígado, no qual ela é secretada no sangue e, por fim, as PGLYRPs 3 e 4 são expressas na pele, olhos, glândulas salivares, garganta, língua, esôfago, estômago e intestino (DZIARSKI; GUPTA, 2006).

A PGLYRP2 é uma proteína monomérica que funcionalmente se distingue das outras PGLYRPs humanas, uma vez que é uma N-Acetil-Muramil-L-alanina amidase (WANG *et al.*, 2003). Dessa forma, essa proteína é responsável pela hidrólise da ligação entre o ácido N-acetilmurâmico (MurNAc) e a L-alanina (L-Ala) degradando o peptidoglicano. No entanto, seu substrato preferencial são peptidoglicanos solúveis resultantes da ação de outros componentes do sistema imunológico, já que o PGN cruzado na parede bacteriana é um substrato de difícil acesso à proteína. Assim, o papel principal da PGLYRP2 é considerado como imunomodulatório, uma vez que reduz a resposta imunológica a esses componentes pró-inflamatórios (WANG *et al.*, 2003).

As outras PGLYRPs são proteínas bactericidas ou bacteriostáticas que se apresentam como homodímeros e heterodímeros ligados por dissulfeto e possuem atividade dependente de cátions divalentes, em especial o zinco (WANG *et al.*, 2007). Inicialmente, suas propriedades antimicrobianas foram atribuídas à promoção de estresse oxidativo constante nesses organismos (KASHYAP *et al.*, 2014).

No trabalho de DIZIARSKY *et al.* (2011) essa atividade foi explicada e considerada nova para proteínas antimicrobianas humanas. Foi demonstrado que as PGLYRPs induzem permanentemente o sistema de dois componentes sensíveis a proteínas de membrana, sendo chamado de CpxA-CpxR em *Escherichia coli*. Esse por sua vez, é presente homologamente em praticamente todas as bactérias e é responsável por proteger a célula dos efeitos do acúmulo de proteínas mal dobradas ou agregadas. Assim, a detecção dessas estruturas é realizada pela proteína de membrana CpxA, que fosforila a CpxR e, finalmente, promove a resposta intracelular ao estresse (DANESE; SILHAVY, 1997).

Durante esse processo há a indução da produção de proteases e espécies reativas de oxigênio (ROS) e inibição de reações biossintéticas (DANESE; SILHAVY, 1997). Quando a cascata não é cessada, a bactéria é levada à morte, que é justamente o principal mecanismo utilizado pelas PGLYRPs. No trabalho de KASHYAP *et al.* (2014), também foi demonstrado que a depleção de tiols e o acúmulo intracelular de metais, mais notavelmente o zinco divalente, são outros processos complementares à ação bactericida dessas proteínas, apesar de não ter sido totalmente elucidado.

Por possuírem um mecanismo de ação diferente dos peptídeos antimicrobianos, a ação conjunta de PGLYRPs e AMPs se mostrou sinérgica (WANG *et al.*, 2007). No trabalho de WANG *et al.* (2007) foi demonstrado que em conjunto essas moléculas demonstraram atividade antibacteriana, mesmo em concentrações subbactericidas individuais. Isso por sua

vez, se mostra uma ótima estratégia para sistemas *in vivo*, uma vez que os compostos são coexpressos em muitos órgãos, como a pele que apresenta produção de PGLYRP e defensinas. Além disso, a ação sinérgica desses mecanismos de ação é uma promissora fonte de novas estratégias antibacterianas (WANG et al., 2007).

As PGLYRPs 1, 3 e 4 humanas já foram produzidas de maneira recombinante em vários trabalhos utilizando linhagens celulares eucarióticas de organismos superiores, como a S2, derivadas de uma cultura de células embrionárias de *Drosophila melanogaster* (WANG et al., 2007), HeLa (câncer cervical), e Expi293 (células renais embrionárias) (BOBROVSKY et al., 2016). Nesses estudos, a expressão foi bem sucedida e sua ação foi conservada na presença de zinco, demonstrando atividade bactericida em *E. coli*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*. Além disso, no trabalho de YANG et al. (2016) foi utilizado o sistema de expressão em leveduras *Pichia pastoris* para produção da PGLYRP1 porcina com sucesso, também conservando sua atividade antimicrobiana. No entanto, sistemas procariotos não se mostraram utilizados, uma vez que a ação dessa classe de proteínas é dependente de glicosilação, modificação pós-traducional não realizada por esses sistemas (DZIARSKI; GUPTA, 2006).

2.2. Peptídeos antimicrobianos

2.2.1. Propriedades gerais

Peptídeos antimicrobianos representam um grupo abrangente de proteínas curtas (5-100 aminoácidos) encontradas em todos os organismos como mecanismo de defesa ou competição. Uma das classes mais importantes, por ser uma parcela bem representativa e estudada, é a dos peptídeos antimicrobianos catiônicos (CAPs), que se enquadram nas seguintes características: possuem entre dez e cinquenta resíduos de aminoácidos; estrutura linear/ α -hélice; resíduos catiônicos e hidrofóbicos ordenados em faces opostas em sua estrutura tridimensional. Essas propriedades estão intimamente relacionadas à sua atividade e especificidade, uma vez que possibilitam a interação com membranas e paredes celulares (ZHANG; GALLO, 2016).

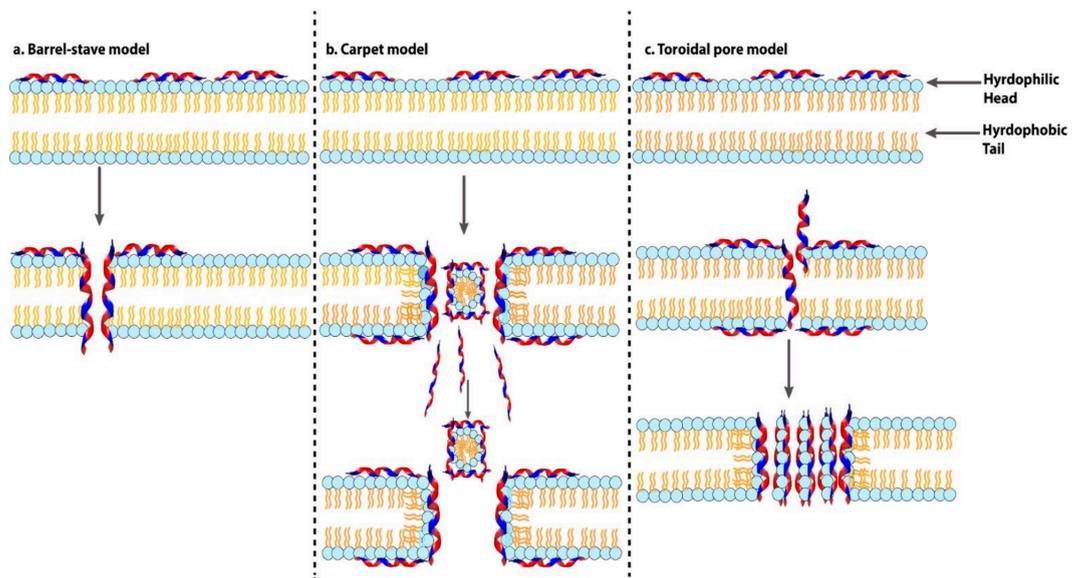
2.2.2. Mecanismo de ação

O mecanismo de ação mais comum dos CAPs é o de ruptura de membrana, o qual é explicado primordialmente pelas interações eletrostática e hidrofóbica (TALAPKO et al., 2022). Particularmente, a primeira é a principal força motriz na ligação inicial dos resíduos carregados positivamente dos AMPs à superfície celular bacteriana, que contém alto teor de lipídios aniônicos, como fosfatidilglicerol e cardiolipina (BAHAR; REN, 2013). Realizada a

atração eletrostática, os resíduos hidrofóbicos passam a interagir com os componentes lipídicos da bicamada e, atingida uma concentração crítica de agregação, os peptídeos penetram-na, formando poros transmembrana que inviabilizam o patógeno (SATO; FEIX, 2006; LUO; SONG, 2021).

A formação e tipo desses poros são descritos por três modelos já encontrados em peptídeos antimicrobianos: o “*barrel-stave*”, “*carpet*” e “*toroidal pore*”, como pode ser observado na **Figura 1**. É importante ressaltar que peptídeos antimicrobianos podem apresentar mais de um modelo de ruptura de membrana, não sendo mutuamente exclusivos (BIN HAFEZ *et al.*, 2021).

Figura 1 - Mecanismos de ação de AMPs sobre a membrana



Mecanismos de permeabilização de membranas pelos modelos “*barrel-stave*”(a), “*carpet*”(b) e “*toroidal pore*”(c). As porções hidrofílicas e hidrofóbicas dos peptídeos estão representadas por vermelho e azul, respectivamente.

Fonte: BIN HAFEZ *et al.*, 2021

O mecanismo de “*barrel-stave*” é caracterizado pela agregação vertical de hélices na bicamada lipídica. Os peptídeos transmembrana se agrupam de maneira semelhante às hastas de um barril, com suas faces hidrofóbicas alinhadas com a região lipídica central da bicamada lipídica, enquanto os constituintes hidrofílicos dos peptídeos formam a região interna de poros preenchidos por água (RAPAPORT; SHAI, 1991; CIUMAC *et al.*, 2019). Os canais estáveis, os quais são poros semelhantes a barris, formados na membrana celular resultam em saída citoplasmática e, em casos graves, colapso da membrana, eventualmente levando à morte celular (YANG *et al.*, 2001, BIN HAFEZ *et al.*, 2021).

No modelo *carpet* os peptídeos inicialmente se agregam na membrana em forma monomérica ou oligomérica (cobrindo a membrana como um tapete), com as regiões hidrofóbicas interagindo posteriormente com a membrana celular e as extremidades hidrofílicas voltadas para a solução aquosa (HUAN et al., 2020). Quando um limiar de concentração é atingido, a agregação dos peptídeos induz a micelização de fragmentos da membrana, retirando porções dela (ZHANG; ROZEK; HANCOCK, 2001; HUAN et al., 2020).

Durante a formação de um poro toroidal, as regiões polares dos peptídeos se alinham com os grupos de cabeça lipídica, resultando em um núcleo central de água revestido pelas interações dos AMPs com os grupos hidrofílicos da membrana (BETERLSEN et al., 2023). Esse mecanismo de ruptura de membrana se assemelha ao modelo *barrel-stave*, mas difere no fato de que os peptídeos se alinham com os grupos fosfato da bicamada lipídica mesmo quando inseridos perpendicularmente (RAPAPORT; SHAI, 1991). Além disso, os poros toroidais formados são transitórios sendo menos estáveis quando comparados aos poros similares a barris (BIN HAFEZ et al., 2021).

Considerando que os mecanismos de ação apresentados não dependem da inibição de compostos específicos, mas sim da interação com compostos amplamente distribuídos em membranas bacterianas, os AMPs normalmente apresentam ação bactericida de amplo espectro (MORAVEJ et al., 2018). Somado à essa interação, durante a eliminação do patógeno não são ativados processos metabólicos de reparo ao DNA, como o SOS e o *rpoS*, que estão associados à aquisição de resistência pela alta taxa mutagênica apresentada (RODRÍGUEZ-ROJAS; MAKAROVA; ROLFF, 2014). Dessa forma, AMPs, quando comparados a antibióticos tradicionais, se demonstram menos suscetíveis ao desenvolvimento de mecanismos de resistência (MORAVEJ et al., 2018). Complementando sua notória atividade antibacteriana, alguns AMPs apresentam outra gama de contribuições de grande interesse, como atividades antiviral e fungicida e propriedade imunomoduladora (BÜYÜKKIRAZ; KESMEN, 2021).

2.2.3. Peptídeos crípticos e modelos de predição *in silico*

Uma estratégia amplamente utilizada para identificação de peptídeos antimicrobianos é a de prospecção genômica ou proteômica utilizando ferramentas computacionais baseadas em machine learning (SZYMCZAK; SZCZUREK, 2023). Dessa forma, as propriedades físico químicas já bem descritas dessas moléculas podem ser utilizadas por pacotes e softwares para

predição de AMPS, permitindo uma grande especificidade e sensibilidade dos algoritmos, que normalmente se encontram acima de 80%. Dentre eles, o AmpGram é um pacote R que pode ser destacado como o primeiro a possuir uma triagem de alto desempenho e com alta capacidade de identificação de peptídeos mais longos. Além disso, ele disponibiliza uma análise detalhada de todos os decapeptídeos consecutivos da sequência, que se mostram interessantes para o design de novos peptídeos antimicrobianos, encriptados em proteínas naturalmente produzidas (BURDUKIEWICZ *et al.*, 2020).

A geração de peptídeos ou proteínas com bioatividade a partir da proteólise de proteínas maiores é uma estratégia geral e bem conhecida em eucariotos superiores (AUTELITANO *et al.*, 2006). Os termos "criptídeo" e "cripteína" foram cunhados para descrever tais peptídeos e proteínas bioativas criptícas, respectivamente, que somados, compreendem o "criptoma" (AUTELITANO *et al.*, 2006; PIMENTA; LEBRUN, 2007). Surpreendentemente, uma ampla gama de atividades biológicas tem sido atribuída aos criptídeos, como, por exemplo, funções hormonais, defesa do hospedeiro, regulação da pressão sanguínea, neuroproteção, regulação de enzimas proteolíticas, função analgésica, sinalização opióide, regulação da angiogênese, entre outras (AUTELITANO *et al.*, 2006; PIMENTA; LEBRUN, 2007; SAMIR; LINK, 2011).

No estudo de AUTELITANO *et al.*, 2006, os criptídeos foram classificados em três classes: o tipo 1 consiste em fragmentos proteicos detectáveis *in vivo* com bioatividade nova e não relacionada à molécula parental; o tipo 2 é constituído por fragmentos detectáveis *in vivo* com bioatividade um tanto relacionada à molécula parental; criptídeos do tipo 3 são fragmentos com bioatividades novas que podem ser obtidas *in vitro*, mas não necessariamente produzidas *in vivo* por processos fisiológicos.

De acordo com as definições mencionadas, os CAPs crípticos são um subconjunto de criptídeos compartilhando uma composição de aminoácidos semelhante aos não crípticos e um painel comum de atividades biológicas, incluindo a eliminação direta de micróbios e funções imunomoduladoras (PIZZO *et al.*, 2018).

2.2.4. Produção de peptídeos antimicrobianos

Embora a ação bactericida de AMPs seja promissora, os métodos convencionais para a sua produção de AMPs apresentam algumas limitações. Por exemplo, a purificação de AMPs a partir de fontes naturais, como bactérias, plantas, sapos, insetos ou fungos, é um processo dispendioso e demorado. Além disso, nesses casos, a obtenção de AMPs com atividade

padronizada e alta pureza geralmente é desafiadora, pois depende de método de extração específico para cada organismo (BÜYÜKKIRAZ; KESMEN, 2021).

Na síntese química de AMPs, outro método tradicional, também são notadas severas dificuldades no aumento de escala de produção. Primeiramente, esse processo apresenta altos custos associados a seus reagentes e equipamentos necessários. Além disso, seus impactos ambientais, pelo grande uso de solventes, e falta de modificações pós-traducionais resultam em um método de aplicação em baixa escala, geralmente voltado a uso laboratorial (ROCA-PINILLA *et al.*, 2022).

Recentemente, a produção recombinante de AMPs, que se baseia na expressão dos genes de AMP provenientes de fontes naturais em organismos hospedeiros, tem se destacado como um método mais atrativo (BÜYÜKKIRAZ; KESMEN, 2021). Isso porque essa tecnologia permite uma produção flexível, escalável, padronizável e custo-efetiva. Dentre os hospedeiros mais utilizados nesse contexto destacam-se a *Escherichia coli*, *Pichia pastoris* e linhagens celulares de insetos (ROCA-PINILLA *et al.*, 2022).

O hospedeiro mais utilizado para a expressão recombinante de proteínas e peptídeos são as bactérias, em especial a *Escherichia coli*, pois são de fácil manipulação, e de rápido crescimento em meios de cultura de custos reduzidos (ROCA-PINILLA *et al.*, 2022). No entanto, as bactérias têm uma capacidade limitada de formar ligações dissulfeto, glicosilação e outras modificações pós-traducionais (LÓPEZ-CANO *et al.*, 2022). Ainda sim, muitas vezes essas modificações não são críticas para a produção recombinante de AMPs. O real fator muitas vezes limitante é a atividade desses compostos contra o próprio hospedeiro e a susceptibilidade à ação de proteases, sendo necessárias estratégias alternativas como utilização de proteínas de fusão ou produção em forma de corpos de inclusão (ZORKO; JERALA, 2009).

As leveduras, em especial a *Pichia pastoris*, apresentam algumas vantagens em relação às células procarióticas, especialmente no que se refere a modificações pós-transcricionais e pós-traducionais, como a glicosilação (CREGG *et al.*, 2009). Além disso, em comparação com as culturas de células de mamíferos, a manipulação desses microrganismos é mais econômica e rápida, o que geralmente resulta em rendimentos e produtividade mais elevados da proteína desejada. Por fim, possibilitam a secreção da proteína recombinante, reduzindo assim as etapas de purificação e, conseqüentemente, proporcionando um aumento no rendimento proteico e facilitando o processo de ampliação de escala (DE BRUIN *et al.*, 2005).

Por fim, o sistema de expressão em linhagens celulares de insetos também se mostra um ótimo aliado para a produção recombinante de AMPs. Atualmente, os trabalhos focam em linhagens de *Drosophila melanogaster* e de *Spodoptera frugiperda* (DEO *et al.*, 2022). Apesar de possuir um custo mais elevado quando comparado aos outros sistemas microbianos supracitados, as proteínas produzidas em células de inseto possuem modificações pós-traducionais mais similares às de mamíferos e ausência de compostos microbianos tóxicos, como os lipopolissacarídeos de bactérias Gram negativas (PATTERSON; SELKIRK; MERRICK, 1995). Além disso, no contexto de peptídeos antimicrobianos, a atividade desses compostos se mostra, majoritariamente, ineficaz contra essas linhagens, garantindo que a síntese do peptídeo não mate a célula hospedeira (ROCA-PINILLA *et al.*, 2022).

3. OBJETIVO GERAL

Identificar e caracterizar in silico um peptídeo antimicrobiano derivado da proteína de reconhecimento de peptidoglicanos 3 (PGLYRP3) humana, bem como a expressão recombinante dessa proteína e do criptídeo identificado (AMP-PGLYRP3)

3.1. Objetivos específicos

- Triagem in silico do proteoma humano com softwares de predição de peptídeos antimicrobianos.
- Caracterização in silico o potencial de atividade antimicrobiana do peptídeo AMP-PGLYRP3, considerando suas propriedades físico-químicas, alergênicas, tóxicas e hemolíticas.
- Expressão recombinante da PGLYRP3 humana em *Pichia pastoris*
- Clonagem e expressão recombinante do AMP-PGLYRP3 em sistema de expressão baculovírus/células de inseto

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Análises *in silico*

4.1.1. Triagem de AMPs derivados do proteoma humano

Inicialmente, foi utilizado o pacote Ampir (<https://github.com/Legana/ampir>) no RStudio para fazer uma pré filtragem do arquivo FASTA do proteoma humano (www.uniprot.org/proteomes/UP000005640). Para isso, foi utilizado o modelo de proteínas precursoras do programa, uma vez que se trata de um proteoma, e determinou-se um *score* mínimo de probabilidade de atividade antimicrobiana igual a 0,7. Assim, o programa tem como *output* um arquivo FASTA das proteínas que atendem a esse critério. Posteriormente, foi realizada a análise no pacote AmpGram (<https://github.com/michbur/AmpGram>) utilizando como *inputs* a árvore de modelos do programa e a lista dos resultados das análises do Ampir. Como *output* foi obtida uma lista com a identificação da sequência proteica e sua probabilidade de apresentar a atividade. Com base nos resultados, foi possível usar a interface gráfica do programa para identificar sub-regiões proteicas com potencial antimicrobiano.

4.1.2. Análise de propriedades alergênicas, tóxicas e hemolíticas

Inicialmente, os peptídeos foram triados quanto a ausência de três principais características importantes que limitam aplicações terapêuticas: alergenicidade, toxicidade e capacidade hemolítica. A primeira foi realizada no programa AllerTOP v2.0 (DIMITROV *et al.*, 2014) (<https://www.ddg-pharmfac.net/AllerTOP/data.html>), que retorna um valor positivo ou negativo. A segunda foi avaliada no programa ToxinPred (GUPTA *et al.*, 2013) (<https://webs.iitd.edu.in/raghava/toxinpred/index.html>) utilizando o modo *batch submission* com os parâmetros *default*. Por fim, o potencial hemolítico foi avaliado no *Database of Antimicrobial Activity and Structure of Peptides* (<https://dbaasp.org/home>) (DBAASP v. 3.0) na ferramenta de predição de citotoxicidade em células de mamíferos por *machine learning* (PIRTSKHALAVA *et al.*, 2020).

4.1.3. Predição de atividade antimicrobiana específica

Também no banco de dados DBAASP, foram utilizadas as ferramentas de predição do espectro de atividade dos peptídeos. Os organismos disponíveis incluem bactérias gram-negativas e gram-positivas, vírus e fungos (*Candida albicans* e *Saccharomyces cerevisiae*). Os peptídeos de maior potencial foram selecionados.

4.1.4. Análise de propriedades estruturais e físico-químicas dos peptídeos

Foi utilizada a ferramenta ProtParam do servidor ExPasy (<https://web.expasy.org/protparam/>) para determinação da massa molecular, carga, ponto isoelétrico e hidropaticidade. Feito isso, as estruturas tridimensionais foram determinadas no servidor PEP-FOLD 4.0 (REY *et al.*, 2023) (<https://moby2.rpbs.univ-paris-diderot.fr/cgi-bin/portal.py#forms::PEP-FOLD4>). Nele, foram analisadas a distribuição espacial dos resíduos hidrofóbicos e catiônicos.

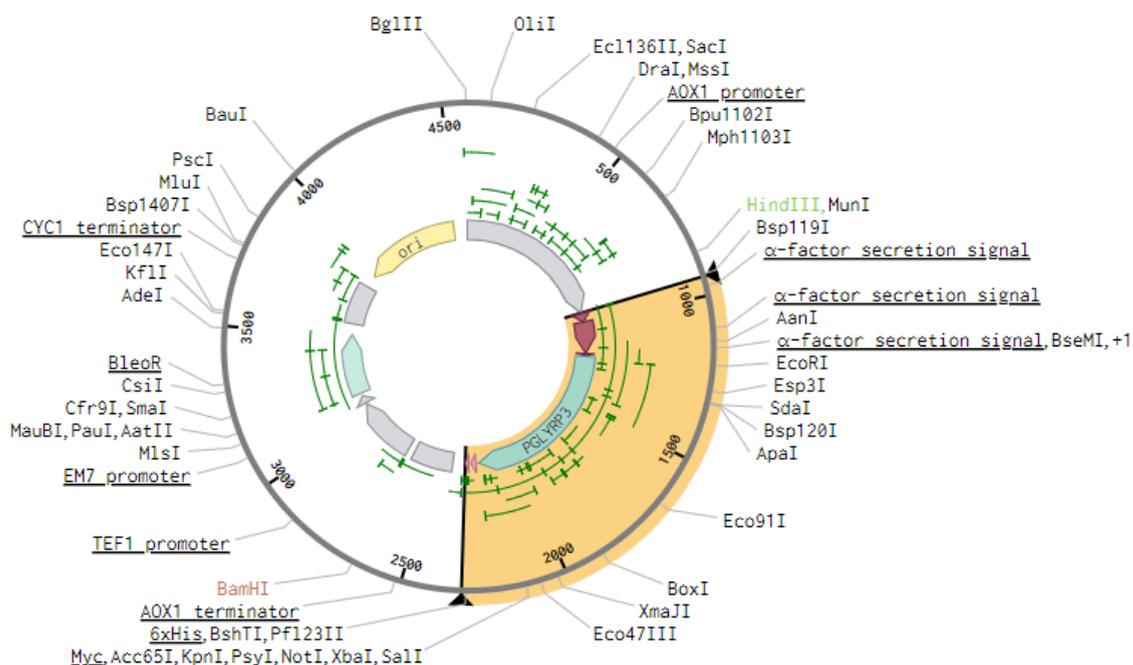
4.1.5. Delineamento de estratégias de clonagem e purificação

4.1.5.1. PGLYRP3

Para a expressão da proteína completa, foi obtida comercialmente a ORF da PGLYRP3 clonada em vetor de expressão. Isso porque o nível de expressão da PGLYRP3 nas seguintes linhagens humanas HeLa, HaCaT (queratinócitos), K562 (leucemia mielóide crônica humana), U2OS (osteosarcoma) e Caco-2 (adenocarcinoma colorretal), não se mostrou suficiente para a amplificação. Inclusive o *Human Protein Atlas* (www.proteinatlas.org/ENSG00000159527-PGLYRP3/cell+line), mostra que há um baixo nível de expressão dessa proteína em linhagens celulares. Dessa forma, para a produção em *Pichia pastoris*, optamos pela obtenção comercial do gene da PGLYRP3 clonado em vetor pPicZ α A, como mostra a **Figura 2**.

O plasmídeo possui um promotor do gene álcool oxidase 1 (*AOX1*), induzível na presença de metanol. Além disso, existem as sequências codificadoras do fator de secreção α na porção 3' e uma cauda de seis histidinas na 5', em relação ao sítio de múltipla clonagem (MCS). Esses recursos facilitam o processo de purificação, uma vez que a proteína é secretada e compatível com cromatografia de afinidade. Para incorporação dessas características, o gene foi clonado em *frame* com suas sequências, como destacado em laranja na **Figura 2**.

Figura 2 - pPicZ α A-PGLYRP3



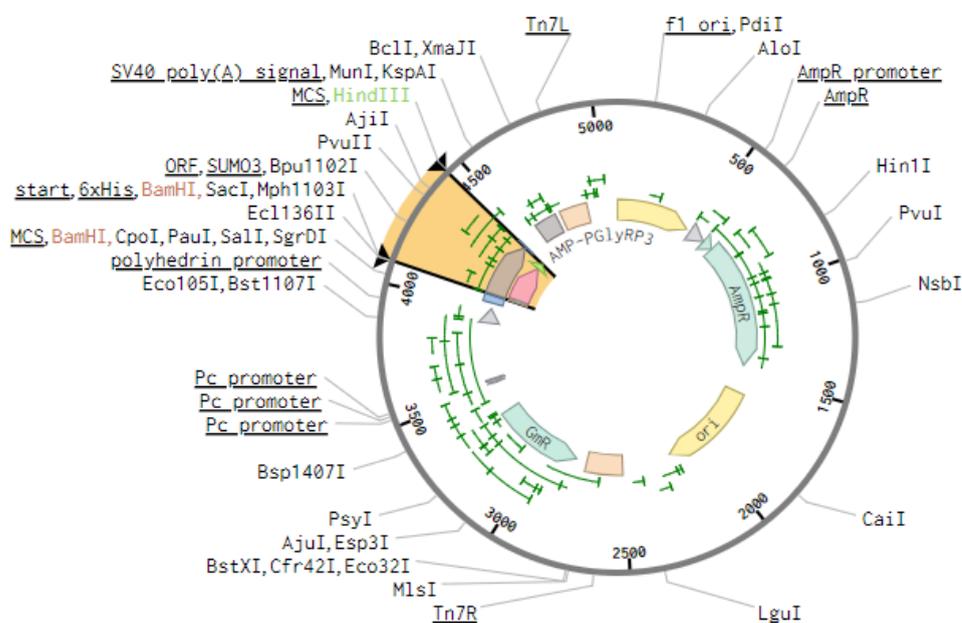
Fonte: Benchling (<https://www.benchling.com/>)

4.1.5.2. AMP-PGLYRP3

A estratégia de expressão foi baseada no trabalho de WANG *et al.* (2014). Assim, optou-se pela utilização de um fragmento da *small ubiquitin like modifier 3* (SUMO3) como proteína de fusão na porção N-terminal do peptídeo. Esse híbrido conta também com uma cauda de histidina ligada ao N-terminal da proteína SUMO3 e um sítio de clivagem de ácido fórmico composta pelos resíduos EDFFP. Assim, torna-se possível o isolamento do peptídeo em três etapas consecutivas: cromatografia de afinidade para isolamento do híbrido, clivagem com ácido fórmico e, finalmente, uma nova cromatografia de afinidade para coleta do eluato contendo a molécula de interesse.

Para a realização da construção pFastBac1-SUMO3-AMP-PGLYRP3 (**Figura 3**), optou-se por isolar o fragmento da SUMO do cDNA de células K562 e amplificar o peptídeo utilizando o gene da PGLYRP3 sintetizada. Em laranja, na **Figura 3** está representado o *frame* de tradução do híbrido no plasmídeo e sua obtenção estará descrita nos itens **4.3** e **4.4**.

Figura 3 - pFastBac1-SUMO3-AMP-PGLYRP3



Fonte: Benchling (<https://www.benchling.com/>)

4.2. Expressão recombinante da PGLYRP3 em *Pichia pastoris*

4.2.1. Preparação de *Pichia pastoris* competentes

As células foram cultivadas em 5 mL de meio YPD e incubadas a 30°C sob aeração (200 rpm) por 8 horas. A cultura resultante foi usada para inoculação de mais 50 mL de meio, visando o crescimento durante a noite a 30°C e 200 rpm. A densidade óptica a 600 nm do inóculo diluído 10 vezes foi monitorada para assegurar que se encontrava entre 1,1 e 1,5.

Quando a densidade óptica desejada foi alcançada, a cultura foi centrifugada a 1500 x g a 4°C por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuspensionado em 5 mL de YPD, ao qual foram adicionados 1 mL de Hepes (1M) e 125 µL de ditriotitol (DTT). A mistura foi incubada a 30°C por 15 minutos e, em seguida, diluída com água gelada até atingir 25 mL. As células foram novamente precipitadas por centrifugação a 1500 x g a 4°C por 10 minutos, e o sobrenadante foi descartado.

Posteriormente, as células foram ressuspensionadas em 2 mL de sorbitol (1M), centrifugadas nas mesmas condições previamente mencionadas, ressuspensionadas em 100 µL de sorbitol (1M) e divididas em alíquotas de 40 µL.

4.2.2. Transformação de *Pichia pastoris* X-33

Utilizando 10 ng da construção pPicZαA-PGLYRP3, foi realizada uma linearização com a enzima Sac I (Cellco) de acordo com o manual do fabricante. A construção linearizada foi precipitada com 1/10 de volume de acetato de sódio 3M e 2,5 volumes de etanol 100% e

ressuspensa em 10 µL de água. O vetor linear foi adicionado à alíquota de células preparada e a mistura foi incubada no gelo por 5 minutos. A amostra foi transferida para uma cubeta de eletroporação de 0,2 cm e foi realizada a eletroporação utilizando o Gene Pulser Unit (BIO-RAD) com os seguintes parâmetros: voltagem de 1,5 kV, capacitância de 25 µF, *low range* 200 Ω e *high range* de 600 Ω. Logo em seguida foi adicionado 1 mL de sorbitol (1M) gelado na cubeta. O conteúdo foi transferido para um tubo de 15 mL e incubado a 30°C por 2 horas sem agitação.

Foi plaqueado 150 µL da transformação em meio YPDS ágar, adicionado de 500 µg/mL de zeocina, para crescimento em estufa por 48 horas a 30°C. As colônias foram isoladas para realização do *screening* de expressão.

4.2.3. Indução da expressão em pequena escala

Em uma placa de 24 poços foram adicionados 3 mL de meio BMGY por poço e as colônias foram inoculadas em seus respectivos poços. Foram utilizados também dois controles: a cepa não transformada e a cepa transformada com o vetor sem o inserto. A placa foi mantida a 30°C por 48 horas sob aeração de 220 rpm. Passado esse período, a placa foi centrifugada a 2000 x g por 5 minutos, foi coletado 200 µL do sobrenadante de cada poço como alíquotas 0 hora e o restante foi descartado. Em cada poço foi adicionado 2 mL de meio BMMY com metanol 2% para dar início à indução por 144 horas. Durante esse período foram coletadas alíquotas de 200 µL de cada clone, realimentando-os com metanol a cada 24 horas. As alíquotas foram centrifugadas a 2000 x g por 5 minutos para coletar os sobrenadantes.

4.2.4. Análises qualitativas

As amostras coletadas foram adicionadas ao tampão de *Laemmli* 3x (Tris base - 187,5 mM; SDS - 6%; glicerol - 30%; β-mercaptoetanol - 15%; azul de bromofenol) para uma concentração final de 1x, e fervidos por 10 minutos. As alíquotas foram analisadas por *Sodium-dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis* (SDS-PAGE) em géis de concentração 15%. As frações de interesse foram selecionadas para realização de Western Blot.

Foi realizado mais um SDS-PAGE com 40 µL dessas amostras. Quando a corrida foi terminada, o gel foi utilizado na transferência para uma membrana de PVDF, previamente ativada em metanol por 3 minutos. Essa etapa ocorreu em tampão de transferência gelado (Tris base a 25 mM, glicina a 192 mM e metanol a 20%) a 40 V *overnight*.

No dia seguinte, a transferência foi averiguada com solução Ponceau (5% ácido acético e 0,2% Ponceau S) e realizou-se o bloqueio com leite em pó desnatado diluído em TBS (Tris - 20 mM; NaCl - 150 mM), a uma concentração de 5%, por 1,5 hora sob leve agitação. A membrana foi lavada 5 vezes de 5 minutos com PBS + *Tween* 20 (0,1%) antes da incubação com o anticorpo primário anti-His (Thermo Scientific) na proporção de 1:1000 por 2 horas. Novamente foram realizadas as lavagens antes da incubação com o anticorpo secundário *anti-mouse* (Thermo Scientific) na proporção 1:15000 por mais 2 horas. Por fim, foi realizado o último ciclo de lavagem e a membrana revelada com uma solução contendo Tris base (100 mM), luminol (1,25 mM), *4-iodophenylboronic acid* (4IBPA - 2mM) e peróxido de hidrogênio (5,3 mM).

4.3. Obtenção da sequência processada da SUMO3

4.3.1. Cultura de células da linhagem K-562

As análises da expressão do mRNA da SUMO3 em células humanas foram conduzidas no servidor online *Human Protein Atlas* na sessão de linhagens celulares (<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000184900-SUMO3>). Posteriormente, as células K562 foram cultivadas em meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado pelo calor (FBS) e antibióticos (penicilina G a 160 U/ml e estreptomicina a 160 µg/ml). As células foram então semeadas em frascos de cultura de células de 25 cm², com uma densidade de aproximadamente 40.000 células por frasco, e mantidas em incubadora a 37°C, em atmosfera umidificada com 5% de CO₂.

4.3.2. Extração de RNA e síntese de cDNA

O RNA total foi isolado com TRIzol (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante. A integridade do material extraído foi analisada em gel de agarose 1% contendo brometo de etídio. Além disso, usando o Nanodrop (Thermo Scientific) avaliou-se a pureza, dada pelas razões 260/280 nm e 260/230 nm, e a concentração da amostra.

Para a síntese de cDNA foi utilizado o kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription* (Thermo Scientific). Para a reação, usou-se 3 ng de RNA, *RT Buffer* 2x, dNTP Mix (80 mM), *RT Random Primers* 2 x, *Multiscribe™ Reverse Transcriptase* (1 U), Oligo DT (100 pM) e água *nuclease free* para um volume final de 20 µL, em um ciclo de 65°C por 5 min; 25°C por 10 min; 37°C por 120 min; 85°C por 5 min.

4.3.3. Amplificação parcial da SUMO3

Um fragmento da SUMO3 foi amplificada pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Foi utilizado *Master mix Taq pol* (Cellco) a uma concentração de 1x, o par de primers (**Quadro 1**) a uma mesma concentração de 5 µM, 20 ng do cDNA molde e água *nuclease free* até um volume de 50 µL. O ciclo utilizado foi: 95°C por 1min, 95°C por 1 min, 64°C por 1 min, 72°C por 1 min (repetindo as 3 últimas etapas 35 vezes) e, por fim, 72°C por 10 min. A amostra amplificada foi analisada através de eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio e purificada utilizando o kit *Agarose Gel Extraction* (Cellco) de acordo com o protocolo do fabricante.

Quadro 1 - Par de primers para a sequência parcial da SUMO3

Identificação	Sequência (5' - 3')
SUMO3 Fw	TCCGAGGAGAAGCCCAAGGAGGGTGTGAAG
SUMO3 Rv	CTAGAACTGTGCCCTGCCAGGCTGCTCTC

Fonte: Autoria própria

4.3.4. Amplificação para adição de *overhangs* de interesse à SUMO3

A SUMO3 parcial amplificada e purificada foi utilizada como molde em uma nova PCR utilizando o as condições de reação já descritas no item anterior, alterando os *primers* para os representados no **Quadro 2** e a temperatura de *melting* para 60°C. O primer SUMO3 Fw 2 possui o sítio de clivagem para a enzima SacI (GAGCTC), destacado em negrito, um códon de início de tradução, sublinhado, e seis códons de histidina (6 x CAT), em vermelho. O *primer* SUMO3 Rv 2 possui a adição dos códons para os aminoácidos aspartato (em verde) e fenilalanina (em vermelho). A adição da sequência codificadora desses resíduos se mostrou necessária para a estratégia utilizada no trabalho de WANG *et al.* (2014) para a etapa de clivagem do peptídeo com ácido fórmico. Utilizando essa técnica, é possível clivar a sequência de aminoácidos glutamato, aspartato, fenilalanina e prolina (sequência representada por EDFP) entre os dois últimos resíduos. Esse sítio foi recriado na nossa construção justamente pela adição dos dois aminoácidos supracitados (aspartato e fenilalanina), uma vez que o último códon amplificado da SUMO3 nativa é codificador do glutamato (representado em azul no **Quadro 2**) e o primeiro resíduo do peptídeo é uma prolina.

A amostra amplificada foi analisada através de eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio e purificada utilizando o kit *Agarose Gel Extraction* (Cellco) de acordo com o protocolo do fabricante. O produto obtido foi denominado SUMO3+6-His.

Quadro 2 - Par de primers para a reamplificação da SUMO3

Identificação	Sequência (5'- 3')
SUMO3 Fw 2	GAGCTCATGCATCATCATCATCATGGTGGATCC
SUMO3 Rv 2	GTCGAATTCACCTCCCGTCTGCTGCTGGAACAC

Fonte: Autoria própria

4.3.5. Clonagem em vetor de propagação

O amplicon foi usado na ligação com o vetor de propagação pGEM-T *Easy* (Promega) de acordo com o protocolo do fabricante. Essa reação foi utilizada na transformação de células quimiocompetentes DH5 α de *Escherichia coli* por choque térmico (SAMBROOK; RUSSEL, 2001).

As bactérias recém transformadas foram semeadas em ágar Luria Bertani (LB) adicionado de ampicilina (100 μ g/mL), X-Gal (20 mg/mL) e IPTG (0,4 mM) e mantido a 37 °C *overnight*. O mecanismo de colônias brancas e azuis utilizado nesse sistema de vetor permitiu a rápida detecção de colônias recombinantes (brancas), as quais também foram validadas por PCR de colônia.

O DNA plasmidial dos clones foi obtido pelo kit *Fast-n-Easy Miniprep* (Cellco) e submetido a sequenciamento por eletroforese capilar. As sequências obtidas foram alinhadas com a esperada utilizando o software ClustalW (<https://www.genome.jp/tools-bin/clustalw>).

4.4. Formação do híbrido SUMO3-AMP-PGLYRP3

4.4.1. Amplificação do AMP-PGLYRP3

A sequência codificante do peptídeo obtida por PCR, utilizando os primers especificados no **Quadro 3**. Nela, encontra-se destacado o sítio de clivagem para a enzima XbaI (TCTAGA) adicionado ao primer AMP Rv, o qual será essencial para a subclonagem em vetor de expressão.

A reação de PCR foi realizada empregando o MasterMix (Cellco), juntamente com os primers forward (5 μ M) (Exxtend), primer reverse (5 μ M) (Exxtend), e a construção pPICZ α A_PGLYRP3 (50 ng). O ciclo de amplificação consistiu nas seguintes etapas: 95°C por 1 minuto, 95°C por 1 minuto, 54°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto (repetindo as últimas

3 etapas por 35 ciclos) e, finalmente, 72°C por 10 minutos. A amostra amplificada foi analisada por eletroforese em gel de agarose 3%, corado com brometo de etídio.

Quadro 3 - Par de primers para a amplificação do AMP-PGLYRP3

Identificação	Sequência (5' - 3')
AMP Fw	CCAGTGATGCCCAAGGAAGG
AMP Rv	TCTAGACTAAGATCGTTTGATGATGTT

Fonte: Autoria própria

4.4.2. Purificação por método adaptado de *freeze squeeze*

A purificação da sequência do AMP-PGLYRP3 não foi possível com um kit de extração convencional, devido ao tamanho reduzido do peptídeo (45 pb). Diante dessa limitação, adotou-se um protocolo adaptado de "*freeze squeeze*" (SANTOS *et al.*, 2017), seguindo as etapas a seguir.

O produto da PCR foi submetido a uma corrida em gel de agarose 1% com TBE. Após identificar as bandas correspondentes ao fragmento desejado, estas foram cortadas e transferidas para um tubo estéril de 1,5 mL. Adicionou-se 150 µL de tampão TE ao tubo, que foi congelado rapidamente com nitrogênio líquido. Após o congelamento, a mistura foi incubada a 72°C por 5 minutos e centrifugada a 10.000 x g por 30 segundos à temperatura ambiente.

O sobrenadante foi transferido para outro tubo estéril de 1,5 mL. Adicionou-se acetato de sódio 3M (um décimo do volume total) e álcool isopropílico (duas vezes e meia do volume total). A mistura foi incubada durante a noite a -20°C. No dia seguinte, uma centrifugação a 16.000xg por 20 minutos a 4°C permitiu o descarte do sobrenadante e a lavagem do pellet com 600 µL de etanol. O pellet foi eluído em 20 µL de água *nuclease free* e quantificado em gel de agarose 3%, corado com brometo de etídio.

4.4.3. Adição da região de homologia à SUMO3+6-His

Foi realizada uma terceira PCR da SUMO3 de maneira análoga às descritas anteriormente (itens 4.3.3 e 4.3.4). Os primers utilizados se encontram no **Quadro 4**. O primer SUMO3 Rv 3 possui adicionado uma sequência de homologia com o AMP-PGLYRP3 (em negrito) que possibilita o anelamento dessas sequências na PCR *Overlap*. O amplicon foi purificado pelo kit *Agarose Gel Extraction* (Cellco).

Quadro 4 - Par de primers para a amplificação final da SUMO3

Identificação	Sequência (5' - 3')
SUMO3 Fw 2	GAGCTCATGCATCATCATCATCATGGTGGATCC
SUMO3-AMP Rv	GGGCATCACTGGGTTCGAATTCACCTCCC GTCTGCTG

Fonte: Autoria própria

4.4.4. PCR *Overlap*

Para a PCR *Overlap* foram montadas duas reações consecutivas: uma de formação do híbrido e outra de amplificação. A primeira foi montada com *MasterMix High Fidelity* (Cellco), água *nuclease free* até um volume de 25 µL e 60 e 200 ng dos amplicons previamente obtidos, SUMO3 e AMP-PGLYRP3, respectivamente. Os reagentes foram termociclados nas seguintes condições: 95°C por 1 min, 95°C por 1 min, 45°C por 1 min, 72°C por 1 min (repetindo as 3 últimas etapas 15 vezes) e, por fim, 72°C por 10 min.

Logo em seguida, foram adicionados os primers SUMO3 Fw 2 (**Quadros 2 e 4**) e AMP Rv (**Quadro 3**), cada qual a uma concentração final de 5 µM. A reação foi submetida a 30 ciclos no termociclador, utilizando 50°C como temperatura de anelamento. O produto foi analisado em gel de agarose 3% corado com brometo de etídio e purificado pelo kit *Agarose Gel Extraction* (Cellco).

4.4.5. Clonagem em vetor de propagação e subclonagem em pFastBac1

O híbrido obtido foi clonado em pGEM-T *Easy* (Promega), validado por sequenciamento e purificado, seguindo os mesmos processos descritos no item 3.3.5. Para o procedimento de subclonagem, foram digeridos 2 µg da construção pGEM-T-SUMO3-AMP-PGLYRP3 e do vetor pFastBac1 (Thermo Scientific). As reações foram conduzidas utilizando uma unidade das enzimas *SacI* (Cellco) e *XbaI* (Thermo Scientific), com o buffer Tango 1x (Thermo Scientific) em um volume de 30 µL, e mantidas a 37°C durante a noite.

O *backbone* do vetor pFastBac1 (Thermo Scientific) foi purificado utilizando o kit *Agarose Gel Extraction* (Cellco). Em contrapartida, esse processo se mostrou ineficiente para

a purificação do inserto, então foi realizada uma extração por fenol-clorofórmio (SAMBROOK; RUSSEL, 2001). O fragmento de gel foi cortado e incubado a 60°C até a dissolução, momento em que foi adicionado um volume de fenol, clorofórmio e álcool isoamílico (na proporção 25:24:1). A amostra foi brevemente agitada em vórtex, centrifugada a 15.000 xg e o sobrenadante foi coletado. Em seguida, realizou-se uma precipitação com 2 volumes de etanol e acetato de sódio, mantendo a reação congelada durante a noite. O material foi recuperado por centrifugação e lavado com etanol 70%. Finalmente, foi eluído em água e quantificado em NanoDrop (Thermo scientific).

Os fragmentos digeridos foram incubados na razão molar 3:1 (inserto:vetor) com a enzima T4 ligase (Thermo Scientific) a 4°C *overnight*. A reação foi transformada em *E. coli* (DH5 α), que foram posteriormente plaqueadas em ágar LB contendo ampicilina (100 μ g/mL). A construção pFastBac1-SUMO3-AMP-PGLYRP3 foi obtida por miniprep e sequenciada por eletroforese capilar.

4.4.6. Recombinação do bacmídeo em células *E. coli* DH10Bac

Para a transformação, foi preparada uma alíquota de células eletrocompetentes *E. coli* DH10Bac, à qual foi adicionada 50 ng da construção. Os parâmetros da eletroporação foram: voltagem 1,5 kV, capacitância de 25 μ F, *low range* 200 Ω e *high range* de 600 Ω . As células foram restabelecidas em meio SOC (Caldo Super Ótimo com repressão catabólica, Thermo Scientific) suplementado de glicose (1%) durante uma hora.

Diluições da transformação foram plaqueadas em ágar LB contendo os seguintes reagentes: kanamicina (50 μ g/mL), gentamicina (7 μ g/mL), tetraciclina (10 μ g/mL), X-Gal (100 μ g/mL) e IPTG (40 μ g/mL). As colônias brancas, potenciais recombinantes, foram isoladas em novas placas com as mesmas condições para confirmação de sua coloração. Para a confirmação da presença de inserto, realizou-se PCR de colônia com o par de primers M13/PUC (**Quadro 5**) para a identificação da recombinação. Para isso, a reação foi submetida às seguintes condições de termociclagem: 95°C por 3 min, 95°C por 45 s, 55°C por 45s, 72°C por 5 min (repetindo as 3 últimas etapas 30 vezes) e, por fim, 72°C por 10 min.

Os resultados foram analisados em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. Uma das colônias foi adicionada a 20 mL de meio LB, sendo incubada a 37°C sob agitação de 200 rpm *overnight*. Dessa cultura foi extraído o bacmídeo recombinante por midiprep utilizando o kit *PureLink™ HiPure Plasmid Midiprep* (Invitrogen) de acordo com o protocolo do fabricante.

Quadro 5 - Par de primers para a amplificação final da SUMO3

Identificação	Sequência (5' - 3')
M13/PUC Fw	CCCAGTCACGACGTTGTAAAACG
M13/PUC Rv	AGCGGATAACAATTTACACACAGG

Fonte: Autoria própria

4.5. Expressão recombinante do AMP-PGLYRP3 em ExpiSf9

4.5.1. Transfecção e amplificação do estoque viral

Células de inseto ExpiSf9 (Gibco) foram inicialmente cultivadas a uma densidade de 5×10^6 células por mL em placas de 6 poços contendo 3 mL de meio ExpiSf™CD (Gibco). Essas células foram mantidas sem agitação por uma hora para facilitar a aderência. O reagente de transfecção ExpiFectamineSf (Gibco) foi diluído em 250 µL de meio Opti-MEM (Gibco) com soro reduzido, seguido pela adição de 1 µg de DNA bacmídeo recombinante. Após uma incubação de 5 minutos à temperatura ambiente e inversões suaves do tubo, a mistura foi transferida para as células nas placas de 24 poços e incubada a 29 °C por 72 horas.

O conteúdo dos poços foi coletado e centrifugado a 300 x g por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante resultante (estoque P0) foi armazenado em tubos cônicos de 15 mL, protegido da luz, e congelado a -20°C. As células foram então cultivadas em 20 mL de meio a uma concentração de 5×10^6 células por mL, com viabilidade superior a 90%. Adicionou-se 150 µL de *ExpiSf Enhancer* (Gibco) e as células foram incubadas a 29°C por 24 horas. Após esse período, 200 µL do estoque P0 foram adicionados, seguido por incubação sob agitação a 125 rpm por 72 horas a 29°C. A cultura resultante foi coletada, centrifugada a 300 x g por 5 minutos a 4 °C, e o sobrenadante coletado (estoque P1), armazenado da mesma forma que o estoque P0.

Após os ciclos iniciais de amplificação viral, o procedimento foi repetido utilizando o estoque P1 para transfecção, resultando na coleta do sobrenadante final (estoque P2) e do pellet celular. Este último foi ressuscitado em 6 mL de tampão de lise (20 mM Tris-HCl pH 7.2; 150 mM de NaCl e 1% de Triton-X) contendo inibidor de protease COMplete mini (Roche) 1X, e submetido à sonicação com os seguintes parâmetros: 10 ciclos de 10 segundos, utilizando uma sonda de 3 mm a 30% de amplitude. Finalmente, a amostra foi clarificada por centrifugação a 15.000 x g por 40 minutos a 4°C, e tanto o sobrenadante quanto o pellet foram coletados.

4.5.2. Purificação e análises qualitativas

O lisado obtido passou por um processo de cromatografia de afinidade utilizando a resina Ni-NTA superflow (Qiagen). Inicialmente, a coluna foi equilibrada com o tampão de lise (20 mM Tris-HCl pH 7.2; 150 mM de NaCl e 1% de Triton-X) contendo 20 mM de imidazol. Em seguida, o lisado foi aplicado à coluna, que foi lavada 10 vezes com o volume da resina com o mesmo tampão de equilíbrio. A eluição foi realizada utilizando o tampão de lise (20 mM Tris-HCl pH 7.2; 150 mM de NaCl e 1% de Triton-X) acrescido de imidazol a uma concentração de 250 mM. Neste momento, foram coletadas 20 frações de 500-750 μ L cada, as quais foram posteriormente analisadas por SDS-PAGE. Para validação das bandas de interesse foi realizado *Western Blot* análogo ao descrito no item **4.2.4**.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Análises *in silico* para obtenção do peptídeo

Considerando a alta prevalência da resistência antimicrobiana, é de interesse global o desenvolvimento de novas terapias. Dentre elas, peptídeos antimicrobianos se destacam como moléculas com grande gama de atividades e potencial de ação (DUTESCU; HILLIER, 2021). Nos últimos anos, a busca por sequências de peptídeos conhecidas ou previstas com propriedades desejadas tornou-se muito popular, e as abordagens correspondentes estão sendo constantemente desenvolvidas (TORRES *et al.*, 2021).

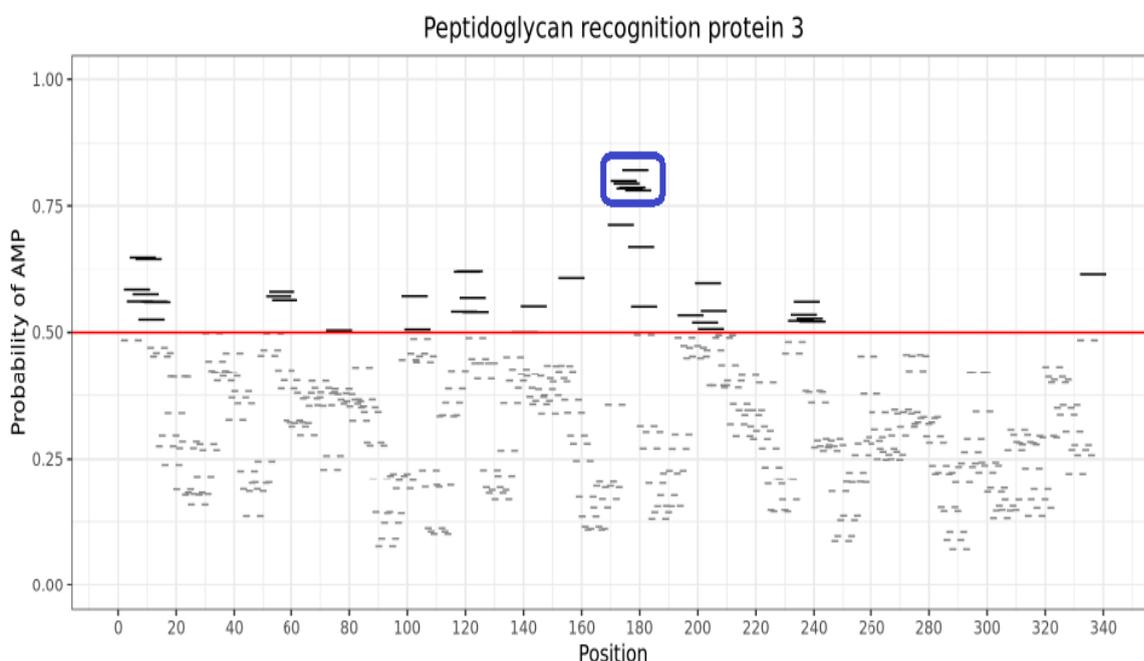
Em nosso estudo, inicialmente pretendíamos analisar o proteoma humano completo no AmpGram para obter um panorama geral das proteínas no programa. No entanto, nossa disponibilidade de capacidade computacional demonstrou-se insuficiente para a análise de dados muito grandes no pacote. Assim, optamos pela pré-filtragem do proteoma em um programa que oferece tempos de análise mais reduzidos: o pacote Ampir. Nesse programa, obtivemos uma lista de 700 proteínas com potencial de conter criptídeos antimicrobianos acima de 0,7.

Para a exploração individual das proteínas, a lista pré-filtrada passou por mais uma análise geral, dessa vez com o pacote AmpGram. Isso possibilita uma análise detalhada individual das proteínas de interesse, nesse caso as de maior *score*, uma vez que o programa analisa todas as regiões de decapeptídeos possíveis sobrepostos pelos 9 resíduos finais (sequências *10-mer*). Cada uma dessas regiões *10-mer* também recebem um *score*, que permite a identificação das regiões críticas de atividade antimicrobiana. Durante nossas análises com o AmpGram, entre as proteínas obtidas, encontramos as proteínas PGLYRPs 1, 3 e 4.

Essa família de proteínas se mostrou de grande interesse para o trabalho, uma vez que possuem ação antimicrobiana de grande sinergia com AMPs (WANG *et al.*, 2007). No trabalho de WANG *et al.* (2007) foi demonstrada ação antimicrobiana dessas proteínas e grande sinergia com AMPs, mostrando-se ativa mesmo quando as PGLYRPs e os AMPs endógenos humanos eram testados em concentrações subbactericidas. Essas observações se mostram uma estratégia de proteção imunológica, uma vez que AMPs são coexpressos nos órgãos e tecidos produtores das PGLYRPs 1, 3 e 4. Dessa forma, consideramos possível também que essas proteínas sejam fontes naturais de peptídeos antimicrobianos críticos, sejam eles dependentes de processos fisiológicos enzimáticos ou não.

As PGLYRPs 1, 3 e 4 tiveram um *score* individual de 0,5233, 0,85 e 0,7465, respectivamente. Assim, neste estudo, optamos pela proteína com maior valor atribuído: a PGLYRP3. Sua análise gráfica pode ser observada na **Figura 4**, que representa um gráfico da posição ocupada pelos decapeptídeos no eixo das abscissas e com sua probabilidade de demonstrar atividade antimicrobiana no eixo das ordenadas. O fragmento de maior destaque quanto ao seu *score* ocupava a posição 173-188 da proteína e encontra-se destacado na **Figura 4**. O **Quadro 6** contém a sequência completa de aminoácidos da proteína com o peptídeo denominado AMP-PGLYRP3 (PRKVC**PNIKRS**) destacado em negrito.

Figura 4 - Representação gráfica do potencial antimicrobiano de criptídeos da PGLYRP3



Fonte: Adaptado de AmpGram

Quadro 6 - Sequência aminoacídica da PGLYRP3 e do AMP-PGLYRP3

Identificação	Sequência aminoacídica (N - C terminal)
PGLYRP3	MGTLPWLLAFFILGLQAWDTP TIVSRKEWGARPLACRALLTLPV AYIITDQLPGMQCQQQSVCSQMLRGLQSHSVYTIGWCDVAYNFL VGDDGRVYEGVGWNIQGLHTQGYNNISLGIAFFGNKIGSSPSPAA LSAAEGLISYAIQKGHLSPRYIQPLLLKEETCLDPQHPVMP PRKVC PNIKRS AWEARETHCPKMNLPAKYVIIIHTAGTSCTVSTDCQTV VRNIQSFHMDTRNFCDIGYHFLVGQDGGVYEGVGWHIQGSHTY GFNDIALGIAFIGYFVEKPPNAAALEAAQDLIQCAVVEGYLTPNY LLMGHSDVVNILSPGQALYNIISTWPHFKH

Fonte: Autoria própria

É importante considerar que, a exploração de criptídeos antimicrobianos no proteoma humano já gerou resultados muito promissores descritos na literatura. No trabalho de TORRES *et al.* (2021) métodos de predição *in silico* de AMPs crípticos foram usados no proteoma humano obtendo resultados muito promissores. Nele, foram identificados cerca de 43.000 peptídeos derivados de proteínas humanas secretadas, que demonstra a grande quantidade de moléculas encriptadas nesse organismo. Além disso, no trabalho de PAPAREDDY *et al.* (2010), também foi possível identificar um novo peptídeo antimicrobiano derivado da trombina por meio desses métodos preditivos. Dessa forma, nota-se que a utilização do proteoma humano para triagem de peptídeos antimicrobianos é uma estratégia de grande relevância.

Posteriormente, realizamos uma análise mais detalhada do peptídeo relacionada à sua atividade, como potencial hemolítico e alergênico, carga, hidrofobicidade, anfipaticidade, espécies-alvo, e estrutura tridimensional.

Primeiramente, utilizamos o software *AllerTop* para identificar se havia semelhança com peptídeos alergênicos definidos em bancos de dados. Nossos resultados indicaram que o peptídeo é não alergênico aos humanos. A citotoxicidade foi avaliada em dois programas: o ToxinPred e a ferramenta de potencial hemolítico em eritrócitos humanos do servidor DBAASP. Em ambos os casos o peptídeo foi predito como não tóxico. Essas análises nos permitiram concluir que o AMP-PGLYRP3 é, muito provavelmente, um peptídeo seguro e um promissor agente terapêutico.

Durante as análises de atividade contra patógenos específicos, no servidor DBAASP, o AMP-PGLYRP3 apresentou ação antibacteriana contra *Klebsiella pneumoniae*. Em relação a atividade contra outros organismos de grande relevância, mostrou-se atividade contra *Candida albicans*, MERS-CoV, SARS-CoV e SARS-CoV2.

A *Klebsiella pneumoniae*, uma bactéria Gram-negativa, é clinicamente significativa devido à sua associação com uma variedade de infecções em seres humanos (BROWN; CORNFORTH; MIDEO, 2012). Essa bactéria é um patógeno oportunista que frequentemente coloniza as vias respiratórias e o trato gastrointestinal, sendo reconhecida por sua capacidade de causar infecções graves, como pneumonia, infecções do trato urinário, bacteremias e infecções em feridas cirúrgicas (CLEGG; MURPHY, 2016). A *K. pneumoniae* é particularmente notável por sua resistência a antibióticos, o que pode complicar o tratamento e aumentar a gravidade das infecções que ela causa. Além disso, a bactéria é associada a

surtos hospitalares e é uma preocupação crescente devido ao desenvolvimento de cepas multidrogas resistentes (NAVON-VENEZIA; KONDRATYEVA; CARATTOLI, 2017).

O SARS-CoV-2, o vírus responsável pela pandemia de COVID-19, é clinicamente relevante devido à sua rápida disseminação global e à gravidade das manifestações clínicas associadas à infecção (OSUCHOWSKI *et al.*, 2020). A COVID-19 pode levar a complicações respiratórias significativas, como a síndrome da angústia respiratória aguda, e está associada a um aumento na morbidade e mortalidade, especialmente em indivíduos mais idosos ou com condições médicas subjacentes (ZAIDI; SINGH, 2024). A relevância clínica do SARS-CoV-2 é enfatizada pela pressão que exerce sobre os sistemas de saúde em todo o mundo, a necessidade de medidas de controle e prevenção rigorosas, bem como a corrida global para desenvolver mais vacinas e novos tratamentos, dentre os quais, peptídeos antimicrobianos demonstram interessantes candidatos (OSUCHOWSKI *et al.*, 2020; LANERI *et al.*, 2021)

Considerando a atividade predita do AMP-PGLYRP3 contra esses dois patógenos de extrema relevância clínica, bem como os resultados negativos para capacidades tóxicas, hemolíticas e alergênicas, sugerimos que o AMP-PGLYRP3 possa ser um novo candidato farmacológico e terapêutico.

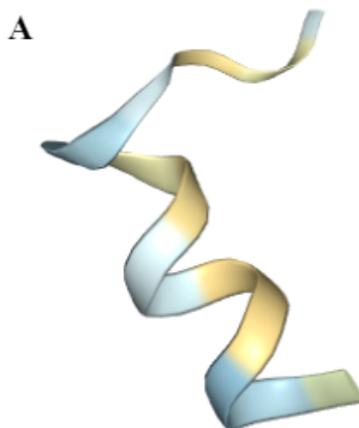
Posteriormente, analisamos as propriedades físico-químicas intrínsecas ao peptídeo AMP-PGLYRP3 utilizando a ferramenta ProtParam do servidor ExPASy. Na **Tabela 1** encontra-se a sequência do peptídeo, destacando seus resíduos hidrofóbicos (prolina, valina, metionina e isoleucina, sublinhados) e catiônicos (arginina e leucina, em negrito), sua carga e índice de hidropaticidade. O peptídeo identificado possui 15 aminoácidos, dentre os quais 8 são de natureza hidrofóbica: três prolinas, duas valinas, uma metionina e duas isoleucinas. Assim, constituem 53,33% do peptídeo, enquanto os resíduos catiônicos representam metade disso, cerca de 26,66% da estrutura. No peptídeo os resíduos encontrados de caráter catiônico foram a arginina e a lisina, tipicamente encontrados em peptídeos antimicrobianos. A carga predita do peptídeo AMP-PGLYRP3 foi +4. Naturalmente, AMPs são constituídos em cerca de 40% a 60% de resíduos hidrofóbicos e possuem carga entre +4 e +6 (GIANGASPERO; SANDRI; TOSSI, 2001). Portanto, a sequência do peptídeo (PVMPRKVCPNIIKRS) indicou ser um peptídeo antimicrobiano.

Tabela 1 - Propriedades físico-químicas dos AMP-PGLYRP3

Identificação	Sequência	Carga	Hidropaticidade
AMP-PGLYRP3	<u>PVM</u> PRK <u>VCP</u> <u>NII</u> KRS	+4	-0,273

Para elucidar a estrutura e a anfipaticidade do peptídeo AMP-PGLYRP3 utilizamos o software PEP-FOLD v4.0. Nossa análise retornou 5 modelos de dobramento, dentre os quais se apresentavam variações de alfa hélice. O AMP-PGLYRP3 foi predito como um peptídeo predominantemente dobrado em alfa hélice (**Figura 5**), que é consistente com as propriedades físico químicas apresentadas: caráter catiônico e presença representativa de resíduos hidrofóbicos (SATO; FEIX, 2006). Além disso, na **Figura 5** é possível visualizar que as regiões hidrofílicas e hidrofóbicas estão dispostas opostamente, que proporciona a anfipaticidade ao peptídeo (SATO; FEIX, 2006). Essa característica também é essencial para a atividade disruptiva de membrana dos AMPs catiônicos de alfa-hélice, uma vez que permite as interações com membranas celulares, as quais também possuem caráter anfipático (SATO; FEIX, 2006). Na **Figura 5** está representado o dobramento do AMP-PGLYRP3 de maior representatividade. Nesse software, utilizou-se a representação espacial da hidropaticidade do peptídeo. Dessa forma, regiões hidrofóbicas ficam representadas em amarelo, enquanto as hidrofílicas estão em azul.

Figura 5 - Estrutura Tridimensional do AMP-PGLYRP3



Fonte: PEP-FOLD v4.0

Interessantemente, a sequência do AMP-PGLYRP3 foi analisada no banco de dados de peptídeos antimicrobianos DBAASP e não obtivemos nenhum retorno de sua presença. Assim, conclui-se que a molécula apresentada não está descrita na literatura.

Dessa forma, em nossas análises *in silico* foi possível identificar um novo peptídeo antimicrobiano de alfa-hélice catiônico e críptico com potencial de ação contra patógenos de grande relevância mundial. Além disso, o peptídeo se mostra como um ótimo candidato

terapêutico, tendo sido predito como não alergênico e não hemolítico. Considerando esses resultados iniciais, optamos pela expressão recombinante do AMP-PGLYRP3.

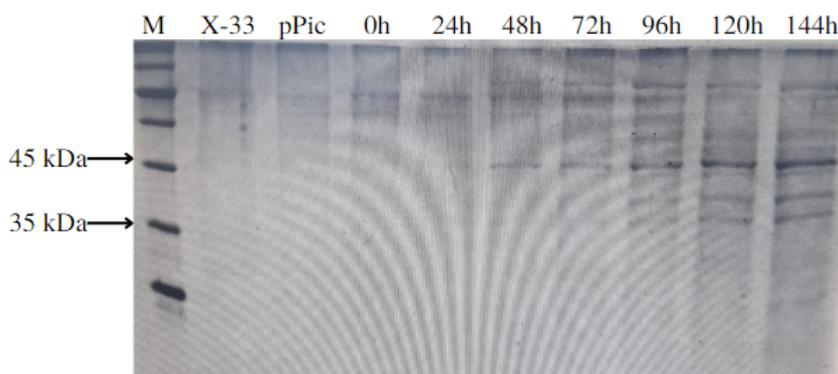
5.2. Expressão heteróloga da PGLYRP3 em *Pichia pastoris*

Neste estudo, também tentamos expressar a proteína recombinante PGLYRP3 humana nativa em sistema *Pichia pastoris*, para utilizá-la como controle em nossos experimentos e também em experimentos de sinergismo junto com o peptídeo AMP-PGLYRP3, uma vez que esta proteína apresentou ação antimicrobiana sinérgica com outros peptídeos antimicrobianos (WANG *et al.*, 2007).

A produção da PGLYRP3 humana de maneira recombinante já foi descrita na literatura utilizando apenas linhagens de *Drosophila melanogaster* e de humanos (WANG *et al.*, 2007; BOBROVSKY *et al.*, 2016). Portanto, acreditamos que a expressão dessa proteína de modo funcional em *P. pastoris* seria de grande interesse, pois a levedura oferece custos menores, rápido crescimento, grandes rendimentos, além de realizar modificações pós-traducionais (CREGG *et al.*, 2009).

Em nosso estudo, durante o *screening* foram isolados os clones 2, 3, 4 e 9 como potenciais produtores da proteína recombinante PGLYRP3. Na análise do perfil de expressão da proteína em SDS-PAGE observamos que o clone 9, a partir de 48 h, apresentou uma banda na faixa da altura esperada para a PGLYRP3 (~40 kDa), que correspondia a aproximadamente 35 e 45 kDa (**Figura 6**). Conforme observado, os controles negativos X-33 e pPicZ não apresentaram as mesmas bandas em até 96 horas de indução.

Figura 6 - Perfil de expressão da proteína recombinante PGLYRP3 no clone 9

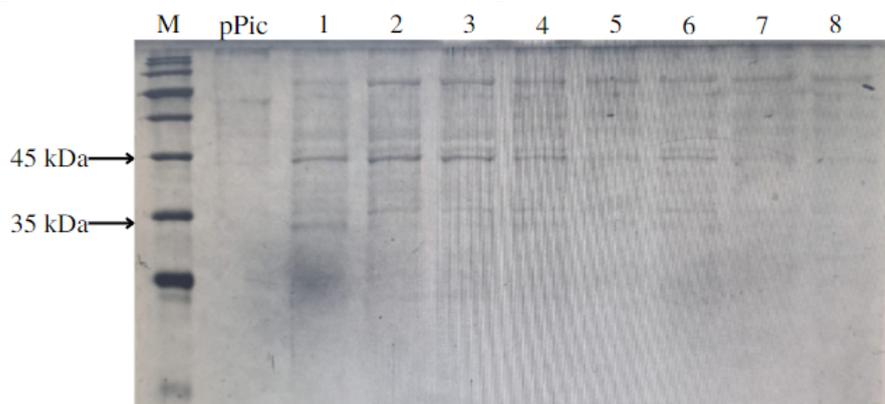


M: Marcador de peso molecular *BlueClassic Prestained Protein Marker* (Jena Bioscience). X-33: expressão cepa não transformada e induzida a 72 horas. pPic: expressão da cepa transformada com o vetor sem inserto a 72 horas. 0h-144h: perfil de expressão do clone 9 a cada 24 horas.

Fonte: Autoria própria

Na **Figura 7** está apresentado o perfil de expressão em *Pichia pastoris* dos controles (pPicZ, e X-33) e dos clones 1 a 8 em 72 horas de indução. Nos clones 2, 3 e 4, também foi possível identificar bandas correspondentes à altura de interesse (aproximadamente 35 e 40 kDa). Portanto, os clones 2, 3, 4 e 9 foram isolados para análises por *immunoblotting*.

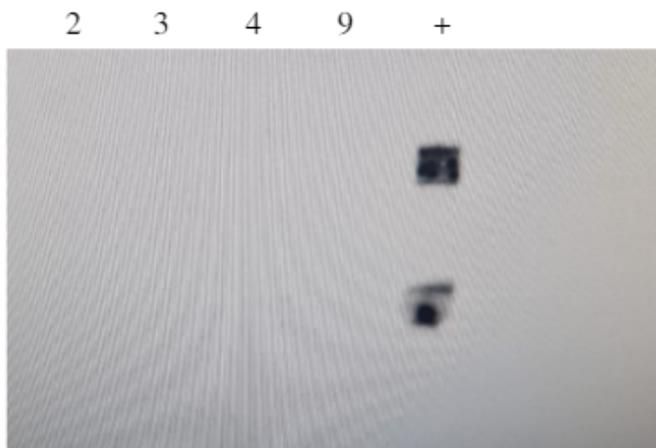
Figura 7 - Análise dos clones de *Pichia pastoris* 1 a 8 em 72 horas de indução



M: Marcador de peso molecular *BlueClassic Prestained Protein Marker* (Jena Bioscience). pPic: expressão da cepa transformada com o vetor sem inserto a 72 horas. 1-8: perfil de expressão dos respectivos clones em 72 horas.

As análise por *Western blot* não apresentaram resultados promissores. A **Figura 8** mostra a revelação da membrana de PVDF utilizando as amostras dos clones 2, 3, 4 e 9, bem como o controle positivo: a proteína Inibidor de cisteíno peptidase de *citrus clementina* 3 adicionada de His-Tag, fornecida pelo laboratório de tecnologia vegetal (LBV) e contando com 25 kDa em sua forma monomérica. Como observado, não houve marcação da proteína recombinante humana PGLYRP3 nas amostras referentes aos clones isolados (colunas 2, 3, 4 e 9), ao contrário do controle positivo (coluna +), o qual foi marcado monomérica e dimericamente.

Figura 8 - Western Blot dos clones 2, 3, 4 e 9 para análise da expressão da PGLYRP3



Western blot com marcação para His-tag. 2, 3, 4 e 9: clones testados na análise. +: controle positivo da reação com marcação.

Fonte: Autoria própria

Com os resultados obtidos, nota-se que não foi possível ainda obter a proteína recombinante PGLYRP3 recombinante de maneira solúvel no sistema *Pichia pastoris*. Considerando o padrão eletroforético da secreção do clone nove, é notável a presença de uma banda com o tamanho esperado próximo a 45 kDa (considerando a glicosilação da proteína), sugerindo que houve expressão da proteína. No entanto, foi observado bandas abaixo à esperada, indicando uma possível degradação do produto. O que poderia explicar a falta de detecção da proteína na análise por *Western blot*.

Nessa situação, de acordo com o manual do kit de expressão em *Pichia* (LIFE TECHNOLOGIES, 2014) seria interessante a expressão em meio não tamponado (checando a susceptibilidade a proteases de pH neutro), adição de inibidores de proteases ou a expressão em cepas deficientes nessas enzimas, como a SMD1168. Testando esses parâmetros, espera-se que será possível realizar otimizações para a obtenção da proteína íntegra.

Por fim, outra alternativa é a coexpressão da PGLYRP3 humana com chaperonas, que, no trabalho de YANG *et al.* (2016), se demonstrou eficiente para a produção da PGLYRP1 porcina.

5.3. Expressão heteróloga do AMP-PGLYRP3 em sistema baculoviral

5.3.1. Clonagem e processamento da sequência da proteína de fusão SUMO3 para produção do híbrido SUMO3-AMP-PGLYRP3

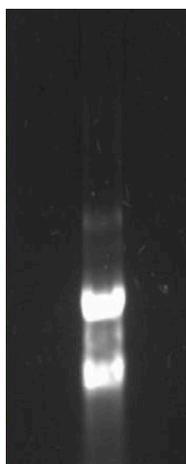
Em nosso estudo, para a obtenção do peptídeo antimicrobiano AMP-PGLYRP3 recombinante, acoplou-se a sequência do peptídeo à sequência da proteína SUMO3. Os

pequenos modificadores relacionados à ubiquitina (SUMOs) regulam quase todos os aspectos da função celular, desde a expressão gênica no núcleo até o transporte de íons na membrana plasmática. Em humanos, a via SUMO possui cinco parálogos com homologias de sequência que variam de 45% a 97% (BOUCHARD *et al.*, 2021).

A SUMO como proteína de fusão N-terminal aumenta a produção funcional de proteínas em sistemas de expressão procarióticos e eucarióticos, aumentando a estabilidade e a solubilidade proteica. Além disso, após a expressão e purificação da proteína de fusão, a SUMO pode ser clivada por proteases específicas ou por métodos químicos (como a clivagem por ácido fórmico) para gerar a porção N-terminal desejada. Além de sua relevância fisiológica em eucariotos, a SUMO pode, assim, ser utilizado como uma poderosa ferramenta biotecnológica para expressão recombinante em sistemas celulares procarióticos e eucarióticos (PANAVAS *et al.*, 2009).

As células K562 semeadas em meio de cultura, quando atingida a densidade desejada, foram utilizadas para extração de RNA. A integridade do RNA foi comprovada pela presença bem definida das bandas das subunidades do RNA ribossomal (**Figura 9**) e sua pureza, pelas razões de absorvância A260/A230 e A260/A280 próximas de 2 obtidas no NanoDrop (**Tabela 2**).

Figura 9 - Eletroforese de RNA extraído de K562



Eletroforese do RNA extraído das células K562 em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio

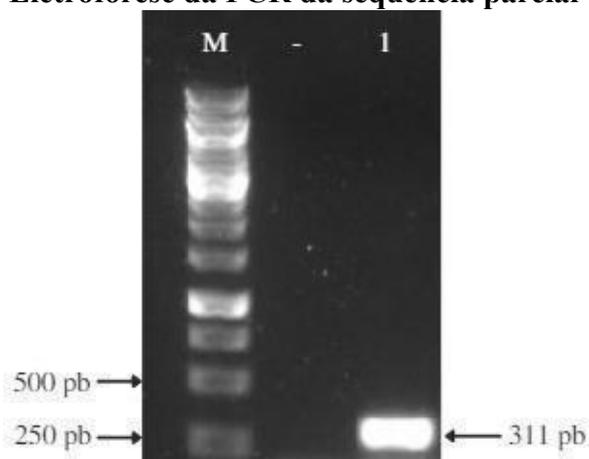
Fonte: Autoria própria

Tabela 2 - Quantificação e pureza do RNA extraído da linhagem K562

Concentração (ng/ μ L)	A260/A230	A260/A280
1.026	2,27	2

O RNA extraído das células K562 foi utilizado para a síntese de cDNA, que foi empregado na reação de amplificação parcial da SUMO3. As reações de amplificação da região parcial, bem como para a adição das *overhangs*, se mostraram bem sucedidas, e estão representadas nas **Figuras 10 e 11**, respectivamente. Nelas, encontra-se no primeiro poço o marcador de peso molecular (M), no segundo o controle negativo (-) e no terceiro, a reação de interesse (1). As setas indicam o material amplificado e seu respectivo tamanho em pares de base (pb).

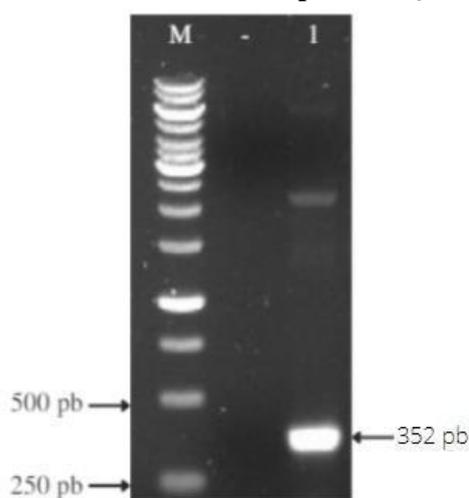
Figura 10 - Eletroforese da PCR da sequência parcial da SUMO3



Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. M: marcador de massa molecular 1kb (Invitrogen). -: controle negativo. 1: reação de amplificação da SUMO3

Fonte: Autoria própria

Figura 11 - Eletroforese da PCR para adição de *overhangs*

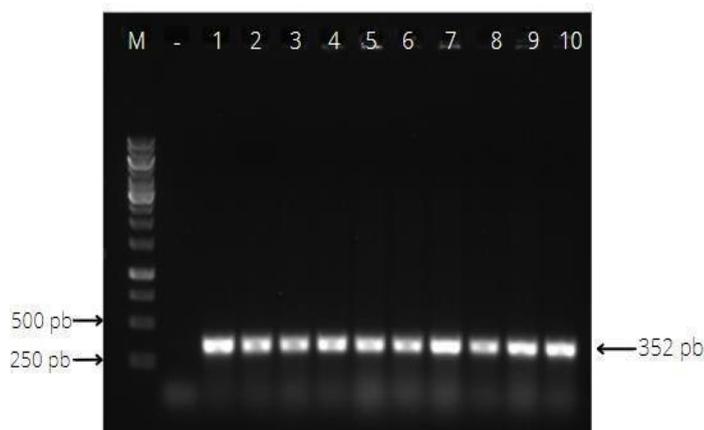


Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. M: marcador de massa molecular 1kb (Invitrogen). -: controle negativo. 1: reação de amplificação da SUMO3 com as *overhangs* de interesse.

Fonte: Autoria própria

A sequência processada da SUMO3+6-His, obtida pela adição das *overhangs*, pôde ser facilmente recuperada pelo kit *Agarose Gel Extraction* (Cellco). Dessa forma, realizamos as reações de ligação em pGEM-T e a transformação em células *E. coli* DH5 α . Essa, por sua vez, mostrou-se validada durante a PCR de colônia e sequenciamento. Na **Figura 12** encontra-se a revelação da eletroforese da PCR de colônia da *E. coli* DH5 α , a qual conta com um marcador de peso molecular (poço M), um controle negativo sem o material bacteriano (poço -) e, por fim, as reações de confirmação das 10 colônias brancas selecionadas (poços 1 a 10). Nela, é possível observar também a amplificação do inserto em questão com a mesma altura de banda (312 pb) da reação observada na **Figura 11**.

Figura 12 - PCR de colônia pGEM-T-SUMO3



Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. M: marcador de massa molecular 1kb (Invitrogen). -: controle negativo. 1-10: reação de confirmação da presença do inserto SUMO3 nas respectivas colônias .

Fonte: Autoria própria

Em relação ao sequenciamento realizado, extraímos a sequência obtida em FASTA e realizamos o alinhamento com a sequência esperada. Essa etapa está ilustrada na **Figura 13** e comprova novamente o sucesso da clonagem do inserto SUMO3+6-His.

Figura 13 - Alinhamento do sequenciamento com a sequência esperada

```
clustalw.aln
CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment

Sequenciamento   AATTCGATTATCGATGGCTCATCATCATCATCATCATGGTGGATCCTCCGAGGAGAAGCC
Esperado          -----ATCGATGGCTCATCATCATCATCATCATGGTGGATCCTCCGAGGAGAAGCC
*****

Sequenciamento   CAAGGAGGGTGTGAAGACAGAGAATGACCACATCAACCTGAAGGTGGCCGGCAGGACGG
Esperado          CAAGGAGGGTGTGAAGACAGAGAATGACCACATCAACCTGAAGGTGGCCGGCAGGACGG
*****

Sequenciamento   CTCCGTGGTGCAGTTCAAGATCAAGAGGCACACGCCGCTGAGCAAGCTGATGAAGCCCTA
Esperado          CTCCGTGGTGCAGTTCAAGATCAAGAGGCACACGCCGCTGAGCAAGCTGATGAAGCCCTA
*****

Sequenciamento   CTGCGAGAGGCAGGGCTTGTCAATGAGGCAGATCAGATTGAGTTTCGACGGGACGCCAAT
Esperado          CTGCGAGAGGCAGGGCTTGTCAATGAGGCAGATCAGATTGAGTTTCGACGGGACGCCAAT
*****

Sequenciamento   CAATGAAACTGACACTCCAGCACAGCTGGAGATGGAGGACGAGGACACCATCGACGTGTT
Esperado          CAATGAAACTGACACTCCAGCACAGCTGGAGATGGAGGACGAGGACACCATCGACGTGTT
*****

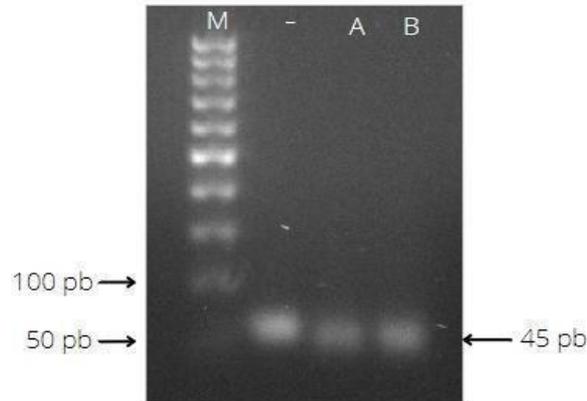
Sequenciamento   CCAGCAGCAGACGGGAGGTGTGCCGGAGAGCAGCCTGGCAGGGCACAGTTTC-----
Esperado          CCAGCAGCAGACGGGAGGTGTGCCGGAGAGCAGCCTGGCAGGGCACAGTTTCAGTCTAG
*****
```

Fonte: ClustalW (<https://www.genome.jp/tools-bin/clustalw>)

5.3.2. Clonagem do híbrido em pFastBac1 e geração do bacmídeo

Obtida a sequência da SUMO3, onde se adicionou a cauda de histidina e os sítios de clivagem (SUMO3-6xHis), prosseguimos com as outras etapas para obtenção da construção de expressão. Primeiramente, foi realizada a PCR para obtenção do AMP (item 4.4.1), a qual tem sua eletroforese ilustrada na **Figura 14**, nela pode-se visualizar o marcador de massa molecular (M), o controle negativo (-) e as reações de amplificação do AMP (A e B). Nota-se que a banda amplificada nas amostras está no tamanho esperado do amplicon (próximo de 50 pares de base), no entanto, é possível visualizar também uma banda similar na reação controle. Ainda foi possível diferenciar o resultado negativo do positivo por uma pequena diferença no padrão de corrida, a banda de primers restantes apresentou uma velocidade menor e, conseqüentemente, ficou disposto um pouco acima dos resultados positivos. Devido ao tamanho reduzido do peptídeo, ele não pode ser purificado pelo kit disponível (*Agarose Gel Extraction* - Cellco). Assim, o método adaptado de *freeze squeeze* (SANTOS *et al.*, 2017) foi utilizado e se mostrou bem sucedido.

Figura 14 - Eletroforese da PCR do AMP-PGLYRP3

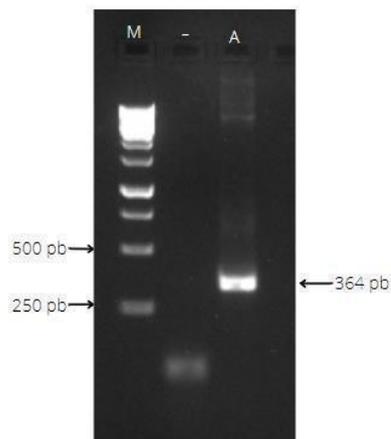


Eletroforese em gel de agarose 3% corado com brometo de etídio. M: marcador de massa molecular 50 pb (Cellco). -: controle negativo. A e B: reações de amplificação do AMP-PGLYRP3.

Fonte: Autoria própria

Em relação à outra etapa preparatória para a fusão dos fragmentos, foi possível adicionar a região de homologia com o AMP-PGLYRP3 à região 3' da SUMO3-6xHis. A eletroforese dessa reação está apresentada na **Figura 15**, na qual se encontram o marcador de massa molecular, o controle negativo e a reação de amplificação, que estão representados nos poços M, -, e A, respectivamente. Na figura é possível notar a amplificação da SUMO3-6xHis com a região de homologia com o AMP, uma vez que a banda se encontra na faixa de tamanho esperada.

Figura 15 - Eletroforese da PCR de adição de região de homologia

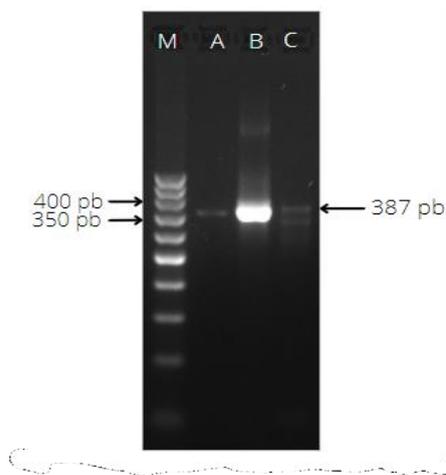


Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. M: marcador de massa molecular 1kb (Invitrogen). -: controle negativo. A: reação de amplificação da SUMO3-6xHis adicionada da região de homologia com o AMP-PGLYRP3.

Fonte: Autoria própria

Finalmente, obtidos os fragmentos necessários (AMP-PGLYRP3 e SUMO3-6xHis com a região de homologia), foi possível realizar a PCR *Overlap* (item 4.4.4). Nessa etapa, as sequências foram submetidas a um ciclo inicial de termociclagem que possibilita o anelamento delas graças à região homóloga. Subsequentemente houve a adição dos primers à reação, a qual foi submetida então a um ciclo de amplificação. Na **Figura 16** está apresentada a eletroforese da amostra final obtida. Podemos observar o marcador de massa molecular, fragmento purificado SUMO3-6xHis adicionado da região homóloga, reação *overlap* submetida à temperatura de anelamento de 45°C e 42°C, representadas nas colunas M, A, B e C, respectivamente. É possível detectar a banda do híbrido na altura esperada (cerca de 390 pb) nas reações realizadas (B e C), que se mostram próximas à banda do fragmento SUMO3-6xHis. No entanto, a reação a 45°C se mostrou muito mais eficaz para a produção do híbrido, demonstrado pela intensidade da amplificação obtida. Ademais, é esperado que na visualização dessa técnica haja presença de bandas inespecíficas devido aos possíveis pareamentos entre os fragmentos de DNA, sendo necessária uma purificação por excisão de gel (CHA-AIM et al., 2012), a qual foi realizada com sucesso.

Figura 16 - Eletroforese da PCR *Overlap*

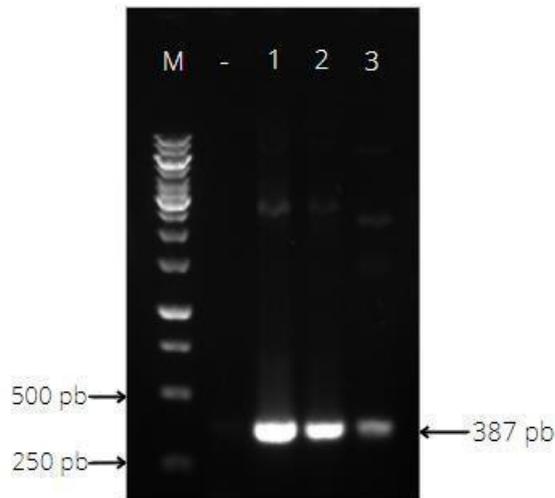


Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. M: marcador de massa molecular 50 pb (Cellco). -: controle negativo. A: SUMO3+6xHis adicionada da região de homologia. B: PCR *Overlap* do híbrido SUMO3-AMP-PGLYRP3 a 45°C. C: PCR *Overlap* do híbrido SUMO3-AMP-PGLYRP3 a 42°C.

Fonte: Autoria própria

Obtido o inserto SUMO3-AMP-PGLYRP3, foi realizada sua ligação em pGEM-T, que, por sua vez, foi utilizada para a transformação de *E. coli* (DH5α). Na **Figura 17** está ilustrada a PCR de colônias dessa transformação, com a presença de clones recombinantes, como indicado pela amplificação do material na altura de interesse.

Figura 17 - Eletroforese da PCR de colônia do pGEM-T-SUMO3-AMP-PGLYRP3



Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. M: marcador de massa molecular 1kb (Invitrogen). -: controle negativo. A, B e C: reações de amplificação do híbrido SUMO3-AMP-PGLYRP3 utilizando material de suas respectivas colônias.

Fonte: Autoria própria

Na **Figura 18** é possível visualizar a correspondência do sequenciamento da construção pGEM-T-SUMO3-AMP-PGLYRP3, bem como de outros elementos importantes: sítio de clivagem da Sac I (em vermelho), *start* codon (azul), 6xHis *tag* (amarelo), *stop* codon (verde) e sítio de Xba I (rosa).

Figura 18 - Alinhamento do sequenciamento com a sequência esperada

```

CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment

Sequência      -----GAGCTCATGCATCATCATCATCATCATGGTGGATCCTCCGAGG
Sequenciamento CGAATTCAGTGTGATTGAGCTCATGCATCATCATCATCATCATGGTGGATCCTCCGAGG
                *****
Sequência      AGAAGCCCAAGGAGGGTGTGAAGACAGAGAATGACCACATCAACCTGAAGGTGGCCGGGC
Sequenciamento AGAAGCCCAAGGAGGGTGTGAAGACAGAGAATGACCACATCAACCTGAAGGTGGCCGGGC
                *****
Sequência      AGGACGGTCCGTGGTGCAGTTCAAGATCAAGAGGCACACGCCGCTGAGCAAGCTGATGA
Sequenciamento AGGACGGTCCGTGGTGCAGTTCAAGATCAAGAGGCACACGCCGCTGAGCAAGCTGATGA
                *****
Sequência      AGGCCTACTGCGAGAGGCAGGGCTTGCAATGAGGCAGATCAGATTAGGTTGACGGGC
Sequenciamento AGGCCTACTGCGAGAGGCAGGGCTTGCAATGAGGCAGATCAGATTAGGTTGACGGGC
                *****
Sequência      AGCCAATCAATGAACTGACACTCCAGCACAGCTGGAGATGGAGGACGAGGACACCATCG
Sequenciamento AGCCAATCAATGAACTGACACTCCAGCACAGCTGGAGATGGAGGACGAGGACACCATCG
                *****
Sequência      ACGTGTTCCAGCAGCAGACGGGAGGTGAATTCGACCCAGTGATGCCAGGAAGGTTTGCC
Sequenciamento ACGTGTTCCAGCAGCAGACGGGAGGTGAATTCGACCCAGTGATGCCAGGAAGGTTTGCC
                *****
Sequência      CCAACATCATCAAACGATCTTAGTAGTCTAGA-
Sequenciamento CCAACATCATCAAACGATCTTAGTAGTCTAGAA
                *****
    
```

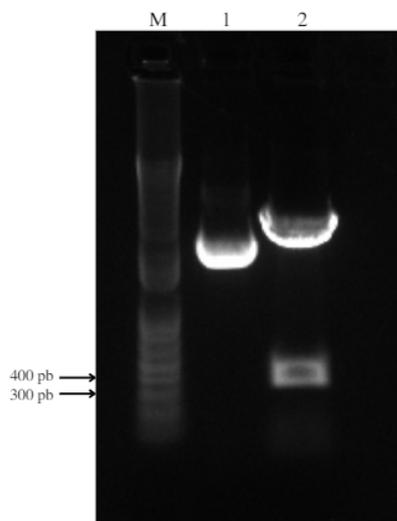
Alinhamento do sequenciamento com a sequência esperada do híbrido SUMO3+AMP-PGLYRP3. Em vermelho está destacado o sítio de restrição da

enzima Sac I; em azul o codon de iniciação da tradução; em amarelo a *tag* de seis histidinas; em verde o codon de parada da tradução; em rosa o sítio de restrição para a enzima Xba I.

Fonte: Adaptado de ClustalW

Validada a construção, deu-se sequência com a subclonagem em pFastBac1. Como descrito no item 4.4.5, primeiramente foi realizada a digestão do *backbone* do vetor bem como da construção pGEM-T-SUMO3-AMP-PGLYRP3 com o mesmo par de endonucleases (SacI e XbaI). Na **Figura 19** está representada a eletroforese da reação de clivagem realizada, contando com marcador molecular (M), clivagem do pFastBac1 (poço 1) e do pGEM-T-SUMO3-AMP-PGLYRP3 (poço 2). No gel, pode ser observado que a clivagem foi bem sucedida, com bandas dispostas no padrão esperado, ou seja, uma banda do vetor aberto no poço 1 e duas bandas no poço 2, uma do inserto, o qual se encontra novamente na faixa de tamanho esperado, e uma do restante do vetor, que constitui a banda de maior tamanho.

Figura 19 - Eletroforese das reações de clivagem



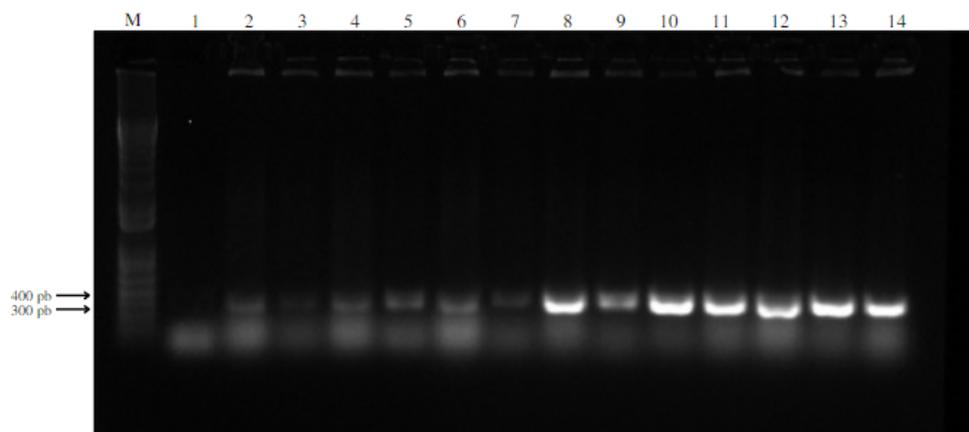
Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. M: marcador de massa molecular Star plus 1kb (Cellco). 1: reação de restrição do plasmídeo pFastBac1. 2: reação de restrição da construção pGEM-T-SUMO3-AMP-PGLYRP3.

Fonte: Autoria própria

Subsequentemente, os fragmentos obtidos foram purificados do gel e ligados pela enzima T4 DNA ligase. A reação de ligação foi utilizada na transformação de cepas *E. coli* DH5a, e os clones transformantes foram submetidos a PCR de colônia e sequenciamento. A eletroforese da PCR de colônia pode ser visualizada na **Figura 20**, a qual mostra o marcador molecular (M), um controle negativo sem o material bacteriano (poço 1) e as reações de validação das dez colônias selecionadas (poços 2-14). A ligação desses fragmentos também se

mostrou eficiente, obtendo clones positivos na PCR de colônia (**Figura 20**). O clone apresentado no poço 10 foi selecionado para a extração de DNA plasmidial, a qual também se mostrou bem sucedida.

Figura 20 - PCR de colônia do pFastBac1-SUMO3-AMP-PGLYRP3

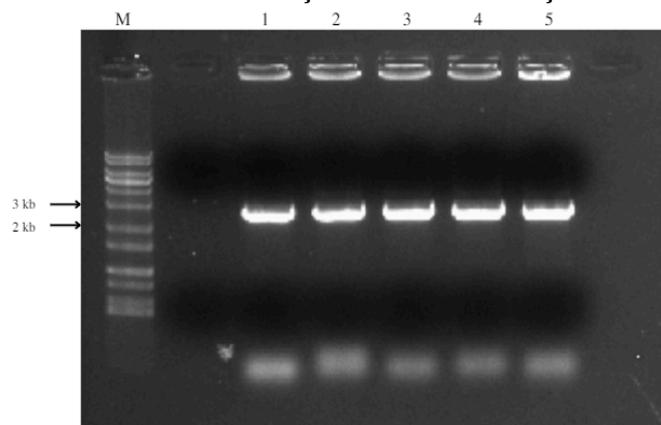


Eletoforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. M: marcador de massa molecular Star plus 1kb (Cellco). 1: controle negativo. 2 a 14: reações de amplificação do híbrido SUMO3-AMP-PGLYRP3 de suas respectivas colônias.

Fonte: Autoria própria

Finalmente, para a obtenção do bacmídeo, o processo de recombinação e de purificação por Midiprep também se mostraram bem-sucedidos. A **Figura 21** mostra a PCR para confirmação da recombinação, uma vez que o tamanho do amplicon desejado nessa etapa é o tamanho do seu inserto somado de 2,3 kpb.

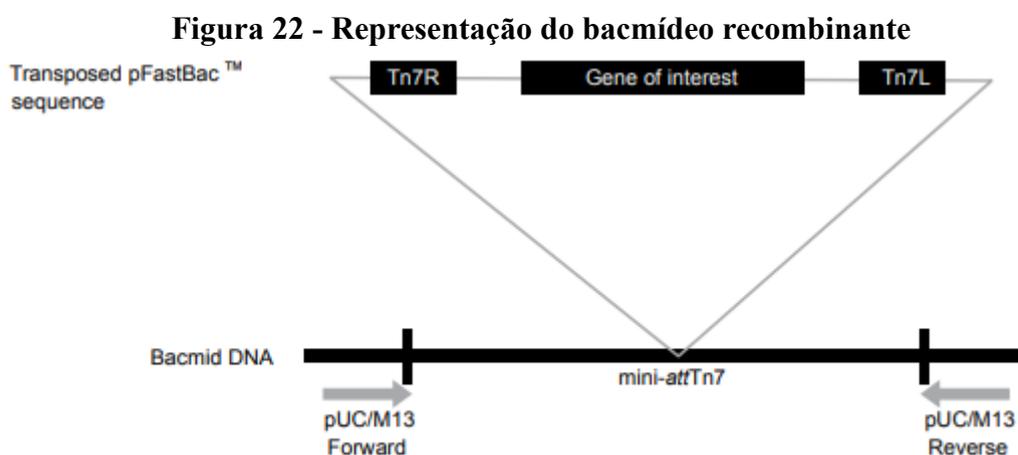
Figura 21 - PCR de validação da recombinação com o bacmídeo



Eletoforese em gel de agarose 3% corado com brometo de etídio. M: marcador de massa molecular TrackI 1 Kb Plus DNA Ladder (Thermo Scientific). 1 a 5: reações de amplificação do vetor pFastBac1-SUMO3-AMP-PGLYRP3 transposto no bacmídeo das respectivas colônias.

Fonte: Autoria própria

O tamanho resultante do amplicon é explicado pela transposição do vetor pFastBac1 no bacmídeo já presente nas células de *E. coli* DH10Bac. Além do bacmídeo, essa cepa conta com um plasmídeo auxiliar que fornece as proteínas de transposição necessárias para a integração do plasmídeo pFastBac no bacmídeo por suas regiões de homologia Tn7 e mini-attTn7, respectivamente. Assim, a sequência amplificada pelo conjunto de primers pUC/M13 no bacmídeo recombinante consiste no vetor pFastBac1 (~2 kpb), o inserto clonado (nesse caso a SUMO3-AMP-PGLYRP3 com cerca de 390 pb) e uma região de anelamento do bacmídeo (~300 pb), como pode ser observado na **Figura 22** (THERMO SCIENTIFIC, 2018). Assim, a banda obtida está de acordo com o tamanho esperado de aproximadamente 2,7 kpb.



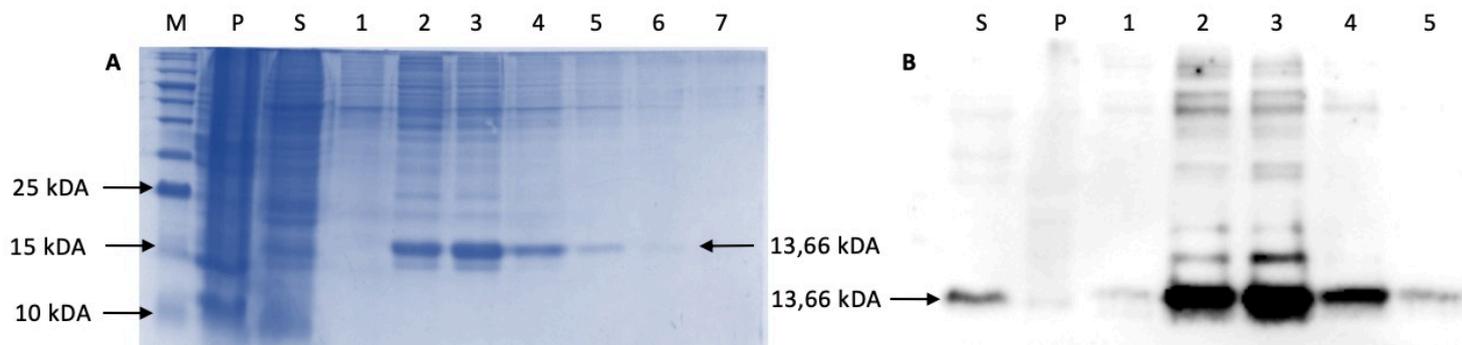
Fonte: ExpiSf Expression System: user guide (THERMO SCIENTIFIC, 2018)

5.3.3. Análise da expressão do híbrido SUMO3-AMP-PGLYRP3

A **Figura 23** representa a análise da expressão por SDS-PAGE (**Figura 23A**) e *Western blot* (**Figura 23B**). Os poços "P" e "S" representam, o *pellet* insolúvel e o sobrenadante da lise clarificado, respectivamente, enquanto os poços numerados representam as frações de purificação obtidas. Após a cromatografia de afinidade em coluna em níquel, nos poços 2, 3 e 4, pode-se observar a banda correspondente na altura do híbrido SUMO3+AMP-rPGLYRP3 (**Figura 23A**) em forma solúvel. Outras impurezas também estavam presentes, o que sugere ligações inespecíficas na coluna de níquel. Para a confirmação da proteína híbrida recombinante SUMO3+AMP-rPGLYRP3, *Western blot* foi realizado. Conforme podemos observar, a marcação com anti-his apresentou bandas na altura desejada (**Figura 23B**). Sinais inespecíficos nessa técnica sugerem *background* do anticorpo secundário, pois conforme podemos notar houve a presença da banda marcada correspondente

a proteína desejada no sobrenadante 32 do lisado (**Figura 23, poço S**). Assim, conclui-se que foi obtido sucesso na expressão recombinante do híbrido.

Figura 23 - Análise da expressão do híbrido SUMO3-AMP-PGLYRP3



Análise da expressão do híbrido SUMO3-AMP-PGLYRP3 por SDS-PAGE (**A**) e *Western blot* (**B**). M: marcador de massa molecular *BlueClassic Prestained Protein Marker* (Jena Bioscience). P: *pellet* obtido após a lise celular, representa a fração insolúvel. S: fração aquosa da lise celular. 1-7: frações de eluição do híbrido com 250 mM de imidazol.

Fonte: Autoria própria

Com a obtenção do híbrido de maneira solúvel pretendemos aumentar a escala de produção para a clivagem do peptídeo com o ácido fórmico. Em seguida, realizaremos uma série de testes de atividade *in vitro* contra cepas bacterianas ATCC e isoladas de unidades de tratamento intensivo (UTI) buscando validar os resultados obtidos em nossas análises *in silico*.

O sistema de expressão baculoviral já foi utilizado para a produção de uma série de peptídeos antimicrobianos, os quais mantiveram suas atividades. No trabalho de FUKUSHIMA *et al.* (2013) o sistema de expressão baculoviral em *Spodoptera frugiperda* foi utilizado para a expressão funcional de três AMPs endógenos humanos: as β -defensinas 1, 2 e 3. Nesses casos, mostrou-se a conservação de suas atividades antibacterianas. Ademais, no trabalho de ALMASIA *et al.* (2017) foi possível expressar o peptídeo SNAKIN-1, isolado originalmente da batata, utilizando linhagens celulares de inseto. Esse peptídeo se demonstrou incapaz de ser produzido eficientemente em linhagens de microrganismos graças à composição de resíduos desse composto.

Além disso, o sistema de expressão em linhagens celulares se mostra de grande interesse para a produção de proteínas de objetivo terapêutico graças a alta similaridade de modificações pós-traducionais às realizadas por mamíferos e ausência de componentes tóxicos bacterianos como lipopolissacarídeos (PATTERSON; SELKIRK; MERRICK, 1995).

Dessa forma, acreditamos que o potencial de atividade do AMP-PGLYRP3 deve ser preservado utilizando esse sistema de expressão.

Atualmente estamos aumentando a escala de produção do peptídeo para que possamos recuperá-lo pela clivagem do sítio de ácido fórmico inserido no híbrido. Padronizada essa etapa, poderemos seguir para uma série de testes *in vitro* contra cepas ATCC e isoladas de UTI disponíveis para nossos estudos.

6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

Durante nossas análises *in silico* conseguimos identificar um criptídeo com grande potencial antimicrobiano, levando em consideração suas propriedades físico-químicas preditas, e terapêutico, uma vez que não apresentou potencial alergênico e citotóxico em humanos. Dessa forma, optamos por expressar de modo recombinante esse candidato (AMP-PGLYRP3), bem como a proteína completa da qual ele é derivado (PGLYRP3), uma vez que ela apresenta atividade sinérgica com AMPs. Até o momento obtivemos o híbrido do peptídeo solúvel em sistema de expressão baculoviral em linhagem ExpiSf9, mas ainda não foi possível obter a proteína secretada em *Pichia pastoris*.

Agora que o híbrido foi expresso solúvel com sucesso em células ExpiSf9 seu isolamento pela clivagem com ácido fórmico está sendo padronizada. Obtido o AMP-PGLYRP3, são abertas portas para diversos testes *in vitro*, principalmente em bactérias patogênicas, para validação dos resultados das análises preditivas. Ademais, pretendemos padronizar a expressão da PGLYRP3 e do AMP-PGLYRP3 em ambos os sistemas utilizados em nosso trabalho para comparação dos resultados. Além disso, com a sequência do híbrido clonada em vetor plasmidial é possível explorar novas estratégias de modificação do peptídeo para otimização da atividade antimicrobiana.

Por fim, a lista de proteínas resultante de nossas análises iniciais ainda é uma fonte de maior exploração para identificação de novas sequências crípticas com atividade antimicrobiana. Dessa forma, espera-se contribuir com novas informações com o estudo de peptídeos antimicrobianos considerando o importante papel dessas moléculas no contexto da preocupante resistência antimicrobiana.

7. REFERÊNCIAS

- 1- ALMASIA, N. I. et al. Successful production of the potato antimicrobial peptide Snakin-1 in baculovirus-infected insect cells and development of specific antibodies. *BMC Biotechnology*, v. 17, n. 1, 9 nov. 2017.
- 2- BAHAR, A.; REN, D. Antimicrobial Peptides. *Pharmaceuticals*, v. 6, n. 12, p. 1543–1575, 28 nov. 2013.
- 3- BOBROVSKY, P. et al. Recombinant Human Peptidoglycan Recognition Proteins Reveal Antichlamydial Activity. *Infection and Immunity*, v. 84, n. 7, p. 2124–2130, 23 jun. 2016.
- 4- BROWN, S. P.; CORNFORTH, D. M.; MIDEO, N. Evolution of virulence in opportunistic pathogens: generalism, plasticity, and control. *Trends in Microbiology*, v. 20, n. 7, p. 336–342, jul. 2012.
- 5- BÜYÜKKIRAZ, E. M.; KESMEN, Z. Antimicrobial peptides (AMPs): A promising class of antimicrobial compounds. *Journal of Applied Microbiology*, v. 132, n. 3, 13 out. 2021.
- 6- CLEGG, S.; MURPHY, C. N. Epidemiology and Virulence of *Klebsiella pneumoniae*. *Microbiology Spectrum*, v. 4, n. 1, 2 fev. 2016.
- 7- COX, M. M. J. Innovations in the Insect Cell Expression System for Industrial Recombinant Vaccine Antigen Production. *Vaccines*, v. 9, n. 12, p. 1504, 20 dez. 2021.
- 8- DEO, S. et al. Strategies for improving antimicrobial peptide production. *Biotechnology Advances*, v. 59, p. 107968, out. 2022.
- 9- DIMITROV, I. et al. AllerTOP v.2—a server for in silico prediction of allergens. *Journal of Molecular Modeling*, v. 20, n. 6, 31 maio 2014.
- 10- DUTESCU, I. A.; HILLIER, S. A. Encouraging the Development of New Antibiotics: Are Financial Incentives the Right Way Forward? A Systematic Review and Case Study. *Infection and Drug Resistance*, v. 14, n. 1, p. 415–434, 5 fev. 2021.
- 11- FINGERHUT, W. et al. ampir: an R package for fast genome-wide prediction of antimicrobial peptides. *Bioinformatics*, v. 36, n. 21, p. 5262–5263, 19 jul. 2020.
- 12- FUKUSHIMA, M. et al. Production of Small Antibacterial Peptides Using Silkworm-Baculovirus Protein Expression System. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, v. 43, n. 6, p. 565–576, 18 ago. 2013.
- 13- GUPTA, S. et al. In Silico Approach for Predicting Toxicity of Peptides and Proteins. *PLoS ONE*, v. 8, n. 9, p. e73957, 13 set. 2013.
- 14- HAFEEZ, A. et al. Antimicrobial Peptides: An Update on Classifications and Databases. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 22, n. 21, p. 11691, 28 out. 2021.

- 15- HUTCHINGS, M. I.; TRUMAN, A. W.; WILKINSON, B. Antibiotics: past, present and future. *Current Opinion in Microbiology*, v. 51, n. 1, p. 72–80, out. 2019.
- 16- JONAS, O. B. et al. Drug-resistant infections: a threat to our economic future (Vol. 2): final report. World: HNP/Agriculture Global Antimicrobial Resistance Initiative Washington, D.C.: World Bank Group, 1 mar. 2017.
- 17- KANG, D. et al. A peptidoglycan recognition protein in innate immunity conserved from insects to humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 95, n. 17, p. 10078–10082, 18 ago. 1998.
- 18- KASHYAP, D. R. et al. Peptidoglycan Recognition Proteins Kill Bacteria by Inducing Oxidative, Thiol, and Metal Stress. *PLoS Pathogens*, v. 10, n. 7, p. e1004280, 17 jul. 2014.
- 19- KESMEN, Z. Antimicrobial peptides (AMPs): A promising class of antimicrobial compounds. *Journal of Applied Microbiology*, v. 132, n. 3, 13 out. 2021.
- 20- KOO, H. B.; SEO, J. Antimicrobial peptides under clinical investigation. *Peptide Science*, v. 111, n. 5, 3 jun. 2019.
- 21- LIFE TECHNOLOGIES. Pichia expression kit: user guide. [S. l.]: Life Technologies Corporation, 2014, 100 p.
- 22- LIU, C. et al. Peptidoglycan recognition proteins: a novel family of four human innate immunity pattern recognition molecules. *Journal of Biological Chemistry*, v. 276, n. 37, p. 34686–34694, 18 jul. 2001.
- 23- LU, X. et al. Peptidoglycan Recognition Proteins Are a New Class of Human Bactericidal Proteins. *Journal of Biological Chemistry*, v. 281, n. 9, p. 5895–5907, mar. 2006.
- 24- MARBLESTONES, J. G. et al. Comparison of SUMO fusion technology with traditional gene fusion systems: enhanced expression and solubility with SUMO. *Protein Sci*, v. 15, n. 1, p. 182-189, 15 jan 2006.
- 25- MAZURKIEWICZ-PISAREK, A.; BARAN, J.; CIACH, T. Antimicrobial Peptides: Challenging Journey to the Pharmaceutical, Biomedical, and Cosmeceutical Use. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 24, n. 10, p. 9031, 1 jan. 2023.
- 26- MURRAY, C. J. Global Burden of Bacterial Antimicrobial Resistance in 2019: A Systematic Analysis. *The Lancet*, v. 399, n. 10325, p. 629–655, 19 jan. 2022.
- 27- NAVON-VENEZIA, S.; KONDRATYEVA, K.; CARATTOLI, A. *Klebsiella pneumoniae*: a major worldwide source and shuttle for antibiotic resistance. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 41, n. 3, p. 252–275, 1 maio 2017.

- 28- OSUCHOWSKI, M. F. et al. SARS-CoV-2/COVID-19: Evolving Reality, Global Response, Knowledge Gaps, and Opportunities. *Shock*, v. 54, n. 4, p. 416–437, 9 jun. 2020.
- 29- PIMENTA, D. C.; LEBRUN, I. Cryptides: Buried secrets in proteins. *Peptides*, v. 28, n. 12, p. 2403–2410, dez. 2007.
- 30- PANAVALAS, T.; SANDERS, C.; BUTT, T. R. SUMO fusion technology for enhanced protein production in prokaryotic and eukaryotic expression systems. *Methods Mol Biol*, v. 497, p. 303-317, 2009.
- 31- PAULIN, S.; BEYER, P. 2019 Antibacterial agents in clinical development: an analysis of the antibacterial clinical development pipeline (G. Weiss, Ed.). Geneva: World Health Organization, 17 jan. 2020.
- 32- PATTERSON, R. M.; SELKIRK, J. K.; MERRICK, B. A. Baculovirus and insect cell gene expression: review of baculovirus biotechnology. *Environmental Health Perspectives*, v. 103, n. 7-8, p. 756–759, jan. 1995.
- 33- PIRTSKHALAVA, M. et al. DBAASP v3: database of antimicrobial/cytotoxic activity and structure of peptides as a resource for development of new therapeutics. *Nucleic Acids Research*, v. 49, n. D1, p. D288–D297, 5 nov. 2020.
- 34- RAPAPORT, D.; SHAI, Y. Interaction of fluorescently labeled pardaxin and its analogues with lipid bilayers. *Journal of Biological Chemistry*, v. 266, n. 35, p. 23769–23775, 1 dez. 1991.
- 35- REY, J. et al. PEP-FOLD4: a pH-dependent force field for peptide structure prediction in aqueous solution. *Nucleic Acids Research*, v. 51, n. W1, p. W432–W437, 11 maio 2023.
- 36- RODRÍGUEZ-ROJAS, A.; MAKAROVA, O.; ROLFF, J. Antimicrobials, Stress and Mutagenesis. *PLoS Pathogens*, v. 10, n. 10, p. e1004445, 9 out. 2014.
- 37- SANTOS, F. et al. Purification, concentration and recovery of small fragments of DNA from *Giardia lamblia* and their use for other molecular techniques. *MethodsX*, v. 4, p. 289–296, 1 jan. 2017.
- 38- SATO, H.; FEIX, J. B. Peptide–membrane interactions and mechanisms of membrane destruction by amphipathic α -helical antimicrobial peptides. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, v. 1758, n. 9, p. 1245–1256, set. 2006.
- 39- SZYMCZAK, P.; SZCZUREK, E. Artificial intelligence-driven antimicrobial peptide discovery. *Current Opinion in Structural Biology*, v. 83, p. 102733–102733, 1 dez. 2023.
- 40- THERMO FISHER SCIENTIFIC. ExpiSf Expression System: user guide. [S. l.]: Thermo Fisher Scientific Inc, 2018, 58 p.

- 41- TORRES, M. D. T. et al. Mining for encrypted peptide antibiotics in the human proteome. *Nature Biomedical Engineering*, v. 6, n. 1, p. 67–75, 4 nov. 2021.
- 42- WANG, M. et al. Human Peptidoglycan Recognition Protein-L Is an N-Acetylmuramoyl-L-alanine Amidase. *Journal of Biological Chemistry*, v. 278, n. 49, p. 49044–49052, dez. 2003.
- 43- WANG, X. J. et al. Recombinant production of the antimicrobial peptide NZ17074 in *Pichia pastoris* using SUMO3 as a fusion partner. v. 59, n. 1, p. 71–78, 2 abr. 2014.
- 44- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global Action Plan on Antimicrobial Resistance. Geneva: World Health Organization Press, 2015, p. 1-19, ISBN 978-92-4-150976-3.
- 45- YANG, J. et al. Effect of cooperation of chaperones and gene dosage on the expression of porcine PGLYRP-1 in *Pichia pastoris*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 100, n. 12, p. 5453–5465, 17 fev. 2016.
- 46- YOSHIDA, H.; KINOSHITA, K.; ASHIDA, M. Purification of a Peptidoglycan Recognition Protein from Hemolymph of the Silkworm, *Bombyx mori*. *Journal of Biological Chemistry*, v. 271, n. 23, p. 13854–13860, 7 jun. 1996.
- 47- ZAIDI, A. K.; SINGH, R. B. Epidemiology of COVID-19. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, 1 jan. 2024.
- 48- ZHANG, L.; GALLO, R. L. Antimicrobial peptides. *Current Biology*, v. 26, n. 1, p. R14–R19, jan. 2016.
- 49- ZHANG, L.; ROZEK, A.; HANCOCK, R. E. W. Interaction of Cationic Antimicrobial Peptides with Model Membranes. *Journal of Biological Chemistry*, v. 276, n. 38, p. 35714–35722, 25 jul. 2001.
- 50- ZORKO, M.; JERALA, R. Production of Recombinant Antimicrobial Peptides in Bacteria. p. 61–76, 28 set. 2009.
- 51- LUO, Y.; SONG, Y. Mechanism of Antimicrobial Peptides: Antimicrobial, Anti-Inflammatory and Antibiofilm Activities. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 22, n. 21, p. 11401, 22 out. 2021.
- 52- CIUMAC, D. et al. Membrane targeting cationic antimicrobial peptides. *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 537, p. 163–185, mar. 2019.
- 53- TALAPKO, J. et al. Antimicrobial Peptides—Mechanisms of Action, Antimicrobial Effects and Clinical Applications. *Antibiotics*, v. 11, n. 10, p. 1417, 16 out. 2022.

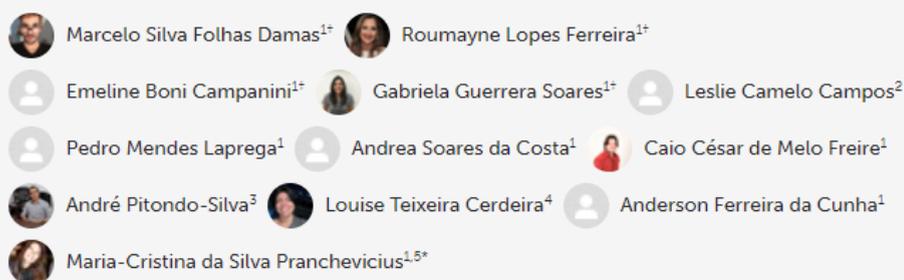
- 54- MORAVEJ, H. et al. Antimicrobial Peptides: Features, Action, and Their Resistance Mechanisms in Bacteria. *Microbial Drug Resistance* (Larchmont, N.Y.), v. 24, n. 6, p. 747–767, 2018.
- 55- BERTELSEN, M. et al. Mechanistic Insight into the Early Stages of Toroidal Pore Formation by the Antimicrobial Peptide Smp24. *Pharmaceutics*, v. 15, n. 10, p. 2399–2399, 28 set. 2023.
- 56- HUAN, Y. et al. Antimicrobial Peptides: Classification, Design, Application and Research Progress in Multiple Fields. *Frontiers in Microbiology*, v. 11, 16 out. 2020.

PRODUÇÃO CIENTÍFICA NO PERÍODO

Durante o período de realização do trabalho foram publicados dois artigos científicos sobre resistência antimicrobiana com os quais colaborei:

1-) *Frontiers in Medicine* - 07/22 - doi: [10.3389/fmed.2022.931379](https://doi.org/10.3389/fmed.2022.931379)

Whole genome sequencing of the multidrug-resistant *Chryseobacterium indologenes* isolated from a patient in Brazil



2-) *Frontiers in Microbiology* - 02/24 - doi: [10.3389/fmicb.2024.1352851](https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1352851)

First Report of Coexistence of blaKPC-2 and blaNDM-1 in Carbapenem-Resistant Clinical Isolates of *Klebsiella aerogenes* in Brazil

