

Laboratories welcoming Master students in 2009/2010

- Animal Cell Technology Unit
- Applied and Environmental Mycology Laboratory
- Bacterial Cell Surfaces and Pathogenesis Laboratory
- Bacterial Membrane Proteomics Laboratory
- Bioinorganic Chemistry and Peptide Design Laboratory
- Biomolecular Diagnostics Laboratory
- Biomolecular NMR Laboratory
- Bioorganic Chemistry Laboratory
- Cell Signaling in Drosophila Laboratory
- Coordination and Supramolecular Chemistry Laboratory
- Disease and Stress Biology Laboratory
- Forest Biotechnology Laboratory
- Glycobiology Laboratory
- Homogeneous Catalysis Laboratory
- Infection Biology Laboratory
- Inorganic Biochemistry and NMR Laboratory
- Macromolecular Crystallography Unit
- Metalloproteins and Bioenergetics Laboratory
- Microbial and Enzyme Technology Laboratory
- Microbial Biochemistry Laboratory
- Microbial Development Laboratory
- Molecular Genetics of Microbial Resistance Laboratory
- Molecular Interactions and NMR Laboratory
- Nutraceuticals and Delivery Laboratory
- Organic Synthesis Laboratory
- Physiology of Environmentally Conditioned Microbiota Laboratory
- Plant Genetic Engineering Laboratory
- Protein Biochemistry, Folding & Stability Laboratory
- Protein Modeling Laboratory
- Raman Spectroscopy of Metalloproteins Laboratory
- Systems Biodynamics Laboratory
- Biomolecular Diagnostics / Physiology of Environmentally Conditioned Microbiota

bookmarks available

Laboratory: Animal Cell Technology

Supervisor: Paula Marques Alves (marques@itqb.unl.pt)
Catarina Brito (anabrito@itqb.unl.pt)

Area: Cell Technology

Project: Desenvolvimento de modelos *in vitro* de células humanas de cérebro para avaliação de vectores para terapia génica

Enquadramento

A prevenção e tratamento de doenças neurodegenerativas, como a doença de Parkinson, estão ainda longe de se tornarem realidade. Embora as estratégias farmacológicas convencionais se tenham revelado pouco eficazes, resultados preliminares indicam que a terapia génica poderá ter grande potencial. Os vectores adenovirais baseados no serotipo canino 2 (CAV-2) transduzem preferencialmente neurónios e a sua expressão a longo prazo conduz a um eficiente transporte do material genético especificamente para neurónios. O projecto europeu BainCAV, no qual este estágio está integrado, propõe-se a utilizar o potencial de vectores CAV-2 para melhor compreender, e possivelmente tratar, a doença de Parkinson.

A aplicação da terapia genica está dependente da resolução de uma série de questões ainda em aberto - em particular, a necessidade de avaliar a sua exequibilidade, eficácia e segurança. Conhecer as perturbações provocada na biologia da célula-alvo (ou seja, os mecanismos de infecção, a interacção com o vector, as alterações a nível transcricional) é indispensável para prever possíveis efeitos adversos.

Tendo em vista a potencial aplicação dos vectores CAV-2 em ensaios clínicos, será necessário, numa primeira fase do projecto, avaliar estes efeitos em células do cérebro. Dada a complexidade do sistema nervoso central, nomeadamente a importância da interacção neurónio-astrocítico, é difícil encontrar modelos celulares adequados. Adicionalmente, a utilização *in vitro* de células de origem humana, cujo comportamento será mais facilmente extrapolado para a situação *in vivo*, é limitada. Alternativas possíveis passam pela utilização de neurónios e células da glia diferenciadas a partir de células estaminais de origem humana. Por outro lado, há abordagens inovadoras, como os sistemas de cultura tridimensionais (3D), que se aproximam mais das condições *in vivo*, por exemplo em termos de interacção célula-célula e célula-matrix extracelular, que as culturas clássicas em monocamada.

Objectivos e Metodologias

Neste projecto, o principal objectivo será o desenvolvimento de um sistema celular modelo tridimensional (3D) de cérebro. Serão utilizadas células estaminais neuronais humanas (hNSCs), com capacidade de diferenciarem nas linhagens do sistema nervoso central, incluindo neurónios e células da glia (Storch *et. al.* 2001; Wegner *et. al.*, 2008). Fazendo uso da experiência do nosso grupo em tecnologia de bioreactores, no desenvolvimento de sistemas de cultura tridimensionais (3D) e na cultura de células estaminais (Santos *et. al.*, 2007; Serra *et. al.*, 2007, 2009), as células serão cultivadas em agregados (neurosferas) em tanques agitados. Serão optimizadas diversas variáveis que poderão afectar a diferenciação e a funcionalidade das células neuronais (formulação do meio de cultura, osmolaridade, pH, O₂, tensão de corte) e avaliadas novas abordagens para cultura 3D, nomeadamente modos de operação de cultura em perfusão. A performance metabólica da cultura será monitorizada pela determinação das taxas de consumo de glucose e glutamina e produção de lactato e amónia, bem como

Further information: www.itqb.unl.pt

consumo de O₂. A caracterização das neuroesferas em termos de composição celular implicará a utilização de metodologias como: microscopia de imunofluorescência, citometria de fluxo, Western Blot e RTPCR quantitativo. Numa fase final, o modelo celular 3D será transduzido com vectores CAV-2 codificando a proteína repórter GFP.

Santos SS, Leite SB, Sonnewald U, Carrondo MJ and Alves PM (2007). Stirred vessel cultures of rat brain

cells aggregates: characterization of major metabolic pathways and cell population dynamics. *J Neurosci Res* 85, 3386-3397

Serra M, Leite SB, Brito C, Costa J, Carrondo MJ and Alves PM (2007). Novel culture strategy for human stem cell proliferation and neuronal differentiation. *J Neurosci Res* 85, 3557-3566.

Serra M, Brito C, Leite SB, Gorjup E, von Briesen H, Carrondo MJ and Alves PM (2009). Stirred bioreactors for the expansion of adult pancreatic stem cells. *Ann Anat* 191, 104-115.

Storch A, Paul G, Csete M, Boehm BO, Carvey PM, Kupsch A, Schwarz J (2001). Long-term proliferation and dopaminergic differentiation of human mesencephalic neural precursor cells. *Exp Neurol*. 170, 317-25.

Wegner F, Kraft R, Busse K, Härtig W, Schaarschmidt G, Schwarz SC, Schwarz J and Hevers W (2008). Functional and molecular analysis of GABA receptors in human midbrain-derived neural progenitor cells. *J Neurochem*. 107, 1056-69.

Duração - 1 ano

Laboratory: Applied and Environmental Mycology

Supervisor: Cristina Silva Pereira (spereira@itqb.unl.pt)

Marija Petkovic (marija@itqb.unl.pt)

Area: Biotechnology/Green Chemistry

Project: Ionic liquids as potential anti bacterial agents

Ionic liquids are, by definition, salts that are liquid at, or near, room temperature, completely composed of ions.¹ They can be, by design, chemically and thermally stable, recyclable, and with tunable physical and chemical properties. Integration with their outstanding solvation ability opens doors for numerous industrial and biotechnological applications. In fact, ionic liquids toxicity to distinct organism (from bacteria and fungi to human cell lines) may suggest their exploitation as active pharmaceutical ingredients (APIs) (for e.g. see ²). Interestingly, Gram(-) and Gram(+) bacteria have different susceptibility towards these liquid salts. The latter, with a thicker peptidoglycan* layer, are more susceptible.

Our vision is to identify ionic liquids with bactericidal properties. Project execution will produce fundamental insights to their mechanism of action, especially towards Gram(+) bacteria, however very distinct sources of peptidoglycan will be covered (isolated from both G(+) and G(-) model bacteria). Very different techniques will be used, e.g. FPLC, UPLC, FTIR and microscopy.

*Bacterial peptidoglycan is formed by linear chains of two amino sugars, N-acetylglucosamine and N-acetylmuramic acid. The latter is attached to a short (4- to 5-residue) amino acid chain, normally containing D-alanine, D-glutamic acid, and mesodiaminopimelic acid. The thickness of this layer in Gram(+) and Gram(-) is 20-80 nm and 7-8 nm, respectively.

(An adequate knowledge of English is required for this project)

References:

- 1 M. Deetlefs and K. R. Seddon, *Chimica Oggi-Chemistry Today*, 2006, **24**, 16-+.
- 2 M. Petkovic, J. Ferguson, A. Bohn, J. R. Trindade, I. Martins, M. Carvalho, M. C. Leitão, C. Rodrigues, H. Garcia, R. Ferreira, K. R. Seddon, L. P. N. Rebelo and C. Silva Pereira, *Green Chem.*, 2009, DOI: 10.1039/B823225C.

Further information: www.itqb.unl.pt

Laboratory: Bacterial Cell Surfaces and Pathogenesis Laboratory

Supervisor: Sérgio Raposo Filipe (sfilipe@itqb.unl.pt)

Area: Biology (Biologia Celular e Biotecnologia, Biologia Molecular e Genética, Microbiologia Aplicada)

Project: Papel da cápsula de *Streptococcus pneumoniae* no reconhecimento do peptidoglicano pelo sistema imunitário inato do hospedeiro

Tema enquadrado no projecto “Contribuição da cápsula para a actividade inflamatória do peptidoglicano bacteriano” financiado pela Fundação para a Ciência e Tecnologia com a referência PTDC/SAU-MII/75696/2006.

Uma característica essencial aos organismos superiores, desde o mais pequenos dos insectos aos mamíferos, para a sua própria sobrevivência é a capacidade de induzir uma resposta imunitária inata quando invadidos por um microrganismo. Dos vários componentes detectados pelo hospedeiro e assim capazes de induzir uma resposta inflamatória, o peptidoglicano é a molécula comum a quase todas as bactérias.

As bactérias gram-negativas têm uma camada fina de peptidoglicano, rodeada por uma membrana exterior constituída por fosfolípidos e LPS. Por outro lado, as bactérias gram-positivas têm uma camada espessa de peptidoglicano, o componente principal da sua parede celular, ao qual se associam de um modo covalente ou não-covalente outros polissacarídeos e proteínas. Um destes polissacarídeos é a cápsula que é um factor essencial de virulência em *Streptococcus pneumoniae*. Iremos usar como modelo de estudo esta bactéria gram-positiva que está associada a uma mortalidade anual nos EUA de valor semelhante à mortalidade causada por SIDA, cancro da mama e cancro da próstata.

Resumidamente pretendemos:

- Construir mutantes de *S. pneumoniae* em genes que codificam proteínas envolvidas no metabolismo da cápsula.
- Identificar o efeito da ausência destas proteínas no processo da síntese da cápsula.
- Purificar paredes e respectivos peptidoglicanos das diferentes estirpes capsuladas de *S. pneumoniae* e respectivos mutantes.
- Analisar a afinidade para a superfície celular dos diferentes mutantes de *S. pneumoniae* de uma proteína modelo capaz de detectar peptidoglicano bacteriano, PGRP-SA, usando SDS-Page e microscopia de fluorescência.

Esperamos no fim do projecto determinar se a cápsula de pneumococos poderá interferir com a capacidade de o hospedeiro detectar o peptidoglicano bacteriano.

Duração aproximada: 1 ano lectivo

Número de alunos por projecto: Um (1)

Further information: www.itqb.unl.pt

Laboratory: Bacterial Membrane Proteomics

Supervisor: Dirk-Jan Scheffers (djscheffers@itqb.unl.pt)

Area: Microbiology/Biochemistry

Project:

Bacteria carefully regulate their shape by coordinating cell division and growth of the cell wall. These processes require the coordinated action of various proteins which are thought to be organised in large complexes. The molecular composition of these complexes however, is not known, and studies into the composition of these complexes are complicated by the fact that most of the proteins involved are embedded in the bacterial membrane.

In the Bacterial Membrane Proteomics laboratory we are interested in isolating complexes of membrane proteins involved in cell division and cell wall growth using native conditions. Additionally, we are interested in proteins that regulate formation of the cell division ring at the middle of the bacterial cell. In the master project a genetic screen will be performed to generate more insight into the interactions between cell division proteins in *Bacillus subtilis*. Cell division is one of the most important targets in the hunt for new antibiotics, and we hope to generate fundamental knowledge that will aid in this search.

Further information: www.itqb.unl.pt

Laboratory: Bioinorganic Chemistry and Peptide Design Laboratory

Supervisor: Olga Iranzo (oiranzo@itqb.unl.pt)

Area: Chemistry

For more information about specific master projects, please contact the laboratory supervisor

Further information: www.itqb.unl.pt

Laboratory: Biomolecular Diagnostics

Supervisor: Abel Oliva (oliva@itqb.unl.pt)

Area: Technology

Project 1: Estudo de eritrócitos infectados com *Babesia* em chips de microfluídica (Study of *Babesia* infected erythrocytes in microfluidic platforms)

O projecto visa a utilização de canais de microfluídica para a manipulação de eritrócitos infectados com *Babesia bovis* (cultivados *in vitro*) com o propósito de realizar ensaios com diferentes reagentes e condições, sob observação contínua em microscópio invertido, de forma a estudar o processo e evolução da infecção.

- Cultura *in vitro* de eritrócitos infectados com *Babesia bovis*
- Setup instrumental de microfluídica
- Manipulação e doseamento de amostra no chip com microcanais
- Implementação de ensaios em chips de microfluídica, com variação de parâmetros (reagentes, pH, temperatura, caudais, etc.)

Duração aproximada:

9 meses de trabalho experimental – 3 de trabalho com literatura e escrita da tese.

Número de alunos por projecto:

2 alunos

Interesse científico:

O laboratório de Diagnóstico Biomolecular do ITQB possui o conhecimento e a técnica para cultura *in vitro* da parasita bovina intra-eritrocítica *Babesia bovis*. O estudo de infecção e manipulação de eritrócitos em ambientes de microfluídica permite a realização de experimentos e observações, que são impraticáveis em macroescala. Esta tecnologia permitirá ao aluno ganhar experiência no uso de canais de microfluídica aplicado ao estudo de uma doença veterinária, com elevado interesse para a sua formação académica e laboratorial.

Further information: www.itqb.unl.pt

Laboratory: Biomolecular Diagnostics

Supervisor: Abel Oliva (oliva@itqb.unl.pt)

Ana Domingos - Unidade de Tecnologia de Proteínas e Anticorpos Monoclonais (UTPAM), IHMT-UNL

Area: Technology

Project 2: Desenvolvimento de ELISA para diagnóstico de *Babesia bovis* (Development of ELISA protocol for *Babesia bovis* diagnostic)

Plano do projecto (tema e enquadramento geral)

O trabalho está focado na detecção de anticorpos contra a parasita *Babesia bovis* em amostras de sangue, com o intuito de obter uma imunoreacção eficiente e reprodutível para uso em diagnóstico clínico. Os pontos a desenvolver no trabalho serão:

- Implementação e caracterização da imunoreacção, a partir de antigénio recombinante (RAP1) e anticorpos (policlonais e monoclonais) e anti-IgG.
- Funcionalização dos anticorpos com enzimas ou fluoróforos
- Caracterização do par anticorpo-antigénio com BIACORE (biosensor SPR)
- Teste do ELISA com amostras de campo de soros bovinos

Duração aproximada:

9 meses de trabalho experimental – 3 de trabalho de pesquisa bibliográfica e escrita da tese.

Local de Realização:

- Biomolecular Diagnostic Laboratory – ITQB-UNL Av. da Republica EAN 2780 -157 Oeiras
- Unidade de Tecnologia de Proteínas e Anticorpos Monoclonais(UTPAM) IHMT-UNL - Departamento de Biotecnologia Estrada do Paço do Lumiar, 22 1649-038 LISBOA

Número de alunos por projecto: 1

Interesse científico:

Um método de diagnóstico baseado em ELISA para o diagnóstico de uma doença endémica em Portugal é de maior importância. O teste de ELISA é uma ferramenta de diagnóstico largamente estendida em laboratórios para diagnóstico clínico. Na medida que ainda não há um perfil epidemiológico no país, é clara a utilidade de um teste com estas características. Assim, os trabalhos conducentes ao desenvolvimento de um protocolo de ELISA para diagnóstico clínico possuem elevado interesse para a formação prática e o futuro profissional do aluno de mestrado.

Further information: www.itqb.unl.pt

Laboratory: Biomolecular Diagnostics

Supervisor: Abel Oliva (oliva@itqb.unl.pt)

Area: Technology

Project 3: Imobilização de biomoléculas em guias de ondas com recurso a técnica laser, para desenvolvimento de biossensor (Immobilization of biomolecules onto optical waveguides by laser deposition techniques towards biosensor development)

Identificação do orientador:

Doutor Abel González Oliva – Biomolecular Diagnostic Laboratory – ITQB-UNL, em colaboração com a Doutora Eniko Gyorgi, do ‘Centro de Investigación en Nanociencia y Nanotecnología’ (Barcelona/Espanha)

Plano do projecto (tema e enquadramento geral)

O trabalho está focado na deposição de biomoléculas em superfícies de sílica, para utilização como suporte de um biossensor óptico. A técnica a utilizar inclui a *Matrix Assisted Pulsed Laser Evaporation* (MAPLE) aplicado sob lâminas de vidro, utilizando diferentes biomoléculas (enzimas, anticorpos, polisacáridos, proteínas antigénicas, etc). Posteriormente pretende-se realizar imobilização em “spots” sob uma guia de ondas, para aplicação como biossensor. Os trabalhos incluem:

- Realização de ensaios de MAPLE com diferentes biomoléculas e suportes.
- Utilização de técnicas de microscopia de fluorescência e de AFM para caracterização e avaliação de resultados
- Implementação de ensaios para avaliação de actividade/viabilidade das moléculas imobilizadas.
- Ensaios de imobilização com MAPLE sob guia de ondas
- Análise de resultados obtidos com recurso a leitura da mudança de parâmetros ópticos das guias (em colaboração com INESC-Porto)

Duração aproximada:

9 meses de trabalho experimental – 3 meses de trabalho com literatura e escrita da tese.

Local de Realização:

- Biomolecular Diagnostic Laboratory – ITQB-UNL Av. da Republica EAN 2780 -157 Oeiras
- Centro de Investigación en Nanociencia y Nanotecnología’ (Barcelona / Espanha)

Further information: www.itqb.unl.pt

Número de alunos por projecto: 2

Interesse científico: A técnica MAPLE é recente e oferece a possibilidade de imobilizar moléculas sob superfícies, com mínimo esforço, elevada reprodutibilidade e eficiência. Esta técnica está provada para tratamento de superfícies e aplicações inorgânicas, mas oferece também possibilidades a imobilização de biomoléculas, com o conseqüente interesse para desenvolvimento de biossensores.

Further information: www.itqb.unl.pt

Laboratory: Biomolecular NMR

Supervisor: Manolis Matzapetakis (matzman@itqb.unl.pt)

Area: Molecular Biology/ Structural Biology

In those projects students will be trained in biochemical and biophysical methods in addition to advanced NMR methods. The students will have the choice to specialize in molecular biology and heterologous protein expression or in more computationally intensive tasks, such as protein structure and dynamics determination.

Some of the scientific problems that we are working on in our lab are: the cloning of new proteins, protein biochemistry, protein structure elucidation and dynamics studies, Protein-protein interactions, Metal binding to proteins, paramagnetic NMR, study of large proteins and solid state NMR.

The projects are interdisciplinary and students from many different backgrounds can apply. Student with a strong background in chemistry, biochemistry or biophysics are welcome. The prior knowledge of NMR is not required but it is welcome.

Project 1: Structural and Biochemical characterization of novel Fe²⁺ metabolic pathways

State of the Art

Iron is an essential element since it is an integral component of many proteins and enzymes. In order to ensure its adequate supply, bacteria have devised complex and elaborate mechanisms to harvest and transport it. While a lot is known about transport of Fe³⁺ much less is known about the metabolic pathways of Iron in the ferrous state (Fe²⁺) in bacteria.

Genome analysis has revealed operons potentially related to ferrous iron transport but little is known about the structure and function of the small proteins that they encode. These proteins are thought to bind Fe²⁺ for either transport or gene regulation. Such types of iron transporters have not been adequately characterized in spite of their importance. Apart from the obvious scientific interest in such systems, it is also possible that pharmaceutical applications can be explored by targeting these metabolic pathways in pathogenic bacteria.

The goal of the project is to isolate and characterize the proteins of those operons. We will investigate Fe²⁺ binding characteristics and structurally characterize them in the apo and metallated forms. The functional characterization of the system will involve the study of the way these proteins interact with each other and with other biologically relevant Fe²⁺ binding proteins in order to understand the pathway that iron follows. A variety of methods will be

Further information: www.itqb.unl.pt

used, such as molecular biology, chromatography and spectroscopy, with NMR playing a key role in this project.

Project description

The first stage of this project is to isolate the genes that compose the *E.coli* Fe²⁺ operon using PCR. These genes will be inserted into expression plasmids for protein over-expression. The expression conditions will be optimized for rich and minimum (defined) media that is suitable for isotopic labelling of the proteins. The proteins will then be purified and biochemically characterized. Their folding, stability and biophysical properties will be determined using spectroscopy and denaturation titrations. The binding of various metals will then be investigated to determine their binding affinity.

Spectroscopy and pH titrations will help define the metal binding site in the protein. These titrations will also be monitored by NMR and site directed mutagenesis will be used to investigate the effect of certain residues in the metal binding.

Isotopically labeled proteins (¹³C ¹⁵N) will be used for structural studies by NMR employing multidimensional heteronuclear experiments for resonance assignment. Structures will be calculated using distance restraints and residual dipolar couplings. The interaction of proteins will mainly be studied by simple NMR monitored titrations.

Techniques

During this project students will be trained in the use of basic molecular biology techniques such as PCR and DNA gel electrophoresis. They will extensively use bioinformatics tools for sequence alignment and prediction of protein properties. During protein purification, they will use various electrophoretic (SDS- and native PAGE) and chromatographic techniques (FPLC, HPLC). During protein characterization the students will gain experience in various spectroscopic techniques such as UV-visible, CD and NMR. Interested students will have the opportunity to have in-depth trained in biomolecular NMR for the structural characterization of the proteins. They will learn how to setup modern NMR experiments at the 800 MHz NMR of ITQB and travel to European facilities to perform additional experiments. During the analysis of the data they will be trained in the most modern computational methods used in NMR analysis.

Project 2: Structural proteomics of thermostable protein libraries by NMR

State of the Art

Proteins are adapted to function at specific conditions and their stability is related to those environmental conditions they are expected to face. Outside those limits, due to stress or because of mutations, proteins tend to lose their original structure, often irreversibly. The understanding of the factors that make proteins more or less stable is crucial for medicinal but also industrial purposes. One way to learn more about protein stability is to study proteins from hyper-thermophilic organisms. These organisms are known to live at extreme temperatures reaching 95 °C.

In the framework of collaboration with the Protein Biochemistry, Folding and Stability Laboratory at ITQB we will perform a proteomic based study of such hyper-stable proteins. Recent protein screening methods have identified large numbers of previously unknown proteins that are overexpressed during thermal stress. We will over-express, isolate and characterize these proteins with a variety of methods such as UV, CD, fluorescence and NMR. Then we will structurally characterize them using NMR. The structure, stability relationship will be analyzed to gain insight into the factors that make these proteins so stable.

Project description

The goal of the student in this project will be to identify, express and structurally characterize these proteins by NMR and biophysical methods.

During this project we will have a secondary goal of implementing efficient manual and automated protocols for structure elucidation using NMR that will pave the way for a larger scale proteomics and functional proteomics initiative.

Techniques

The plasmids for the first set of proteins are available. The proteins will be overexpressed in *E.coli* and the protocols will be optimized for expression in rich and minimum media. They will also extensively use bioinformatics tools for sequence alignment and prediction of protein properties. During protein purification, they will use various electrophoretic (SDS- and native PAGE) and chromatographic techniques (FPLC, HPLC). During protein characterization the students will gain experience in various spectroscopic techniques such as UV, CD and NMR. Interested students will have the opportunity to have in-depth training in biomolecular NMR for the structural characterization of the proteins. They will learn how to setup modern NMR experiments at the 800 MHz NMR of ITQB and travel to European facilities to perform additional experiments. During the analysis of the data they will be trained in the most modern computational methods used in NMR analysis.

Laboratory: Bioorganic Chemistry

Supervisor: Rita Ventura Lima (rventura@itqb.unl.pt)

Area: Chemistry

Project 1: Síntese de derivados do ácido tartárico para a elaboração de novos organocatalisadores

O trabalho consiste na síntese de alguns intermediários derivados do ácido tartárico para a preparação de uma nova classe de catalisadores: os organocatalisadores. Estes novos organocatalisadores serão testados em vários tipos de reacções.

Project 2: Síntese de derivados de açúcares para estudos de estabilização de proteínas

O trabalho consiste na preparação de alguns açúcares derivados da manose, glucose e galactose para estudos bioquímicos de estabilização de proteínas. Diferentes tipos de glicosilação envolvendo diversos dadores glicosídicos/condições de reacção serão estudados de modo a otimizar a selectividade anomérica para cada açúcar.

Further information: www.itqb.unl.pt

Laboratory: Cell Signaling in Drosophila Laboratory

Supervisor: Pedro Domingos (domingp@itqb.unl.pt)

Area: Genetics/Molecular Biology

For more information about specific master projects, please contact the laboratory supervisor

Further information: www.itqb.unl.pt

Laboratory: Coordination and Supramolecular Chemistry

Supervisor: Rita Delgado (delgado@itqb.unl.pt)

Area: Chemistry

For more information about specific master projects, please contact the laboratory supervisor

Further information: www.itqb.unl.pt

Laboratory: Disease and Stress Biology

Supervisor: Ricardo B. Ferreira (rbferreira@itqb.unl.pt)

Area: Plant Biology

For more information about specific master projects, please contact the laboratory supervisor

Further information: www.itqb.unl.pt

Laboratory: Forest Biotech

Supervisor: Célia Miguel (cmiguel@itqb.unl.pt)

Area: Molecular Biology and Plant Biotechnology

Duas candidaturas a estágios de Mestrado em *Biologia Celular e Biotecnologia*. Pretendem-se candidatos com uma forte motivação e interesse em Investigação nas áreas de Biologia Molecular e Biotecnologia em Plantas. Os Projectos de Mestrado (ver em baixo) terão a duração máxima de um ano. Os candidatos deverão enviar uma carta de apresentação, acompanhada de Cv, do qual deverão constar grau académico, classificação final e ano de conclusão, classificação em disciplinas pertinentes à área de candidatura, bem como quaisquer outros elementos que o candidato julgue valorizar a sua candidatura. Deverá acompanhar a candidatura 1 carta de recomendação. Dá-se preferência a alunos com média igual ou superior a 15 valores, bons conhecimentos de inglês e com interesse em prosseguir para doutoramento.

Duração e carga horária - 6 meses a 1 ano, 35 horas semanais

Project 1: Molecular Analysis of Class III HD-Zip transcription factors and role in plant vascular development

In eukaryotes, transcription of protein-coding genes is controlled by complex networks of transcription factors. In *Arabidopsis* model plant, the transcription factors family Class III homeodomain-leucine zipper (HD-Zip III) genes have been reported to regulate vascular development. In trees, the role of these transcription factors is still largely unknown. The aim of this project is to functionally characterize the provascular and vascular organization in the woody poplar plants by

the use of fluorescent markers. We propose as part of the project the cloning of poplar HD-Zip III orthologs genes and the heterologous expression in *Arabidopsis* will also be pursued. The transcriptional regulation of vascular development in plants is a competitive area of study, and we aim to contribute to the molecular understanding of the plant vascular patterning, development and wood formation processes. The experimental work will involve:

- *In vitro* and greenhouse growth of poplar and *Arabidopsis* plants;
- Molecular cloning of HD-Zip III genes;
- Over-expression and silencing of HD-Zip III genes in poplar and *Arabidopsis* plants;
- Confocal microscopy for analysis of vascular development

Project 2: Functional studies of genes involved in maritime pine embryogenesis

Most studies of plant embryogenesis have been conducted in angiosperms like the model plant *Arabidopsis* (Willemsen e Scheres 2004, *Annu Rev Genet* 38:587–614). Despite the similarities in the embryogenesis of angiosperms and gymnosperms, the evolutionary divergence resulted in unique characteristics in the development of the embryo in both groups of plants. However, comparative molecular studies of embryo development in angiosperms and gymnosperms are still scarce (Cairney et al. 2006, *Plant Mol Biol* 62:485-501). In this project, the previously initiated functional characterization of genes involved in the embryogenesis of the gymnosperm species *Pinus pinaster* will be continued using somatic embryogenesis as an experimental system. The experimental work will involve:

- Preparation of constructs for modulation of gene expression in somatic embryos;
- Genetic transformation of embryogenic cultures;
- Phenotype characterization and molecular analyses of transformants

Further information: www.itqb.unl.pt

Laboratory: Glicobiology

Supervisor: Julia Costa (jcosta@itqb.unl.pt)

Area: Biology

Modelos celulares de doenças neurodegenerativas, em particular, esclerose lateral amiotrófica

A Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA) é uma doença neurodegenerativa grave caracterizada pela perda progressiva de neurónios motores do córtex motor, tronco cerebral e medula espinal. Em 90-95% dos pacientes não existe uma base genética para a doença (ELA esporádica), mas em 5-10% dos casos é dominante (ELA familiar). Em 20% dos casos familiares observam-se mutações no enzima superóxido dismutase 1 de cobre, zinco (SOD1). A nível do neurónio motor foi observada em ELA agregação de proteínas, disfunção do proteassoma, activação das caspases 1 e 3, fragmentação do Golgi entre outras características. Em ELA familiar foi observada a agregação de SOD1 mutante e mais recentemente, em ELA esporádica, agregação de TDP-43. Em linhas celulares modelo da doença, observou-se também a presença de SOD1 mutante em vesículas de secreção denominadas exossomas, o que poderá ser responsável pela transmissão de patogenicidade.

Further information: www.itqb.unl.pt

Laboratory: Homogeneous Catalysis

Supervisor: Beatriz Royo (broyo@itqb.unl.pt)

Area: Organometallic Chemistry

Project: Functionalized *N*-Heterocyclic Carbene Complexes in Asymmetric Catalysis

Organometallic chemistry lies at the interface of organic and inorganic chemistry and many of these complexes have been used as synthetic tools in organic synthesis. Work in the Homogeneous Catalysis Lab is directed at developing novel catalysts to enable clean and selective transformations and achieving efficient synthesis of novel bioactive molecules for application as drugs and agrochemicals.

This research project will be focussed on the development of novel, chiral functionalized *N*-heterocyclic carbenes (NHCs). In the last few years NHCs have begun to play an increasingly prominent role as ligands in many catalyzed processes. However, the use of chiral NHCs as ligands for asymmetric metal-mediated processes is still in its infancy. Recently, we have synthesized the first chiral cyclopentadienylfunctionalized NHC ligand (Cp-NHC) and we have studied its coordination to Iridium and Molybdenum (part of this work has been published in *Organometallics*, 2008, 27, 1305; *Dalton Trans.* 2009, in press). We are now extending our studies in preparing novel metal complexes containing this new ligand and evaluating their potential in asymmetric processes.

Students will have the opportunity to learn to perform synthesis of some organic and organometallic compounds (using Schlenk techniques, vacuum lines and dry-box), to characterize new complexes by using different techniques (*eg.* NMR spectroscopy, IR, elemental analysis, mass spectrometry) and to perform catalytic experiments (catalytic runs will be monitored by chromatography, using a GC Trace 200 Series). This project is funded by FCT through project PTDC/QUI/64458/2006.

Further information: www.itqb.unl.pt

Laboratory: Infection Biology

Supervisor: Luis Jaime Mota (jmota@itqb.unl.pt)

Area: Biology

Project: Identification of type III secretion effectors of *Chlamydia trachomatis*

Chlamydiae are a large group of obligate intracellular bacteria that cause a wide range of diseases in both animals and humans. Of particular concern, infections with *Chlamydia trachomatis* are the most prevalent cause of preventable infectious blindness in developing countries and the major bacterial cause of sexually transmitted infections worldwide. There is no established method to genetically manipulate chlamydiae and, therefore, the knowledge of the mechanisms used by these bacteria to thwart host cells is poor. However, all chlamydiae express an active type III secretion system (T3SS) throughout the infectious cycle. T3SS are used by many bacterial pathogens to manipulate eukaryotic host cells by translocating effector proteins into the host cell cytoplasm. The identity of the complete set of chlamydial T3S effectors is elusive but studies using other bacteria as surrogate hosts suggest that *C. trachomatis* might encode for over 70 effectors. We are currently developing *Yersinia enterocolitica* as a surrogate host to specifically and reliably identify chlamydial T3S effectors. The aim of this project is to identify new T3S effectors of *C. trachomatis*. About 20 putative effectors will be expressed as appropriate hybrid proteins in *Y. enterocolitica* and their capacity to engage on the T3S pathway will be analysed. The candidate T3S effectors identified will be expressed as His-tagged or GST-tagged proteins in *Escherichia coli* and the more relevant one(s) will be purified by affinity chromatography. The purified protein(s) will be used to raise antibodies. These antibodies will allow testing the subcellular localisation of the candidate effector(s) in human epithelial HeLa cells infected with *C. trachomatis*. In parallel, candidate T3S effectors will be ectopically expressed in mammalian cells and their subcellular localisation and possible phenotype will be analysed. Technically, this will involve PCR, DNA cloning into plasmid vectors, SDS-PAGE, immunoblotting, protein expression and purification, mammalian cell culture, DNA transfection of mammalian cells, and immunofluorescence microscopy.

Further information: www.itqb.unl.pt

Laboratory: Inorganic Biochemistry and NMR

Supervisor: Ricardo Louro (louro@itqb.unl.pt)

Area: Biochemistry

For more information about specific master projects, please contact the laboratory supervisor

Further information: www.itqb.unl.pt

Laboratory: Macromolecular Crystallography Unit

Supervisor: Célia V. Romão (cmromao@itqb.unl.pt)

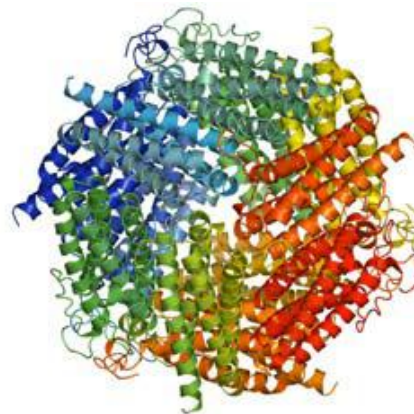
Area: Biochemistry

Project

A Master project is proposed to carry out structural studies of an important biological system that is involved in the protection of DNA against stress conditions (e.g. radiation and oxidative damage). The protein concerned is called Dps. This family of proteins is widespread amongst bacteria and archaea and is considered to be functionally close to the human ferritin analogues in terms of the iron-storage capacity; the mechanisms by which the protein interacts with the DNA are not known, it is being proposed that these type of proteins can have a chromatin-type function in prokaryotes.

The work proposed will be focused on the structural determination of both Dps in different conditions: metals, DNA, and from several mutants which will be produced à priori. The results will provide new insights for an understanding of the mechanisms by which the DNA is protected.

Deinococcus radiodurans (*Dr*) is an aerobic bacterium extremely resistant to ionizing radiation, desiccation, as well as to several other stress conditions. There are two Dps (prokaryotic DNA-binding proteins from starved cells present in this organism: DR2263 (Dps1) and DRB0092 (Dps2). These two proteins are unique as the only examples of Dps known to date with particularly long N-terminal extensions compared to the other family members. Dps can store iron and bind DNA to protect it from oxidative stress. Structural and biochemical characterization of these features are important to understand the highly effective mechanisms that allow *Dr* to recover from remarkably high levels of cellular damage under the various stress conditions. We have already determined the high-resolution X-ray crystal structures of the two Dps in two different stages of their activity: the apo and one iron-bound form. Both proteins share the same overall structure with other members of the family: a hollow sphere (which stores variable amounts of iron) composed of 12 identical subunits (each a four-helix bundle) (Figure). However, in both forms for the two proteins the electron density for the N-terminal extension of each subunit could not be located, probably due to degradation and the inherent disorder and flexibility of these extensions.



Dps2 overall structure determined by X-ray crystallography.

Further information: www.itqb.unl.pt

Laboratory: Metalloproteins and Bioenergetics Laboratory

Supervisor: Miguel S. Teixeira (miguel@itqb.unl.pt)

Area: Biochemistry

For more information about specific master projects, please contact the laboratory supervisor

Further information: www.itqb.unl.pt

Laboratory: Microbial & Enzyme Technology

Supervisor: Ligia O. Martins (lmartins@itqb.unl.pt)

Area: Biotechnology/Enzyme Engineering

Project: Turning an Hyperthermophilic Metallo-oxidase into a Laccase by Directed Evolution

This proposal focuses on research involving bacterial multicopper oxidases as a tool for biotechnology. These are copper-containing enzymes that oxidize a wide range of substrates including polyphenols and are considered useful biocatalysts for diverse biotechnological applications (Pereira et al. 2009). Nowadays, enzymes have found many applications in the industrial, analytical, environmental and biomedical sectors. However, catalysts which are stable to high temperatures, can function in diverse solvents, tolerate wider ranges of pH, catalyse reactions not encountered in nature, are still scarce. Directed evolution has developed quickly to become a method of choice for protein engineers in order to generate enzymes having desired properties. Multicopper oxidase from *Aquifex* (McoA) is a remarkable hyperthermostable copper-activated metallo-oxidase with low efficiency towards aromatics oxidation (Fernandes et al. 2007, 2009). The goal is to change the substrate specificity of McoA from metals to bulky aromatic (poly) phenols and amines, through directed evolution (Brissos et al. 2009).

Research strategies will cover: a) Construction of libraries of McoA mutants by combinatorial techniques, b) High-throughput robotic screening towards target substrates, c) Expression, production and purification of the best mutants and d) Biochemical and stability characterisation of mutants.

Brissos, V, Pereira, L, Munteanu, F-D, Cavaco-Paulo, A, Martins, LO. 2009. Expression system of CotA-laccase for directed evolution and high-throughput screenings for the oxidation of high-redox potential dyes. *Biotechnol. J* 4:558-563

Fernandes, AF, Soares, CM, Pereira, MM, Huber, R, Grass, G, Martins, LO. 2007. A robust metallo-oxidase from the hyperthermophilic bacterium *Aquifex aeolicus*. *FEBS J.* 274: 2683-94

Fernandes, AF, Martins, LO, Melo, EP. 2009. The hyperthermophilic nature of the metallo-oxidase from *Aquifex aeolicus*. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1794: 75-83

Pereira, L, Coelho, AV, Viegas, CA, Correia dos Santos, MM, Robalo, MP, Martins, LO. 2009. Enzymatic biotransformation of the azo dye sudan orange G with bacterial CotA-laccase. *J Biotechnology.* 139: 68-77.

Further information: www.itqb.unl.pt

Laboratory: Microbial Biochemistry

Supervisor: Inês Cardoso Pereira (ipereira@itqb.unl.pt)

Area: Microbiology/Biochemistry

Project: Biological Hydrogen Production by Anaerobic Bacteria

Hydrogen is a promising energy resource/energy carrier as future alternative to fossil fuels. Nowadays, hydrogen is mainly produced from carbon-containing non-renewable sources, in processes that are not sustainable or environmentally friendly. Thus, development of a sustainable hydrogen production system is of the utmost importance. Biological production of hydrogen is a very interesting alternative as it requires a very low energy input and is sustainable if using waste or renewable substrates. In this project we propose to study an anaerobic sulfate-reducing bacterium, *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough, as an alternative hydrogen producer under fermentative conditions, to replace methanogenic organisms in the second step of anaerobic digestion processes.

Sulfate-reducing bacteria are notorious for expressing very high levels of hydrogenases (Hases), the enzymes responsible for hydrogen production and/or consumption. The genome of *D. vulgaris* has been

sequenced and encodes for six different Hases. Some of these are hydrogen-producing and others are hydrogen-consuming. The project will comprise the study of conditions to optimize the hydrogen producing ability of *D. vulgaris* wild type as well as single and double deletion mutants of the hydrogenconsuming Hases. This work will develop expertises in several areas such as: Microbial Technology, Microbiology, Biochemistry, Bioinformatic analysis and others.

Laboratory: Microbial Development Laboratory

Supervisor: Adriano Henriques (aoh@itqb.unl.pt)

Area: Microbiology

Project 2: Coupling between gene expression and morphogenesis during development in a model bacterium

Gene expression during spore differentiation in the model organism *Bacillus subtilis*, a rod-shaped gram-positive bacterium, is controlled by a cascade of cell typespecific transcription factors. Their activation responds to morphological cues that signal the completion of key intermediate structures in the process. The Project proposed relates to the activation of the late forespore factor, called σ_G . Activation of σ_G is somehow coupled to the completion of the engulfment process, but also requires a signal emanating from the mother cell. Transmission of this signal involves a novel type of synapse-like signaling complex that spans the space between the two cells and allows for direct communication between them.

Project 3: Identification of probiosis genes

Spores of several aerobic and anaerobic spore-forming bacteria of the genus *Bacillus* and *Clostridium* are found in the gastro-intestinal tract of several animals, including humans. Genome sequencing of a gut strain of *Bacillus subtilis* and its comparison to the genome of a standard laboratory strain, suggests a set of well defined adaptations to the gut ecosystem. The Project deals with testing whether certain genes or operons specifically found in the gut strain are important for colonization in animal models. The Project also involves the use of IVET (in vivo expression technology) approaches to find genes induced in vivo, that may be important for probiosis.

Further information: www.itqb.unl.pt

Laboratory: Molecular Genetics of Microbial Resistance Laboratory

Supervisor: Ligia M. Saraiva (lsta@itqb.unl.pt)

Area: Molecular Biology

Project: Study of pathogen resistance to antimicrobial action of the human immune system

Plano do projecto - Pathogenic microbes are able to resist host defences, in particular, the antimicrobial actions of reactive oxygen and nitrogen species generated by the human immune system. This project aims to elucidate and study the gene involved in the resistance of pathogens with impact in human health.

Duração aproximada: 8 meses a 1 ano

Número de alunos por projecto: 2

Further information: www.itqb.unl.pt

Laboratory: Molecular Interactions and NMR

Supervisor: Patrick Groves (@itqb.unl.pt)

Area: Biochemistry

The group's main focus is on method development for structural and systems biology, with a personal interest in calcium-binding, EF-hand proteins. We have a number of topics on offer and can adapt them towards BII/Masters students.

A) Analysis of protein-ligand interactions by NMR spectroscopy

We offer training in NMR methods, in particular Diffusion NMR and Saturation Transfer Difference spectroscopy –commonly used by the pharmaceutical industry for drug discovery and design. The projects will involve the preparation of suitable NMR samples, acquisition of data, processing and analysis of data. The project can be expanded backwards to involve protein expression and purification as part of the sample preparation and forwards to molecular modeling of the NMR data. Suitable for anyone with a chemistry / biology / physics background, with P.Groves.

1. M. Politi, J. Alvaro-Blanco, P. Groves, A. Prieto, J.A. Leal, F.J. Cañada and J. Jiménez-Barbero "Screening garlic water extract for binding activity with Cholera Toxin B pentamer by NMR. An old remedy giving a new surprise", *Eur. J. Org. Chem.*, 2006, 2067-73.
2. A. Bastida, A. Hidalgo, J.L. Chiara, M. Torrado, F. Corzana, J.M. Cañadillas, P. Groves, E. Garcia-Junceda, J. Jimenez-Barbero and J.L. Asensio "Exploring the use of conformationally locked amino-glycosides as a new strategy to overcome bacterial resistance", *J. Am. Chem. Soc.*, 2006, 126, 100-16.
3. F. Chevalier, J. Lopez-Prados, P. Groves, S. Perez, M. Martín-Lomas and P.M. Nieto "Structure and dynamics of the conserved protein GPI anchor core inserted into detergent micelles", *Glycobiol.*, 2006, 16, 969-980.

B) New methods for the analysis of protein-ligand interactions by NMR spectroscopy

Although we have many established NMR protocols suitable for the project described above, we still need to develop new tools to solve some of the problems brought to us. Examples of new and modified protocols are given in [4-6]. Future challenges include the use of DNA or in situ membrane proteins present in live mammalian cells as target molecules in STD experiments, as well as the application of the methods in [4] to investigate protein-protein interactions. The student will first work on a short project using established methods before starting to develop new methodology. Apart from preparing samples, this will essentially be a dry lab project requiring computer skills. Suitable for anyone with a physics / chemistry background with P. Groves.

4. K.E. Kövér, P. Groves, J. Jiménez-Barbero and G. Batta "Molecular recognition and screening using STD NMR: 15N-group selective STD NMR experiment to study intermolecular interactions in heavily overlapped spectra", *J. Am. Chem. Soc.*, 2007, 129, 11579-82.
5. P. Groves, K.E. Kövér, S. André, J. Bandorowicz-Pikula, G. Batta, M. Bruix, R. Buchet, A. Canales, F.J. Cañada, H-J. Gabius, D.V. Laurents, J.R. Naranjo, M. Palczewska, S. Pikula, E. Rial, A. Strzelecka-Kiliszek, and J. Jiménez-Barbero "Effect of temperature in Saturation Transfer Difference NMR experiments", *Magn. Reson. Chem.*, 2007, 45, 745-8.
6. K. Fehér, P. Groves, G. Batta, J. Jiménez Barbero, C. Muhle-Goll, K.E. Kövér "Application of isotope edited and filtered STD NMR experiments for ligands with overlapping signals", *J. Am. Chem. Soc.*, 2008, 130, 17148-53.

Further information: www.itqb.unl.pt

C) Determining the pH structural switch in calbindin D28k

Closely related calretinin and calbindin D28k are neuronal proteins that offer protection against intracellular calcium insults. We believe these proteins also contain a pH switch that turns them into dual sensors, only becoming activated in the presence of elevated concentrations of both calcium and protons. We will express and purify a small, 87 residue calbindin domain to prove this by solving NMR structures at low and high pH. We will use standard NMR methods to collect, assign and model the structures. We will also use advanced NMR methods to collect complementary data to improve the structures. This longer project first needs the expression / purification system to be established (cloning, electrophoresis, chromatography) before biochemical characterization can take place (calcium-binding measurements, 1D NMR, fluorescence and UV). Suitable for someone with a biology/biochemical background with M. Palczewska (and P. Groves). The follow-up structural project will be carried out with P. Groves.

7. M. Palczewska, G. Batta, P. Groves, S. Linse, and J. Kuźnicki "Localization of the Ca(2+)- and H(+)-dependent hydrophobic properties of calretinin", *Protein Sci.*, 2005, 14, 1879-87.

D) Characterization of a new EF-hand protein from *Medicago truncatula*

The lab of Prof. Julie Cullimore (INRA, Toulouse) has discovered a new EF-hand protein related to the signaling pathway between symbiotic rhizobia and legumes, leading to nitrogen fixation. Our task is to express and purify this protein, its deletion mutants and to characterize the interaction of these proteins with a peptide derived from the interacting protein by spectroscopic and biochemical methods. This longer project first needs the expression / purification system to be established (cloning, electrophoresis, chromatography) before biochemical characterization (fluorescence, circular dichroism, nmr spectroscopy). Suitable for someone with a biology/biochemical background with M. Palczewska and P. Groves.

References 7, 1, 4, 5 and:

8. M. Palczewska, P. Groves, A. Ambrus, A. Kaleta, K. E. Kövér, G. Batta and J. Kuźnicki "Structural and biochemical characterization of neuronal calretinin domain I-II (residues 1-100); comparison to homologous calbindin D_{28k} domain I-II (residues 1-93)", *Eur. J. Biochem.*, 2001, 268, 6229-6237.

E) Yeast two-hybrid at low pH

Yeast two-hybrid techniques are at the forefront of systems biology efforts to define protein-protein interactors. A recent paper describes the conditions where the intracellular pH of yeast can be lowered from pH 7.4 to pH 6.8. In principal, these conditions allow us to screen for protein-protein interactions at low pH. In this project, we will set up a defined library to compare protein-protein interactions at the two different pH. The library will include neuronal calbindin D28k and three known binding partners. We expect at least one of them will only interact at low pH. A second test system from Dr D.J. Scheffers' lab will test the reverse, i.e. an interaction at pH 7.4 that will be absent at pH 6.8. Suitable for someone with a biological background with M. Palczewska.

Further information: www.itqb.unl.pt

F) Functional foods against cholera toxin

The effect of cholera toxin can be blocked by plants extracts. We will express and purify cholera toxin B and test several plant extracts by fluorescent and NMR methods. Suitable for someone with a biology / chemistry background with M. Palczewska and P. Groves.

Reference 1

Further information: www.itqb.unl.pt

Laboratory: Nutraceuticals and Delivery

Supervisor: Catarina Duarte (cduarte@itqb.unl.pt)

Area: Chemical Engineering

Project:

Exploring the potentiality of combining environment-benign ionic liquids and supercritical CO₂ for the selective extraction of bioactive compounds from natural matrices

The search for green solvents and processes especially for applications related with products for human consumption is a major challenge concerning chemists and engineers all over the world. Ionic liquids and supercritical CO₂ are two classes of fascinating, environment-benign solvents with unique properties that are attracting a lot of interest within a large variety of applications in all areas of the chemical industries.

Ionic liquids are liquid salts made up of two components (the anion and cation) which can be varied, allowing the solvents to be designed with a particular set of properties.

One of the problems in using ionic liquids as a solvent in an extraction process is that it is often difficult to separate the products from the solvent. In this work, the possibility of performing a primary extraction with ionic liquids to recover natural bioactive compounds from solid matrices, followed by a second step separation of the products with supercritical CO₂, will be explored.

Preparation of cellular -active delivery systems using supercritical CO₂ technology The cell membrane is a major barrier for drug transport into cells. Passage of molecules across this barrier is highly regulated and highly restricted, with particle size and carrier selection comprising the most important issues to address. In this project supercritical CO₂ technology will be explored in order to prepare nanoparticle-based drug delivery systems using cellular penetrating carriers like peptides. Supercritical CO₂ technology allows the production of particles with controllable morphology, narrow size distribution, and low static charge and is making in-roads in the formulation of particulate drug delivery systems, such as microparticles and nanoparticles, liposomes, and inclusion complexes, which control drug delivery and/or enhance the drug stability.

The possibility of preparing drug delivery systems with enhanced cellular up-take using supercritical CO₂ technology will be investigated.

Laboratory: Organic Synthesis Laboratory

Supervisor: Chris Maycock

Area: Chemistry

Projecto

Uma das vertentes de investigação desenvolvida no Laboratório de Síntese Orgânica no ITQB visa a síntese de compostos naturais e não naturais, com interesse biológico. As vias sintéticas exploradas visam a obtenção de compostos opticamente activos, na forma isomericamente pura. Pretendemos desenvolver estratégias de síntese estereosselectiva de pequenas moléculas, relativamente complexas. Alguns destes projectos são interdisciplinares, envolvendo vários grupos de investigação, no ITQB. Estamos também interessados na síntese de moléculas com impedimento geométrico que seja conducente a propriedades químicas e ópticas específicas.

Também pretendemos desenvolver a síntese de nanopartículas funcionalizadas e biocompatíveis. Nanopartículas fluorescentes podem ser obtidas numa forma hidrofílica com grupos funcionais simples ligados, mas possuindo uma dimensão que lhes permita entrar nas células de sistemas biológicos. Por outro lado, é possível ligar anticorpos que vão permitir estabelecer ligações específicas dentro das células. Através de microscopia fluorescente é possível vêr estas partículas e obter a respectiva imagem. Outras nanopartículas, tais como, de ouro ou magnéticas são também interessantes, as quais apresentam potenciais aplicações em biologia e em química.

Short description of projects for BII and Masters

The organic synthesis laboratory is involved in the synthesis of natural and unnatural compounds of biological interest. These synthesis are directed toward the formation of optically active compounds in isomerically pure form. We develop strategies for the stereoselective synthesis of small relatively complex molecules. Some of these projects involve other groups within the ITQB. We are also interested in geometrically constrained molecules which could have specific chemical or optical properties.

Also we are involved in the synthesis of functionalised biocompatible nanoparticles. Fluorescent nanoparticles can be prepared in a hydrophilic form with simple groups attached which are of such dimensions that they are able to enter the cells of biological entities. They can also be attached to antibodies which makes them attach to specific species within these cells. Using fluorescence microscopy we can see these particles and create an image. Other nanoparticles such as gold or magnetic (ferrite) ones are also of interest and have many potential applications in biology and chemistry.

Further information: www.itqb.unl.pt

Laboratory: Physiology of Environmentally Conditioned Microbiota

Supervisor: Vitória S. Romão (vsr@itqb.unl.pt)

Area: Microbiology

Projecto 1: Purificação e caracterização de celulasas de *Crysonilia sitophila* (co-supervisor Isabel Bento)

Foi isolado o fungo *Crysonilia sitophila* como dominante ao longo do processo fabril de rolhas de cortiça, (Danesh *et al.*, J. Appl. Microbiology, 82: 689-694, 1997).

A cortiça é um ambiente aparentemente hostil ao desenvolvimento microbiano. A actividade de água é baixa e os nutrientes não estão numa forma facilmente assimilável. Muitos fungos são microaerofílicos e possuem o equipamento enzimático que lhes permite catabolizar material vegetal, predominantemente celulose, hemicelulose e também lenhina.

A elucidação dos mecanismos de decomposição da celulose tem incidido sobre estudos com *Trichoderma*, *Sporotrichum*, *Aspergillus*, *Penicillium*. O sistema celulase mais intensivamente estudado é o produzido por *Trichoderma viride*. Trata-se de um sistema complexo formado por três actividades enzimáticas diferentes: exo e endoglucanase e 1,4- β -glucosidase (Fungal Physiology, David Griffin, 1994, Wiley-Liss, NY). A actividade celulolítica envolve 3 enzimas: β -glucosidase, exo e endoglucanase. Estas enzimas foram já estudadas em outros sistemas. Pretende-se verificar qual a composição do complexo enzimático envolvido no metabolismo de hidratos de carbono por *C. sitophila*.

Em trabalho anterior verificou-se que as enzimas endoglucanase e β -glucosidase *de C. sitophila* apresentam um máximo de actividade após cerca de 50 horas de crescimento, propõe-se:

- realizar crescimentos em meio líquido em grande escala, interrompendo-se o crescimento às 50 horas, utilizando-se estes extractos enzimáticos para concentração e purificação.
- concentrar os extractos utilizando membranas adequadas para sistemas de ultrafiltração

Further information: www.itqb.unl.pt

- Para purificação utilizar dois tipos de cromatografia líquido-líquido: filtração gel e troca iónica.
- Optimização de métodos para detectar actividade endoglucanásica e β -glucosidásica ao longo do processo de purificação.

Após separação e purificação das enzimas deverá proceder-se à sua sequenciação e cristalização.

Projecto 2: Selecção e identificação de fungos isolados em diferentes pontos de recolha de águas não tratadas

A presença de fungos em ambientes aquáticos tem sido relativamente pouco estudada. A equipa do IBET, integrada num projecto mais amplo de estudo de tratamentos para água potável, isolou recentemente uma colecção importante de fungos em diferentes pontos de recolha de águas não tratadas, tendo identificado alguns deles. Alguns dos fungos isolados foram identificados como pertencendo aos Géneros *Aspergillus*, *Alternaria*, *Botrytis*, *Cladosporium*, *Cosmospora*, *Eurotium*, *Fusarium*, *Kloeckera*, *Mucor*, *Paraconiothyrium*, *Penicillium*, *Phoma*, *Pichia* e *Trichoderma*.

Neste projecto pretende-se caracterizar os restantes isolados com a finalidade de seleccionar os mais representativos para subseqüentes estudos em termos das suas potencialidades benéficas (degradação de xenobióticos) ou desfavoráveis (produção de micotoxinas em meio aquático).

Plano de trabalho

‘Scening’ inicial dos isolados

- Agrupamento dos diferentes isolados ao nível do Género por técnicas de caracterização morfológica e somática das respectivas estruturas reprodutoras. Os resultados obtidos serão analisados usando o *software* Bionumerics (Applied Maths) com o objectivo de construir uma base de dados que permita a construção de dendrogramas para cada um dos géneros identificados.
- Após esta primeira fase, agrupamento dos fungos seleccionados baseado na semelhança genómica por ‘fingerprinting’ ao nível de DNA
- Identificação ao nível da espécie de alguns isolados considerados representativos na selecção anterior por sequenciação da região 18S e ou total ITS (ITS1+5.8S rDNA+ITS2) do respectivo rDNA

Serão usados *pimers* como a ‘core’ sequencia do fago M13, sequências (GACA)₄, (GTG)₅ ou (GAC)₄, e outros descritos como apropriados para a identificação de isolados de *Penicillium*, *Phoma* e *Aspergillus*. As sequências a obter serão comparadas com bases de dados públicas usando o *software* apropriado.

Laboratory: Plant Genetic Engineering

Supervisor: Nelson Saibo (saibo@itqb.unl.pt)

Area: Plant Biology

Project 1: Identificação e Caracterização de Factores de Transcrição que regulam a Expressão do Gene *NHX1* em Arroz

O desenvolvimento e produtividade das plantas são fortemente afectados pela elevada salinidade. De modo a garantir a sobrevivência nestes ambientes adversos, as plantas evoluíram no sentido de adoptarem uma série de mecanismos de protecção. A resposta e adaptação das plantas à salinidade consiste numa série de alterações nos seus processos fisiológicos, bioquímicos, celulares e moleculares. Nestas condições, a expressão de muitos genes é alterada, sendo esta alteração regulada através de factores de transcrição (FT). Um bom exemplo é o gene *NHX1*. Este gene codifica para uma bomba Na^+/H^+ e a sua expressão é altamente induzida por níveis elevados de NaCl. O estudo da regulação transcricional dos genes que respondem à elevada salinidade, nomeadamente do gene *NHX1*, irá contribuir para a compreensão das vias reguladoras, que controlam a expressão dos genes de resposta à salinidade em particular e aos stresses abióticos em geral.

O principal objectivo deste projecto é a identificação e caracterização funcional de novos FT que regulam a expressão do gene *NHX1* de arroz.

Tarefas:

A identificação dos factores de transcrição que regulam o gene *OsNHX1* vai ser realizada utilizando a técnica de Yeast One Hybrid (Y1H). Neste sentido já foram construídas 4 estirpes de levedura ("bait strains") com fragmentos (~500 pb cada) do promotor do gene *OsNHX1*. Estas estirpes, em conjunto com uma biblioteca de expressão de cDNA de arroz induzido pela elevada salinidade (construída no nosso laboratório), serão utilizadas para a técnica de Y1H.

1- Identificação dos factores de transcrição que regulam a expressão do *OsNHX1*

Cada estirpe de levedura contendo um dos fragmentos do promotor do gene *OsNHX1*, será transformada com a biblioteca de expressão de cDNA. As leveduras transformadas com as duas construções serão então crescidas em meio selectivo de modo a seleccionar os clones em

Further information: www.itqb.unl.pt

que há interacção proteína - DNA. Dos clones de levedura seleccionados serão extraídos os respectivos plasmídeos, que serão posteriormente sequenciados de modo a identificar o factores de transcrição que contêm.

2- Validação dos resultados obtidos por “Yeast One Hybrid”

A validação da interacção proteína (factor de transcrição) – DNA (promotor) será, inicialmente, realizada por re-transformação individual de levedura com cada um dos plasmídeos entretanto isolados (tarefa 3). Se esta re-transformação voltar a indicar uma possível interacção, será então necessário recorrer a técnicas *in vitro* para a confirmação final. A técnica utilizada será então o “gel/band gift assay”. Para realizar esta técnica será necessário sobre-exprimir e purificar a proteína em estudo. As proteínas serão sobre-expressas em *E.coli*, em fusão com uma cauda de 6xHIS, utilizando vectores de expressão baseados na tecnologia de GATEWAY™. Depois de purificada em coluna (agarose Ni-NTA), a proteína será utilizada nos ensaios de interacção *in vitro*.

3- Análise funcional dos novos factores de transcrição através de estudos de expressão.

Depois de confirmada a interacção entre o factor de transcrição isolado e o promotor do gene *OsNHX1* é necessário proceder à análise funcional deste(s) gene(s). Se se isolarem vários factores de transcrição que interajam com o promotor do gene *OsNHX1*, serão seleccionados apenas o(s) mais interessantes para caracterizar funcionalmente. Esta análise será inicialmente realizada através de estudos de expressão (real time RT-PCR), os quais consistirão em analisar os níveis de transcrição do gene em resposta ao stress provocado pela salinidade e secura, durante vários tempos de exposição.

Em termos de perspectivas futuras, a análise funcional destes genes poderá passar pela sobre expressão ou silenciamento destes genes em *Arabidopsis* ou arroz, para perceber de que modo é que estes genes estão associados ao fenótipo da planta e qual o seu papel na regulação dos genes a jusante na cadeia de transdução de sinal de resposta à salinidade.

Duração e carga horária: de 6 meses a um ano, 35 horas semanais.

Número de estagiários: 1

Further information: www.itqb.unl.pt

Project 2: Caracterização Funcional do factor de Transcrição ICE1 de Arroz

As baixas temperaturas são um dos factores ambientais que mais afecta o desenvolvimento e produtividade do arroz. Em Portugal, por exemplo, este factor ambiental impede a produção de arroz a norte do Mondego. A resposta e adaptação das plantas de arroz ao frio consiste numa série de alterações nos seus processos fisiológicos, bioquímicos, celulares e moleculares. Estas respostas envolvem a expressão diferencial de muitos genes, sendo estes regulados através de vários factores de transcrição (FT). Um dos FT chave nesta resposta é o ICE1 (“master gene”), o qual regula a expressão de outros TF a jusante na cadeia de transdução de sinal, e assim controla a expressão de vários genes de resposta ao frio. O ICE1 por sua vez é altamente regulado ao nível pós traducional. O principal objectivo deste projecto é a caracterização funcional deste factor de transcrição, de modo a aprofundar o nosso conhecimento em relação aos mecanismos moleculares que, em última instância, determinam a resposta ao frio e identificar alvos que possam ser utilizados no futuro para gerar plantas com maior tolerância a este stress ambiental.

No nosso laboratório temos produzido várias ferramentas que nos irão permitir estudar em pormenor a função do ICE1. Essas ferramentas são: plantas de arroz e plantas de *Arabidopsis* a sobre-exprimir o gene *OsICE1*, plantas de arroz a silenciar o gene *OsICE1*, plantas de arroz transformadas com a construção *OsICE1::TAP-tag*, biblioteca de cDNA de arroz de expressão induzida pelo frio (para utilizar nas técnicas de “Yeast One-Hybrid” e “Yeast Two-Hybrid”) e anticorpo policlonal contra a proteína *OsICE1*.

Tarefas que serão realizadas durante este projecto, utilizando as ferramentas descritas anteriormente:

- 1- Análise fisiológica e molecular das plantas a sobre-exprimir (arroz e Arabidopsis) e silenciar (arroz) o gene *OsICE1*
- 2- Purificação do anticorpo específico para o OsICE1 e estudo da estabilidade da proteína OsICE1 (em condições controlo vs. stress de frio).
- 3- Estudo da interacção do factor de transcrição OsICE1 com outros reguladores proteicos através da técnica de “Yeast Two-Hybrid”
- 4- Análise da interacção do OsICE1 com o promotor do gene *OsDREB1A*.

Técnicas que poderão ser praticadas durante a realização deste projecto:

- a) SDS-PAGE e Western blotting
- b) Northern blotting
- c) Yeast two-Hybrid
- d) Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)
- e) Real time RT-PCR
- f) Electrolyte leakage
- g) Imunolocalização

Duração e carga horária: de 6 meses a um ano, 35 horas semanais.

Número de estagiários: 1

Laboratory: Plant Genetic Engineering

Supervisor: Ana Paula Santos (apsantos@itqb.unl.pt)

Area: Plant Biology

Project 3: Do environmental stresses affect plant chromatin dynamics?

All genomes are subjected to stresses. The effect of stress on whole genomes is not well known. The large-scale genome organization, including genes, repetitive DNA sequences and the chromatin structure, is dynamic and determinant in genome-restructuring events in response to abiotic stresses. Environmental stresses limit plant growth and seed production. In Portugal, the rice productivity is strongly affected by abiotic stresses e.g. mild salinity and low temperature. The challenge we propose to face is to investigate the functional organization of rice chromatin as part of genomic responses to abiotic stresses. The studies will be focused on a cytogenomic analysis including Fluorescence *In Situ* Hybridization (FISH) on tissue sections followed by confocal analysis and image processing. The global assessment of chromatin changes will be studied by using epigenetic marks of chromatin state such as antibodies to access open states (euchromatin) and packed states of chromatin (heterochromatin). A second approach will include the cytogenomic analysis of rice transgenic plants with improved tolerance to abiotic stresses including studies on 3D transgene organization and disposition preferentially using transgenic lines with a high transgene copy number. This work will contribute to clarify if there is interaction between endogenous genes and transgenes (homologous). If yes, do these interactions imply co-localization and physical gene clustering?

Duração aproximada e carga horária: de 6 meses a 1 ano até um máximo de 60 ECTS.

Nº de alunos por projecto: 1

Further information: www.itqb.unl.pt

Laboratory: Plant Genetic Engineering

Supervisor: M. Margarida Oliveira (mmolive@itqb.unl.pt)

Tiago Lourenço (tsantos@itqb.unl.pt)

Area: Plant Biology

Project: Caracterização fisiológica e molecular da resposta à secura em *Jatropha curcas*, uma planta produtora de biodiesel

Jatropha curcas (purgueira) tem, recentemente, atraído grande interesse a nível mundial devido ao óleo que acumula na semente e que possui boa qualidade para a produção de biodiesel, constituindo uma alternativa viável aos combustíveis fósseis. Apesar do interesse geral nesta espécie se centrar na produção de óleo, *J. curcas* tem também interesse pela sua adaptação a solos impróprios para cultivo e passíveis de desertificação. Esta capacidade deve-se a uma tolerância natural a condições de secura e salinidade extremas. No entanto, os mecanismos envolvidos nesta tolerância não têm sido explorados nem se encontram esclarecidos. Até ao momento, poucos genes de *J. curcas* foram descritos como envolvidos na tolerância à secura. Apesar dos recentes esforços para conhecer e explorar o património genético desta espécie, existe ainda muito pouca informação disponível. Dos estudos citados parece no entanto poder-se concluir que *J. curcas* apresenta reduzida variabilidade genética. Esta baixa variabilidade genética não explica no entanto as variações fenotípicas e fisiológicas observadas entre diferentes acessos, quando crescidos sob condições idênticas. Alguns autores têm sugerido mecanismos de regulação epigenética para justificar as diferentes respostas. Várias ferramentas biotecnológicas estão a ser desenvolvidas para *J. curcas*, nomeadamente o início da sequenciação do genoma e protocolos de transformação genética. Estas ferramentas vão naturalmente ajudar ao desenvolvimento biotecnológico da espécie.

O objectivo geral do presente projecto é o aumento do conhecimento dos mecanismos biológicos de *J. curcas* em resposta à secura. Para atingir este objectivo, a equipa irá utilizar sementes de 2 acessos diferentes de *J. curcas* com comportamento fisiológico distinto.

O material vegetal será clonado (propagado vegetativamente) a partir de sementes e utilizado numa primeira fase nos ensaios fisiológicos a realizar em cooperação com outros laboratórios situados no campus de Oeiras. Em paralelo, serão realizados estudos de expressão génica em genes candidatos, seleccionados nas bases de dados e em estudo no nosso laboratório. Os genes considerados de maior interesse serão utilizados em estudos de caracterização funcional numa espécie modelo (*Arabidopsis*).

O estudante integrar-se-á num grupo que estuda activamente os mecanismos moleculares de tolerância ao stress abiótico em diversas plantas, em colaboração com uma empresa internacional.

Further information: www.itqb.unl.pt

Duração aproximada: de 6 meses a 1 ano até um máximo de 60 ECTS.

6. Número de alunos por projecto: 1 (a seleccionar de acordo com o interesse demonstrado no projecto)

Further information: www.itqb.unl.pt

Laboratory: Protein Biochemistry, Folding & Stability

Supervisor: Cláudio M. Gomes (gomes@itqb.unl.pt)

Area: Biochemistry

Projecto 1: Protein Misfolding in Neurodegeneration

We are looking for a highly motivated and creative student to collaborate on our ongoing research project on the metallochaperone **frataxin**. Deficiency in this small mitochondrial protein is associated to the development of a neurodegenerative disease Friedreich's ataxia (FRDA). Some FRDA patients have missense mutations on the frataxin gene, leading to a protein with features different from the wild type. Focusing on the effect that clinical point mutations have on the protein conformation and stability, we aim at establishing a correlation between protein structural modifications and impaired biological function and also at gaining a better insight of the molecular mechanism behind FRDA.

The selected student will have a chance to be involved in a state-of-the-art research project and to come into contact with molecular, biophysical, biochemical and cell biology methodologies.

A very good level of English is required. We are accepting applications from students of biochemistry, cell biology, biology, or related areas. Admission may be immediate.

Further information: www.itqb.unl.pt

Laboratory: Protein Modeling

Supervisor: Cláudio M. Soares (claudio@itqb.unl.pt)

Bruno L. Victor (bvictor@itqb.unl.pt)

Area: Computational Biology / Structural Biology

Projecto 1: Modelação molecular/Bioinformática estrutural do péptido de fusão da hemaglutinina do vírus influenza

Epidemias e pandemias virais são problemas que cada vez mais afectam a humanidade. O vírus influenza é o exemplo clássico de vírus permanentemente emergentes responsáveis pelas infecções virais mais devastadoras do século XX e agora XXI. Temos como exemplos a famosa Gripe Espanhola e mais recentemente a Gripe das Aves e a Gripe A no México (actualidade).

O vírus influenza apresenta no seu envelope membranar uma glicoproteína denominada por hemaglutinina (HA). Esta proteína está envolvida nos passos iniciais da infecção do vírus, através da promoção da sua fusão com a célula. Apesar da sua importância no ciclo de vida deste vírus, os actuais conhecimentos estruturais acerca da sua acção bem como os mecanismos associados a esta são ainda limitados. A HA é composta por duas cadeias polipeptídicas, a HA1 e a HA2. A cadeia HA1 contém regiões que são utilizadas para ligação a receptores à superfície da célula contendo ácido siálico. Após a internalização do vírus em endossomas, o baixo pH induz dramáticas alterações conformacionais na cadeia HA1. Estes movimentos permitem que o péptido de fusão, localizado no N-terminal da cadeia HA2, fique exposto, promovendo a fusão das membranas do vírus e da célula.

O péptido de fusão é o caso mais simples que podemos utilizar para perceber o processo de fusão que ocorre na infecção de um vírus a uma célula. Actualmente podemos encontrar na bibliografia vários relatos de simulações utilizando este péptido. No entanto, este projecto de mestrado pretende ir mais além destes trabalhos. A utilização de diferentes metodologias de Simulação Molecular e Bioinformática Estrutural irá permitir realizar simulações em condições fisicamente mais realistas e nunca esquecendo a necessidade de obter resultados estatisticamente significativos. Pretende-se investigar tanto as mudanças conformacionais observadas na interacção com membranas com diferentes características, bem como o seu efeito na organização lipídica. Na sequência destes estudos, e com o objectivo de identificar resíduos que sejam importantes no processo de fusão irão igualmente ser delineadas simulações com mutações do mesmo péptido de fusão.

Pretende-se um estagiário/a muito motivado para trabalhar numa área de investigação em grande expansão e num grupo dinâmico e competitivo. Motivação para trabalhar com metodologias de modelação molecular e com meios informáticos é importante para o sucesso do trabalho. No entanto, não é necessária experiência prévia nestas metodologias.

O Laboratório de Modelação de Proteínas desenvolve investigação na área da simulação física de proteínas, tentando compreender processos biológicos utilizando meios computacionais, ou em colaboração com grupos de investigação experimental. O objectivo final destas investigações é a compreensão da Vida ao nível molecular e atómico, pela simulação dos seus mais pequenos componentes. O trabalho do Laboratório de Modelação de Proteínas centra-se no estudo de proteínas envolvidas em cadeias transportadoras de electrões, e em processos com interesse biotecnológico e biomédico.

São possíveis trabalhos noutras temáticas de interesse para o grupo de Modelação de Proteínas.

Further information: www.itqb.unl.pt

Projecto 2: Modelação molecular/Bioinformática estrutural de *ABC transporters*

Os *ABC transporters* são uma família de proteínas que utilizam a energia da hidrólise de ATP para transportar substratos através de membranas. Os membros desta família intervêm num grande número de processos fisiológicos que vão desde o transporte de nutrientes até a exportação de medicamentos nas células cancerígenas. Mutações destas proteínas estão associadas ao aparecimento de doenças, como por exemplo a fibrose cística.

Apesar da grande diversidade de substratos transportados, todos os membros desta família são formados por uma unidade básica funcional constituída por dois domínios catalíticos (NBDs) e dois domínios transmembranares (TMDs). Presumivelmente, a ligação/hidrólise de ATP produz alterações conformacionais nos NBDs, rearranjos esses que são posteriormente transmitidos aos TMDs, permitindo assim o transporte unidireccional dos substratos. Contudo e apesar de toda a informação disponível acerca desta família, ainda existem muitas questões por esclarecer, tais como a identificação das alterações conformacionais que ocorrem durante a hidrólise de nucleótidos ou o mecanismo de transmissão de energia entre os vários domínios.

O trabalho do/a estudante consistirá em investigar, através da utilização de metodologias de Simulação Molecular e Bioinformática Estrutural, o funcionamento desta família de proteínas, nomeadamente esclarecer os detalhes atómicos associados ao processo de ligação/hidrólise dos nucleotidos e identificação das alterações conformacionais que ocorrem durante o ciclo de transporte.

Pretende-se um/a estudante muito motivado/a para trabalhar numa área de investigação em grande expansão e num grupo dinâmico e muito competitivo. Motivação para trabalhar com metodologias de modelação molecular e com meios informáticos é importante para o sucesso do trabalho. No entanto, não é necessária experiência nestas metodologias.

O Grupo de Modelação de Proteínas do ITQB:

O Laboratório de Modelação de Proteínas desenvolve investigação na área da simulação física de proteínas, tentando compreender processos biológicos utilizando meios computacionais, ou em colaboração com grupos de investigação experimental. O objectivo final destas investigações é a compreensão da Vida ao nível molecular e atómico, pela simulação dos seus mais pequenos componentes. O trabalho do Laboratório de Modelação de Proteínas centra-se no estudo de proteínas envolvidas em cadeias transportadoras de electrões, e em processos com interesse biotecnológico e biomédico. *São possíveis trabalhos noutras temáticas de interesse para o grupo de Modelação de Proteínas.*

Laboratory: Raman Spectroscopy of Metalloproteins

Supervisor: Dr Smilja Todorovic (smilja@itqb.unl.pt)
Dr Philip Jackson (phil@itqb.unl.pt)

Area: Biochemistry

Projecto: Purification of heterologously expressed peroxidase and spectroscopic characterization to probe the mechanistic basis for function

Peroxidases constitute a superfamily of haem-containing enzymes that catalyze the reduction of hydrogen peroxide to water while oxidizing an organic substrate. These enzymes are broadly distributed among living organisms and are involved in a wide range of physiological functions including cell wall formation, lignification, defense, stress related processes, protection of tissues from pathogens, etc. Moreover, peroxidases are extremely interesting proteins due to their actual and potential technological applications. In this project, a multidisciplinary approach will be undertaken, in order to:

- purify an extensin peroxidase

The isolation and purification of the recombinant GvEP produced in *E. coli*, will be performed in collaboration with the Plant Cell Wall Laboratory, ITQB.

- look at the active site structure and reaction dynamics of a peroxidase

Resonance Raman and stationary and time-resolved surface enhanced resonance Raman spectroscopies, that can reveal highly specific and sensitive information on discrete metal site(s) within a protein, will be employed.

- address the molecular basis of functioning of an immobilized peroxidase

As prerequisite for understanding of their functioning in bioelectronic devices, such as biosensors for determination of H₂O₂ in rainwater, in disinfectant preparations and in the textile, paper and food industries.

Further information: www.itqb.unl.pt

Laboratory: Systems Biodynamics

Supervisor: Andreas Bohn (abohn@itqb.unl.pt)

Area: Computational Biology

Project:

A investigação no laboratório Biodinâmica Sistémica (sbd.itqb.unl.pt) está centrada em processos dinâmicos, tais como crescimento ou ritmicidade em sistemas multi-celulares ou organismos inteiros sob condições ambientais complexas. Seguimos uma abordagem integrativa da biologia sistémica, unindo estratégias de análise com base em dados, e métodos modelação e simulação baseados em hipóteses. Presentemente, o nosso principal projecto consiste na análise e modelação do crescimento de biomassa de comunidades microbianas com uma forte componente fotossintética, os chamados biofilmes fototróficos.

No âmbito deste projecto, estamos interessados em receber um estudante de Mestrado para participar no desenvolvimento de um modelo de crescimento estocástico de biofilmes, englobando i) um modelo derivado de dados experimentais de um projecto a nível Europeu já concluído, ii) um modelo genérico de crescimento baseado em equações diferenciais parciais e estocásticas, e iii) modelos com cinética detalhada e baseada em biofilmes individuais.

O trabalho baseia-se na sua totalidade em ferramentas computacionais e matemáticas, e estará integrado na investigação em curso conduzida no laboratório de Biodinâmica Sistémica, sob supervisão de Andreas Bohn.

Further information: www.itqb.unl.pt

Laboratory: Biomolecular Diagnostics / Physiology of Environmentally Conditioned Microbiota

Supervisor: Abel Oliva (oliva@itqb.unl.pt) and Vitória S. Romão (vsr@itqb.unl.pt)

Area: Biochemistry and Biotechnology

Project: Desenvolvimento de um biossensor para quantificação de histamina para monitorização de amostras alimentares

Objectivos

Optimização do ensaio de afinidade (imunológico) para detecção e quantificação de histamina.

Desenvolvimento de um biossensor óptico baseado em anticorpos ou bioreceptores imobilizados em guias de ondas.

Interesse científico

A detecção e quantificação de amins biogénicas em produtos alimentares fermentados (vinho, queijo, conservas de peixe) é uma forma de caracterizar a qualidade e a segurança, e reveste-se de crescente interesse nos nossos dias. As amins biogénicas resultam da descarboxilação dos respectivos aminoácidos, e algumas delas, nomeadamente a histamina e tiramina são consideradas responsáveis por alguns problemas de saúde. A histamina representa um papel importante em várias funções fisiológicas (inflamações, secreção de ácido gástrico, neurotransmissão e regulação imunológica) através dos seus receptores H1, H2, H3 e H4, respectivamente.

A detecção e quantificação destas moléculas têm um interesse relevante no diagnóstico clínico, bem como no controlo de qualidade de alimentos fermentados. Há muitos anos já que os anticorpos e bioreceptores têm vindo a ser usados para o desenho e construção de biossensores, cuja performance depende da afinidade e especificidade da molécula usada como bioreceptor (Handbook of Biosensors and Biochips, 2007, Ed. R. Marks, D. Cullen, I. Karube C.R. Lowe and H.H.Weetall, John Wiley; Biosensors: Practical Approach. Editor Jon Cooper & Tony Cass, Oxford University, 2004). A possibilidade de otimizar o processo de imobilização do bioreceptor sob a superfície do substrato confere vantagens significativas no conceito e na eficiência de funcionamento do biossensor. Simultaneamente, este projecto oferece a possibilidade do desenvolvimento de uma ferramenta para aplicação na área de controlo alimentar, de grande interesse para o controlo rápido e preciso destes compostos a baixo custo.

Further information: www.itqb.unl.pt

Este trabalho será feito em colaboração com o grupo do 'Centro de Investigación en Nanociencia y Nanotecnología' (UAB), que deverá implementar uma técnica inovadora baseada em laser de posicionamento de bioreceptores sobre suportes sólidos para posterior desenvolvimento do biossensor.

Plano de trabalho

1 - Caracterização dos bioreagentes

Serão caracterizados os anticorpos a utilizar contra a histamina do ponto de vista da bioreacção, nomeadamente constantes de afinidade, especificidade, tempo de reacção, etc., usando equipamento BIACOR 2000 e Leitor de ELISA Spectra Max 340.

2– Preparação e caracterização da imunoreacção competitiva e desenvolvimento de um teste ELISA e respectiva calibração e validação

3– Desenvolvimento de um biossensor óptico

Aplicação da técnica de quantificação de histamina desenvolvida para teste em amostras reais (vinho, conservas, outros alimentos fermentados).

Período de trabalho

De acordo com o estipulado nas normas de mestrado.