



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
INSTITUTO DE BIOQUÍMICA MÉDICA

**INTERAÇÃO DA DEFENSINA *PSD1* COM A
MONOHEXOSIL CERAMIDA (CMH)
ISOLADA DO FUNGO *FUSARIUM SOLANI*.**

LUCIANO NEVES DE MEDEIROS

Rio de Janeiro

2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**Interação da defensina *Psdl* com a monohexosil
ceramida (CMH) isolada do fungo
Fusarium solani.**

Luciano Neves de Medeiros

**Universidade Federal do Rio de Janeiro
Centro de Ciências da Saúde
Instituto de Bioquímica Médica**

**Interação da defensina *Psdl* com a monohexosil
ceramida (CMH) isolada do fungo
Fusarium solani.**

Luciano Neves de Medeiros

Tese submetida ao corpo docente do
Instituto de Bioquímica Médica da
Universidade Federal do Rio de Janeiro,
como parte dos requisitos necessários
à obtenção do grau de doutor em
Química Biológica

Orientadora: Profa Eleonora Kurtenbach

Banca Examinadora:

Prof^a. Georgia Correa Atella

Professora Adjunta do Instituto de Bioquímica Médica

Prof. Jose Daniel Figueroa Villar

Professor Associado do Departamento de Química do Instituto Militar de Engenharia

Prof^a. Valdirene Moreira Gomes

Professora Associada do Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro

Revisor e Suplente Interno:

Prof. Jose Ricardo Murari Pires

Professor Adjunto do Instituto de Bioquímica Médica

Suplente Externo

Prof. Paulo Mascarello Bisch

Professor Titular do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho

Orientadora:

Prof^a. Eleonora Kurtenbach

Professora Associada do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho

Medeiros, L. N.

Interação da defensina *Psd1* com a monohexosil ceramida (CMH) isolada do fungo *Fusarium solani*.

Fls. 180

Tese: Doutor em Química Biológica

1 – *Psd1*; 2 – RMN; 3 – Dinâmica Molecular; 4 – SPR; 5 - CMH

I – Universidade Federal do Rio de Janeiro – Instituto de Bioquímica Médica

II - TÍTULO

Este trabalho foi desenvolvido no laboratório de Biologia Molecular e Bioquímica de Proteínas – LBMBP do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho – IBCCF do Centro de Ciências da Saúde – CCS da Universidade Federal de Rio de Janeiro – UFRJ, sob orientação da Prof^a Dra Eleonora Kurtenbach, e em colaboração com o Prof. Fabio C. L. Almeida e a Prof^a Ana Paula Valente do Centro Nacional de Ressonância Magnética Nuclear Jiri Jonas do Instituto de Bioquímica Médica -IBqM, o Prof. Gilberto Weissmüller do Laboratório de Química Biológica do IBCCF, e o Prof. Jose Maria Delfino do Instituto de Química y Fisicoquímica Biológicas da Universidad de Buenos Aires, na vigência de auxílios concedidos pelo CNPq, FINEP, ICGEB, FUJB, FAPERJ, CAPES e PRONEX.

***Aos meus pais Cilene e Sebastião,
Espero obter tanto sucesso na criação dos meus filhos quanto vocês
tiveram. Espero poder retribuir ainda em vida por tudo.
Eu os amo muito pai e mãe!***

*Ao meu tio Mario,
Você que sempre foi um segundo pai para mim, que sempre colocou a
família a frente de tudo, sua participação nesse trabalho foi mais do que
importante, foi determinante para esse sucesso.
Meu muito obrigado por tudo!*

***Ao meu irmão Marcelo,
Alguém que admiro mais a cada dia e que foi muito importante quando
mais precisei.
Valeu mano!***

A minha esposa Priscila

Never gonna give you up, never gonna let you down
Never gonna run around and desert you
Never gonna make you cry, never gonna say goodbye
Never gonna tell a lie and hurt you

Never Gonna Give You Up (Matthew James Aitken / Michael Stock / Pete Waterman)

***Que esses 5 anos 7 meses e 29 dias sejam só o começo de nossas vidas
juntos, muito obrigado.
Te amo muito!***

*Ao Laboratório de Biologia Molecular e Bioquímica de Proteínas,
Como disse Roberto Carlos “são tantas emoções”, tantas que nem sei por
onde começar. Obrigado ao pessoal que conviveu ou convivi comigo
todos esses anos, rindo, chorando, correndo da EK, isto é,
compartilhando o dia a dia junto. Só tenho a agradecer, até mesmo nas
horas difíceis do convívio diário. E momentos difíceis eu passei por
muitos, sempre com incentivo e carinho de todos. Uma menção especial a
minha orientadora Eleonora, que em muitas vezes mais parecia uma
mãe, para o bem e para o mal. Obrigado Eleonora por todo carinho,
atenção, compreensão e dedicação prestados nesses 9 anos e meio de vida
científica que tenho desde que entrei em seu laboratório, fato que foi um
divisor de águas na minha vida.
Muito Obrigado!*

Agradecimentos

Gostaria de começar agradecendo ao IBqM, seus professores e funcionários, pelo convívio sempre inspirador nesses quase 10 anos que frequento as instalações, desde da época em que éramos um departamento, nossa to ficando velho. Fiz muitos amigos, não só de trabalho, nesse instituto, e sempre contei com a compreensão e ajuda de todos do IBqM quando foi necessário. Obrigado ao prof Jose Ricardo que como revisor contribuiu muito com essa tese.

Aos integrantes do passado, do antigo LEHPM e atuais, do agora LBMBP, meu muito obrigado por todas as horas eu passamos juntos, e foram horas. Vocês foram um grande incentivo para minha manutenção nessa área, em especial a minha orientadora Eleonora Kurtenbach.

Nesses 5 anos de doutorado fiz muita coisa e por conta disso conheci muita gente, muitos colaboradores, pessoas que sempre me desafiaram a pensar sobre assuntos dos mais diversos sobre nosso trabalho, sobre a ciência básica. Um carinho especial ao CNRMN, onde trabalho desde o mestrado, na figura dos profs Fabio e Ana Paula com quem tive o prazer de trabalhar todos esses anos, sempre com muita alegria e disposição. Ao lab. Do prof Jose Delfino, local em que trabalhei por 3 meses, onde fui muito bem recebido, onde fiz bons amigos que sempre me deixaram muito a vontade para trabalhar. Ao lab. prof Gilberto e Prof Paulo Bisch, do IBCCF, onde realizei os experimentos de SPR e foi o local em que tive boas discussões sobre meu trabalho. Aos demais colaboradores, são muitos, deixo registrado aqui meu obrigado por fazer o dia a dia sempre prazeroso.

Agradeço aos meus amigos que torcem pelo meu sucesso e sofrem com o trabalho que dá para alcançar esse sucesso. São amigos que agora não vejo mais com tanta frequência, já que não moro mais em Petrópolis e nem no ALO-UFRJ, mas que sempre me procuram e vão ficar muito felizes tanto quanto eu com a superação de mais uma etapa.

A minha família, que como uma boa família que é, foi quem segurou as pontas diante dos ocorridos nos últimos anos, minha esposa Priscila, meu mano Marcelo, meus pais Cilene e Sebastião, meus tios Marco e Mario, todos, não é nenhum exagero dizer que isto não seria possível sem os esforços de vocês, muito obrigado mesmo.

Uma nova jornada se aproxima, e com ela novos desafios que com certeza sei que vamos superar todos juntos.

OBRIGADO PESSOAL, E BOLA PARA FRENTE QUE ATRÁS VEM GENTE!

Abreviaturas

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BBS – “Buffered Basal Salt Medium”
BMG – “Buffered Minimal Glycerol”
CDH - dihexosil ceramida
CFU – unidades formadoras de colônia
CMH - monohexosil ceramida
CPM – contagem por minuto
CSP – perturbação de deslocamento químico, do inglês “Chemical Shift Perturbation”
DNA – ácido desoxirribonucléico
GCS - glicosilceramida sintase
HPLC – cromatografia líquida de alta performance
IC₅₀ - concentrações necessárias para inibir 50 % do crescimento
IL – interleucina
IPC - inositol-fosforilceramida
IPT1 – gene da enzima que converte MIPC em M(IP)₂C
ka – constante de velocidade de associação
kd – constante de velocidade de dissociação
KD – constante de dissociação
LPS – lipopolissacarídeos
LUV - grande vesícula unilamelar, do inglês “large unilamellar vesicle”
MD – “Minimal Dextrose Medium”
MIPC – manose-(inositol-fosfato)-ceramida
M(IP)₂C - manose-(inositol-fosfato)₂-ceramida
MLV - vesícula multilamelar, do inglês “multilamellar vesicle”
NMR – Ressonância Magnética Nuclear, do inglês “Nuclear Magnetic Resonance”
PC - fosfatidilcolina
PDB ID – código de identificação no Protein Data Bank
R1 – constante de velocidade de relaxação longitudinal
R2 – constante de velocidade de relaxação transversal
Req – resposta de ressonância no equilíbrio
Rex – constante de troca conformacional
Rmax – resposta máxima
RNA – ácido ribonucléico
RPM- rotações por minuto
RU – unidade de resposta ou unidade de ressonância
S² – parâmetro de ordem
SDS – dodecil sulfato de sódio, do inglês “sodium dodecyl sulfate”
SIDA – Síndrome da imunodeficiência adquirida
SPR - Ressonância Plasmônica de superfície, do inglês Surface Plasmon Resonance
SUV - pequena vesícula unilamelar, do inglês “small unilamellar vesicle”
TFA – ácido trifluoroacético
TID-PC - 3-(trifluorometil)-3-fenildiazirina-fosfatidilcolina
TNF- fator de necrose tumoral
UNAIDS – United Nation Programme on HIV/AIDS
UV- ultra violeta
WHO – “World Health Organization”
WHOPES – “WHO Pesticides Evaluation Scheme”

YPD – meio de cultura contendo de extrato de levedura, peptona e dextrose

Proteínas antimicrobianas

Ah-AMP1 - proteína antimicrobiana 1 de *Aesculus hippocastanum*

*Bj*D – Defensina de *Brassica juncea*

Ct-AMP1 - proteína antimicrobiana 1 de *Clitoria ternatea*

Dm-AMP1 - proteína antimicrobiana 1 de *Dahlia merchii*

HBD-2 - β -Defensina 2 humana

HNP-3 – peptídeo 3 de neutrófilo humano

Hs-AFP1 - proteína antifúngica 1 de *Heuchera sanguinea*

*Na*D1- Defensina 1 de *Nicotiana alat*

*Ph*D1- Defensina 1 de *Petunia hybrida*

*Psd*1 - Defensina 1 de *Pisum sativum*

Rs-AFP1- proteína antifúngica 1 de *Raphanus sativus*

Rs-AFP2 – proteína antifúngica 2 de *Raphanus sativus*

*Vr*D1 - Defensina 1 de *Vigna radiata*

*Vr*D2 - Defensina 2 de *Vigna radiata*

Resumo

Psd1 é uma defensina de planta, com 46 resíduos de aminoácidos, isolada de sementes de ervilha, que exibe atividade antifúngica por um mecanismo de ação ainda pouco entendido. Sua estrutura, determinada por ressonância magnética nuclear (NMR) em solução (PDB ID: 1jkz), é caracterizada pelo motivo α/β estabilizado por pontes de sulfeto. Nesta tese a interação de *Psd1* com membranas artificiais enriquecidas com a monohexosil ceramida CMH, componente de parede/membrana de células fúngicas, foi mostrada utilizando a sonda fotoativada análoga a fosfatidilcolina [^{125}I] TID-PC, por ressonância magnética nuclear (NMR) e ressonância plasmônica de superfície (SPR).

A sonda [^{125}I] TID-PC foi incorporada em vesículas multilamelares (MLV) e incubada com *Psd1* por 15 minutos antes de ativação com luz UV. Eletroforese em gel de triscina-glicina na presença de SDS foi utilizada para detectar e isolar a proteína marcada com a sonda. Os resultados obtidos mostraram que *Psd1* é capaz de interagir com lipídeos de membrana uma vez que a mesma foi marcada quando MLVs contendo PC ou PC: CMH (9:1, M/M) foram utilizadas.

Grandes vesículas unilamelares (LUV) foram utilizadas para detecção e mapeamento da interação de *Psd1* com CMH através da espectroscopia de NMR utilizando perturbação de deslocamento químico (CSP) e parâmetros de relaxação de ^{15}N . *Psd1* foi capaz de interagir com LUVs contendo PC ou PC: CMH (9:1, M/M), confirmando os resultados obtidos utilizando MLV. Demonstramos que pela interação com LUVs quais os resíduos de aminoácidos da região da alça 1 (Ala7-Asn17) e volta 3 (His36-Trp38) apresentam variação em seus deslocamentos químicos. Relaxação de ^{15}N revelou que essas regiões apresentam mobilidade interna (mudanças conformacionais) quando a proteína encontra-se livre em solução. Os valores de R_2/R_1 obtidos nessas regiões, na presença de CMH, foram significativamente alterados, indicando que a mobilidade interna foi diminuída, corroborando os dados de CSP. Em paralelo, mapeamentos de CSP foram realizados com *Psd1* na presença de micelas de DPC, contendo ou não CMH, e resultados semelhantes foram obtidos.

A cinética da interação da proteína *Psd1* e CMH foi quantificada através da técnica de SPR. A interação de *Psd1* com SUVs (pequenas vesículas de unilamelares) compostas de PC, PC: CMH (7:3, M/M) ou CMH foi realizada em CHIP L1 no sistema BIACORE X. *Psd1* mostrou afinidade 60 vezes maior pela SUV composta de CMH

(Req~ 1500 RU para 14 μ M *Psd1*) do que para SUV composta de PC (Req~ 25 RU para 14 μ M *Psd1*) nas mesmas condições.

A atividade biológica de *Psd1* mostrou-se dependente da presença de CMH. Cepas de *Candida albicans* selvagens e deficientes na enzima glicosilceramida sintase (Δ GCS1) foram diferentemente inibidas por *Psd1*, sendo a atividade inibitória do crescimento maior para a cepa selvagem (> 60 %) do que para a cepa deficiente em CMH (30 %) na presença de 10 μ M de *Psd1*.

A relevância da alça 1 e da volta 3 de *Psd1* na sua interação com CMH e para a atividade antifúngica foi avaliada pela mutação pontual dos resíduos de glicina na posição 12 por ácido glutâmico e histidina na posição 36 por lisina. Ambas as mutantes sítio dirigidas, *Psd1*Gly12Glu e *Psd1*His36Lys, possuem menor afinidade por CMH do que a *Psd1* nativa, comparação realizada por SPR (respectivamente, Reqs = 65 RU e 160 RU contra 260 RU para a concentração de 1,5 μ M das proteínas em questão). A atividade antifúngica contra *Candida albicans* foi prejudicada com as mutações pontuais, enquanto a atividade antifúngica de *Psd1*His36Lys teve uma significativa redução (inibição de 25 % do crescimento) a atividade de *Psd1*Gly12Glu foi abolida (< 10 % inibição de crescimento) se comparadas à atividade de *Psd1* nativa (> 95 % inibição de crescimento) na concentração de 20 μ M de proteína.

Estes resultados indicam que os movimentos intramoleculares da alça 1 e da volta 3 são cruciais para ligação de *Psd1* a CMH e para sua atividade biológica, uma vez que a ausência de CMH na parede/membrana de célula conferiu resistência do fungo *Candida albicans* a esta defensina. Além disso, a mutação pontual no resíduo de Gly12 diminui os movimentos intramoleculares, causando grande redução de afinidade por CMH e da atividade antifúngica. Esta é a primeira evidência concreta de um alvo para *Psd1* na parede/membrana de célula fúngica.

Abstract

Psd1 is a 46 amino acid residue plant defensin isolated from pea seeds, which exhibits anti-fungal activity by a not very well-understood mechanism of action. Its structure is characterized by the so-called cysteine-stabilized α/β motif as determined by solution NMR (PDB ID: 1jkz). In this thesis, the interaction of *Psd1* with a CMH-doped artificial membrane. CMH (monohexosyl ceramide, is a component of the fungal cell wall/membrane) was accessed by [125 I]TID-PC photolabeling, nuclear magnetic resonance (NMR) and surface plasmon resonance (SPR).

The photoactivatable phosphatidylcholine analogue [125 I] TID-PC was incorporated into multilamellar vesicle (MLV) and incubated with *Psd1* for 15 minutes before UV activation. Electrophoresis was performed according to the Triscine-glicine 15 % - 20 % SDS-PAGE method (Schägger H. and von Jagow G., 1987) to identify labeled protein. [125 I]TID-PC was found to covalent binding the *Psd1* in both MLV, PC or PC:CMH (9:1, M/M), indicating that this defensin is able to interact with lipid membranes. Large unilamellar vesicles (LUV) doped or not with CMH were used to measure the interaction of *Psd1* with CMH by NMR spectroscopy analysis of chemical shift perturbations (CSP) and 15 N relaxation. *Psd1* was able to interact with both LUV, PC or PC:CMH (9:1, M/M), confirming the results obtained with MLV. Moreover, CSP experiments revealed that residues present in loop 1 (Ala7-Asn17) and turn 3 (His36-Trp38) are involved in the interaction with LUV containing CMH. These regions showed internal motion (conformational change) in the free protein in solution, as probed by 15 N relaxation, but conformational change in *Psd1* loop 1 and turn 3 diminished in the presence of PC:CMH (9:1, M/M) LUV. In parallel, CSP experiments were performed with *Psd1* in the presence of DPC micelles doped or not with CMH showing similar results.

Psd1 protein affinity to CMH was also evaluated real-time kinetic of interaction named SPR. The interaction of *Psd1* with PC, PC:CMH (7:3, M/M) and CMH SUV (small unilamellar vesicles) was performed with a L1 CHIP at a BIAcore X system. *Psd1* was able to bind to CMH SUV ($R_{eq} \sim 1500$ RU from $14 \mu\text{M}$ *Psd1*) with a 60 times higher affinity to the observed for PC SUV ($R_{eq} \sim 25$ RU from $14 \mu\text{M}$ *Psd1*) in the same condition. *Psd1*-biological activity was CMH-dependent as determined by *Candida albicans* wild type and ΔGCS1 (deficient in glucosylceramide synthase enzyme) antifungal assay. *Psd1* antifungal activity was more prominent in the wild type

C. albicans (<60 % growth inhibition) when compared to the observed for CMH-deficient strain (30 % growth inhibition) at 10 μ M concentration of defensin. Concluding, *Psd1* specific binding to CMH seems to be very important to its antifungal activity. The relevance of the loop 1 and the turn 3 of *Psd1* for its interaction with CMH became clear when residues Gly12 and His36 were punctually mutated to Glu and Lys, respectively. Both site-directed mutants, *Psd1*Gly12Glu and *Psd1*His36Lys, had a lower CMH affinity when compared to the wild type *Psd1* (Reqs = 65 RU and 160 RU against 260 RU). *In vitro* antifungal activity against *Candida albicans* was reduced in the *Psd1*His36Lys (25 % growth inhibition) mutant and almost abolished in the *Psd1*Gly12Glu (> 10 % growth inhibition) recombinant protein (*Psd1* < 95 % growth inhibition) at 20 μ M protein concentration. All results indicated that the flexibility and conformational changes of the loop 1 and the turn 3 seem to be crucial for binding to CMH and biological activity of *Psd1*, once the absence of CMH in the cell wall/membrane of *Candida albicans* conferred yeast resistance to *Psd1* defensin. Also, site-directed mutation, *Psd1*Gly12Glu, diminished internal motion of *Psd1* and this cause its loosing binding to CMH and antifungal activity. This work provides the first line of evidence of a target for *Psd1* in the fungal cell wall/membrane

Sumário

Abreviaturas.....	IV
Resumo.....	XV
Abstract	XVII
Sumário.....	XIX
1. Introdução.....	1
1.1. Problemas agrícolas associados à infecção por fungos.	1
1.2. Problemas médicos associados à infecção por fungos.	5
1.3 Proteínas Antimicrobianas.....	13
1.4. As defensinas.....	15
1.5. Defensinas de plantas	18
1.5.1. Estrutura tridimensional	18
1.5.2. Atividade biológica	20
1.6. A defensina Psd1	26
2. Objetivos.....	34
3. Parte I.....	35
<i>Interação da defensina Psd1 com vesículas multilamelares (MLV), contendo ou não uma glicoceramida isolada de Fusarium solani (monohexisilceramida - CMH), capazes de mimetizar uma membrana biológica utilizando para esse fim a sonda radioativa fotoativada [¹²⁵I] TID-PC.....</i>	35
3.1. Materiais e métodos.....	36
3.1.1. Expressão da proteína recombinante Psd1 (rPsd1) em levedura <i>Pichia pastoris</i>	36
3.1.2. Purificação da proteína Psd1 da cultura de expressão de <i>Pichia pastoris</i> ...	36
3.1.3. Observação da ligação de Psd1 em membranas artificiais através da sonda [¹²⁵ I]TID-PC.	37
3.1.3.1. Iodinação da sonda com ¹²⁵ I.	37
3.1.3.2. Ensaio de interação de Psd1 com vesículas multilamelares (MLV).	39
3.2. Resultados	43
4. Parte II	50

Avaliação da interação de Psd1 com grandes vesículas unilamelares (LUV) contendo ou não CMH por Ressonância Magnética Nuclear (NMR) e mapeamento dos resíduos de aminoácidos de Psd1 responsáveis por esta interação. 50

Artigo: Backbone dynamics of the antifungal Psd1 pea defensin and its correlation with membrane interaction by NMR spectroscopy..... 52

Abstract 53

1. Introduction 54

2. Materials and Methods..... 58

2.1. *Pichia pastoris* expression and purification of ¹⁵N Psd1 58

2.2. Vesicles preparation 58

2.3. NMR spectroscopy 59

2.3.1. Relaxation parameters 59

2.3.2. Model-free calculations 60

2.3.3. Psd1 in PC and PC:CMH vesicles..... 60

2.3.4. Psd1 or pepLoop1 in DPC and DPC:CMH micelles..... 60

2.3.5 – PepLoop1 structural calculations..... 61

Results 62

3.1. Psd1 backbone dynamics in the free state 62

3.2. Psd1 interaction with vesicles of PC and PC:CMH: Chemical shift..... 67

perturbation..... 67

3.2. Psd1 interaction with vesicles of PC and PC:CMH: Dynamic properties 68

3.3. Psd1 interaction with micelles of DPC: Chemical shift perturbation and..... 72

Dynamic properties 72

3.4. PepLoop1 (Gly12-Val13-Ser14-Phe15-Thr16-Asn17-Ala18-Ser19) structure

in DPC and DPC:CMH. 74

4. Discussion 79

4.1. Identification of minimal domains in defensins 79

4.2. Dynamic properties and membrane interaction..... 81

4.4. Conformation selection 82

Acknowledgments 83

References:..... 84

5. Parte III..... 91

Comparação da afinidade de Psd1 a pequenas vesículas unilamelares (SUV) compostas de PC, de PC:CMH e de CMH por Ressonância Plasmônica de superfície (SPR) e avaliação da importância dos resíduos de glicina na posição 12 e histidina na posição 36 de Psd1 na interação com CMH por SPR bem como para sua atividade biológica. 91

5.1 Materiais e métodos 93

5.1.1. Mutantes sítio dirigidas da defensina Psd1 93

5.1.1.1. Transformação de *Pichia pastoris* com os plasmídeos recombinantes para produção das mutantes sítio dirigidas Psd1Gly12Glu e Psd1His36Lys 93

5.1.1.2. Seleção da levedura de melhor expressão. 94

5.1.1.3. Confirmação da produção das proteínas recombinantes. 95

5.1.2. Interação proteína-lipídeo por Ressonância Plasmônica de superfície (SPR).	95
5.1.2.1 Preparação de vesículas lipídicas para SPR.	95
5.1.2.3. Ensaio de ligação de <i>Psd1</i> a vesículas lipídicas por Ressonância Plasmônica de Superfície (SPR).	96
5.1.3. Ensaio antifúngico	105
5.2 Resultados	106
6. Discussão	126
7. Referências	144

1. Introdução

1.1. Problemas agrícolas associados à infecção por fungos.

Dados do ministério da agricultura brasileiro apontam o Brasil como um dos maiores produtores de grãos do mundo. Enquanto nossa produção total de grãos era de aproximadamente 58 milhões de toneladas num total de 14 produtos em 1990, dezesseis anos depois (2006), a quantidade produzida quase triplicou atingindo os 126 milhões de toneladas. No entanto, o aumento da produção nacional de grãos não supera o volume de gastos com defensivos agrícolas. Os números sobre o uso legal de fungicidas na plantação e estocagem de grãos são alarmantes. Em 1992, foi gasto na compra de fungicidas o valor de 145 milhões de dólares e o gasto total em defensivos agrícolas foi de 945 milhões de dólares. Esses números aumentam a cada ano alcançando em 2005, somente para fungicidas o valor de 1,1 bilhões de dólares, e um montante de 4,25 bilhões de dólares considerando todos os defensivos agrícolas, ou seja, um aumento de quase 10 vezes em 13 anos. Diante deste quadro países do mundo inteiro, incluindo o Brasil, tem investido na otimização do uso de pesticidas determinando limites no seu uso.

A Organização Mundial da saúde (WHO) possui um grupo de trabalho voltado somente para o controle de pesticidas, chamado WHO Pesticide Evaluation Scheme (WHOPES) que trabalha em colaboração no Brasil com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Em seu relatório de 2007, a ANVISA divulgou as quantidades de agrotóxicos encontradas em mais de 40 amostras (entre frutas, verduras, e outros) apresentados na TABELA 1.1. Esse relatório mostrou índices insatisfatórios

de resíduos de agrotóxicos em muitas das amostras testadas, além da presença de agrotóxicos não regulamentados.

Note na TABELA 1.1 que em praticamente todos os produtos há pelo menos um antifúngico não autorizado para aquele cultivo ou acima do limite máximo de resíduos.

Tabela 1.1: Análise de resíduos de pesticidas realizados pela ANVISA em alimentos no ano de 2007.

Cultura	Total de amostras analisadas	Amostras insatisfatórias		Agrotóxicos encontrados nas amostras insatisfatórias
		Total	%	
ALFACE	135	54	40,00	NA - <i>Ditiocarbamatos</i> , metamidofós, acefato, clorpirifós
BATATA	147	2	1,36	NA – Endossulfam
MORANGO	94	41	43,62	NA - Metamidofós, <i>Clorotalonil</i> , <i>Folpete</i> , Tetradifona, <i>Procloraz</i> , Endossulfam, Acefato, <i>Captana</i> , Pirimifós-etílico, <i>Ciproconazol</i> , Dimetoato, clorpirifós, Profenofós. Acima do LMR - Difenocanazol, Ditiocarbamatos, Iprodiona, Azoxistrobina, Procimidona
TOMATE	123	55	44,72	NA - Metamidofós, clorpirifós, monocrotofós, endossulfam
MAÇA	138	4	2,90	NA - Azinfós metílico, lambdacialotrina, diclorvós
BANANA	139	6	4,32	NA - <i>Procloraz</i> , lambdacialotrina, carbendazim Acima do LMR – <i>Tebuconazol</i>
MAMÃO	122	21	17,21	NA - Clorpirifós, bromopropilato, dimetoato, lambda-cialotrina, endossulfam, <i>carbendazim</i> , acefato, Acima LMR - tetradifona, <i>clorotalonil</i>
CENOURA	151	15	9,93	NA - Clorpirifós, endossulfam, acefato, metomil, <i>captana</i>
LARANJA	149	9	6,04	NA - Fenitrotrona, <i>procloraz</i> , profenofós Acima do LMR – Triazofós
TOTAL	1198	207	17,28	

NA – não autorizado, LMR – limite máximo de resíduo. Em itálico, compostos com ação fungicida. Adaptado da Nota Técnica de Esclarecimento sobre o Risco de Consumo de Frutas e Hortaliças Cultivadas com Agrotóxicos, ANVISA 2007.

Pesquisadores da área trabalham na busca de alternativas aos pesticidas, uma vez que esses não são baratos e contaminam o meio ambiente sendo um problema de saúde pública crescente. Anuradha T. S. e colaboradores (2008) mostraram que plantas transgênicas de tabaco e amendoim que receberam o gene da defensina de mostarda, chamada *BjD*, tornaram-se mais resistentes à infecção pelos fungos *Fusarium moniliforme*, *Phytophthora parasitica* pv. *Nicotianae*, *Pheoisariopsis personata* e *Cercospora arachidicola*. Nesse trabalho, observou-se que as plantas transgênicas apresentavam redução de 92 % e 88 % (tabaco e amendoim, respectivamente) no número de lesões foliares quando desafiadas pela borrifação com conídios das espécies descritas (Anuradha T. S. e col., 2008). Essa alternativa apresenta inúmeras vantagens, como a diminuição ou eliminação do uso de fungicidas na plantação, implicando em uma redução de custos e da quantidade de resíduos tóxicos no produto final. Porém, a produção e consumo de transgênicos envolve a melhor discussão de questões científicas e éticas, além da resistência da população a esses produtos geneticamente modificados. Entretanto, com o passar dos anos, o uso de produtos geneticamente modificados tem aumentado uma vez que, na maioria das vezes, são economicamente mais viáveis que os não transgênicos (European Initiative for Biotechnology Education, 1998 e 1999; Mendonça-Hagler L. e cols., 2008).

O uso de pesticidas, dentre eles fungicidas, também ocorre com frequência para preservação de produtos agrícolas após a colheita, já que a perda da produção pode alcançar até 20 % durante sua estocagem (Janisiewicz W. J. J. e Korten L., 2002). O uso de tratamentos físicos e/ou químicos (luz UV, calor, fungicidas sintéticos, dentre outros) ajudam a minimizar essas perdas. Um adjuvante nessas manobras ou até uma alternativa que vem ganhando força no mercado é o uso de bioantagonistas, agentes microbianos

capazes de colonizar o produto e assim reduzir a infestação por determinado patógeno (Janisiewicz W. J. J. e Korten L., 2002).

Janisiewicz W. J. e colaboradores (2008) acreditam ainda que o melhoramento de bioantagonistas através de modificação genética apresenta grande potencial para a diminuição de perdas pós-colheita. Isso porque essas modificações podem levar, por exemplo, a um aumento da tolerância a estresses ambientais ou a produção de antifúngicos naturais, como as defensinas. No trabalho citado, uma levedura *Pichia pastoris* recombinante capaz de secretar a proteína antifúngica *Psd1*, foi aplicada em maçãs antes da infecção com o fungo *Penicillium expansum*. Os resultados mostraram uma redução maior que 80 % na severidade da infecção na fruta que recebeu o bioantagonista, em comparação com a que não recebeu nenhum tratamento (Janisiewicz W. J. e col., 2008).

Plantas são continuamente expostas a diferentes estresses oriundos de condições ambientais como temperatura, salinidade e patógenos predadores, como fungos. Em resposta a esses estresses, as plantas desenvolveram mecanismos de defesa durante sua evolução para minimizar os efeitos desses estresses. Faz parte desses mecanismos a produção de compostos como fenóis, metabólicos secundários e proteínas antimicrobianas. Estas últimas apresentam papel chave na defesa contra microorganismos uma vez que utilizam diferentes estratégias de ação (Tavares L. S. e col., 2008).

A produção de proteínas antimicrobianas é uma estratégia de amplo espectro usada para defesa de muitos organismos, incluindo as plantas (Carvalho A. O. and Gomes V. M., 2009). Dentro da classe de proteínas antimicrobianas de plantas, está uma grande família chamada defensinas de plantas, que inclui moléculas com surpreendente conservação de estrutura e função, descritas inicialmente em sementes de

trigo e cevada (Colilla FJ e col., 1990; Carvalho A. O. e Gomes V. M., 2009). Essas proteínas possuem atividade antimicrobiana contra fungos e/ou bactérias, ou ainda atividade inibidora da enzima α -amilase, sendo classificadas de acordo com sua atividade biológica e sequência de aminoácidos (Almeida M. S. e col., 2002). A atividade e estrutura das defensinas de plantas serão partes integrantes desta tese e serão abordadas mais a frente.

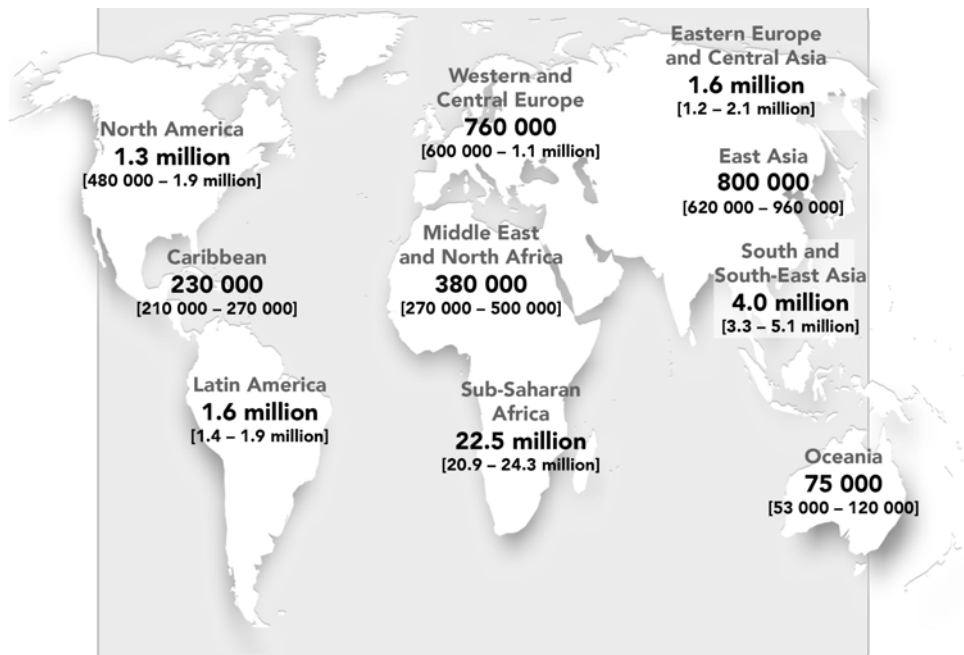
1.2. Problemas médicos associados à infecção por fungos.

A pandemia SIDA/HIV se tornou um desastre humano e social, particularmente afetando o desenvolvimento de países da África, Sul da Ásia e América Latina. Em 2007, o número de pessoas infectadas com HIV foi estimado em 35 milhões no mundo inteiro (UNAIDS/WHO, 2007) (FIGURA 1.1 A).

Durante o ano de 2007, a pandemia SIDA/HIV foi responsável pela morte de 2,5 milhões de pessoas, e 2,5 milhões de novos casos foram reportados (FIGURA 1.1 B). A cada dia, são registrados 14 mil novos casos de infecção por HIV, sendo mais da metade desses casos de pessoas com menos de 25 anos (UNAIDS/WHO, 2007).

No Brasil, de 1998 até hoje, o número de óbitos tem permanecido constante, em torno de 11 mil casos, sendo a região sudeste responsável por mais da metade desses casos (Ministério da Saúde, <http://portal.saude.gov.br/saude/>, Cidadão, Orientação e Prevenção, DST-AIDS).

A



B

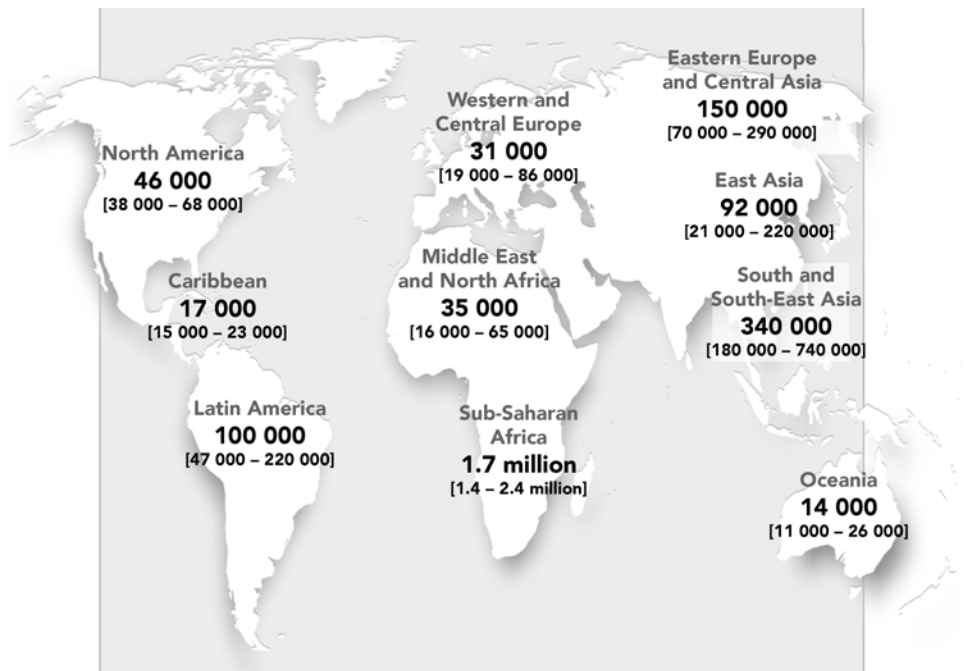


Figura 1.1: Número de casos de portadores do vírus HIV no ano de 2007. A- estimativa de pessoas portadoras do vírus HIV. O número total de casos chega a 35 milhões em todo o mundo. B- estimativa de novos casos de HIV. O número total pode chegar a 4 milhões em todo o mundo. Modificado do manual: AIDS epidemic update UNAIDS/WHO 2007.

O vírus HIV, ao entrar em contato com fluidos do hospedeiro, liga-se a um receptor presente na superfície celular dos macrófagos, monócitos e linfócitos T

chamado receptor CD4 através da glicoproteína viral gp120. Outros co-receptores justos posicionados também são requeridos para infecção viral. Após a adesão, a glicoproteína transmembrana gp41 do vírus HIV é inserida na membrana da célula do hospedeiro para iniciar a fusão entre o vírus e essa membrana. Na fusão, o vírus HIV insere na célula hospedeira seu material genético (RNA fita simples), mais as proteínas transcriptase reversa e ribonuclease, além dos primers necessários para a síntese da primeira fita dupla de DNA. Essa fita de DNA é integrada ao DNA da célula hospedeira e começa a síntese de material protéico para formação de novos vírus (Rivera D. M.e Frye R.E., 2007). A partir deste ponto, a célula hospedeira perde sua função na defesa do organismo e passa somente a produzir novos vírus. A síntese de novos vírus tem como uma das principais etapas a modificação da membrana plasmática do hospedeiro. Esta, uma vez modificada, servirá de arcabouço dos novos vírus no momento da liberação, que estarão livres para poderem encontrar outra célula CD4⁺ e recomeçar o ciclo. A diminuição de células de defesa CD4⁺ acarreta em uma menor capacidade de o organismo evitar e eliminar infecções.

A TABELA 1.2 mostra a incidência de algumas das doenças oportunistas mais freqüentes em para pacientes portadores do vírus HIV em seis países, incluindo o Brasil (UNAIDS/WHO, 1998). Estes dados mostram a incidência maior de alguns tipos de infecções e revelam que doenças devem receber especial atenção dos órgãos de saúde. Note que na TABELA 1.2 há 6 doenças causadas por fungos: aspergilose, candidíase, criptococcodiose, criptococcodiose – isoporíases e peniciliose.

Tabela 1.2: Prevalência em 6 países de doenças oportunistas em portadores do vírus HIV

Doença oportunista	Costa do Marfim	Brasil	México	Tailândia	USA	Zaire
Aspergilose	3%	—	3-7 %	-	-	-
Micobacteriose atípica	4 %	-	5-6 %	2 %	4 %	-
Bacteremia	7 %	-	-	4 %	-	-
Candidiase	24 %	5 %	30 %	11 %	13 %	-
CMV	26 %	5 %	65-69 %	4 %	5 %	13 %
Criptococcodiose	5 %	5 %	7-11 %	2 %	7 %	19 %
Criptococcodiose – isoporiasas	4 %	14 %	8 %	4 %	6 %	< 2 %
Enterite, não específica	12 %	-	-	-	-	13 %
Herpes (sistêmica)	6 %	-	5 %	10 %	4 %	-
Histoplasmose	3 %	-	5-10 %	8 %	-	< 2 %
Sarcoma de Kaposi	13 %	5 %	30-43 %	-	21 %	16 %
Linfoma	4 %	4 %	10 %	-	< 1 %	-
Nocardiose	5 %	-	< 2 %	-	-	-
Peniciliose	-	-	-	4-25 %	-	-
PML ou HIV encefalite	6 %	11 %	-	7 %	< 1 %	-
Pneumonia (Pneumocystis carinii)	4 %	22 %	24 %	26 %	64 %	< 2 %
Pneumonia	5 %	16 %	-	-	-	34 %
Toxoplasmose	21 %	14-34 %	17 %	2 %	3 %	11 %
Tuberculose	54 %	41 %	28 %	20 %	3 %	41 %
Outros	9 %	-	-	9 %	-	-

Em cinza estão doenças causadas por fungos. Espaços com traço (-) significam dados não fornecidos. Modificado do manual: HIV-related opportunistic diseases: UNAIDS Technical Update 1998.

A infecção por fungos é também uma complicação crescente em outras situações como transplante de órgãos, medicina neonatal e cirurgia pediátrica (Steinbach W. J. 2006) sendo uma importante causa de morbidade e mortalidade em crianças imunocomprometidas (Prasad P. A. e cols., 2008). A maioria das infecções é causada por espécies de *Candida* e *Aspergillus* e estão associadas com mortalidade significativamente abrupta (Prasad P. A. e cols., 2009).

Dentro da categoria infecção fúngica, clinicamente, são utilizados os termos infecção superficial (pele e mucosa) e infecção invasiva. As infecções superficiais são causadas por fungos dermatófitos e leveduras, e estão presentes em pacientes hospitalizados e não hospitalizados. Já as infecções invasivas são doenças potencialmente perigosas, com risco de morte para as pessoas doentes e/ou imunocomprometidas, ou seja, pessoas que precisam de atendimento médico especializado (Chen S. C. A. e Sorrell T. C. 2007).

A aspergilose invasiva tem emergido no mundo inteiro como uma importante causa de infecção entre pacientes imunocomprometidos, incluindo pacientes em terapia contra o câncer, transplante de órgãos e avançada infecção por HIV. Neste último, como visto na TABELA 1.2, a aspergilose já se apresenta como uma infecção de significativa prevalência. A mortalidade por aspergilose invasiva é dramaticamente alta, aproximando-se de 90 % da população de pacientes profundamente imunocomprometidos sendo a principal causa nos transplantados de medula óssea (Maertens J. e cols., 2004).

As opções terapêuticas viáveis para o tratamento de aspergilose invasiva estão limitadas a um pequeno arsenal de compostos antifúngicos. O deoxicolato de anfotericina B foi considerado o agente antifúngico padrão para o tratamento de aspergilose invasiva em pacientes severamente imunocomprometidos, principalmente

pelo longo histórico de 40 anos de uso desse fármaco. Porém, a nefrotoxicidade e toxicidade aguda de infusão limitam muito seu uso. Formulações lipídicas de anfotericina B diminuem a toxicidade das doses mais altas, mas com resultados similares ao uso do deoxicolato para o tratamento primário de aspergilose invasiva (Maertens J. e cols., 2004). O mecanismo de ação para a atividade antifúngica de anfotericina B (FIGURA 1.2) ocorre através da ligação desta ao esterol de membrana do fungo (ergosterol) e posterior aglomeração na membrana deste complexo para formação de um poro inespecífico contendo em sua luz somente moléculas da droga.

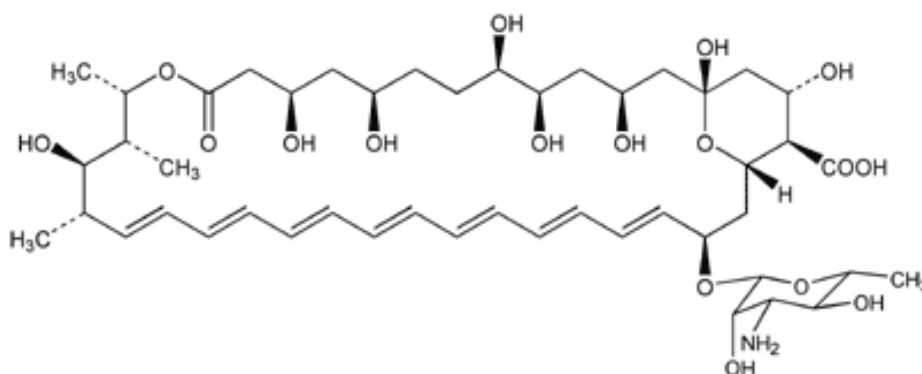


Figura 1.2: estrutura da droga anfotericina B.

Os antifúngicos triazólicos (FIGURA 1.3), fluconazol, itraconazol e voriconazol, são outra classe de compostos que podem ser utilizados no tratamento de aspergilose invasiva. Esses compostos possuem o mérito de serem viáveis em formulações orais e parentais. Entretanto sua indicação é realizada com muita cautela por causa de seu alto grau de hepatotoxicidade e a presença de interações cruzadas com outras drogas (Maertens J. e cols., 2004). Essa classe de antifúngicos é capaz de inibir o crescimento de fungos através da inibição da enzima lanosterol 14-demetilase (ERG11) da via de síntese do ergosterol. A ausência de ergosterol diminui a fluidez de membrana

impedindo várias de suas funções, inclusive crescimento, e ocorre também o acúmulo de intermediários da via síntese, muitas vezes tóxicos para a célula do fungo.

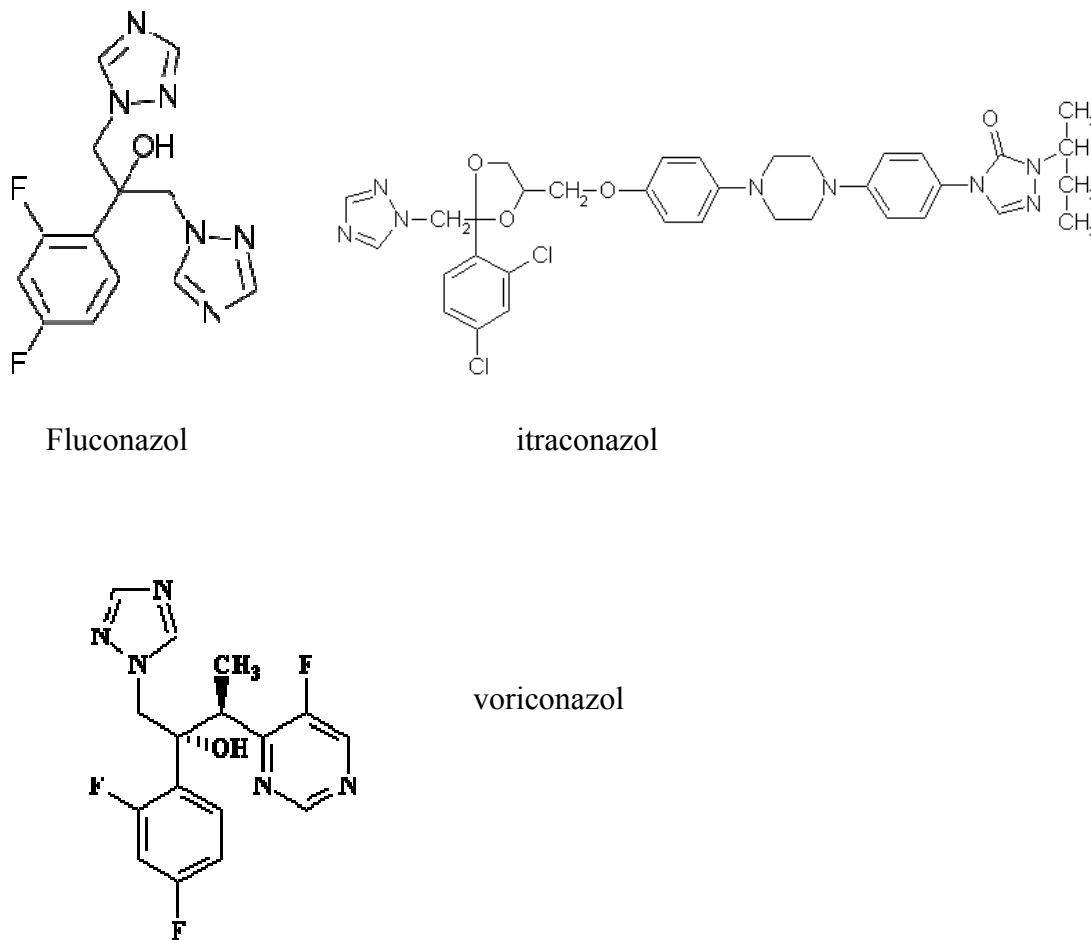


Figura 1.3 : estrutura dos azóis fluconazol, itraconazol e voriconazol.

A candidíase invasiva, dentre as infecções fúngicas, são as mais frequentes e embora *Candida albicans* permaneça como a espécie mais comum (40 - 50 % das candidemias) foi relatado o aumento de infecções por espécies de *Candida* resistentes a azóis (Chen S. C. A. e Sorrell T. C. 2007).

Em pacientes com candidemia, é essencial evitar a disseminação da infecção para outras partes do corpo, como coração (endocardite) e ossos (osteomielite), o que

influencia a duração do tratamento e suas implicações no prognóstico (Chen S. C. A. e Sorrell T. C. 2007).

Equinocandinas (FIGURA 1.4) foram descritas como uma classe muito promissora de compostos antifúngicos, mas com espectro de atividade relativamente restrito. Apesar de serem ativos contra espécies de *Candida* e *Aspergillus*, incluindo aquelas resistentes a azóis e polienos, suas atividades contra espécies de *Penicillium* são muito variáveis não tem atividade contra espécies de *Criptococcus*, e também possuem baixa ou nenhuma atividade “*in vitro*” contra espécies de *Fusarium*, *Rhizopus*, *Mucor*, *Scedosporium* e *Pseudallescheria boydii*. Sem dúvida, o breve panorama descrito acima justifica a procura de novas drogas para o tratamento das infecções fúngicas (Chen S. C. A. e Sorrell T. C. 2007). São inibidores da β (1-3) glucan sintase, e dessa forma inibem o crescimento do fungo por inibir a síntese de parede celular.

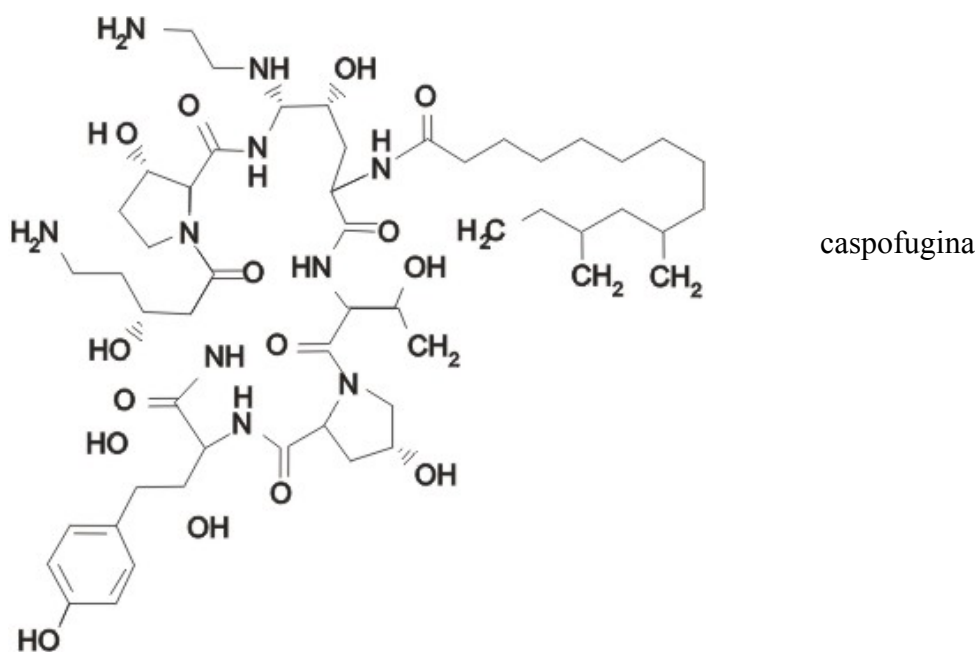


Figura 1.4: estrutura da caspofungina (equinocandina).

A necessidade de alternativas aos antifúngicos tradicionais, com compatível atividade e viabilidade na produção, tem demandado esforços de muitos pesquisadores não só na área médica, mas também na agrícola. Trabalhos nessas áreas apontam os peptídeos e proteínas antimicrobianas, cujos mecanismos de ação não apresentam qualquer semelhança com os antifúngicos tradicionais, como uma futura fonte de antibióticos devido à notórias vantagens como simplicidade molecular, amplo espectro de ação e ausência de mecanismos de resistência (Rotem S. e Mor A., 2009).

Duas proteínas antimicrobianas *Rs-AFP2* e *heliomicin* (obtidas de rabanete e mariposa, respectivamente) apresentam atividade tóxica “*in vitro*” para fungos, mas não para células de mamíferos, sendo apontadas como moléculas promissoras a serem aperfeiçoadas para uso terapêutico (Thevissem K. 2007). Adicionalmente foi mostrado que a proteína *Rs-AFP2* reduz o número de unidades formadoras de colônias de *Candida albicans* nos rins de camundongos infectados por via intravenosa com este microrganismo (Tavares P. M. e cols., 2008). Sem dúvida para a utilização dessas e de outras proteínas devemos avançar na pesquisa básica visando identificar com maior precisão, os seus alvos de ação, bem como, na pesquisa aplicada com a proposição de testes pré-clínicos e clínicos, que certamente serão realizados nos próximos anos.

1.3 Proteínas Antimicrobianas

Proteínas de defesa contra microrganismos invasores estão presentes em todos os reinos da natureza constituindo uma forma de defesa inata muito eficiente, visto que tal sistema foi mantido com poucas alterações até os dias de hoje. Nos Reinos Animal e Vegetal existe uma ampla distribuição dessas proteínas, sugerindo que estas possuam um papel de importância fundamental no sucesso evolutivo de organismos multicelulares complexos. Em seres superiores, encontram-se principalmente nos locais

mais propícios à invasão por patógenos (como mucosas de humanos e raízes ou folhas de plantas), combatendo diretamente ou trabalhando em conjunto com outros efetores do sistema de defesa, a fim de conter logo nos estágios iniciais uma possível infecção (Grayer e Kokubun, 2001).

Considerando a quantidade e a diversidade das proteínas antimicrobianas, podemos categorizá-las com base em suas estruturas secundárias. Um princípio geral para todas as classes é a capacidade destas moléculas em adotar uma conformação que apresenta regiões hidrofóbicas e catiônicas espacialmente organizadas em discretos segmentos da molécula (Epand, R. M. e Vogel, H. J., 1999). Proteínas lineares com no máximo 25 aminoácidos, como a magainina (isolada de pele de sapo *Xenopus laevis*) possuem somente atividade ao adotarem uma estrutura em α -hélice, mesma estrutura apresentada por elas quando estão inseridas na membrana do microrganismo alvo (Zasloff M., 1987). Proteínas com uma ou duas pontes de dissulfeto, como a protegrin-1 (isolada de neutrófilo de porco) possuem diversidade de tamanho (de 10 a 35 aminoácidos), porém mantêm a característica de proteínas catiônicas com atividade antimicrobiana. Possuem, ainda, estrutura em folha- β e seu mecanismo de ação, assim como para as proteínas lineares, se concretiza através da formação de poros na membrana do microrganismo (Jang H. e cols., 2007). As proteínas que apresentam em sua estrutura três ou quatro pontes dissulfeto englobam várias classes de proteínas, com atividades complexas como, por exemplo, atividade antimicrobiana, inibidores de proteases, antiviral, hemolítica, inibidores de canais, entre outros. Uma classe de proteínas, as defensinas, tem especial interesse para esta tese. As defensinas são proteínas que possuem uma estrutura que consiste em uma α -hélice e uma folha- β anti-paralela relativamente rígida, mantida pela presença de pontes dissulfeto. Em algumas estruturas apresentam somente a folha- β anti-paralela. Em sua estrutura terciária,

apresentam regiões com grupos de aminoácidos hidrofóbicos e catiônicos segregados e bem organizados (Bruix e cols., 1993; Fant e cols., 1998, 1999; Almeida e cols, 2002).

1.4. As defensinas

Este grupo de proteínas apresenta, como dito anteriormente, características em comum, como massa molecular de aproximadamente 5 kDa e presença de pontes dissulfeto, importantes para sua atividade biológica. Apresentam, também, regiões bem definidas com motivos positivos e hidrofóbicos caracterizando-as como proteínas básicas (Osborn e cols., 1995; Broekaert e cols., 1995; Segura e cols., 1998; Almeida e cols., 2002, Janssen e cols., 2003, e Lin Y. J. e cols., 2006). Como ilustrado na FIGURA 1.5, as defensinas possuem uma estrutura tridimensional característica desse grupo, composta de uma α -hélice e uma folha- β ou somente folha- β , dispostas no padrão conservado de fita- β / α -hélice/ fita- β / fita- β (Landon C. e cols.,1997).

A atividade antimicrobiana dessa classe de proteínas é o principal ponto de divergência entre as defensinas de plantas e as de mamíferos e insetos. As proteínas HBD-2 (β -Defensin 2 humana) e cecropina (defensina de inseto) possuem atividade antibacteriana e antifúngica. Outras, como a drosomicina (defensina de inseto), possuem somente atividade antifúngica (Landon e cols., 2000). As defensinas de plantas possuem atividade antifúngica e serão abordadas mais a frente. As defensinas de mamíferos são proteínas que possuem três pontes dissulfetos que estabilizam três fitas- β anti-paralelas e uma pequena α -hélice para as β -defensinas (α -defensinas não apresentam α -hélice). As defensinas de mamíferos diferem ainda no pareamento das pontes dissulfetos, sendo a sequência ordinal das cisteínas para α -defensinas 1^a CISTEÍNA - 6^a CISTEÍNA, 2^a CISTEÍNA - 4^a CISTEÍNA e 3^a CISTEÍNA - 5^a CISTEÍNA e para β -defensinas a ordem

é 1^a CISTEÍNA - 5^a CISTEÍNA, 2^a CISTEÍNA - 4^a CISTEÍNA e 3^a CISTEÍNA - 6^a CISTEÍNA (Sawai e cols., 2001).

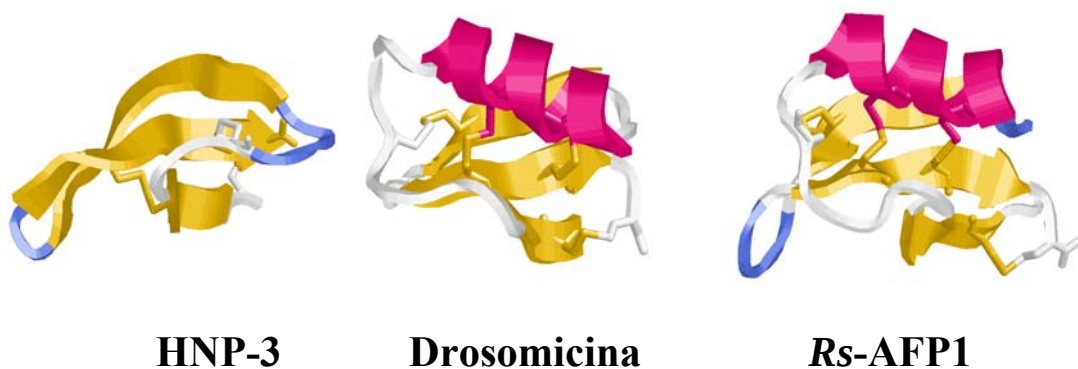


Figura 1.5: Representação da estruturas tridimensionais das defensinas HNP-3 (*Homo sapiens*, neutrófilo humano), Drosomicina (*Drosophila melanogaster*, drosófila) e Rs-AFP1 (*Raphanus sativus*, rabanete) obtidas por NMR. As fitas- β antiparalelas estão representadas por fitas amarelas, com cabeças de seta, enquanto as α -hélices são representadas por fitas espiraladas vermelhas; as voltas- β estão coloridas de azul; em branco são as regiões sem estrutura definida, chamadas de alças; as pontes dissulfeto estão representadas na forma de bastões Estruturas tridimensionais extraídas do banco de dados PDB, com os códigos PDB ID: 1DFN (HNP-3), 1MYN (Drosomicina) e 1AYJ (Rs-AFP1).

As defensinas de mamíferos são descritas como agentes que atuam diretamente na membrana plasmática alvo, porém acredita-se que essa não deva ser o seu único alvo de ação. Como geralmente 50 % ou mais dos seus resíduos são hidrofóbicos, em conjunto com os também abundantes resíduos básicos, as interações das proteínas desta família com a membrana bacteriana se refletem nas suas atividades biológicas. Inicialmente, as defensinas de mamíferos interagem com LPSs (lipopolissacarídeos) polianiónicos para posterior destruição da camada externa da membrana plasmática. O próximo passo é uma associação dessas proteínas com fosfolipídios de carga negativa e inserção para dentro da membrana, onde se reorientam paralelamente a esta. Após atingirem uma concentração crítica, essas proteínas são capazes de formar canais

transmembranares, chamados poros (FIGURA 1.6), tratando-se de complexos de proteína/lípido supramoleculares (Matsuzaki e cols., 1998; Jenssen H. e cols., 2006).

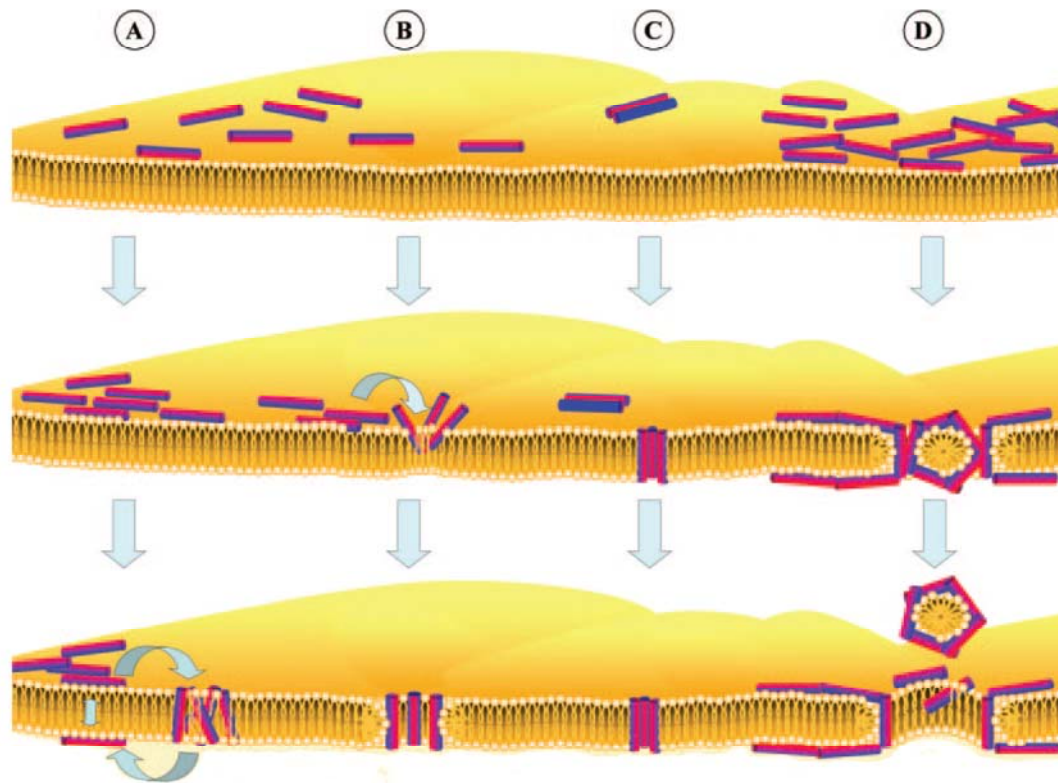


Figura 1.6: Os mecanismos de ação de proteínas antibacterianas. A membrana bacteriana é representada como uma bicamada lipídica amarela com as proteínas representadas como cilindros, em que as regiões hidrofílicas estão em vermelho e as regiões hidrofóbicas estão em azul. Os modelos que explicam os mecanismos de permeabilização de membrana são indicados (A a D). No modelo "A", as proteínas são reorientadas na membrana como um agregado formando complexos similares a micelas de proteínas e lipídios, mas sem adotar qualquer orientação particular nem poro. No entanto, as proteínas conseguem acesso a superfície interna da bicamada, de onde podem continuar agindo na membrana ou ligar-se a alvos intracelulares. O modelo "B" propõe uma reorientação perpendicular ao plano da bicamada lipídica com as regiões hidrofílicas da proteína associadas com os grupos de cabeça do fosfolípido, enquanto as regiões hidrofóbicas associam-se com a calda do lipídio. Neste processo, a membrana curva-se para dentro tal forma que a bicamada também forra o poro. No modelo "C", as proteínas em uma orientação perpendicular ao plano da bicamada, com as regiões hidrofílicas da proteína voltadas para o lúmen do poro e as regiões hidrofóbicas interagindo com os lipídios da bicamada. Note-se nesse modelo que o diâmetro do poro é bem inferior ao apresentado o modelo "B". O modelo "D" propõe o agregado de proteínas paralelamente a bicamada até que em uma determinada concentração dada, chamada de limiar, ocorre a ação similar a detergente causando formação de micelas e poros na membrana. Adaptado de Jenssen H. e cols., 2006.

Além da atividade antibacteriana direta, alguns autores acreditam que as defensinas de mamíferos estejam envolvidas na sinalização de citocinas e mediação de resposta imunológica baseados em: (a) HBD-2 tem sua expressão fortemente induzida em queratinócitos após contato destes com bactéria Gram (+) ou por citocinas pró-inflamatórias como Fator de Necrose Tumoral (TNF)- α ou IL-1 β ; (b) HBD-2 é capaz de se ligar a LPS solúvel e assim antagonizar a habilidade do LPS de estimular a produção de citocinas em macrófagos (por exemplo, TNF- α , e assim diminuir o estímulo a sepsis); (c) outras defensinas de mamíferos foram descritas com capacidade de recrutar células T e aumentar a quimiotaxia de monócitos (Sawai e cols., 2001). Todas essas atividades, entre outras não citadas, são objeto de estudo de vários grupos de pesquisa.

1.5. Defensinas de plantas

1.5.1. Estrutura tridimensional

As defensinas isoladas de plantas compreendem um grupo de proteínas antimicrobianas de 45-54 aminoácidos, ricas em cisteínas utilizadas na formação de quatro pontes dissulfeto (não três como as de mamíferos). A importância das pontes dissulfeto para a organização estrutural das defensinas é indicada pelo fato de que as mesmas perdem sua atividade quando as cisteínas encontram-se reduzidas (Terras e cols., 1992).

O nome dado a essa família de proteínas decorre da similaridade estrutural e funcional dessas com as defensinas isoladas de mamíferos e de insetos. Apesar da similaridade de estrutura secundária e terciária, as defensinas de plantas não apresentam similaridade significativa de sequência primária de aminoácidos com as defensinas de mamíferos e inseto (Thomma e cols., 2002; Antcheva N. e col. 2009).

As defensinas de plantas possuem poucos aminoácidos altamente conservados entre si, porém uma identidade bem mais alta pode ser notada entre alguns membros dessa família de peptídeos antimicrobianos. Com base nesse fato, Terras e colaboradores propuseram a subclassificação das defensinas de plantas em pelo menos três grupos distintos (Terras e cols., 1992, 1993; Broekaert e cols., 1995). Apesar dessa subclassificação, a defensina *Psd1* isolada de semente de ervilha não possui identidade de sequência primária suficiente com os membros dos grupos I, II ou III, o que levantou a possibilidade de existirem defensinas que poderiam ser classificadas em grupos distintos (Almeida e cols., 2000). As proteínas são agrupadas conforme atividade antifúngica e atividade inibidora de α -amilase, como será descrito no tópico 1.5.2 sobre atividades das defensinas de plantas.

As defensinas de plantas da figura abaixo (FIGURA 1.7) tiveram suas estruturas tridimensionais determinadas por espectroscopia de ressonância magnética nuclear (NMR). São elas: *Rs-AFP1* de *Raphanus sativus* (Fant e cols., 1998), *Ah-AMP1* de *Aesculus hippocastanum* (Fant e cols., 1999), gamma 1-hordothionin de *Hordeum vulgare* (Bruix e cols., 1993), gamma 1-purothionin de *Triticum aestivum* (Bruix e cols., 1993), *Psd1* de *Pisum sativum* (Almeida M. S. e cols., 2002), *PhD1* de *Petunia hybrida* (Janssen e cols., 2003), *NaD1* de *Nicotiana glauca* (Lay F, T. e cols., 2003), *VrD1* de *Vigna radiata* (Lin Y. J. e cols., 2006) e *VrD2* de *Vigna radiata* (Lin K. F. e cols., 2007). Todas elas, com exceção da proteína *PhD1*, possuem estruturas altamente homólogas, em que um segmento Cys-X-X-X-Cys na α -hélice conecta-se através de duas pontes dissulfeto ao segmento Cys-X-Cys na terceira fita- β . Tal padrão estrutural é conhecido como α -hélice estabilizada por cisteínas e também é encontrado nas defensinas de insetos e neurotoxinas de veneno de escorpiões (Kobayashi e cols., 1991).

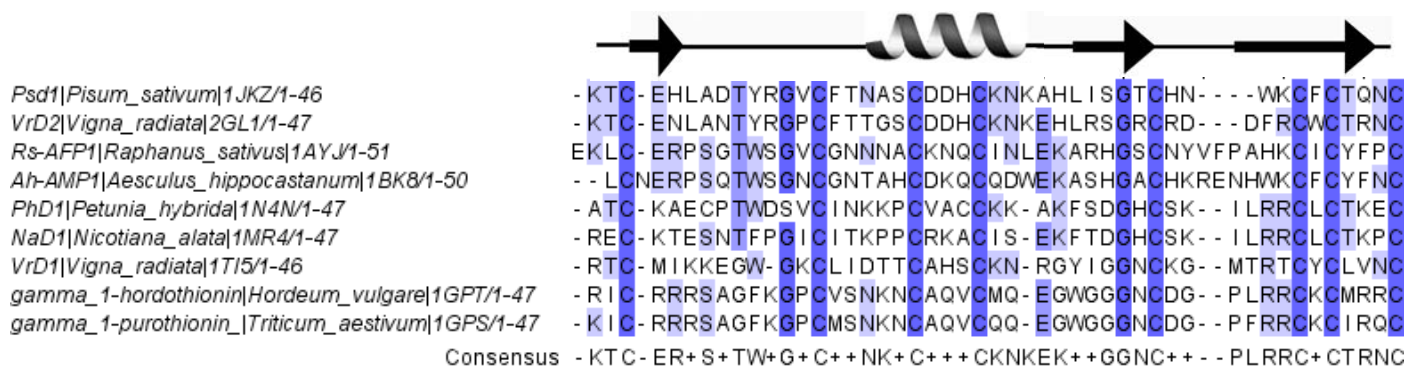


Figura 1.7: Alinhamento da sequência primária de algumas defensinas isoladas de várias espécies de plantas com estrutura tridimensional determinada. Os resíduos conservados em todas as defensinas descritas nesta figura estão em azul escuro. Os resíduos semi-conservados aparecem em azul claro. Os resíduos de aminoácidos mais conservados são mostrados na última linha da figura (consensus). A numeração apresentada está relacionada com a sequência da proteína *Rs-AFP1*.

Além desse padrão estrutural em comum, em todas as estruturas a alça 1 (após a primeira fita- β e antes da α -hélice) é conectada através de uma ponte dissulfeto ao final da segunda fita- β , e a primeira fita- β é conectada por uma ponte dissulfeto entre a primeira e a última cisteína (resíduo C-terminal destas proteínas), com a terceira e última fita- β . A defensina *PhD1*, isolada de Petúnia, possui uma ponte dissulfeto a mais que liga a primeira alça a α -hélice (totalizando cinco pontes dissulfeto), porém essa ponte dissulfeto adicional, aparentemente, não causa alteração alguma de estrutura terciária com respeito às outras defensinas (Janssen e cols., 2003). Esta proteína também não possui um resíduo de glicina na alça 1, o que também não é comum às defensinas de plantas.

1.5.2. Atividade biológica

Grande parte das defensinas isoladas de plantas, entre elas todas as defensinas pertencentes ao grupo I e II, apresentam atividade antifúngica em concentrações micromolares (Terras e cols., 1992, 1993; Broekaert e cols., 1995; Osborn e cols., 1995). Outras possuem alta atividade antibacteriana além de serem antifúngicas, como

as isoladas de semente de espinafre *Spinacia oleracea* (Segura e cols., 1998) ou então são capazes de inibir a enzima α -amilase de insetos sem, no entanto, apresentarem atividade antifúngica, o que as inclui no grupo III (revisão de Broekaert e cols., 1995). A distinção em relação à atividade das defensinas do grupo I e II se baseia na observação microscópica do fungo *Fusarium culmorum* incubado na presença dessas proteínas. Quando esse fungo é inibido por defensinas pertencentes ao grupo I, há um aumento acentuado da ramificação das suas hifas, enquanto que as defensinas do grupo II são incapazes de induzir tal alteração morfológica. Essa definição, apesar de simplista, é adotada por alguns autores até hoje (Aerts A. M. e cols., 2008), porque permitiu o agrupamento de proteínas que apresentaram certa identidade de sequência de aminoácidos em algumas regiões da proteína.

Assim como para as defensinas de insetos e mamíferos, a atividade antifúngica e antibacteriana das defensinas de plantas é alterada, na maioria das vezes, na presença de cátions. Nesses casos, que dependem não só do tipo de defensina, mas também do tipo de organismo-alvo, as defensinas de plantas apresentam sua potência antifúngica reduzida em aproximadamente 100 vezes, quando o meio de cultura onde se realiza o ensaio de atividade antifúngica é suplementado com CaCl_2 1 mM ou KCl 50 mM (Terras e cols., 1992, 1993; 1995; Osborn e cols., 1995; Almeida M. S. e cols., 2000). Essa diminuição da atividade antifúngica causada pelo aumento da força iônica é um indício da possível interação das defensinas de plantas com receptor (es) específico(s) presente(s) na membrana ou parede celular dos fungos. A alta afinidade de ligação das defensinas [^{35}S]Hs-AFP1 (isolada de *Heuchera sanguinea*) e [^{35}S]Dm-AMP1 (isolada de *Dahlia merckii*) tanto em hifas como em uma preparação bruta de membrana de *Neurospora crassa* (KD~ 28 nM) apontam nesta direção.

As defensinas capazes de inibir o crescimento de *N. crassa* como *Ct*-AMP1 (*Clitoria ternatea*), *Rs*-AFP2 (*Raphanus sativus*), *Dm*-AMP1 (*Dahlia merckii*), *Ah*-AMP1 (*Aesculus hippocastanum*) e a própria *Hs*-AMP1 (*Heuchera sanguinea*) competem com a ligação das [³⁵S]*Hs*-AFP1 e [³⁵S]*Dm*-AMP1, porém deslocam parcialmente a ligação destas defensinas marcadas com radioisótopos. Acredita-se que o principal efeito responsável pela inibição do crescimento do fungo pelas defensinas é a permeabilização da membrana desses microrganismos, porém essa permeabilização pode apresentar duas características distintas dependendo da concentração de defensina.

As defensinas (*Dm*-AMP1, *Hs*-AFP1 e *Rs*-AFP2), em concentrações acima de 10 µM (cerca de 100 vezes acima do IC₅₀), induzem permeabilização por toda hifa do fungo. Esse efeito pode ser detectado pelo extravasamento de [¹⁴C] ácido isoaminobutírico (composto que não é metabolizado pelo fungo) previamente incorporado ao citoplasma de *N. crassa* ou então pelo influxo de um corante hidrofílico (SYTOX GREEN) muito usado para investigar comprometimento da membrana celular e que se torna fluorescente após ligação com ácidos nucleicos (Thevissen e cols., 1996, 1999). Em concentrações necessárias para inibir o crescimento de *N. crassa* (acima de 80 nM), pelo menos duas defensinas, *Rs*-AFP2 e *Dm*-AMP1, induzem um aumento do fluxo iônico na membrana de *N. crassa*. Esse efeito é caracterizado por um influxo de Ca²⁺, efluxo de K⁺ e alcalinização do meio onde se incuba o fungo com as defensinas.

Foi descrito recentemente que a defensina *NaD1* isolada de tabaco é capaz de ligar-se à superfície celular ao longo da hifa do fungo *Fusarium oxysporum*. Após 1 hora de incubação do fungo com 2 µM *NaD1*, observou-se também a presença da proteína no citoplasma. Nessas condições, houve ainda a incorporação de SYTOX GREEN indicando um aumento da permeabilidade celular. Porém, essa permeabilidade é aparentemente seletiva por tamanho, uma vez que também foi observada a entrada de

moléculas de dextran de 4 kDa mas não de dextran de 10 kDa (van der Weerden N. L. 2008). Esta proteína, assim como *Rs*-AFP2, foi capaz de aumentar o número de espécies reativas de oxigênio, sugerindo uma ação no processo de morte celular.

Foi demonstrado por Lobo D. S. e colaboradores (2006) que a defensina de ervilha *Psd1* apresenta pelo menos um alvo intracelular. Os resultados apresentados neste trabalho serão abordados na seção 1.6.

A atividade antibactericida apresentada pelas defensinas de mamífero foi atribuída à quantidade e posicionamento na estrutura terciária de resíduos de aminoácidos positivos bem como às diferenças na composição entre membranas procarióticas e eucarióticas (a primeira apresenta uma membrana rica em fosfolipídios de carga negativa).

A atividade das defensinas de plantas foi descrita, principalmente, como antifúngica, sendo a atividade antibacteriana ou mesmo atividade contra células de plantas ou mamíferos muito pouco encontrada nessa classe de proteínas (Osborn, R. W. e cols., 1995; Fujimura M. e cols., 2005; Yokoyama S. e cols., 2008). Na tentativa de explicar essa atividade, a pesquisa de componentes de fungos que podem ser reconhecidos por defensinas revelou que alguns esfingolipídios, principalmente as glicosil ceramidas e as manose-(inositol-fosfato)₂-ceramida, presentes nas células de fungos são importantes para a atividade antifúngica.

Esfingolipídios, particularmente esfingomielina e glicosfingolipídios, encontrados predominantemente na camada externa da membrana plasmática são essenciais para a manutenção de células eucarióticas. Durante a síntese desses lipídeos, ocorre a formação de moléculas estruturalmente diferentes das encontradas nas células de mamíferos (ceramidas e seus derivados). Como descrito por Dickson R. C. e Lester L. R. (1999), todos os fungos estudados adicionam inositol fosfato a fitoceramida para

formar inositol-fosforilceramida (IPC), diferentemente das células de mamífero que não apresentam enzimas capazes de catalisar tal reação e sim transferir fosfocolina ou fosfatidilcolina à ceramida para formar o seu principal esfingolípido, a esfingomielina. Células de mamífero podem ainda adicionar glicose ou galactose a ceramida e uma posterior sulfatação destes leva a formação das mais complexas estruturas de glicosfingolípídios. Em fungos, outros tipos de esfingolípídios são encontrados, dentre eles a monohexosil ceramida (CMH) e a dihexosil ceramida (CDH) que se localizam predominantemente na membrana e parede celular. Também chamados de cerebrosídeos, são sintetizados a partir da união de uma ceramida com um hexosídeo pela ação da enzima glicosilceramida sintase (GCS), como vista na FIGURA 1.8. (Duarte e cols., 1998. Barreto-Bergter E. e cols., 2004).

Thevissen K. e colaboradores (2000) demonstraram que a ausência de um gene na via de síntese de inositol fosfoceramida (IPC) de *S. cerevisiae*, o *IPT1*, que codifica para a enzima IPC sintase que converte MIPC em M(IP)₂C, provoca praticamente perda total da atividade antifúngica das defensinas *Rs*-AFP1, *Rs*-AFP2, *Dm*-AMP1, *Ah*-AMP1 e *Ct*-AMP1. Posteriormente, esse mesmo grupo de pesquisadores demonstrou que a defensina *Rs*-AFP2 possui especificamente maior afinidade pelo glicolípido isolado de *Pichia pastoris* do que os isolados de células de humano e soja através de ensaio de ligação baseado no ELISA, em que os glicolípídios foram imobilizados na superfície do poço e para revelação foram utilizados anticorpo anti- *Rs*-AFP2 de coelho como anticorpo primário e anticorpo anti-imunoglobulina de coelho como secundário (Thevissen e cols., 2004).

Glicosfingolípídios são moléculas presentes na camada externa da membrana celular de fungos e a síntese é regulada durante o desenvolvimento. A administração exógena desses compostos induz a proliferação e diferenciação celular, sugerindo importante participação no desenvolvimento fúngico (Kasahara K. e cols., 2000, Barreto-Bergter E. e cols., 2004). Recentes estudos sugerem que lipídeos de membrana plasmática não são homogeneamente distribuídos podendo se localizar em microdomínios e/ou compartimentos. Esses microdomínios podem ser isolados em frações de baixa densidade após centrifugação em gradiente diferencial de sacarose e são insolúveis na presença de detergentes neutros. São frações ricas em glicosfingolípídios, colesterol, proteínas ligadas a glicosilfosfatidilinositol e mais uma variedade de moléculas sinalizadoras. Esses microdomínios, considerando sua constituição, indicam a presença de “lipid rafts” na membrana celular, que são envolvidos na transdução de sinal. (Kasahara K. e cols., 2000). Tudo indica que, esses “lipid rafts” funcionam como uma plataforma para associação dinâmica de moléculas de sinalização. A interação de defensinas com esfingolípídios, presentes nos “lipid rafts”, poderia explicar a inibição de crescimento e sobretudo diferenciação.

1.6. A defensina Psd1

Nosso grupo de pesquisa isolou duas proteínas de sementes de ervilha *Pisum sativum*. Estas proteínas foram selecionadas através de suas atividades antifúngicas e após terem sido purificadas, seqüenciadas e comparadas com aquelas depositadas nos principais bancos de dados, mostraram as mesmas características das defensinas de plantas, sendo então denominadas de Psd1 e Psd2 (*Pisum sativum* defensina 1 e *Pisum sativum* defensina 2, respectivamente). Análises de imunohistoquímica mostraram que

as mesmas se encontram predominantemente localizadas em feixes vasculares e epiderme de vagens de ervilha, ressaltando seu papel de proteção contra invasões por microrganismos (Almeida e cols., 2000).

A defensina *Psd1* é composta por 46 resíduos de aminoácidos (FIGURA 1.9), apresentando um largo espectro de atividade antifúngica sem, no entanto, apresentar atividade contra diversas bactérias por nós testadas. Ela é capaz de inibir fungos com concentrações necessárias para inibir 50 % do crescimento fúngico (IC_{50}) abaixo de 5 μ M (TABELA 1.5). Como as demais defensinas de plantas, *Psd1* possui quatro pontes de dissulfeto, entre as cisteínas Cys3-Cys46, Cys14-Cys35, Cys20-Cys40 e Cys24-Cys42 (FIGURA 1.9), que são importantes para sua atividade biológica (Almeida e cols., 2000).

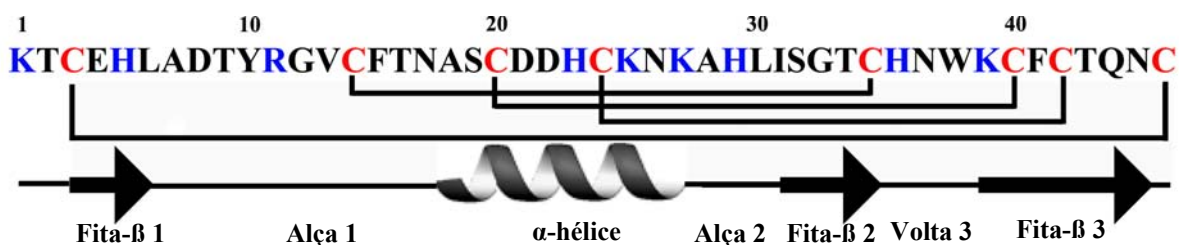


Figura 1.9: Sequência da defensina *Psd1* isolada de semente de ervilha. Em vermelho as cisteínas conservadas com o padrão de pontes de sulfeto representado pelas linhas abaixo da sequência. Em azul os aminoácidos básicos. Desenho representativo das estruturas secundárias presentes em *Psd1* determinadas por NMR.

Tabela 1.5: Espectro de ação das proteínas *Psd1* e *Psd2* contra diversos microrganismos.

Microrganismos	<i>Psd1</i>	<i>Psd2</i>
	IC ₅₀ (μM)	IC ₅₀ (μM)
<i>Aspergillus niger</i>	2,3	1,9
<i>Aspergillus versicolor</i>	< 0,1	0,06
<i>Fusarium moniliforme</i>	4,2	1,9
<i>Fusarium oxysporum</i>	>19,2	> 18,5
<i>Fusarium solani</i>	2,3	1,6
<i>Fusarium subglutinans Fsp ananas</i>	5,1	NT
<i>Neurospora crassa</i>	0,01	< 0,09
<i>Colletotricum gloesporioides</i>	0,67	NT
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	> 19,2	< 18,5
<i>Sacchamyses cereviseae</i>	>19,2	< 18,5
<i>Pseudomonas syringae</i>	> 38,5	> 37,0
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	> 38,5	> 37,0
<i>Rhizobium leguminosarum</i> BR619	NT*	> 37,0
<i>Rhizobium leguminosarum</i> BR10062	NT	>37,0

IC₅₀ é a concentração necessária para inibir 50 % do crescimento microbiano em relação ao controle sem antifúngico. NT – não testado.

A elucidação da estrutura tridimensional da *Psd1* por ressonância magnética nuclear ¹H bidimensional permitiu uma melhor comparação dessa proteína com as demais defensinas com estruturas já resolvidas (FIGURA 1.10). As 20 possíveis soluções para a estrutura a partir dos parâmetros de restrição utilizados indicam que as

regiões de fitas- β anti-paralelas (3) e α -hélice (1) como bem definidas. Porém, a região N- e C-terminal e a região da alça 1 e da volta 3 são bem menos definidas, indicado pela baixa sobreposição destas regiões nas 20 estruturas de menor energia.

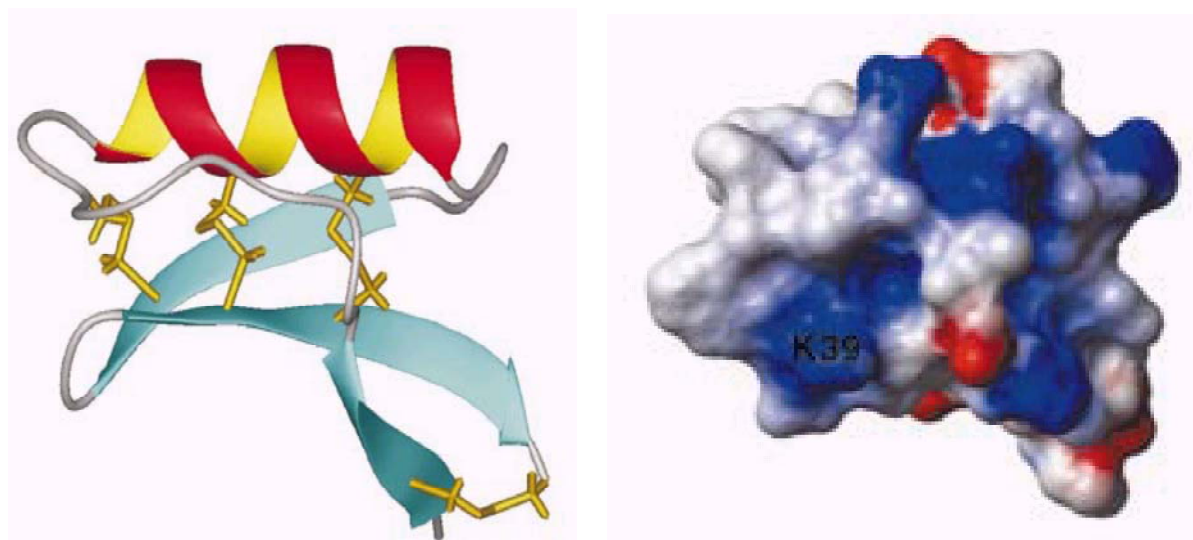


Figura 1.10: Estrutura tridimensional da *Psd1* nas formas de (A) fita e (B) superfície com potencial eletrostático. Em (A), as setas azuis simbolizam a folha- β tripla e a espiral vermelha a estrutura em α -hélice. As ligações dissulfeto são representadas na forma de esqueleto em amarelo. Em (B), as regiões em branco são de aminoácidos com cadeia lateral neutra, em azul com cadeia lateral básica e em vermelho com cadeia lateral ácida (Almeida e cols., 2002).

O motivo α/β (três fitas- β anti-paralelas e uma α -hélice) e o potencial eletrostático de superfície (regiões positivas e neutras) como visto na figura 1.8, são as principais características conservadas na classe de defensinas de plantas. Porém a baixa homologia de sequência primária entre as proteínas com estrutura tridimensional resolvida (FIGURA 1.7) não ajuda muito na determinação do componente do fungo que serve como alvo para o mecanismo de ação da defensina *Psd1*.

O gene da defensina *Psd1* madura foi clonado a partir de RNA de semente de ervilha e a proteína foi expressa heterologicamente na levedura metilotrófica *Pichia pastoris*. A proteína recombinante obtida possui estrutura compatível com a nativa, como demonstrado por comparações através das espectroscopias de dicroísmo circular e

ressonância magnética nuclear (Cabral K. M. S. e cols., 2003). A obtenção da proteína de forma heteróloga facilitou o uso da ressonância magnética nuclear por permitir o enriquecimento da proteína com isótopos como ^{15}N , estratégia que será utilizada nesta tese.

O mecanismo de ação da defensina *Psd1* ainda não está claro, mas nossos dados mais recentes vão de encontro a esse objetivo. Lobo D. S. e colaboradores (2006) mostraram a presença da *Psd1* marcada com fluoróforo FITC no citoplasma de hifas intactas do fungo *Fusarium solani* após incubação deste com *Psd1* por até 5 horas. Micrografias dessa cultura mostraram que *Psd1*-FITC se encontra no núcleo, uma vez que foi possível demonstrar sua co-localização junto ao marcador nuclear DAPI, sugerindo a presença de um alvo nuclear (FIGURA 1.11).

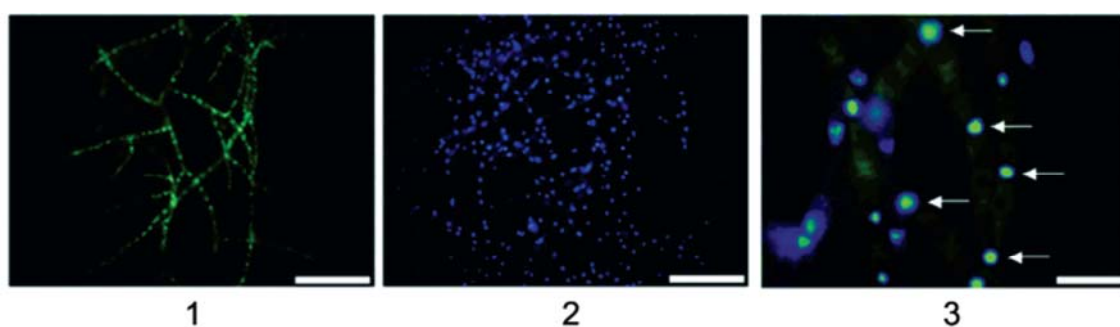


Figura 1.11: Análise de microscopia de fluorescência de *Psd1* conjugada com FITC e núcleo marcado com DAPI. Hifas de *Fusarium solani* foram incubadas por 5 horas com *Psd1* conjugada com FITC (fluorescência verde, painel 1). Após esse período de incubação, o núcleo foi marcado com DAPI (fluorescência azul, painel 2). No painel 3, a sobreposição do painel 1 sobre o painel 2. As setas brancas indicam co-localização de *Psd1* e núcleo. Barras brancas representam 50 μm no painel 1 e 2, e 10 μm no painel 3.

Ensaio de duplo-híbrido mostraram a interação de *Psd1* com ciclina F, uma proteína que participa na regulação do ciclo celular de alguns fungos, e nesse trabalho foi realizado contra uma biblioteca de cDNA de *Neurospora crassa*, interação depois confirmada por ensaio de GST “pull-down”.

Através de citometria de fluxo, observamos que *Psd1* foi capaz de interferir na divisão nuclear de conídios de *Neurospora crassa* afetando o ciclo celular, muito

possivelmente, através da interação com ciclina F (Lobo D. S. e cols., 2007). Esse trabalho foi e ainda é muito importante, porque abriu uma nova perspectiva sobre o mecanismo de ação de *Psd1* e de outras defensinas de plantas, levando outros grupos a também trabalharem nesta linha (van der Weerden N. L. e cols., 2008; Aerts A. M. e cols., 2009)

Outra contribuição no sentido de esclarecer o mecanismo de ação foi a determinação da dinâmica da *Psd1* em solução (FIGURA 1 – Parte II, Medeiros L. N. e cols., 2009). Esse trabalho, em que foi possível mapear as regiões de *Psd1* que apresentavam mobilidade interna, foi crucial para o direcionamento dos demais experimentos realizados nesta tese.

A detecção de proteínas apresentando variações conformacionais levou a uma nova visão da relação entre estrutura e função das mesmas, em que a diversidade conformacional fornece um mecanismo para controlar a ativação de proteínas e permitir multi-funcionalidade. (James L. C. and Tawfik D. S., 2003).

Tipicamente, há movimentos coletivos de maior amplitude entre o número relativamente pequeno de estados possíveis. A proteína não se encontra estática dentro de um desses estados; em vez disso, flutua ao redor da estrutura média num período de tempo mais rápido, explorando um conjunto grande de estruturas proximamente relacionadas. Dinâmicas em escalas de tempo “lentas” definem flutuações entre estados cineticamente distintos que são separados por barreiras de energia de vários kT (o produto da constante de Boltzmann e a temperatura absoluta, ou ainda, $1,38 \times 10^{-23} \text{ J/K} \times K$), correspondendo a períodos de tempo de iguais ou menores que microssegundos. As dinâmicas nesses períodos de tempo receberam muita atenção recentemente, porque muitos processos biológicos — inclusive catálises de enzima, transdução de sinal e

interações de proteína com proteína — ocorrem nesse período de tempo (Henzler-Wildman K and Kern D., 2007).

Experimentos de velocidade de relaxação (R1 e R2) e NOE - heteronuclear de *Psd1* em solução foram utilizados no presente trabalho a fim de determinar a variabilidade conformacional na escala de tempo de mili a microssegundos de acordo com o formalismo livre do modelo descrito por Lipari-Szabo (Lipari G. e Szabo A., 1982). O parâmetro Rex (taxa de troca conformacional) indica a variabilidade conformacional, onde valores positivos de Rex estão relacionados com uma maior troca conformacional. Os resíduos Arg11, Val13, Cys14, Phe15 e Asn17 presentes na alça 1 e Cys35 e His36 presentes na volta 3 apresentam valores significativamente altos (entre 5 e 12) para Rex, comparados com a média desse parâmetro para a proteína (2,5), significando que esses resíduos realizam mudanças conformacionais na escala de μ s a ms (FIGURA 1B, PARTE II da tese). A estrutura tridimensional da proteína evidenciou uma proximidade espacial entre essas duas regiões (FIGURA 1.10). Esses resultados nos fizeram vislumbrar um possível sítio de ativo ou de interação em *Psd1*. A partir daqui, o trabalho foi direcionado para a procura de possíveis ligantes no fungo. Diversos lipídeos de fungos foram descritos como diretamente responsáveis pela atividade de defensinas de plantas, uma vez que, na ausência deles, as proteínas tinham seu potencial antifúngico perdido ou diminuído (Thevissen K. e cols., 2000; Ferket K. K. A. e cols., 2003; Thevissen K. e cols., 2005; Park C. e cols. 2005). Corroborando essa hipótese, duas defensinas, uma de planta (*Rs*-AFP2) e uma de inseto (hemolicidin), apresentaram uma capacidade de ligação maior a glicolipídios de *Pichia pastoris* do que a humana, como descrito anteriormente (Thevissen e cols., 2004). Esses resultados indicam que determinados lipídeos de fungos, estruturalmente diferentes dos encontrados nas células

de mamíferos, podem ser um componente importante para atividade biológica das defensinas, incluindo *Psd1*.

Nesta tese temos então como objetivo principal descrever a interação da defensina *Psd1* com o monohexosil ceramida (CMH) isolado do fungo *Fusarium solani*, importante patógeno da planta *Pisum sativum*, e sua contribuição na sensibilidade do fungo a *Psd1*. Também pretendemos correlacionar as regiões de mudanças conformacionais presentes na alça 1 e na volta 3 na interação com CMH, bem como com a atividade biológica desta proteína.

2. Objetivos

Parte I

Interação da defensina *Psd1* com vesículas multilamelares (MLV), contendo ou não uma glicoceramida isolada de *Fusarium solani* (monohexosil ceramida - CMH), capazes de mimetizar uma membrana biológica utilizando para esse fim a sonda radioativa fotoativada [125 I] TID-PC.

Parte II

Avaliação da interação de *Psd1* com grandes vesículas unilamelares (LUV) contendo ou não CMH por Ressonância Magnética Nuclear (NMR) e mapeamento dos resíduos de aminoácidos de *Psd1* responsáveis por esta interação.

Parte III

Comparação da afinidade de *Psd1* a pequenas vesículas unilamelares (SUV) compostas de PC, de PC:CMH e de CMH por Ressonância Plasmônica de superfície (SPR).

Avaliação da importância dos resíduos de glicina na posição 12 e histidina na posição 36 de *Psd1* na interação com CMH por SPR bem como para sua atividade biológica.

.

3. Parte I

Interação da defensina Psd1 com vesículas multilamelares (MLV), contendo ou não uma glicoceramida isolada de *Fusarium solani* (monohexosil ceramida - CMH), capazes de mimetizar uma membrana biológica utilizando para esse fim a sonda radioativa fotoativada [¹²⁵I] TID-PC.

Em 2006 nosso grupo divulgou a interação entre a defensina Psd1 e um alvo intracelular, a ciclina-F de *Neurospora crassa* nos levando a sugerir um novo modelo de ação para a defensina Psd1, que talvez se aplique a maioria das defensinas de plantas, onde a interação do peptídeo com a membrana plasmática de alvos fúngicos leva a posterior internalização da mesma. Uma vez no citoplasma, esta é direcionada ao núcleo impedindo o progresso do ciclo celular da fase S para a fase G2, possivelmente devido à sua interação com a ciclina F (Lobo et al., 2006). Recentemente, Van der Weerden descreveu que a defensina NaD1, também é internalizada por *Fusarium oxysporum*, reforçando nossos achados prévios (van der Weerden N. L. 2008).

Apesar da descrição da interação de Psd1 com este alvo intracelular, seu mecanismo de entrada ainda é pouco conhecido. Para melhor explorar este fenômeno, experimentos com a sonda radioativa fotoativada [¹²⁵I] TID-PC foram realizados na presença de Psd1. **A sonda** é capaz de se orientar na membrana como os demais lipídeos de forma a posicionar a estrutura fotoativável (TID) no interior da bicamada. Como a sonda, após ativação com luz UV, liga-se a moléculas nas proximidades do TID acreditamos ser esta uma boa ferramenta para detectar a inserção ou não dessa proteína a vesículas multilamelares (MLV), contendo PC ou PC:CMH, uma monohexosilceramida (CMH) fungo específica, o que será explorado a seguir. Os experimentos desta seção foram realizados em colaboração com o Dr. José Maria Delfino do Departamento de Química Biológica e Instituto de Bioquímica e Biofísica da Universidade de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina.

3.1. Materiais e métodos

3.1.1. Expressão da proteína recombinante *Psd1* (r*Psd1*) em levedura *Pichia pastoris*.

Uma colônia de *Pichia pastoris* (GS115/*Psd1*) previamente crescida em placa de Petri em meio MD (Minimal dextrose: YNB sem aminoácidos 1,34 %, biotina $4 \cdot 10^{-5}$ % e dextrose 1%) foi cultivada em 5 mL (frasco de 50 mL) de meio BMG (tampão fosfato de potássio 100 mM pH 6,0, YNB sem aminoácido 1,34%, biotina $4 \cdot 10^{-5}$ % e glicerol 1%) por aproximadamente 18 horas a 30° C com agitação constante. Esta cultura foi transferida para 600 mL (frasco de 2 L) de meio BMG pH 6,0 e cultivada a 30° C com agitação constante (180 RPM) até atingir absorvância entre 6,0 e 10,0 a 600 nm para obtenção de uma grande massa de células. Após atingir a absorvância esperada, a cultura foi centrifugada (2.800 g por 10 min) e a massa de células ressuspensa em 100 mL (frasco de 500 mL) de meio BBS metanol (tampão fosfato de potássio 100 mM pH 6,0, cloreto de amônia (NH₄Cl) 4 g/L, biotina $4 \cdot 10^{-5}$ %, CaCl₂ 0,68 mM, NaCl 1,7 mM, solução 2 M de Mg⁺⁺ 0,1 %, suplementado com metanol para concentração final de 0,7 %). Para obtenção da proteína *Psd1* marcada com o isótopo ¹⁵N foi acrescentado ao meio BBS 4 g/L de ¹⁵NH₄Cl. A indução da síntese da proteína foi mantida pela adição de 0,7 % de metanol a cada 24 horas até um total de 120 horas.

3.1.2. Purificação da proteína *Psd1* da cultura de expressão de *Pichia pastoris*

Após o término da expressão, o meio de cultura contendo as células foi centrifugado e o sobrenadante, contendo a proteína *Psd1*, diluído em citrato de sódio 30 mM pH 3,0 na proporção de 1: 2 (concentração final de citrato igual a 20 mM). A purificação ocorreu através da interação das proteínas presentes na amostra com 50 mL

de resina de troca catiônica TOYOEARL SP 650M pré-equilibrada com 20 mM citrato de sódio pH 3,0 em duas passagens com fluxo constante de 1,5 mL/minuto. Posteriormente, A resina foi lavada com 50 mL de citrato de sódio 20 mM pH 3,0 e as proteínas eluídas com Tris-Cl 50 mM pH 7,5 com fluxo constante de 1,5 mL/minuto. A eluição foi acompanhada do recolhimento de frações com volume aproximado de 3 mL (120 gotas) e medida da absorvância de cada fração a 280 nm. Um pico único enriquecido da proteína de interesse é obtido, sendo que as frações correspondentes à proteína foram agrupadas e posteriormente aplicadas (5 mL) em uma coluna semipreparativa de fase reversa Vydac C8, previamente equilibrada com uma solução aquosa de TFA 0,1 % e acetonitrila 9 %, em sistema de HPLC. A proteína *Psd1* foi eluída com um gradiente linear de acetonitrila (9 % - 45 % v/v) em TFA 0,1% em 50 minutos. O fluxo foi de 4 mL/minuto e a absorvância monitorada a 214 nm e 280 nm. A fração correspondente a proteína foi coletada, seca sob vácuo e solubilizada em água Milli-Q.

3.1.3. Observação da ligação de *Psd1* em membranas artificiais através da sonda [¹²⁵I]TID-PC.

3.1.3.1. Iodinação da sonda com ¹²⁵I.

Todo o processo de iodinação foi realizado em temperatura ambiente e em sala escura. 3-(trifluorometil)-3-fenildiazirina-fosfatidilcolina (TID-PC) (Sigma) foi diluído em clorofórmio e o volume equivalente a 100 nmol foi transferido para um balão de fundo redondo de 125 mL. O clorofórmio foi removido por evaporação com nitrogênio gasoso e o material foi dissolvido em 10 mL de ácido acético puro. Em seguida, foi adicionado em torno de 5 mCi de Na¹²⁵I. Após solubilização do sal, a reação foi iniciada pela adição de 5 µL de ácido paracético. A reação ocorreu por 10 minutos e a

temperatura foi mantida em torno de 25° C com ajuda de um banho. Após este período, a reação foi interrompida com a adição de 100 µL de uma solução Na₂S₂O₅ 10 %. O [¹²⁵I] TID-PC (FIGURA 3.1) foi purificado através de extração utilizando 10 mL de uma mistura de clorofórmio:metanol (2:1, v/v). A sonda foi purificada em cromatografia utilizando como fase estacionária sílica e fase móvel uma mistura de clorofórmio:metanol:água:ácido acético (65:25:4:1) com eluição ocorrendo por gravidade. Foram recolhidas frações de aproximadamente 200 µL e 1 µL de cada fração foi aplicada em papel de filtração de aproximadamente 2 cm por 2 cm. A contagem por minuto (CPM) da radiação gama foi aferida para determinação das frações que contém a sonda marcada. Em paralelo foi realizada uma cromatografia de camada fina em sílica nas mesmas condições da purificação para observação do padrão de migração das amostras. Em uma mesma placa foram cromatografados TID-PC (não radioativo e visualizado através de impregnação com iodo sublimado por alguns minutos. As amostras eluídas foram autoradiografadas em filme impressionável. As frações 4 e 5 renderam um volume de 400 µL com uma contagem total de 2,6 x 10⁶ CPM total.

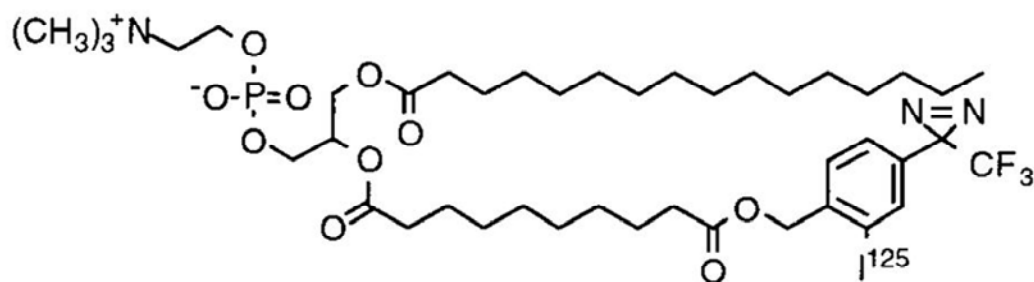


Figura 3.1: molécula de [¹²⁵I] TID-PC. Note que o TID possui um ¹²⁵I ligado ao anel benzênico, este emite radiação gama usada para detecção da proteína *Psdl* após sua ligação ao radical benzênico presente em TID-PC. A posição ocupada pelo [¹²⁵I] TID na molécula (cauda lipídica) só permitirá a marcação de proteínas que apresentem uma forte ligação com a membrana ou que sejam capazes de se incorporar a membrana de fato.

3.1.3.2. Ensaio de interação de *Psd1* com vesículas multilamelares (MLV).

A sonda [125 I] TID-PC foi adicionada a preparação de lipídeos contendo PC ou PC:CMH (9:1, M/M) em clorofórmio numa contagem próxima a 2×10^5 CPM de sonda (sempre ao abrigo da luz) e o clorofórmio removido pela adição de nitrogênio gasoso. O CMH isolado de *Fusarium solani* foi fornecido pela Profa Dra. Eliana Barreto Bergter do IMPPG-UFRJ (Duarte R. S. e cols., 1998). O CMH em pó foi ressuspenso para uma concentração final de 1mM em fosfato de sódio 5 mM pH 5,0. Os lipídeos foram misturados por 5 minutos por agitação em vortex e depois sonicados em banho por 30 minutos para clarificação da amostra lipídica. Após sonicação, a solução de lipídeos foi dividida em duas partes iguais chamadas aqui de: experimental – em que foi adicionada proteína *Psd1* para concentração final de 10 μ M; e controle – em que foi adicionado mesmo volume de fosfato de sódio 5mM pH 5,0. A amostra foi misturada por agitação em vortex por mais ou menos 5 segundos, incubada por 15 minutos em banho a 25° C e exposta à luz UV (comprimento de onda de 366 nm) por mais 15 minutos. Após este tempo, foi adicionado mesma quantidade de *Psd1* ao controle e ambas as amostras foram secas a vácuo com temperatura próxima a 4° C até secagem.

A sonda [125 I] TID-PC uma vez incorporada às membranas lipídicas artificiais é ativada através da luz UV formando um radical carbeno instável e muito reativo capaz de ligar-se covalentemente às proteínas, desde que estas estejam próximas à sonda na hora da formação do radical (FIGURA 3.2). A maior parte dos radicais formados reagem com água e são perdidos.

Como nesse caso, a sonda foi posicionada na molécula de TID-PC de forma a ocupar o interior da bicamada formada (figura 3.1), a ligação entre *Psdl* e TID-PC somente ocorrerá caso *Psdl* consiga interagir a ponto de acessar o interior da bicamada, seja porque interaja de forma suficientemente estável com a monocamada externa ou pela perturbação ou destruição da bicamada.

Cada amostra (experimental e controle) foi solubilizada em 30 µL de tampão de amostra (SDS 0,1 %, β-mercaptoetanol 20 % e azul de bromofenol 8 %), mantido em banho a 95° C por 5 minutos e aplicado em diferentes volumes (5 µL, 10 µL e 15 µL) em gel de gradiente 15 % - 20 % tricina-glicina com 0,1 % SDS. Os parâmetros para a corrida foram: 50 mA, 100 mV em câmara fria a 4° C por mais ou menos 4 horas. Foram aplicados também no gel 2 µg, 4 µg e 6 µg de albumina de soro bovino e padrão de peso molecular contendo as seguintes amostras: 6,5 kDa – aprotinina, 14,2 kDa – α-lactoalbumina de leite bovino, 20 kDa – inibidor de tripsina de soja, 24 kDa – tripsinogênio de pâncreas bovino, 29 kDa – anidrase carbônica de eritrócito bovino, 36 kDa – gliceroldeído-3-fosfato desidrogenase de músculo de coelho, 45 kDa – ovalbumina de ovo de galinha, 66 kDa – albumina de soro bovino, 97 kDa – fosforilase B de músculo de coelho, 116 kDa – β-galactosidade de *E. coli*, e 200 kDa – miosina de coração de porco. Posteriormente, o gel foi corado com comassie blue brilhante R250 por 18 horas e descorado com solução contendo metanol 40 % e ácido acético 10 %. Com uma boa visualização das bandas, o gel foi foto documentado e exposto em filme autoradiográfico por 3 minutos para em seguida ser revelado e foto documentado.

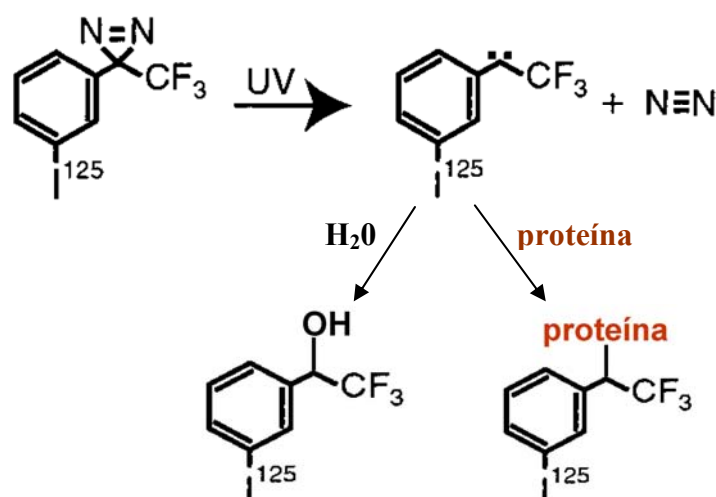


Figura 3.2: esquema simplificado da fotoativação do radical carbeno do TID e posterior ligação a proteína. Note que a ligação formada é covalente, o que reflete numa marcação estável e independente do isótopo que se pretende usar para a detecção.

Cada banda protéica do gel revelada tanto na coloração com comassie blue quanto no filme autoradiografico foi recortada do gel e descorada por 6 a 144 horas com no mínimo de 1 mL de solução contendo SDS 30 % e isopropanol 50 % em um banho a 37° C.

O sobrenadante foi utilizado para aferição da quantidade de proteína na banda recortada do gel através da leitura da absorvância a 595 nm pela comparação com a curva de absorvância obtida para 2 µg, 4 µg e 6 µg de albumina.

Todas as bandas do gel depois de descoradas foram levadas a um contador de radiação gama. Os controles utilizados foram: somente gel que não representava banda protéica; albumina; além da sonda ativada na ausência de *Psd1*.

OS valores de CPMs de cada banda do gel foram divididos pela quantidade de proteína presente naquela banda, obtendo assim a medida de CPM / µg de proteína. Assim, pudemos verificar a relação CPM versus µg de *Psd1* em 3 amostras contendo quantidades diferentes de proteína (5 µL, 10 µL e 15 µL de um total de 30 µL

aplicados) para a amostra experimental e para a amostra controle. A média obtida para a amostra experimental foi subtraída da média de contagens obtida para a amostra controle, para quantificação da sonda ligada especificamente a *Psd1*. O experimento foi realizado três vezes.

3.2. Resultados

Para obtenção da sonda [^{125}I] TID-PC foi realizado a iodinação do composto comercial TID-PC com Na^{125}I . Após a iodinação, o composto resultante foi purificado por cromatografia em que a sílica gel é a fase estacionária e clorofórmio:metanol:água:ácido acético (65:25:4:1). Nessa cromatografia foram recolhidas frações de aproximadamente 200 μL de volume e 1 μL de cada fração foi pingada em papel de filtro para contagem de radiação gama (FIGURA 3.3) e as frações com maior contagem de radiação foram observadas após cromatografia fina em sílica gel para comparação da migração destas com TID-PC não iodinado (FIGURA 3.4). As frações de números 2 a 5 apresentaram alta contagem de radiação gama, sendo que as de números 4 e 5 apresentaram as mais altas contagens, em torno de 10^6 CPM.

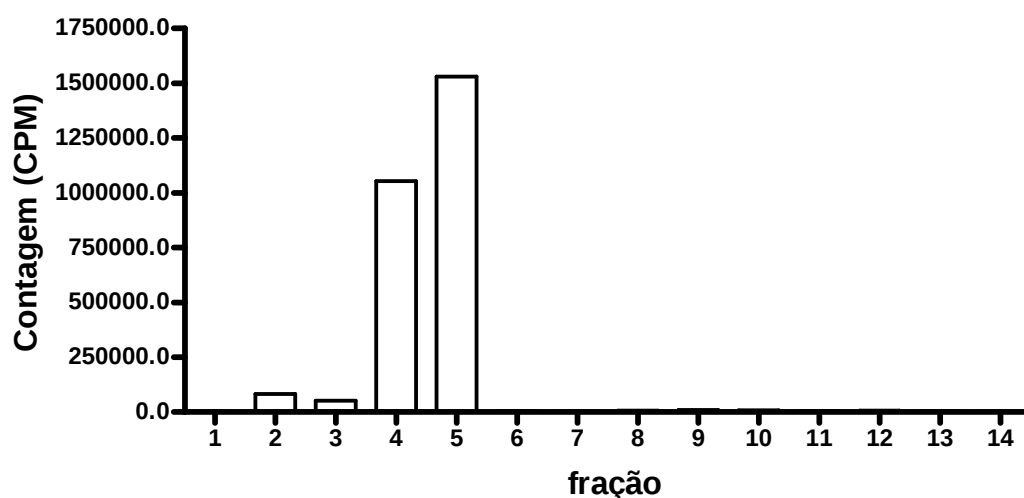


Figura 3.3: Contagem (CPM) de radiação gama das frações de 200 μL da purificação de [^{125}I] TID-PC em sílica gel (fase estacionária) utilizando como fase móvel uma mistura de solventes clorofórmio:metanol:água:ácido acético (65:25:4:1).

As frações de número 4 e 5 apresentaram migração compatível com TID-PC utilizado como padrão (FIGURA 3.4). Diferente delas, a fração de número 3 apresentou quantidades muito pequenas de [^{125}I] TID-PC quando comparada com as frações de

números 4 e 5 na cromatografia de camada fina (FIGURA 3.4), apesar da alta contagem obtida (5.10^4 CPM) como visto na FIGURA 3.3.

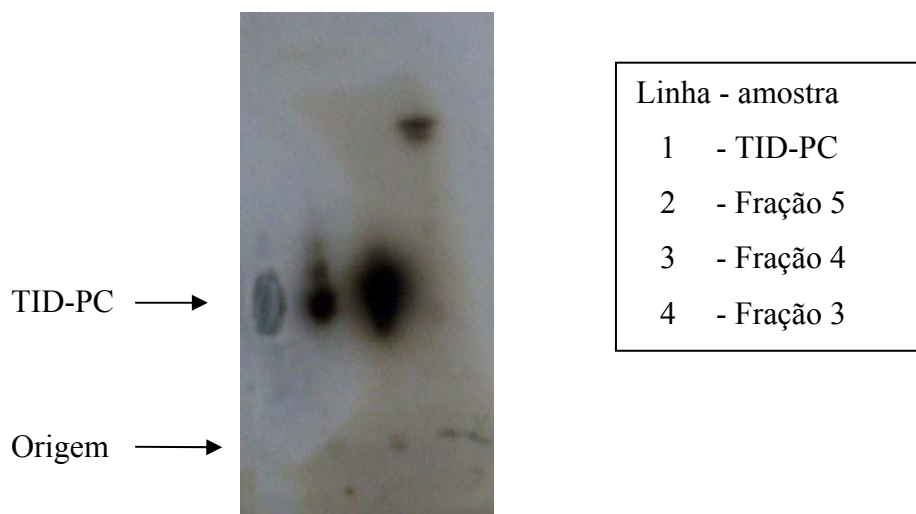


Figura 3.4: Cromatografia em camada fina de sílica do composto [125 I] TID-PC purificado. Na figura são mostradas as frações 3, 4 e 5 obtidas da purificação de [125 I] TID-PC em sílica e fase móvel de clorofórmio:metanol:água:ácido acético. Note que na linha 1 não há radioatividade, isso porque utilizamos como referência de migração o composto não iodinado. Este último foi evidenciado através da impregnação com iodo sublimado.

Depois de obtida a sonda marcada com 125 I, realizamos os experimentos de ligação em MLVs contendo a sonda sintetizada incorporada. A quantidade de sonda utilizada em relação a quantidade de lipídeo foi muito pequena, uma proporção de nmolar a μ molar da sonda marcada para mmolar de lipídeo total. Após formação das MLVs com as sondas incorporadas, seja a MLV composta de PC ou PC:CMH (9:1, M/M), adicionou-se *Psdl* para concentração final de 10 μ M. Após uma incubação de 15 minutos a 25° C, a sonda foi ativa com exposição a luz UV por outros 15 minutos. Terminada a ativação a amostra foi seca em concentrador a vácuo. Em paralelo uma preparação de lipídeos, seja a MLV composta de PC ou PC:CMH (9:1, M/M), com a sonda incorporada sofreu todo o processo de ativação, porém na ausência de *Psdl*. Essa última, somente recebeu proteína ao final da ativação com luz UV e recebeu o nome de

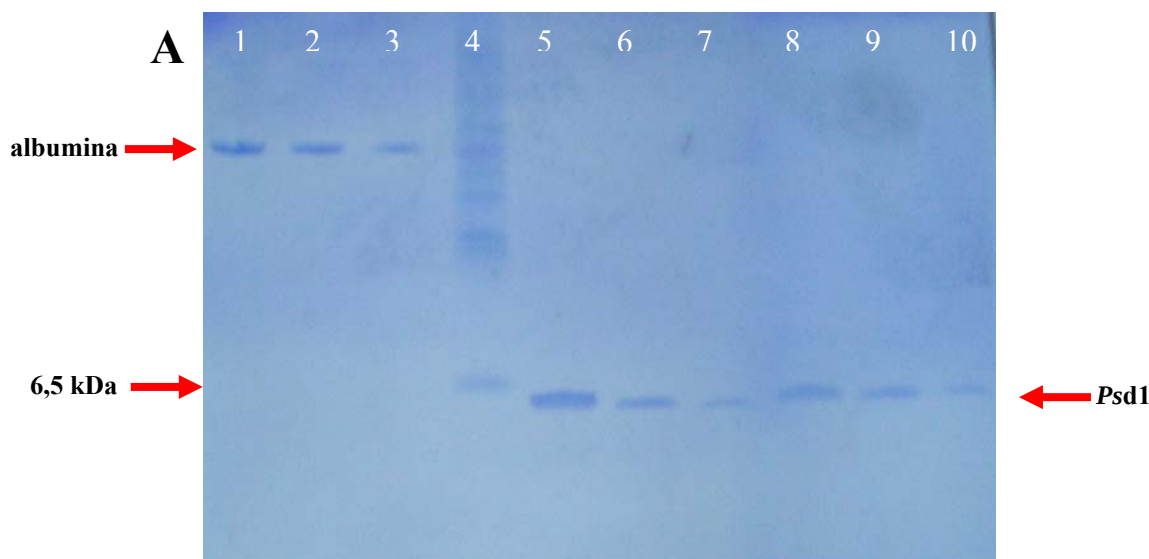
amostra CONTROLE. A amostra em que a sonda foi ativada na presença de proteína *Psd1* recebeu o nome de EXPERIMENTAL.

As amostras secas, controle e experimental, foram solubilizadas em 30 μ L de tampão de amostra para eletroforese, aliquotadas em volumes 5 μ L, 10 μ L e 15 μ L. Cada alíquota foi aplicada em gel de eletroforese com gradiente 15-20 % de Triscina-Glicina SDS. Após 4 horas de eletroforese, o gel foi corado com comassie blue durante a noite e depois descorado até boa visualização das bandas correspondentes a *Psd1*.

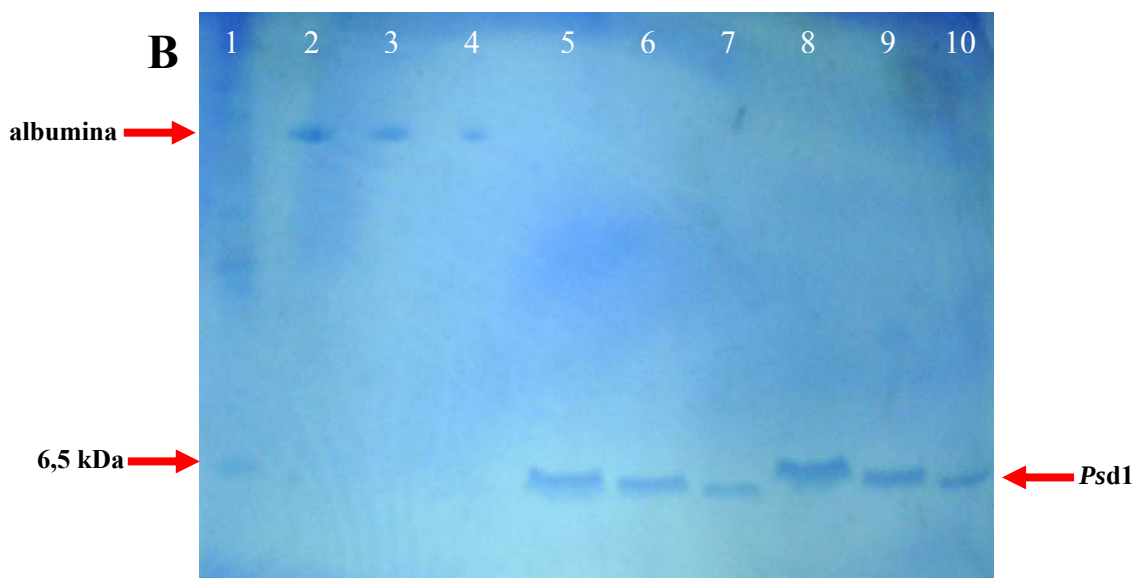
A observação dos géis dos experimentos com MLV de PC (figura 3.5 A) ou de PC:CMH (figura 3.5 B) mostrou bandas visíveis após coloração com comassie blue, com tamanho esperado dentro do perfil de migração de *Psd1* pura (5 kDa), repare a banda de aprotinina (6,5 kDa) (setas vermelhas) do padrão de peso molecular com migração muito semelhante. Em ambos os géis, fica clara a pureza das proteínas, uma vez que somente aparece uma banda para cada linha de migração. Outra observação relevante é de que as bandas referentes as amostras chamadas experimentais (onde a proteína foi incubada com a sonda antes da ativação da com luz UV) no gel apresentam uma redução da quantidade de proteína em comparação ao controle (onde a proteína só foi adicionada após o termino da ativação com luz UV) (figura 3.5 A e B). Este primeiro problema dificultou muito em todos os casos a terminação da massa, importante para determinação da CPM/ μ g da proteína observada. A aplicação no gel de albumina em concentrações crescentes (2 μ g, 4 μ g e 6 μ g) serviu de referência em todos os géis de triscina-glicina (materias e métodos).

Outro problema ocorrido com o gel foi a contaminação inicial de radioatividade, isso porque não importava se a autoradiografia era feita antes ou depois da coloração por comassie blue, a alta contagem de radioatividade impedia a diferenciação entre

controle e experimental, uma vez que a proteína migrava nessa condição muito próxima do fronte da corrida.



linhas: 1 – 6 µg albumina; 2 – 4 µg albumina; 3 – 2 µg albumina; 4 – padrão de peso molecular; 5 – 15 µL amostra controle; 6 – 10 µL amostra controle; 7 – 5 µL amostra controle; 8 – 15 µL amostra experimental; 9 – 10 µL amostra experimental; 10 – 5 µL amostra experimental.



linhas: 1 – padrão de peso molecular; 2 – 6 µg albumina; 3 – 4 µg albumina; 4 – 2 µg albumina; 5 – 15 µL amostra controle; 6 – 10 µL amostra controle; 7 – 5 µL amostra controle; 8 – 15 µL amostra experimental; 9 – 10 µL amostra experimental; 10 – 5 µL amostra experimental.

Figura 3.5 – Eletroforese da preparação *Psd1*-PC (A) e *Psd1*-PC:CMH (B) após fotoativação da sonda [125 I] TID-PC (ver mais detalhes na seção 3.1.3.2) em gel desnaturante (0,1 % SDS) de triscina-glicina. Padrão de peso molecular Sigma: 6,5 kDa – aprotinina, 14,2 kDa – α -lactoalbumina, 20 kDa – inibidor de tripsina, 24 kDa – tripsinogênio, 29 kDa – anidrase carbônica, 36 kDa – gliceroldeído-3-fosfato desidrogenase, 45 kDa – ovalbumina, 66 kDa – albumina, 97 kDa – fosforilase B, 116 kDa – β -galactosidade, e 200 kDa – miosina.

A redução da radioatividade não específica nas bandas descoradas foi realizada até os controles (albumina e gel sem proteína) possuísem valores de contagem de radiação gama inferiores a 500 CPMs (figura 3.6) o que foi obtido entre 18 e 24 horas de incubação com a solução de SDS e isopropanol. Tempos de incubação maiores do que 24 horas (48 horas e 144 horas) não resultaram em diminuição significativa dos valores de contagem de radiação gama.

Os valores obtidos para as amostras experimental e controle, nas interações *Psd1*-PC e *Psd1*-PC:CMH, respeitados os procedimentos acima descritos, foram significativamente diferentes (figura 3.6). A subtração da média dos valores de CPM/ μ g da *Psd1* do chamado experimental pela média dos valores de CPM/ μ g de *Psd1* do controle nas interações *Psd1*-PC e *Psd1*-PC:CMH mostra que a proteína interage com ambas as MLVs. A diferença obtida foi de 390 ± 120 CPM para a interação *Psd1*-PC e 435 ± 65 CPM para interação *Psd1*-PC:CMH, mostrando que a *Psd1* foi capaz de interagir com ambos os sistemas (PC e PC:CMH), (figura 3.6, caixa no topo a direita).

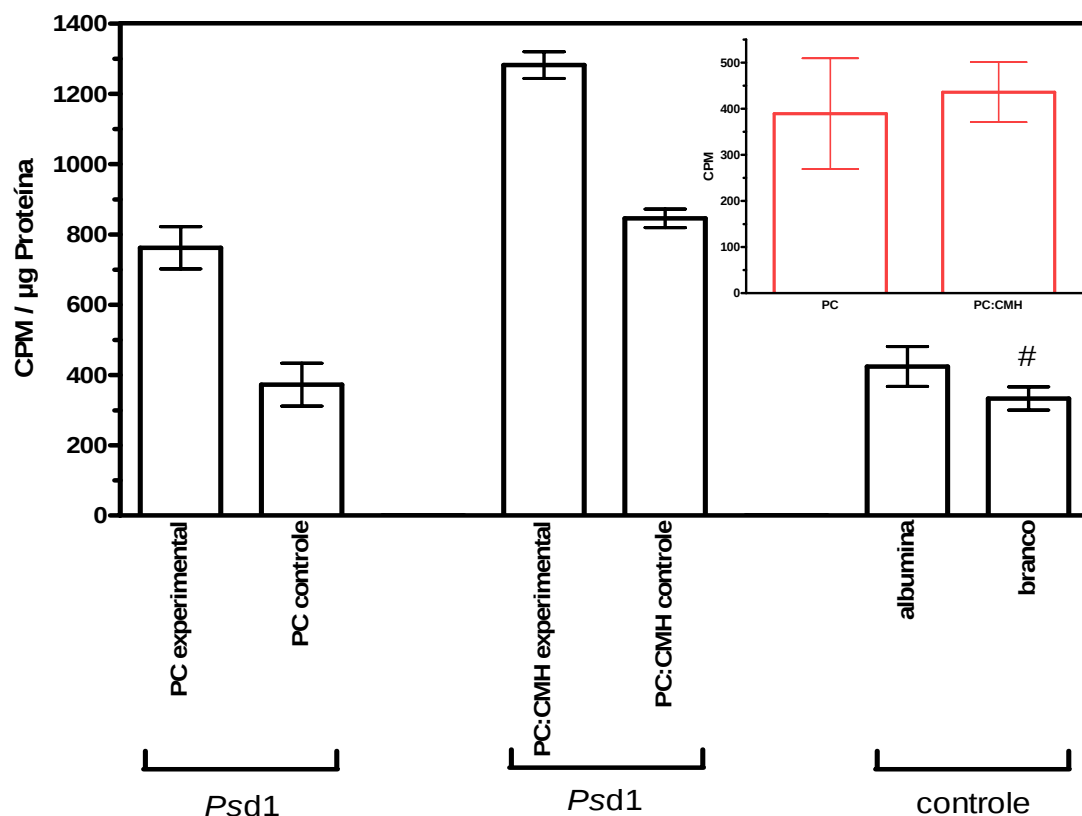


Figura 3.6: Interação de *Psd1* com MLV compostas de PC ou PC:CMH contendo a sonda [125 I] TID-PC. PC ou PC:CMH experimental – amostra em que a sonda foi ativada na presença de *Psd1*. PC ou PC:CMH controle – amostra em que a sonda foi ativada na ausência de *Psd1*, sendo proteína posteriormente adicionada. Albumina foi utilizada como controle de impregnação inespecífica do [125 I] TID-PC, isto é, ligação não covalente formada durante a eletroforese e coloração com comassie blue pela sonda com as proteínas do gel, bem como serviu como parâmetro para a estimativa de quantidade de proteína na banda corada. # - branco nada mais é que pedaço recortado do gel de tamanho equivalente do gel sem proteína aparente, utilizado na estimativa de proteína (0 µg de proteína) e na contagem de fundo, portanto o gráfico apresenta somente a contagem de CPM sem normalizar pela quantidade de proteína. Caixa superior direita indica a marcação específica nos sistemas *Psd1*–PC e *Psd1*–PC:CMH obtida pela subtração da média de CPM das amostras PC ou PC:CMH experimental das amostras PC ou PC:CMH controle.

Uma vez que a sonda [125 I] TID encontra-se inserida na ponta da cauda hidrofóbica da molécula de PC, permitindo desta forma somente a marcação de proteínas que de alguma forma tem acesso ao interior da bicamada acreditamos que a marcação obtida é suficiente para dizer que há interação da proteína com a membrana, sem a princípio distinguir entre as composições PC ou PC:CMH, uma vez que ambas situações resultaram na marcação da proteína *Psd1*.

4. Parte II

Avaliação da interação de *Psd1* com grandes vesículas unilamelares (LUV) contendo ou não CMH por Ressonância Magnética Nuclear (NMR) e mapeamento dos resíduos de aminoácidos de *Psd1* responsáveis por esta interação.

A avaliação realizada na PARTE I indica que *Psd1* possui a capacidade de ligação a membranas através da interação com lipídeos. Essa ligação com *Psd1* é forte o suficiente para comprometer a integridade da membrana e expor o interior hidrofóbico da bicamada ou para permitir a inserção de *Psd1* na mesma, podendo estar relacionada à sua ação antifúngica.

A razão da especificidade de ação em fungos pode residir na presença de moléculas lipídicas existente somente em células fúngicas, como a monohexosilceramida (CMH). Esta parece ser uma hipótese plausível, uma vez que *Psd1* não possui atividade inibitória do crescimento de células de mamíferos (dissertação de mestrado de Luciano Neves de Medeiros, 2004).

Fortalecendo esta hipótese, foi demonstrado que a defensina *Rs-AFP2* é capaz de interagir mais fortemente com glicosilceramidas isoladas do fungo *Pichia pastoris* do que com glicoceramidas isoladas de baço humano e de soja (Thevissen K. e cols., 2004).

A medida da interação de *Psd1* a MLVs, contendo somente PC ou contendo um misto de PC:CMH (9:1, M/M) mostrada na PARTE I, não indicou significativa diferença de ligação entre as duas MLVs, devendo ser aplicadas outras técnicas para busca da distinção da ligação de *Psd1* com PC e com CMH.

Ainda nesse sentido, como demonstramos anteriormente na minha dissertação de mestrado, a defensina *Psd1* apresenta mobilidade interna na região da alça 1 (Ala7-Asn17) e da volta 3 (His36-Trp38) associados na literatura com sítios ativos, como regiões de reconhecimento de ligante ou de interação proteína – proteína (James L. C. e Tawfik D. S., 2003; Henzler-Wildman K. e Kern D., 2007).

Esses resultados serviram de base para os questionamentos: Uma vez que a defensina *Psd1* é capaz de ligar-se às membranas artificiais de PC e PC:CMH (9:1) como visto na PARTE I, essas interações com as membranas artificiais são similares ou há especificidade de ligação ao CMH? Os mobilidade da alça 1 (Ala7-Asn17) e da volta 3 (His36-Trp38) estão de alguma forma envolvidos na interação com a(s) membrana(s)?

Para responder essas perguntas, experimentos de interação por perturbação de deslocamento químico (CSP) e razão dos tempos de relaxação R2/R1 de *Psd1* na presença das LUVs contendo PC, ou contendo PC:CMH (9:1, M/M) foram realizados nessa PARTE da tese com a intenção de medir e mapear a interação com membranas artificiais, contendo ou não CMH.

Backbone dynamics of the antifungal *Psd1* pea defensin and its correlation with membrane interaction by NMR spectroscopy.

Luciano Neves de Medeiros^{‡§}, Renata Angeli^{#§}, Carolina Sarzedas[#], Eliana Barreto-Bergter[†], Ana Paula Valente^{#*}, Eleonora Kurtenbach[‡], and Fabio C. L. Almeida^{#*}.

[‡]Instituto de Bioquímica Médica, Programa de Biotecnologia e Biologia Molecular and Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Programa de Biologia Molecular e Estrutural, Universidade Federal do Rio de Janeiro; [#]Instituto de Bioquímica Médica, Programa de Biologia Estrutural, Universidade Federal do Rio de Janeiro; [†]Instituto de Microbiologia - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Centro de Ciências da Saúde, Cidade Universitária, 21941-900, Rio de Janeiro RJ, Brazil.

*To whom correspondence should be addressed:

FCLA – falmeida@cnNMR.bioqmed.ufrj.br

APV- valente@cnNMR.bioqmed.ufrj.br

§Both authors contributed equally to this work

Running Title:

Plant defensin *Psd1* interaction with glucosylceramides probed by NMR

Abbreviations: CMH – monohexosylceramide; CSP - Chemical shift perturbation; *DmAMP* - *Dahlia merckii* antimicrobial peptide; DPC - dodecylphosphocholine; Het-NOE – Heteronuclear ¹⁵N Nuclear Overhauser Enhancement; -M(IP)₂C) - mannosyldiinositolphosphoryl-ceramide; pepLoop1 - Gly12 to Ser19; *Psd* – *Pisum sativum* defensin; *RsAFP1* - *Raphanus sativus* antifungal peptide; PC - L- α -phosphatidylcholine; PRE – Paramagnetic relaxation enhancement; R₁- heteronuclear longitudinal relaxation time, R₂ – heteronuclear transverse relaxation time.

Abstract

Plant defensins are cysteine-rich cationic peptides, components of the innate immune system. The antifungal sensitivity of certain exemplars was correlated to the level of complex glycosphingolipids in the membrane of fungi strains. Psd1 is a 46 amino acid residue defensin isolated from pea seeds which exhibit antifungal activity. Its structure is characterized by the so-called cysteine-stabilized α/β motif linked by three loops as determined by two-dimensional NMR. In the present work we explored the measurement of heteronuclear Nuclear Overhauser Effects, R_1 and R_2 ^{15}N relaxation ratios, and chemical shift to probe the backbone dynamics of Psd1 and its interaction with membrane mimetic systems with phosphatidylcholine (PC) or dodecylphosphocholine (DPC) with glucosylceramide (CMH) isolated from *Fusarium solani*. The calculated R_2 values predicted a slow motion around the highly conserved among Gly12 residue and also in the region of the Turn3 His36–Trp38. The results showed that Psd1 interacts with vesicles of PC or PC:CMH in slightly different forms. The interaction was monitored by chemical shift perturbation and relaxation properties. Using this approach we could map the loops as the binding site of Psd1 with the membrane. The major binding epitope showed conformation exchange properties in the μs – ms timescale supporting the conformation selection as the binding mechanism. Moreover, the peptide corresponding to part of Loop1 (pepLoop1: Gly12 to Ser19) is also able to interact with DPC micelles acquiring a stable structure and in the presence of DPC:CMH the peptide changes to an extended conformation, exhibiting NOE mainly with the carbohydrate and ceramide parts of CMH.

1. Introduction

Defensins have been identified in many organisms from insect to humans, including plants. They play an important role in innate immunity against invading microorganisms. Defensins present a wide and distinctive antifungal and/or antibacterial spectrum of activity, suggesting their application as natural antimicrobials and/or antibiotics [1,2]. Recently, the availability of complete genomes or transcriptomes has revealed a surprising abundance of genes encoding putative defensins [3,4]. They have been underestimated mainly because they share low similarity in the primary sequence but new bioinformatics techniques revealed the universe of defensin sequences [3]. The amount of coded proteins presumably protect against tolerance because it represents a dynamic strategy against pathogens. The biotechnological opportunity of defensin has been long recognized both as antibiotics for resistant strains and also expression in plant for crop protection [5,6,7,8].

Some important structural features can be identified by comparing the defensins: the majority shares the same cysteine-stabilized α/β motif, composed of three antiparallel β -strands and one α -helix. Their positive charge at physiological pH seems to be related to the initial interaction with anionic head groups of the microbial membrane lipids. The hydrophobic properties enable interaction with the core of the membrane that permits accommodation of the protein and consequently membrane disruption [9].

Different evidences have shown that the membrane permeation or disruption is only one among several mechanism involved but still the microbial membrane is the first barrier that should be overcome [7,9-11]. Thevissen et al. [12,13] proposed that glucosylceramide present in fungus membrane is one important receptor for plant defensin binding. The blockage of glucosylceramide synthesis changes the fungus to a

defensin-resistant form. Evidence from the literature demonstrated that patches of fungi membrane containing mannosyldiinositolphosphoryl-ceramide and glucosylceramides are selective binding sites for plant defensins *Dm*-AMP1 and *Rs*-AFP2 isolated from *Dahlia merckii* and *Raphanus sativus*, respectively [2,7,12,13].

Defensin mechanism of action is still unknown and the divergence in primary sequence hampers the identification of binding site and their mechanism of action being cysteines the only (clear) conserved amino acid. Recently a new feature was included in the analysis: dynamic properties.

The importance of protein dynamics in binding process has gained huge attention in the last few years. The possibility to measure movements in the ns to ms timescale has revealed the complexity of protein conformation ensemble in solution. [14,19,20]. Recent studies on protein dynamic have led to the realization that proteins are not structured in a unique conformation; rather, they frequently display regions undergoing conformational exchange. The novel view of binding and allostery takes into consideration the equilibrium among pre-existing conformational states of the protein before it encounters the ligand. In the ligand-bound form, no significant conformational transition is needed; instead, there is a population shift toward the ligand-bound conformational state. Several evidences have shown that regions displaying conformational diversity participate directly either in binding or in allosteric transitions [14-18].

The dynamics of the backbone of a protein can be monitored by Nuclear Magnetic Resonance (NMR) relaxation measurements, typically ^{15}N longitudinal relaxation (T_1), transverse relaxation (T_2), and ^{15}N - ^1H heteronuclear NOE of a uniformly ^{15}N labeled protein. The relaxation measurements can be interpreted in terms of physical events, such as order parameters and correlation times, to obtain a

hydrodynamic description of the protein by fitting data with the Lipari-Szabo model-free formalism [19-21]. Multiple timescales can be resolved, from seconds (real time measurements) to picoseconds. Movement on the pico- to nanosecond timescale corresponds to local and segmental motions whose energy barrier is below the thermal energy (kT) [19,20]. These are the so called thermal motions. Overall rotational tumbling occurs on a timescale of tens of nanoseconds and is also thermally.

Our group used relaxation studies to assess the importance of conformational selection for protein-membrane binding. We used PRE (Paramagnetic Relaxation Enhancement) effect to investigate the conformational ensemble of PW2, an anticoccidial peptide selected by phage-display, with no stable structure in solution and that acquires different stable conformations in the presence of SDS and DPC micelles [22,23]. Cruzeiro-Silva et al., 2007 [24] showed that PW2 in solution is not completely flexible. The distances measured by PRE revealed the constrained motion in the aromatic region (Trp-Trp-Arg) and 10 ns molecular dynamic simulation in water showed the increase in order parameters in this same region. Measurements of relaxation dispersion pointed the amino acids in exchange and they locate close to the WWR motif. Interesting to note that the aromatic region is the consensus among different peptides in the phage-display selection process [25].

In this work we assessed the defensin-membrane interaction using *Pisum sativum* defensin 1 (*Psd1*) as our model [26]. *Psd1* exhibit high antimicrobial activity against specific fungi, including pea pathogens, but not against bacteria [26]. The solution structure of *Psd1* was determined by high-resolution NMR spectroscopy [27]. *Psd1* adopts a typical cysteine-stabilized α/β motif, composed of three antiparallel β -strands and one α -helix. The secondary elements are joined by two loops and one turn

(Ala7-Asn17, Ala28-Ile31 and His36-Trp38) and those were the less defined regions in the calculated structure [27]. The recombinant *Psd1* was acquired at high levels in *Pichia pastoris* expression system [28] and it exhibit the same structural and functional properties as the native one.

We have used NMR to analyze the conformation and dynamics of *Psd1* in the presence of vesicles containing phosphatidylcholine (PC) and a mix of PC with glycosphingolipid extracted from hyphae of *Fusarium solani* (CMH). We also investigated the effect of DPC micelles with or without CMH. The results showed that *Psd1* interacts with vesicles of PC or PC:CMH in slightly different manner. The interaction was monitored by chemical shift perturbation and relaxation properties. Using this approach we could map the loops as the binding site of *Psd1* with the membrane. The major binding epitope showed conformation exchange properties in the μ s-ms timescale supporting the conformation selection as the binding mechanism. Moreover, the peptide corresponding to this loop is also able to interact with DPC micelles acquiring a stable structure and in the presence of DPC:CMH the peptide change to an extended conformation, exhibiting NOE mainly with the carbohydrate and ceramide parts of CMH. This is in accordance with previous studies showing the fragments of defensins presents antimicrobial activity [29-31].

2. Materials and Methods

L- α -Phosphatidil-choline (PC) from egg yolk was purchased from Avantis Corp.; Perdeuteretade D38-dodecylphosphocholine (DPC) and $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ was purchased from Cambridge Isotope Laboratory; Monohexosylceramide (CMH) from *Fusarium solani* was isolated as described by Duarte et al., 1998 [32]. All other chemicals were purchased from Sigma Chemical (St. Louis, MO, USA). All products were of analytical grade.

2.1. *Pichia pastoris* expression and purification of ^{15}N Psd1

Psd1 was expressed and purified as described elsewhere [26]. Briefly, Psd1-expressing *P. pastoris* colony was grown in minimal glycerol medium (BMG) for approximately 24 h at 28 °C and for 18 h at 30° C with constant shaking. These cultures were centrifuged and the cell mass was resuspended in BBS medium containing 0.7 % methanol and 4 g/L $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$. The induction of Psd1 synthesis was carried out for 120 h by daily supplementation of 0.7 % methanol. The crude culture was applied to a Toyopearl SP-650M column. The peak containing proteins with low molecular weights was pooled and purified by semipreparative reversed-phase HPLC on a Vydac C8 column (208TP510). The fractions collected were dried under vacuum and dissolved in milli-Q water.

2.2. Vesicles preparation

Large unilamellar vesicles (LUV, 100 nm in diameter) were prepared according to the extrusion method of [33]. PC (3.8 mg) or PC:CMH (9:1 ratio containing 3.42 mg PC and 0.37 mg CMH) were dissolved in 200 μl of chloroform, dried under a stream of nitrogen and hydrated in 1 ml of 20 mM sodium phosphate buffer and 20 mM sodium

chloride. The final concentration of PC or PC:CMH was 5 mM. Extrusion was done 40 times through stacked polycarbonate filters with a pore size of 0.1 μm .

2.3. NMR spectroscopy

All experiments were carried out at 25° C on a Bruker DRX-600 spectrometer. Water suppression was achieved using the WATERGATE technique [34,35].

2.3.1. Relaxation parameters

^{15}N relaxation measurements were acquired using two-dimensional, proton-detected heteronuclear NMR experiments, for each of assigned amide nitrogen implementing standard pulse sequences based on Farrow et al. (1994) [36]. T_1 , T_2 and NOE spectra were recorded with spectral widths of 1024 x 256 points in the ^1H and ^{15}N dimensions. The field strength of the CPMG refocusing train was 3.3 kHz and a 1.2 ms delay was used between the refocusing pulses [37,38]. The effects of cross relaxation between ^1H - ^{15}N dipolar and ^{15}N chemical shift anisotropy were removed applying ^1H 180° pulses during relaxation delays [39]. The relaxation delay for T_1 and T_2 measurements was 4 and 2 s, respectively. T_1 values were measured in a series of spectra with relaxation delays of 0.020 s; 0.050 s; 0.100 s; 0.200 s; 0.300 s; 0.400 s; 0.500 s; 0.700 s; 0.900 s; 1.000 s; e 1.250 s. T_2 measurements were taken with relaxation delays of 0.010 s; 0.025 s; 0.050 s; 0.075 s; 0.100 s; 0.125 s; 0.150 s; 0.175 s; 0.200 s; 0.250 s; e 0.300 s. To allow NOE evolution, ^1H - ^{15}N steady-state NOE values were measured with two different data sets, one collected with no initial proton saturation and a second with initial proton saturation. The proton saturation period was 5 s.

2.3.2. Model-free calculations

Relaxation parameters were fitted according to Lipari-Sazabo model free formalism to extract the intramolecular dynamics. We have used the software Model-free (v. 4.0) [19,40], from Arthur G. Palmer III research group. We used R1, R2, and NOE relaxation parameters and an axially symmetric diffusion model. The estimates of the overall correlation time τ_m was obtained using the R2/R1 ratio mean in a Monte-Carlo simulation.

2.3.3. Psd1 in PC and PC:CMH vesicles

Chemical shift perturbation (CSP) spectra were obtained using ¹H-¹⁵N heteronuclear single quantum coherence (HSQC) spectra with 1024 points x 256 points. NMR spectra were recorded on 0.5 mL samples of 50 – 200 μ M ¹⁵N-labeled *Psd1* in 20 mM sodium phosphate buffer pH 5.0 and 20 mM sodium chloride in the presence or absence of 5 mM PC or PC:CMH (9:1, molar ratio) vesicles. The chemical shift perturbation was evaluated by the following equation: $\Delta\delta = (\Delta\delta_H^2 + (\Delta\delta_N/10)^2)^{1/2}$ in ppm, and $\Delta\delta_H$ or $\Delta\delta_N$ equal δ_H or δ_N of *Psd1* in presence of vesicles less δ_H or δ_N of *Psd1* free in solution.

2.3.4. Psd1 or pepLoop1 in DPC and DPC:CMH micelles

Psd1 (160 μ M) or pepLoop1 (3.6 μ M) were dissolved in 300 mM DPC, 40 mM sodium phosphate buffer (pH 5.5) and 10% D2O. DPC:CMH samples were prepared by adding dry weight of CMH to the DPC/protein or peptide sample. *Psd1*:CMH molar ratio was 1:10 and pepLoop1/CMH was analyzed in two molar ratios 0.5: 1 and 3:1.

2.3.5 – PepLoop1 structural calculations

The peptide pepLoop1 (GVSFTNAS) was synthesized by Genemed Synthesis Inc at 95 % purity and certified by mass spectrometry. For pepLoop1 in DPC, the structure were calculated using CNS_solve v.1.1 using a set of 300 distance restraints derived from a NOESY spectra acquired in a Bruker Avance III 800 MHz. The peptide was fully assigned using a combination of NOESY and TOCSY spectra; three NOESY spectra were acquired at 100 ms, 150 ms and 200 ms; we used the 200 ms NOESY for structural calculation. No spin diffusion was observed at this mixing time. For the peptide in DPC plus CMH using pepLoop1:CMH molar ratio of 3:1, we used CNS_solve v 1.1 with a set of 80 NOEs most of them sequential NOEs. We also use dihedral restraints derived from 3JHNHa. According to Figure 5, when 3JHNHa. was higher than 8 Hz we used the phi angle restrained to from 90o to 150o. The 3JHNHa. was measured using the splitting of the NOESY spectra processed using Gaussian Multiplication window functions. For the sample DPC plus CMH using pepLoop1:CMH molar ratio of 3:1 we also run a COSY spectrum. For the structure statistics see supplementary Table.

Results

3.1. *Psd1* backbone dynamics in the free state

The backbone dynamics of *Psd1* have been determined through solution NMR measurements of relaxation parameters R_1 , R_2 and steady-state NOE of the amide group resonances. FIGURE 1A shows the relaxation measurements values for the *Psd1* amino acid residues. Most of *Psd1* residues showed similar values for R_1 , R_2 and NOE compatible with the defensin fold and therefore stable secondary structure elements. Gly12 is the only residue that showed reduced values of R_1 , R_2 and HNNOE, indicating the presence of motion in the timescale of picoseconds. R_2 values in the first loop (Ala7-Asn17) and turn 3 (His36-Trp38) showed bigger values than the average, typical of internal motion in μ s-ms time scale.

We used the extended Lipari Szabo model free formalism to obtain the order parameter (S^2), that describe the presence of thermal motion and the residues involved in conformational exchange, undergoing motions timescale μ s-ms (R_{ex}). High values (0.87) observed in S^2 indicated significant restriction of the fast motion of the amide bond vector (N-H vector), consistent with well-organized *Psd1* structure. Gly12 is the only exception, showing thermal motion with an order parameter of 0.51. The extended model, with the inclusion of the parameter R_{ex} , was necessary to correctly describe the dynamics around the loops, especially Loop 1 (from Ala7 to Asn17) and Turn3 (from His36 to Trp38). The isotropic overall correlation time was 5.0 ns, consistent with the monomeric form of the protein.

Another way to find the presence of conformational exchange is by analysis of R_2/R_1 ratio. Values of R_2/R_1 bigger than the average value can be readily attributed to conformational exchange, especially for *Psd1* as shown in FIGURE 2. In the present manuscript we will use R_2/R_1 ratio to compare the milli- to microsecond motion

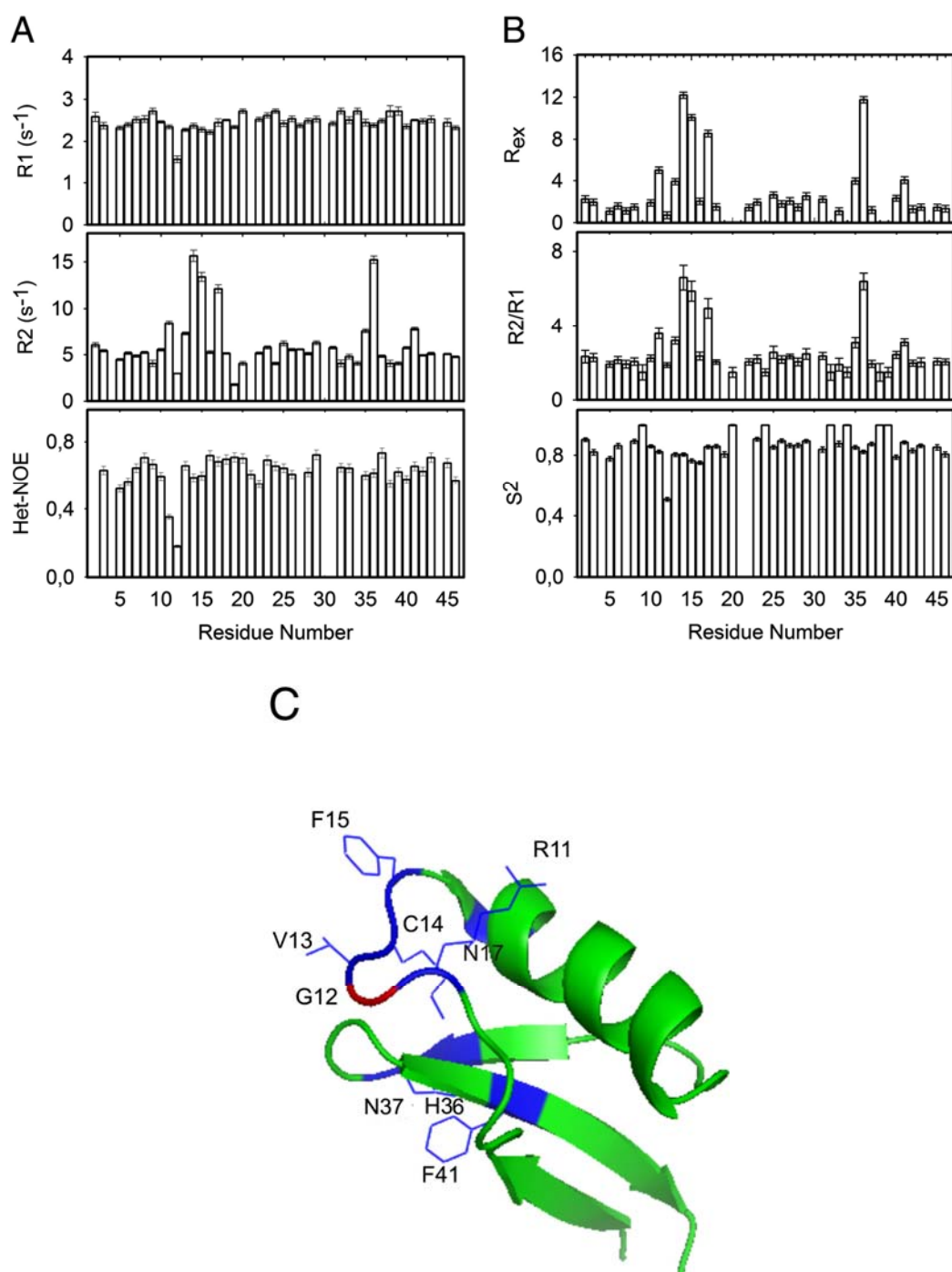


Figure 1: ¹⁵N backbone relaxation measurements for *Psd1* free in solution. (A) – R1, R2, and ¹H/¹⁵N heteronuclear NOE plotted as a function of the residue number for *Psd1*. Values of R1 and R2 were obtained from the fit as single exponential decay of the time dependence of the relaxation data measured. The error bars indicate the fitting error. The absence of bars indicates that the values could not be accurately measured due to overlaps. (B) Lipari-Szabo model-free analysis of ¹⁵N relaxation data of *Psd1*. The figure shows Rex, R2/R1 and order parameter (S2) plotted as a function of the residue number for *Psd1*. The experiments were run at 25 oC. (C) Ribbon representation of *Psd1* highlighting the side chains of the residues in conformational exchange in blue and the flexible hinge Gly12 in red. Gly12 is the only residue with decreased order parameter, showing thermal flexibility.

between *Psd1* free in solution and in the presence of phospholipid vesicles. The advantage of using this ratio is that it does not depend on any model or fitting. This is an important advantage since it is not trivial to describe the hydrodynamic motion of *Psd1* in rapid exchange between the free and vesicle-bound form. Both the fitting of R_{ex} by using the extended Lipari-Szabo model free formalism or by looking at R_2/R_1 values indicated the presence conformational variability in Loop1 and Turn3, with the exchange between conformers in the micro- or millisecond time scale. The residues in Loop1 that exhibited significant conformational exchange were Arg11, Val13, Cys14, Asn17, resulting in positive values of R_{ex} and residues Cys35 and His36, close to turn 3. It is not surprising the correlated motion between Loop1 and Turn3, since they are connected via disulfide bond (Cys14-Cys35). FIGURE 1C shows the ribbon representation of *Psd1* where the amino acids with conformational exchange (high R_{ex}) were colored in blue and the Gly12 in red. Note that the residues in conformation exchange are close to each other forming a patch in *Psd1* structure. Gly12 displayed thermal motion, which occurs in the timescale of pico to nanoseconds, acting as a hinge in the middle of the loop in conformational exchange. This hinge motion of Gly12 plays an important role in the loop dynamic properties; it is worth mentioning that this residue is highly conserved among plant defensins.

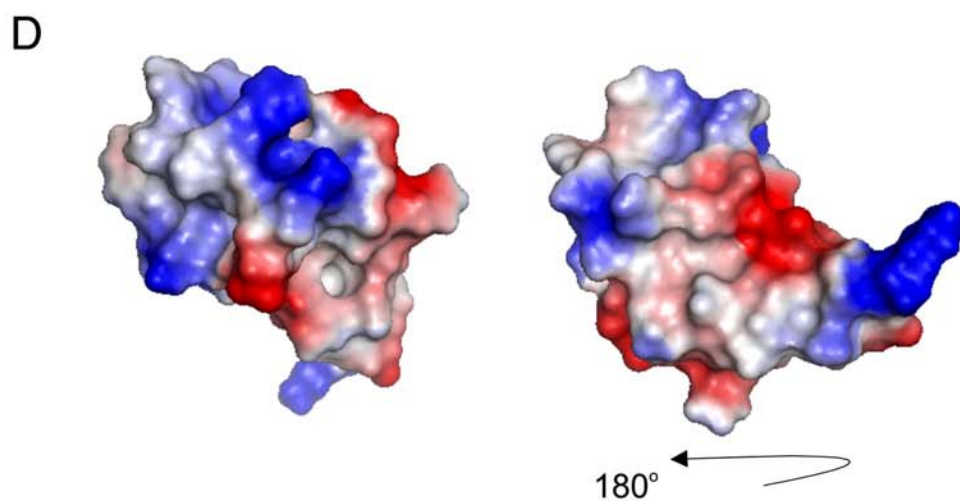
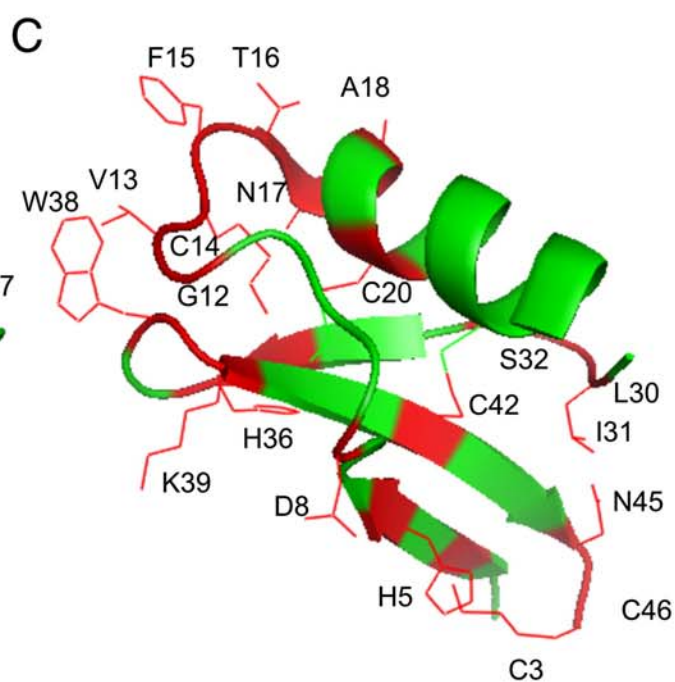
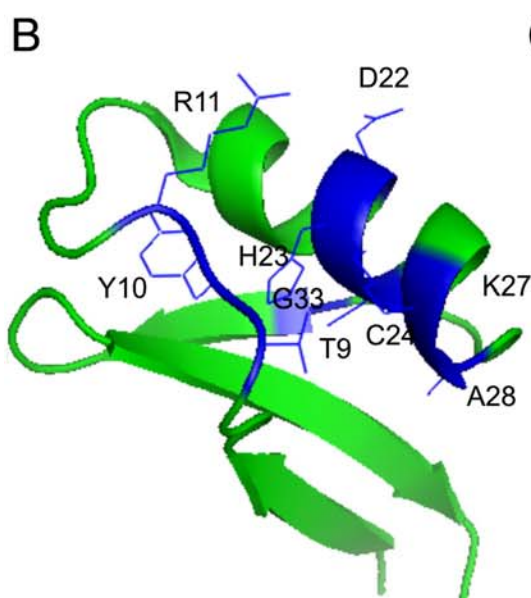
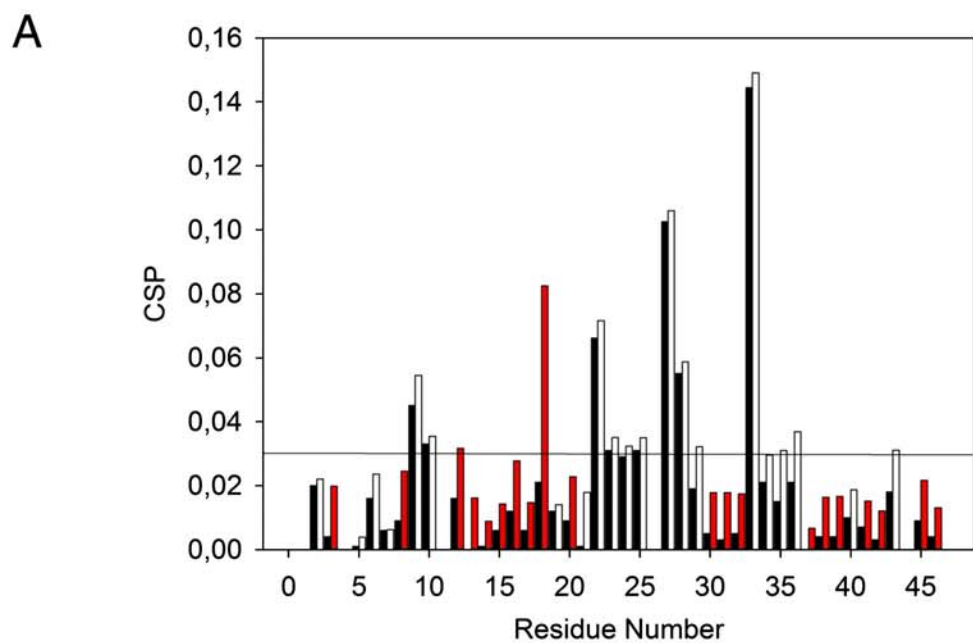


Figure 2: Chemical shift perturbation (CSP) of *Psd1* in the presence of vesicles of PC and PC:CMH (9:1) (A). CSP was obtained according to the equation shown in the Methods section. The horizontal line shows the limit of one standard deviation. To map CSP evoked by the presence of PC, we considered significant CSP above one standard deviation (above the line). Sample condition was as following: 50 mM [*Psd1*], 20 mM phosphate buffer pH 5.0 plus 20 mM NaCl. Black bars refer to chemical shift perturbation in the presence of PC vesicles and white/red bars in the presence of PC:CMH (9:1) vesicles. The residues that were perturbed by PC:CMH (9:1) in more than 100 % relative to PC only were colored in red bars. (B) Ribbon representation of *Psd1* highlighting in blue the CSP evoked by the presence of PC vesicles. (C) Ribbon representation of *Psd1* highlighting in red the CSP evoked by the presence of CMH. These residues were also colored as red bars in A. (D) Electrostatic potential surface of *Psd1*. Blue are positive, red are negative and white neutral residues. The structure shown in the left are in the exact same orientation as in B and C. In the right it was rotated by 180°.

3.2. *Psd1* interaction with vesicles of PC and PC:CMH: Chemical shift perturbation

We used chemical shift perturbation (CSP) to monitor *Psd1* interaction with PC and PC:CMH vesicles. We acquired HSQC spectra of the ^{15}N labeled *Psd1* free and in the presence of vesicles prepared with PC and PC:CMH (molar ratio 9:1). FIGURE 2A shows the difference in chemical shift observed for the amide group for the free protein and in the presence of vesicle of PC (black bars) and PC: CMH (white and red bars).

The changes in chemical shift indicated that *Psd1* interacts with PC and PC:CMH vesicles causing similar CSP. Since the line width did not increase significantly, we could also infer that *Psd1* interacts in fast exchange with the PC vesicle. Similar regions were probed by both systems, and bigger changes were observed around Loop1 and helix1 in the presence of both PC and PC:CMH. The line in Figure 2A shows the limit of one standard deviation. In FIGURE 2B the residues with CSP above the line are highlighted. Note that the perturbed regions are predominantly positive (FIGURE 2D), mainly due to Arg11, His23 and Lys27 residues. This indicates that Coulombic attraction is very important for the interaction of *Psd1* with PC vesicles, as expected. This data suggested that *Psd1* might slide freely in the PC bi-dimensional interface. The increase in salt concentration led to a decrease in CSP values, tending to the chemical shift values of the free state (not shown). The salt dependence reinforces that the Coulombic attraction is the first binding event.

Also CSP decreases with the increase of protein concentration, showing a saturation behavior. The effect showed in FIGURE 2A tends to vanish at *Psd1* concentration above 200 μM and lipid concentration of 5 mM . All the experiments of CSP in the present manuscript are done at non-saturant concentrations of *Psd1* (50 μM).

Since PC comprises the vast majority of the PC:CMH vesicle surface (~ 90 %), it was expected that the absolute value of CSP was predominantly due to the contact with PC. Nevertheless, significant differences were observed comparing the CSP in the presence of PC (black bars) and PC:CMH (white and red bars). To further analyze these differences we looked at residues that exhibited changes in CSP greater than 100 % when compared with PC only (FIGURE 2A, red bars). They are highlighted in red in FIGURE 2C. The presence of CMH in the bilayer generated perturbation in the residues located at loop regions, especially those in Loop1 and Turn3. Remarkably, several cysteines changed in the presence of CMH indicating a conformation accommodation of *Psd1* in this type of vesicle. Overall we believe that the main perturbation was probably due to non-specific electrostatic interaction with PC, while changes generated by the presence of CMH involve other type of interactions such as hydrogen bonds (Thr16 and Asn17 among others) and hydrophobic interactions with residues Val13, Phe15, Ala18 and Trp38.

3.2. *Psd1* interaction with vesicles of PC and PC:CMH: Dynamic properties

To further investigate the interaction of *Psd1* with membranes we compared the R2/R1 ratio observed in the free state and in the presence of PC:CMH vesicles, since it has a relationship with overall rotational correlation time, t_m , and motions in ms-ms timescale [40]. The R2/R1 ratio of the each residue for *Psd1* free solution was very similar in all protein, with an average value around 2.15 (FIGURE 3A). The residues around the first loop and the turn3 (Ala7-Asn17 and His36-Trp38) had bigger R2/R1 values when compared to the average, compatible with exchange processes

The presence of PC:CMH vesicles induced several changes in the R2/R1 ratio. Amino acids Cys14, Phe15 and His36 had a decrease in R2/R1 ratio (FIGURE 3B, red). In opposition, residues Asn17, His29, His36, Asn37 and Trp38 had an increase in the

R2/R1 ratio (FIGURE 3B, magenta). As expected, the amino acids with that presented bigger changes co-localize in the first loop and turn3 region.

Here, we used the information from R2/R1 ratio solely as a way to map the site of interaction of *Psd1* with PC:CMH (FIGURE 3B). Since binding can induce restriction of motion of a certain regions of a protein, stabilizing one particular conformer [14]. This conformational selection leads to a decrease in Rex, as observed for residues Cys14, Phe15 and His36. On the other hand, transient binding can induce an increase in Rex, since the ligand can be in exchange between its free and bound conformation. The binding of *Psd1* to PC:CMH vesicle can evoke both effects in Rex. Probably, conformational selection is taking place, but the transient binding prevent

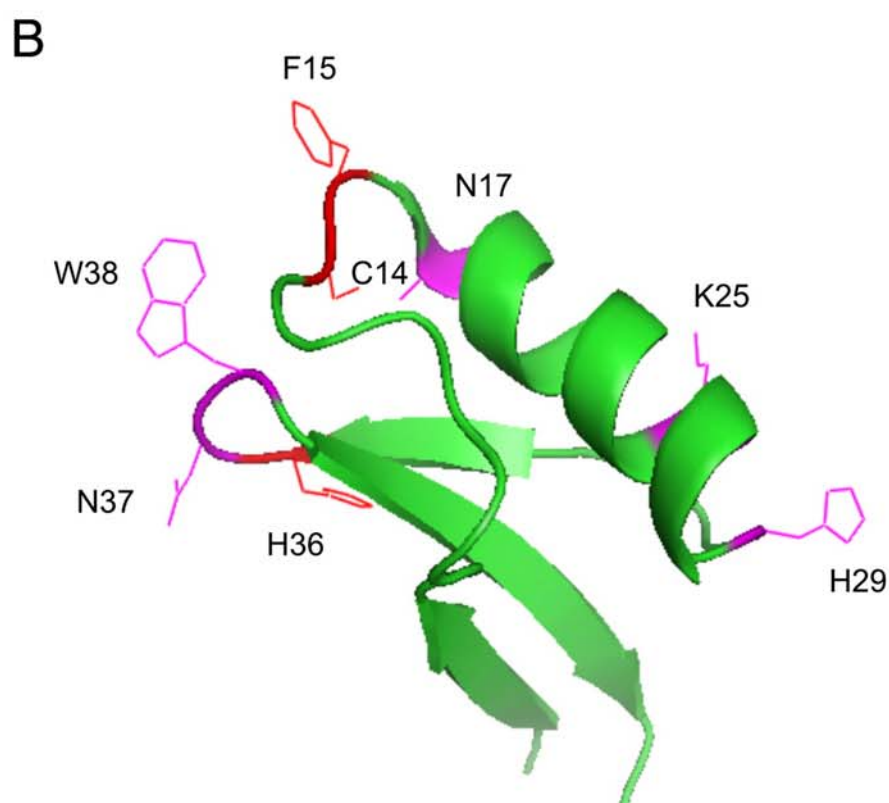
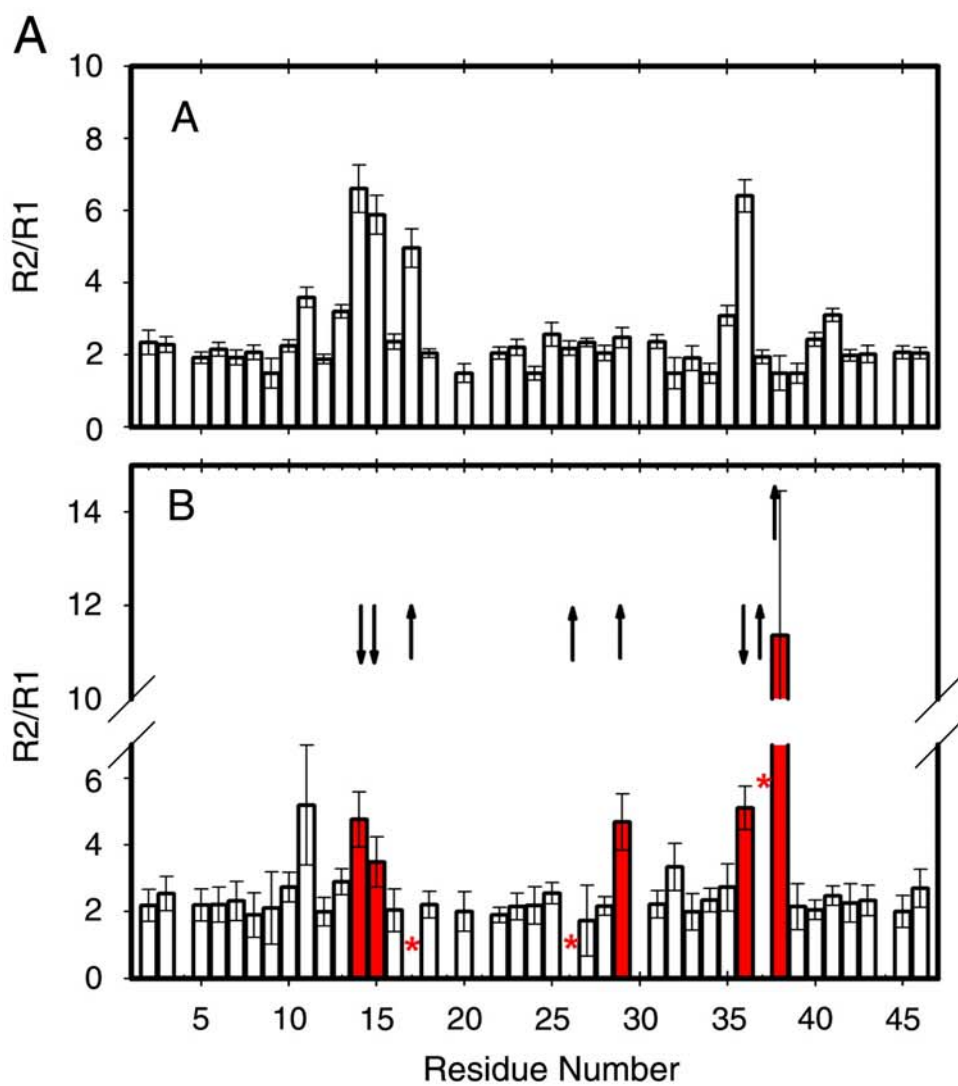


Figure 3: (A) R2/R1 ratio for each amide 15N of *Psd1* (top), values obtained for *Psd1* free in solution, the same shown in Figure 1; (bottom), values obtained for *Psd1* in the presence of PC:CMH (9:1) vesicles. The experiments were performed with extruded vesicles prepared with 20 mM phosphate pH 5, 20 mM NaCl, 200 mM *Psd1* and 5 mM total lipids. The error bars are the sum of the fitting error from R1 and R2. The bars in red highlight the residues with significant difference in R2/R1. We considered significant when the observed difference in R2/R1 ratio are bigger than the sum of the error. The red star indicates the residues where R2/R1 ratio could not be measured due to broadening of the line beyond detection. These residues are in conformational exchange. The arrow indicates the increase or decrease of conformational exchange. The absence of bars indicates that the values could not be accurately measured due to overlaps. (B) Ribbon representation of *Psd1* highlighting the residues where conformation exchange were modified by the presence of PC:CMH (9:1) vesicles. Increase in conformational exchange is in magenta and decrease in red. Note that both reflect binding.

us to fully analyze this data. To completely understand this phenomenon we need further data and this is not the main purpose of this manuscript.

3.3. *Psd1* interaction with micelles of DPC: Chemical shift perturbation and

Dynamic properties

The use of vesicles for solution NMR studies is restricted to systems in fast exchange; otherwise the resonances would be broadened. Micelles are the alternative system for membrane protein studies. We decided to investigate the changes in chemical shift of *Psd1* in the presence of micelles of DPC and DPC CMH. FIGURE 4A shows the CSP when chemical shift values in the presence of compared to *Psd1* in the free state. The residues that were perturbed above one standard deviation were colored in magenta (FIGURE 4B). Residues that the resonances are broadened beyond detection are shown in red (FIGURE 4B). The same regions probed by the experiments with phospholipid vesicles were also monitored with DPC micelles: Loop1 and Turn3. Furthermore, the changes observed extend the ones in vesicles, probably because due to micelle properties the *Psd1* binding equilibrium is shifted toward the bound-state. It is possible to speculate that in micelles, due to different dynamics (faster) and bigger curvature, the hydrophobic aliphatic chains are more exposed leading to bigger *Psd1* insertion.

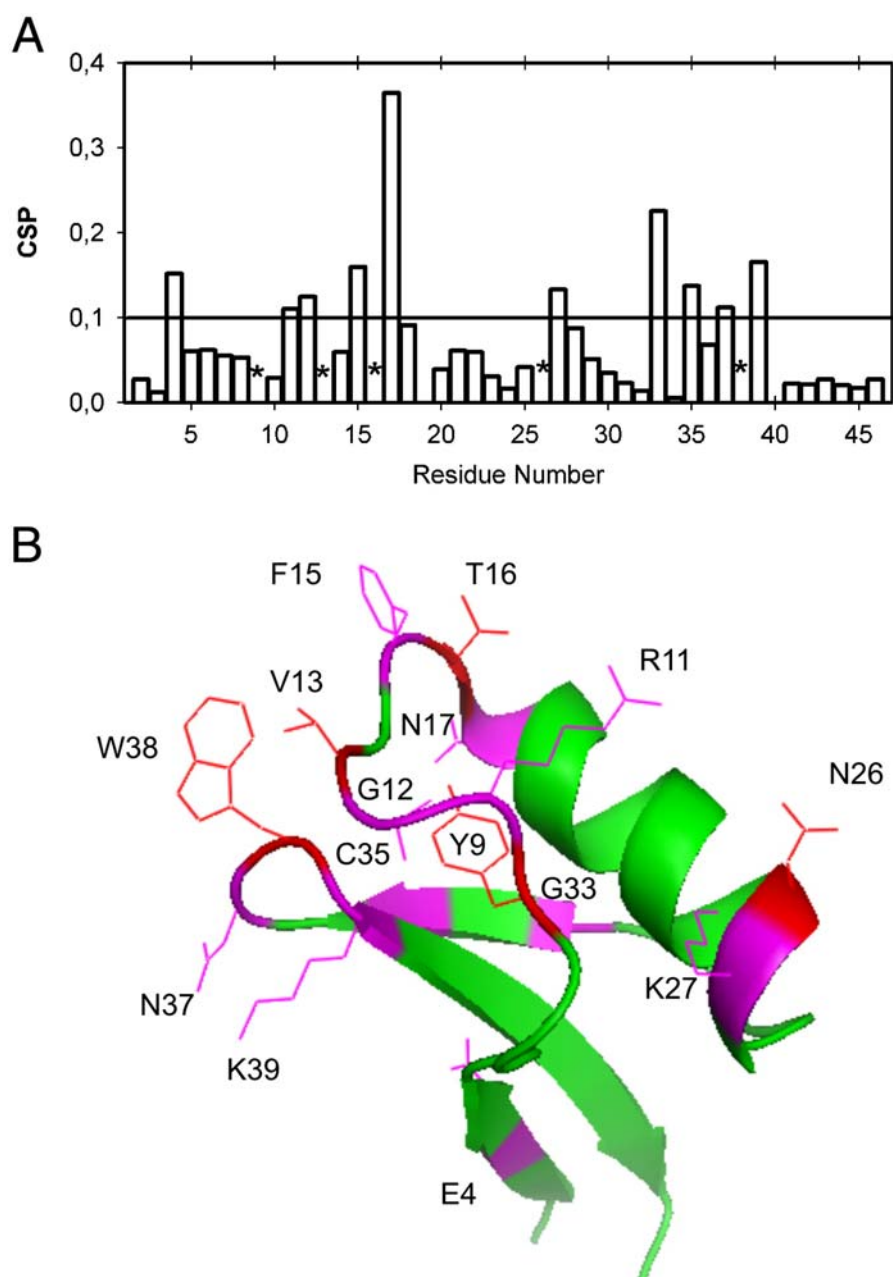


Figure 4: (A) Chemical shift perturbation of *Psd1* by the presence of DPC micelles and DPC micelles plus CMH, respecting a molar ratio CMH:*Psd1* 1:10. The presence of CMH did not show any change in the HSQC spectrum. The CSP plot refers to both conditions. The sample condition was as following: 160 mM [*Psd1*] in 20 mM phosphate buffer pH 5.0 plus, 20 mM NaCl, 300 mM DPC. In the sample containing CMH, we added 600 mM of CMH. The horizontal line shows the limit of one standard deviation. To map CSP evoked by the presence of DPC or DPC plus CMH, we considered significant CSPs above one standard deviation (above the line). The black stars show residues with broadening of the line beyond detection. These residues are in conformational exchange. (B) Ribbon representation of *Psd1* highlighting in magenta the residues with significant CSP. In red are the residues that vanished from the spectra indicating that the presence of DPC significantly increased conformational exchange.

3.4. PepLoop1 (Gly12-Val13-Ser14-Phe15-Thr16-Asn17-Ala18-Ser19) structure in DPC and DPC:CMH.

Based on the mapped specific interaction with CMH we synthesized pepLoop1. PepLoop1 comprises the residues that were perturbed by the presence of CMH. Fragments of a given protein do not necessarily display the same conformation when it is free in solution. However, they maintain the interaction properties, often with lower affinities. One explanation is that the peptide free in solution is in equilibrium among several conformations and upon interaction the interacting-conformer is stabilized [14, 18, 24]. Based on this assumption, we mapped the specific interaction with CMH using pepLoop1.

Loop1 extends from residue 7 to 17 and appear as the most important membrane binding site. We decided to synthesize pepLoop1 starting from Gly12, since it is the flexible hinge of Loop1. To facilitate the experimental procedure we switched Cys14 to Ser14 in the synthetic peptide. Next we probe the interaction of pepLoop1 with DPC and DPC:CMH. The peptide sequence is the following: Gly12-Val13-Ser14-Phe15-Thr16-Asn17-Ala18-Ser19.

PepLoop1 did not have stable structure in solution but was stabilized in the presence of DPC micelles. Interesting for such small peptide, its structure converged as shown in FIGURE 5A. The side chain of Ser14, Phe15 and Thr16 are well converged. Val13, Phe15 and Ala18 form a hydrophobic surface, probably facing the micelle, while Thr16 seems to be interacting with the polar head group.

Figure 6A shows the observed NOEs for pepLoop1 in DPC micelles. Several medium and long range connectivities were observed. The long range NOE between Val13 and Ala 18 imposed a slight bend in the peptide.

When the micelles were mixed with CMH, there was a big change in the NOE

profile and scalar coupling values ($^3J_{\text{HNHa}}$). FIGURE 5B shows the calculated structure for the new set of NOEs and the observed scalar coupling ($^3J_{\text{HNHa}}$). It is worth mentioning that in the presence of CMH $^3J_{\text{HNHa}}$ ranged from 7 to 15 Hz in the region Val13-Ans17, indicative of an extended conformation.

FIGURE 6B shows the observed NOEs for pepLoop1 in the presence of DPC:CMH (0.5:1 - CMH:pepLoop1) and FIGURE 6C DPC:CMH (3:1 - CMH:pepLoop1). There was a decrease in the number of NOEs when compared with the peptide in DPC. This is probably due to the adoption of an extended conformation in the presence of CMH. The long range NOE between Val13 and Ala18 observed for the peptide in DPC was not observed in the presence of CMH. The structural statistics are shown in supplementary TABLE 1.

Moreover, several NOEs between pepLoop1 and CMH were observed (FIGURE 7). CMH was re-assigned in DPC based on previously published values [32]. Phe15 aromatic d protons showed NOEs with the ceramide part of CMH and Thr16 b protons showed several unambiguous NOEs with the glycosil part of CMH. These data suggest that *Psd1* is interacting with the surface of the micelle.

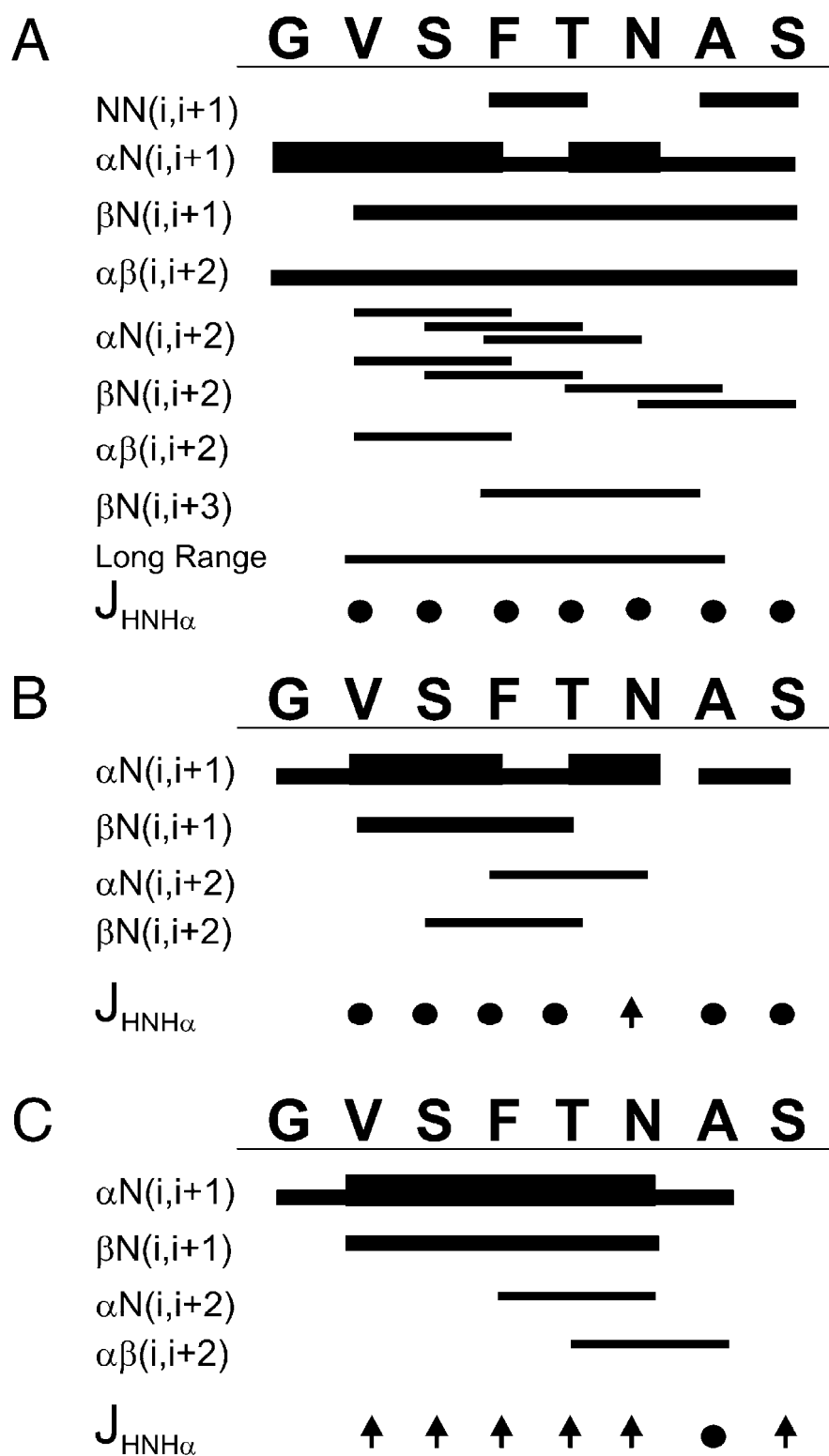


Figure 5: Summary of NOEs of pepLoop1 in DPC micelles (A) or DPC plus CMH, respecting the CMH:pepLoop1 molar ratio of 0.5:1 (B) and 3:1 (C). The data were extracted from NOESY spectra with mixing time of 150 ms. All experiments were carried out at 3.6 mM pepLoop1, 20 mM phosphate buffer and 300 mM DPC.

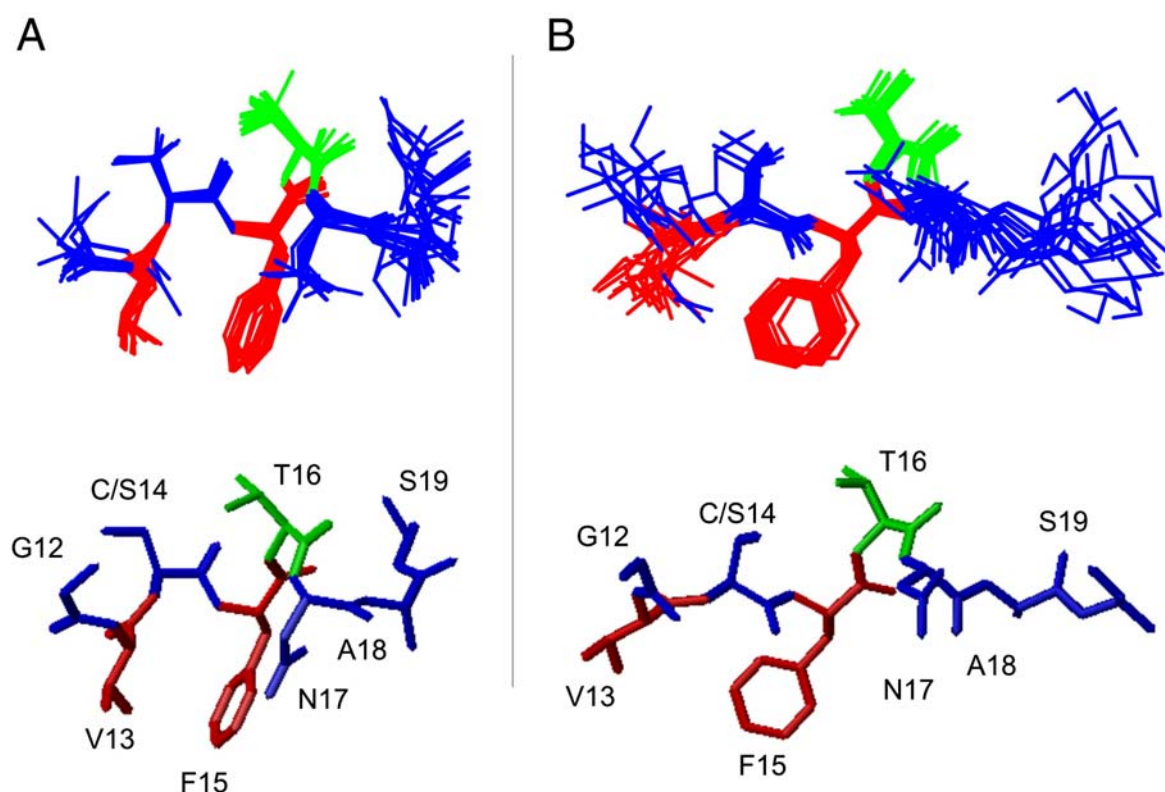


Figure 6: Superposition of the 15 lowest energy structures of pepLoop1 in the presence of DPC (A, top) and DPC plus CMH, respecting a molar ratio CMH:pepLoop1 3:1 (B, top). pepLoop1 sample (3.6 mM) was prepared in 300 mM DPC, 20 mM sodium phosphate buffer (pH 5.5), 10% D₂O and DPC:CMH samples were prepared by adding dry weight of CMH to the DPC sample. In the bottom it is shown a representative of the ensemble for each of the structures.

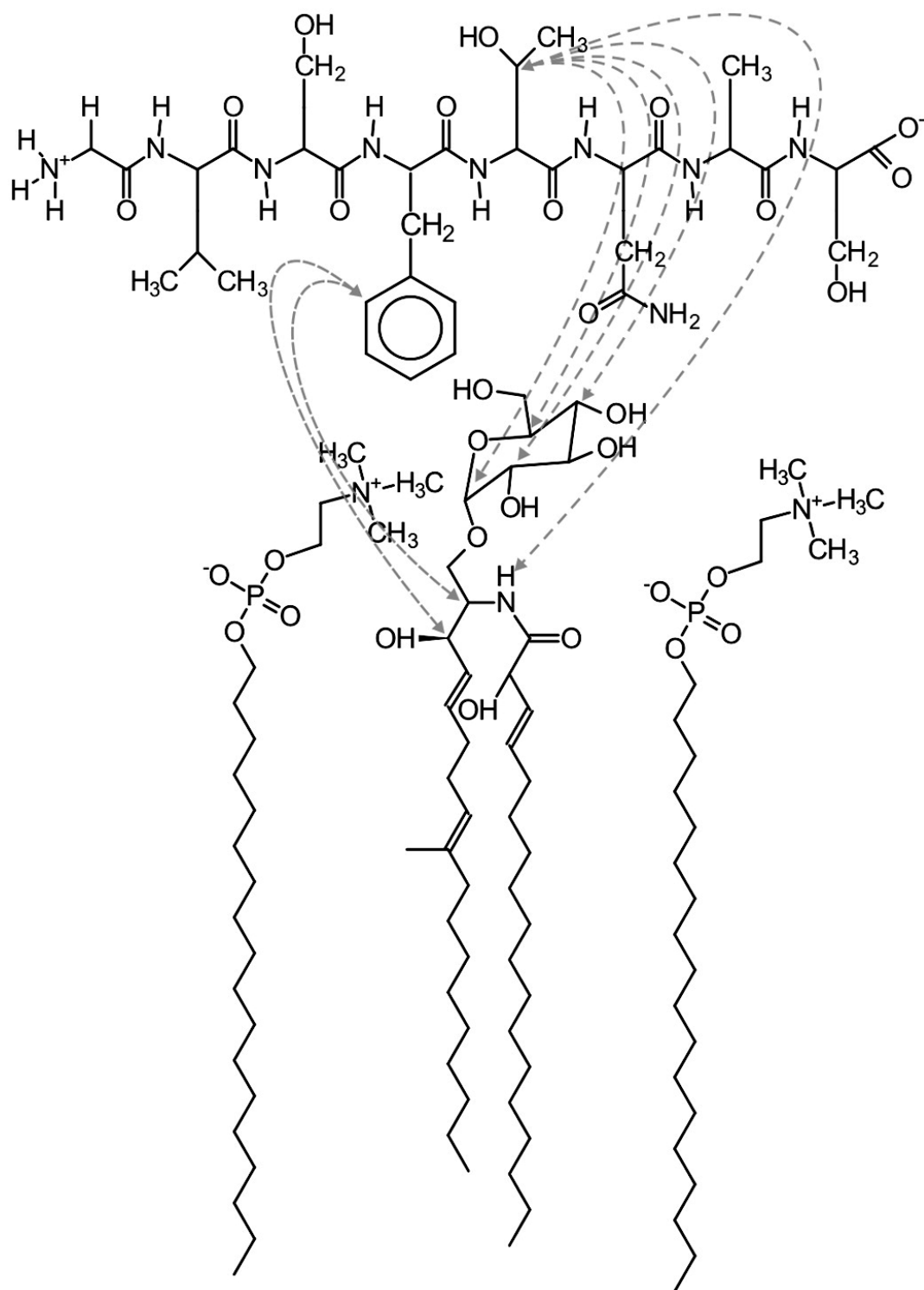


Figure 7: Representation of pepLoop1, two DPC monomers and one CMH. The arrows shows the observed intermolecular NOEs obtained from a NOESY spectrum with mixing time of 150 ms. All experiments were carried out at 3.6 mM pepLoop1, 20 mM phosphate buffer and 300 mM DPC and 10.8 mM CMH (CMH:pepLoop1 molar ratio of 3:1). Note that the interaction of the peptide with CMH occurred through the contact of Phe15 side chain with the aliphatic chains and Thr16 with the carbohydrate group, possibly making hydrogen bonds. We could not observe intermolecular NOEs with DPC, possibly because it is only 1 % protonated.

4. Discussion

4.1. Identification of minimal domains in defensins

Several strategies have been used to identify minimal active domains of defensins in an attempt to create new antimicrobial agents [29-31, 41]. Peptides derived from full length proteins are sometimes even more potent than the source. The MBG01 peptide (19-mer) deduced from *Raphanus* defensin Rs-AFP2, that corresponds to the b2-b3 loop was synthesized and its cysteines replaced by α -aminobutyric acid [31]. The derived peptide showed improved antifungal activity when compared to the native defensin (lower MIC value). Interesting, this peptide also has a Phe and a Val in the loop region. Vila-Perelló et al [29,30] synthesized 13- to 19- mer peptides based on a thionin from *Pyricularia pubera* and the resulting peptides showed an antimicrobial activity similar to the native thionin. Here we showed that pepLoop1 binds CMH, helping us to contribute toward the elucidation of the binding mechanism of Psd1 to fungal membranes. For now we do not know if this peptide shows anti-microbial activity. Studies with peptides, including pepLoop1, corroborate the assumption that fragments of defensins conserve the interaction properties.

Similar results were observed for human defensins where the three-dimensional structure is not always important for antimicrobial activity since the replacement of cysteines by α -aminobutyric acid does not interfere in the antibacterial activity but changes chemotatic properties of the protein [42]. On the other hand, it is not clear if this is always the case. The presence of cystines and, thus the correct fold, seems to be important for many of the activities of defensins [43,44].

Summarizing, these results suggest that specific region in the defensins is

responsible for activity and that includes the ability to interact with membranes and other parts of defensins are responsible for specific recognition and anchoring to the membrane.

There are features of the primary sequences of plant defensins that are important to comment with perspective of the results showed in this manuscript. We compared the primary sequence of *Psd1* with other defensins, focusing the ones from the same family and tribe. Defensins that are evolutionary related may maintain the mechanism of action and their interaction target in the membrane [4]. Cysteines are conserved in all defensins. The highly conserved Gly (position 12 in *Psd1*) is present in all plant defensins. Among the residues that compose the interacting Loop1, the Gly12 contributed to the plasticity of the loop and is probably essential for the recognition process. A conserved residue with thermal flexibility may be a key feature maintained by evolution.

The CMH interacting residue Phe (Phe15 in *Psd1*) is 50 % conserved among plant defensins and alternatively is replaced by bulky hydrophobic residues. The second hit is Leu with 18.5 %. If we compare the presence of Phe among defensins of Fabaceae family the conservation increases to 74 %. The other interacting residue Thr (Thr16 in *Psd1*) is not so conserved as Phe15 but is maintained in 26 % among all plant defensins. Thr16 is 51 % conserved among Fabaceae family. Thr is frequently changed by Ser, which appear at a frequency of 38.5 % in the same family. In conclusion, the ability to make hydrogen bonds with the glucosyl group is maintained for 69.5 % of the Fabaceae defensins. Based on these results the ability to bind CMH should be a conserved feature within Fabaceae defensins.

Defensins in general tends to show low conservation of primary sequence. This is probably due to different mechanisms of interaction with the membrane. The

interaction with the membrane may be only the first cellular target. Afterward, they can get internalized and interact with a cytoplasmic target. Therefore, although the similarity between defensin sequences is small this region can reach high scores in the interacting loops if we compare defensins that share the same membrane target. Similarity is higher among defensins from the same family (Fabaceae). We also found high similarity scores among defensins from Poaceae [4].

4.2. Dynamic properties and membrane interaction

Our data pointed out the importance of Loop 1 for *Psd1* membrane interaction. The mapping was only effective with the use of dynamic properties upon binding. The chemical shift perturbation for such small protein could only partially identify the specific changes that occurred in the binding site. The accommodation in the membrane led to chemical shift changes in different regions of *Psd1*.

On the other hand the R2/R1 ratio changed in specific regions of the protein due to differences in conformational exchange. The decrease in R2/R1 ratio in Loop1 was indicative of decrease in conformational exchange upon membrane binding, probably because the membrane stabilized a specific conformation. Other residues showed increased conformational exchange. This is also indicative of transient binding and mapped the same Loop1 and Turn3.

We mapped the same regions in the presence of PC:CMH vesicles and DPC micelles. However, no difference was observed in DPC micelles in the presence or absence of CMH. We believe that the higher protein insertion of *Psd1* in micelles hampered the observation of small differences in the interaction in PC and PC:CMH. Our data suggests that the phosphatidylcholine head groups are the major attractor of *Psd1* through coulombic attraction. *Psd1* search for specific CMH binding in the membrane surface. The recognition of CMH triggers a conformational change that

promote protein insertion in the membrane, possibly through a local destabilization of the membrane that ultimately leads to exposure of hydrophobic aliphatic chains. The protein flips toward the membrane surface leading to interaction of Loop1 and turn3. Since in micelles there are higher hydrophobic exposure the specific effect was not observed.

Several data in the literature suggest the importance of loop regions for interaction [45,46]. The analysis of protein-protein complexes showed that loop regions are preferred contact points and the frequent presence of aromatic amino acids suggest that their side chain are important probably to restrict the loop conformation in the free state [45,47].

4.4. Conformation selection

In the last ten years a new view of binding and allostery is being deduced from the dynamical behavior of protein in their free states. Frequently, regions that participate in recognition show motions in the timescale of milli- to microseconds. In the case of *Psd1*, Loop1 and Turn3 showed concerted motion in this timescale. In the free state, these recognition regions (frequently loops) are in equilibrium between two or more conformational states. The process of recognition implies in the stabilization of one of these pre-existent conformational states and selection occurs through population shift toward the bound state. These binding mechanisms are being named conformational selection [14-18]. Here, we showed that conformational selection took place in membrane recognition by *Psd1*. Binding to the membrane leaded to decrease in conformational exchange for residues Cys14 and Phe15 and His36. We showed that Phe15 interacted directly to CMH. The construction of mutants will validate the important amino acids for interaction.

Acknowledgments

Thanks are due to Dr. Pedro L. Oliveira (UFRJ, Brazil) for the use of their laboratory facilities and for useful discussions. We also thank R. M. Domingues and Fabricio Cruz for technical assistance. This work was supported by Grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), ICGEB-Trieste, Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro Carlos Chagas Filho (FAPERJ- Pensa Rio), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and National Institute of Structural Biology and Bioimaging (INBEB).

Reference:

- [1] B.P.H.J. Thomma, B.P.A. Cammue and K. Thevissen, Plant defensins, *Planta* **216** (2002), pp. 193-202.
- [2] J. Sels, J. Mathys, B.M.A. De Coninck, B. Cammue and M.F.C. De Bolle, Plant pathogenesis-related (PR) proteins: A focus on PR peptides, *Plant Physiol. And Biochem.* **46** (2008), pp. 941-950.
- [3] K.A. Silverstein, W.A. Moskal, H.C. Wu, B.A. Underwood, M.A. Graham, C.D. Town, K.A. VandenBosch, Small cysteine-rich peptides resembling antimicrobial peptides have been underpredicted in plants, *Plant J.* **51** (2007), pp. 262-280.
- [4] V.S. De Paula, G. Razzera, L. Medeiros, C.A. Miyamoto, M.S. Almeida, E. Kurtenbach, F.C.L. Almeida and A.P. Valente, Evolutionary relationship between defensins in the Poaceae family strengthened by the characterization of new sugarcane defensins, *Plant Mol. Biol.* **68** (2008), pp. 321-35.
- [5] F.R. Terras, K. Eggermont, V. Kovaleva, N.V. Raikhel, R.W. Osborn, A. Kester, A. S.B. Rees, J. Vanderleyden, B.P. Cammue and W.F. Broekaert, Small cysteine-rich antifungal proteins from raddish: their role in host defense, *Plant cell* **7** (1995), pp. 573-588.
- [6] A.G. Gao, S.M. Hakimi, C.A. Mittanck, Y. Wu, B.M. Woerner, D.M. Stark, D.M. Shah, J. Liang and C.M. Rommens, Fungal pathogen protection in potato by expression of plant defensin peptide, *Nature Biotechnol.* **18** (2000), pp. 1307-1310.
- [7] J.F. Marcos, A. Muñoz, E. Pérez-Payá, S. Misra and B. López-García, Identification and rational design of novel antimicrobial peptides for plant protection, *Ann. Rev. Phytopathol.* **46** (2008), pp. 273-301.
- [8] W.W.J. Janisiewicz, I.B. Pereira, M.S. Almeida, D.P. Roberts, M. Wisniewski and

- E. Kurtenbach, Improved biocontrol of fruit decay fungi with *Pichia pastoris* recombinant strains expressing Psd1 antifungal peptide, *Post. Biol. Technol.* **47** (2008), pp. 218–225.
- [9] A.M. Aerts, I.E.J.A. François, B.P.A. Cammue and K. Thevissen, The mode of antifungal action of plant, insect and human defensins, *Cell. Mol. Life Sci.* **65** (2008), pp. 2069–2079.
- [10] R. Jelinek and S. Kolusheva, Membrane interactions of host-defense peptides studied in model systems, *Curr. Protein Pept. Sci.* **6** (2005), pp. 103–114.
- [11] D. Lobo, I.B. Pereira, L. Fragel-Madeira, L.N. Medeiros, L.M. Cabral, J. Faria, R.C. Campos, R. Linden, E. Kurtenbach, Antifungal *Pisum sativum* defensin one interacts with *Neurospora crassa* cyclin F related to cell cycle, *Biochemistry* **46** (2007), pp. 987–996.
- [12] K. Thevissen, B.P. Cammue, K. Lemaire, J. Winderickx, R.C. Dickson, R.L. Lester, K.K. Ferket, F. Van Even, A.H. Parret, W.F. Broekaert, A gene encoding a sphingolipid biosynthesis enzyme determines the sensitivity of *Saccharomyces cerevisiae* to an antifungal plant defensin from dahlia (*Dahlia merckii*), *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **97** (2000), pp. 9531–9536.
- [13] K. Thevissen, D.C. Warnecke, I.E. Francois, M. Leipelt, E. Heinz, C. Ott, U. Zahringer, B.P. Thomma, K.K. Ferket, B.P. Cammue, Defensins from insects and plants interact with fungal glucosylceramides, *J. Biol. Chem.* **279** (2004), pp. 3900–3905.
- [14] K. Henzel-Wildman and D. Kern, Dynamic personalities of proteins, *Nature* **450** (2008), pp. 964–972.
- [15] B. Volkman, D. Lipschitz, D.E. Wemmer and D. Kern, Two-State Allosteric Behavior in a Single-Domain Signaling Protein, *Science* **295** (2002), pp. 2429–2433.

- [16] L.C. James and D.S. Tawfik, Conformational diversity and protein evolution – a 60-year-old hypothesis revisited, *Trends Biochem Sci.* **28** (2003), pp. 361-368
- [17] N. Tokuriki, F. Stricher, L. Serrano and D.S. Tawfik, How Protein Stability and New Functions Trade Off, *PloS Comp. Biol.* **4** (2008), e1000002.
- [18] A.P. Valente, C.A. Miyamoto and F.C.L. Almeida, Implications of protein conformational diversity for binding and development of new biological active compounds, *Curr. Med. Chem.* **13** (2006), pp. 3697-3703.
- [19] A.G. Palmer III, NMR probes of molecular dynamics: Overview and comparison with other techniques, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **30** (2001), pp. 129–55.
- [20] R. Brüschweiler, New approaches to the dynamic interpretation and prediction of NMR relaxation data from proteins, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **13** (2003), pp. 175 – 183.
- [21] G. Lipari and A. Szabo, Model-Free Approach to the Interpretation of Nuclear Magnetic Resonance Relaxation in Macromolecules. 1. Theory and Range of Validity, *J. Am. Chem. Soc.*, **104** (1982), pp. 4546-4559.
- [22] L.W. Tinoco, A. Da Silva Jr., A. Leite, A.P. Valente and F.C.L. Almeida, NMR structure of PW2 bound to SDS micelles. A tryptophan-rich anticoccidial peptide selected from phage display libraries, *J. Biol. Chem.* **27** (2002), pp. 3651-3656.
- [23] L.W. Tinoco, F. Gomes-Neto, A.P. Valente and F.C. Almeida, Effect of micelle interface on the binding of anticoccidial PW2 peptide, *J. Biomol. NMR* **39** (2007), pp. 315-322.
- [24] C. Cruzeiro-Silva, F. Gomes-Neto, L.W. Tinoco, E.M. Cilli, P.V. Barros, P.A. Lapido-Loureiro, P.M. Bisch, F.C. Almeida and A.P. Valente, Structural biology of membrane-acting peptides: conformational plasticity of anticoccidial peptide PW2 probed by solution NMR, *Biochim Biophys Acta.* **1768** (2007), pp. 3182-92.

- [25] A. Da Silva Jr, U. Kawazoe, F.F. Freitas, M.S. Gatti, H. Dolder, R.I. Schumacher, M.A. Juliano, M.J. Da Silva MJ and A. Leite, Avian anticoccidial activity of a novel membrane-interactive peptide selected from phage display libraries, *Mol. Biochem. Parasitol.* **120** (2002), pp. 53-60.
- [26] M.S. Almeida, K.M.S. Cabral, R.B. Zingali, E. Kurtenbach, Characterization of two novel defense peptides from pea (*Pisum sativum*) seeds, *Arch. Biochem. Biophys.* **378** (2000), pp. 278-286.
- [27] M.S. Almeida, K.M.S. Cabral, E. Kurtenbach, F.C.L. Almeida, A.P. Valente, Solution structure of *Pisum sativum* defensin 1 by high resolution NMR: plant defensins, identical backbone with different mechanisms of action, *J. Mol. Biol.* **315** (2002), pp. 749-757.
- [28] K.M.S. Cabral, M.S. Almeida, A.P. Valente, F.C.L. Almeida, E. Kurtenbach, Production of the active antifungal *Pisum sativum* defensin 1 (*Psd1*) in *Pichia pastoris*: overcoming the inefficiency of the STE13 protease, *Protein Express. Purif.* **31** (2003), pp. 115-122.
- [29] M. Vila-Perello, S. Togno, A. Snchez-Vallet, F. Garca-Olmedo, A. Molina, and D. Andreu, A Minimalist Design Approach to Antimicrobial Agents Based on a Thionin Template, *J. Med. Chem.*, **49** (2006), pp. 448-451.
- [30] M. Vila-Perello, A. Sanchez-Vallet, F. Garcia-Olmedo, A. Molina and D. Andreu Structural Dissection of a Highly Knotted Peptide Reveals Minimal Motif with Antimicrobial Activity *J. Biol. Chem.* **280** (2005), 1661-1668.
- [31] W.M. Schaaper, G.A. Posthuma, H.H. Plasman, L. Sijtsma, F. Fant, F.A. Borremans, K. Thevissen, W.F. Broekaert, R.H. Meloen, A. van Amerongen, Synthetic peptides derived from the beta2-beta3 loop of *Raphanus sativus* antifungal protein 2 that mimic the active site, *J. Pept. Res.* **57** (2001), pp. 409-418.

- [32] R.S. Duarte, C.R. Polycarpo, R. Wait, R. Hartmann, E. Barreto-Bergter, Structural characterization of neutral glycosphingolipids from *Fusarium* species, *Biochim. Biophys. Acta*, **1390** (1998), pp. 186-196.
- [33] M.J. Hope, M.B. Bally, G. Webb, P.R. Cullis, Production of large unilamellar vesicles by a rapid extrusion procedure. Characterization of size distribution, trapped volume and ability to maintain a membrane potential, *Biochim. Biophys. Acta* **812** (1985), pp. 55-65.
- [34] M. Piotto, V. Saudek, V. Sklenar, Gradient-tailored excitation for single-quantum nmr-spectroscopy of aqueous-solutions, *J. Biomol. NMR* **2** (1992), pp. 661–666.
- [35] V. Sklenar, M. Piotto, R. Leppik, V. Saudek, Gradient-tailored water suppression for ¹H-¹⁵N HSQC experiments optimized to retain full sensitivity, *J. Magn Reson A* **102** (1993), pp. 241–245.
- [36] N.A. Farrow, R. Muhandiram, A.U. Singer, S.M. Pascal, C.M. Kay, G. Gish, S.E. Shoelson, T. Pawson, J.D. Forman-Kay and L.E. Kay, Backbone dynamics of a free and a phosphopeptidecomplexed Src homology 2 domain studied by ¹⁵N NMR relaxation, *Biochemistry* **33** (1994), pp. 5984–6003.
- [37] H. Y. Carr, E. M. Purcell, Effects of Diffusion on Free Precession in Nuclear Magnetic Resonance Experiments, *Phys. Rev.* **94** (1954), pp. 630- 638.
- [38] S. Meiboom, D.Gill, Modified spin-echo method for measuring nuclear spin relaxation times, *Rev. of Sci. Instrum.* **29** (1958), pp. 688-691.
- [39] A.G.Palmer III, J. Willians, A. McDermott, Nuclear Magnetic Resonance studies of biopolymer dynamics, *J. Phys. Chem.* **100** (1996), pp. 13293-13310.
- [40] A.G. Palmer, C.D. Kroenke, J.P. Loria, Nuclear magnetic resonance methods for quantifying microsecond-to-millisecond motions in biological macromolecules, *Methods Enzymol.* **339** (2001), pp. 204-238.

- [41] T.L. Raguse, E.A. Porter, B. Weisblum and S.H. Gellman, Structure–Activity Studies of 14-Helical Antimicrobial β -Peptides: Probing the Relationship between Conformational Stability and Antimicrobial Potency, *J. Am. Chem. Soc.* **124** (2002), pp. 12774-12785.
- [42] Z. Wu, D.M. Hoover, D. Yang, C. Boulegue, F. Santamaria, J.J Oppenheim, J. Lubkowski and W Lu, Engineering disulfide bridges to dissect antimicrobial and chemotactic activities of human α -defensin 3, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **100** (2003), pp. 8880-8885.
- [43] V. Dhople, A. Krukemeyer, A. Ramamoorthy. The human beta-defensin-3, an antibacterial peptide with multiple biological functions. *Biochim Biophys Acta.* **1758** (2006) pp.1499-1512.
- [44] J.P. Powers, A. Tan, A. Ramamoorthy, R.E. Hancock. Solution structure and interaction of the antimicrobial polyphemusins with lipid membranes. *Biochemistry.* **44** (2005) pp. 15504-15513.
- [45] M. Buyong, T. Elkayam, H. Wolfson and R. Nussinov, Protein–protein interactions: Structurally conserved residues distinguish between binding sites and exposed protein surfaces, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **13** (2003), pp. 5772-5777.
- [46] A. Shulman-Peleg, M. Shatsky, R. Nussinov and H. J. Wolfson, Spatial chemical conservation of hot spot interactions in protein-protein complexes, *BMC Biology* **5** (2007), pp. 43-54.
- [47] S.A. Dames, R. Aregger, N. Vajpai, P. Bernado, M. Blackledge, S. Grzesiek, Residual dipolar couplings in short peptides reveal systematic conformational preferences of individual amino acids, *J. Am. Chem. Soc.* **128** (2006), pp. 13508-13514.

Supplementary Table 1: Summary of structural statistics for PepLoop1 in DPC micelles and DPC/CMH (Molar Ratio of PepLoop 1/CMH was 3:1).

	PepLoop1 in DPC	PepLoop1 in DPC:CMH
Total no. of distance constraints	106	34
No. of intraresidue constraints	36	18
No. of sequential constraints	37	14
No. of medium range constraints (> i, i+2)	33	2
No. of dihedral constraints ($^3J_{\text{HNHA}}$)	0	5
R.M.S. deviation from ideal geometry		
Bonds (Å)	0.0027 +/- 0.00030	0.0021 +/- 0.00095
Angles (degrees)	0.4637 +/- 0.0550	0.2452 +/- 0.0415
Dihedral (degrees)	6.759 +/- 2.4210	1.982 +/- 0.7398
Improper (degrees)	0.2574 +/- 0.0695	0.1058 +/- 0.0120
NOE (Å)	0.0123 +/- 0.0041	0.0300 +/- 0.0183
Energy (Kcal/mol)		
Overall	21.86 +/- 4.56	7.37 +/- 3.88
Bonds	0.75 +/- 0.16	0.55 +/- 0.36
Angle	6.17 +/- 1.40	1.75 +/- 0.54
Improper	0.60 +/- 0.36	0.10 +/- 0.02
VDW (Repel)	7.92 +/- 2.05	1.38 +/- 0.67
NOE	1.32 +/- 0.90	3.11 +/- 2.32
Pairwise RMSD (Å)		
Backbone/Heavy Atoms (all)	0.852/1.337	1.097/1.538
Backbone/Heavy Atoms (2-7)	0.515/1.143	0.613/1.134
Procheck		
Allowed region	99.6 %	100 %

5. Parte III

Comparação da afinidade de *Psd1* a pequenas vesículas unilamelares (SUV) compostas de PC, de PC:CMH e de CMH por Ressonância Plasmônica de superfície (SPR) e avaliação da importância dos resíduos de glicina na posição 12 e histidina na posição 36 de *Psd1* na interação com CMH por SPR bem como para sua atividade biológica.

Os resultados apresentados nas partes I e II dessa tese mostram que a proteína *Psd1* interage com CMH através da alça 1 e da volta 3, regiões que possuem mudanças conformacionais (figura 2 e 3, parte II). As medidas através CSP e parâmetros de relaxação de ^1H - ^{15}N por NMR forneceram uma visão geral sobre o mecanismo de interação de *Psd1* com CMH, atração por carga da superfície, orientação da proteína na membrana, e estabilização em uma (s) conformação (ões) por conta da ligação ao CMH. Entretanto a metodologia utilizada não permitiu que informações quantitativas desta interação fossem.

Nessa parte a seguir, o objetivo principal será quantificar a interação de *Psd1* com CMH de forma a tentar diferenciá-la numericamente da interação com PC, mostrada nas seções anteriores, bem como relacioná-la com a atividade antifúngica através de ensaios utilizando a cepa de *Candida albicans* deficiente no gene que codifica a enzima glicosilceramida sintase (GCS), em comparação com a cepa parental.

A interação foi avaliada por Ressonância Plasmônica de Superfície (SPR) que fornece dados sobre a dinâmica da interação em tempo real, como as velocidades de associação e de dissociação. A relevância da glicoceramida CMH para a atividade biológica de *Psd1* foi testada contra as cepas de *Candida albicans* selvagem e ΔGCS1 , portanto deficiente em CMH. Ainda nesta linha, foi realizada a avaliação da importância de resíduos de *Psd1* presentes na alça 1 (Gly12) e na volta 3 (His36) na interação por

CMH por SPR e para sua atividade biológica por ensaio de microcultura através da utilização de mutantes sítio-dirigidas de *Psd1* em que os aminoácidos Gly12 e His36 foram substituídos por Glu e Lys respectivamente.

5.1 Materiais e métodos

5.1.1. Mutantes sítio-dirigidas da defensina *Psd1*

5.1.1.1. Transformação de *Pichia pastoris* com os plasmídeos recombinantes para produção das mutantes sítio-dirigidas *Psd1Gly12Glu* e *Psd1His36Lys*

Os genes de *Psd1Gly12Glu* e *Psd1His36Lys* foram sintetizados pela GeneScripts Company e inseridos no vetor de expressão pPIC9 gerando os plasmídeos recombinantes pPIC9-*Psd1Gly12Glu* e pPIC9-*Psd1His36Lys*. Cepas da bactérias *E. coli* DH5- α foram transformadas com os plasmídeos recombinantes pPIC9-*Psd1Gly12Glu* ou pPIC9-*Psd1His36Lys* e plaqueadas em meio LB ágar contendo ampicilina (100 μ g/mL).

Bactérias contendo o plasmídeo de interesse foram crescidas em 50 mL de meio LB com ampicilina (100 μ g/mL) e os respectivos DNAs plasmidiais foram purificados utilizando o kit *PureYield™ Plasmid Midiprep System* (Promega). Todos os DNAs (25 μ g cada) foram linearizados com 2 U da enzima Sal I durante a noite a 37° C. O produto completamente linearizado foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1,0 % e uma vez verificada a digestão, todo o material foi recuperado utilizando-se *kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega) para transformação de *Pichia pastoris* GS115 como descrito a seguir.

Uma colônia da cepa selvagem *Pichia pastoris* GS115 foi crescida em 250 mL de meio YPD por 12 horas até atingir absorvância 1,5. Nesta fase do crescimento, as culturas foram imediatamente resfriadas e centrifugadas a 2.300 g por 15 minutos a 4° C para descarte do sobrenadante. As células foram ressuspensas em 250 mL de água Milli-Q estéril gelada e novamente recuperadas através de centrifugação. Este passo foi repetido por mais duas vezes utilizando-se 250 e 125 mL de água Milli-Q estéril. Uma

quarta lavagem das células foi realizada com 10 mL de sorbitol 1 M gelado. Após esta última centrifugação, as células foram ressuspensas em 2 mL de sorbitol 1 M gelado e mantidas em gelo até o momento da transformação.

80 microlitros das células eletrocompetentes obtidas na etapa anterior foram incubados por 5 minutos no gelo em cubeta de 0,2 cm (própria para eletroporação) com vetor linearizado (volume final obtido com adição de sorbitol 1 M gelado foi de 400 μ L). Passado este tempo, as cubetas foram submetidas ao pulso com 400 Ω de resistência, 2,5 kV e 25 μ F de capacitância. Imediatamente após o pulso, as amostras receberam 1 mL de sorbitol 1 M gelado e foram transferidas para tubos de 15 mL. Estes foram incubados por 1 hora a 30° C até adição de 1 mL de meio YPD. Após isto, as células foram mantidas a 30° C por mais 1 hora até plaqueamento de 200 μ L desta suspensão em meio MD Agar (YNB sem aminoácidos 1,34 %, biotina 4×10^{-5} %, glicose 1 %, ágar bacteriológico 2 %). As placas foram mantidas a 28° C por 72 horas até visualização das colônias transformadas. Células de *Pichia pastoris* somente submetidas ao choque (sem plasmídeo) foram usadas como controle da transformação.

5.1.1.2. Seleção da levedura de melhor expressão.

Cinco colônias de cada transformação foram crescidas em 3 mL de meio BMG a 28° C com agitação constante em frasco de 50 mL por 24 horas. A seguir, as culturas foram submetidas a centrifugação em centrífuga clínica por 5 minutos a velocidade total e após retirada do sobrenadante as células foram ressuspensas em cinco mL de meio BBS contendo 0,5 % metanol. A concentração inicial de células nessas amostras variou entre 1,0 e 2,0 de absorvância. As culturas foram mantidas por 72 horas em BBS com a adição de 2,5 μ L de metanol (0,5 %) a cada 24 horas para expressão das proteínas de interesse.

O sobrenadante foi separado das células em suspensão por centrifugação em centrífuga clínica por 5 minutos a velocidade total. Os sobrenadantes foram submetidos a eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida 18 % e as amostras de interesse evidenciadas por coloração por prata (Oakley, B.R. e cols., 1980).

5.1.1.3. Confirmação da produção das proteínas recombinantes.

As proteínas *Psd1*, *Psd1Gly12Glu* e *Psd1His36Lys* foram seqüenciadas após digestão com tripsina e LC/MS/MS pela Molecular Biology Proteomics Facility, The University of Oklahoma Health Sciences Center. Os resultados obtidos estão no anexo 1.

5.1.2. Interação proteína-lipídeo por Ressonância Plasmônica de superfície (SPR).

5.1.2.1 Preparação de vesículas lipídicas para SPR.

Os lipídeos PC, CMH ou uma mistura dos dois PC:CMH na proporção de 7:3 (M/M), foram solubilizados em clorofórmio e secos com nitrogênio gasoso até total remoção do solvente orgânico. Uma vez obtido o filme lipídico seco, o material foi ressuspenso em HEPES 10 mM, pH 7,4 e NaCl 150 mM, para uma concentração final de lipídeo igual a 1 mM. Após forte agitação em vortex por 5 minutos a preparação foi mantida no gelo e sonicada no sonicador de ponteira *microson ultrasonic cell disruptor* (Misonix) com pulsos de 5 segundos de duração, com pausa de 5 segundos entre os pulsos (pulsator, Virtis) por um tempo total de 5 minutos, sempre no gelo. Após a sonicação a preparação foi centrifugada a 14 000 RPM por 20 minutos a 4° C e a parte superior da preparação foi utilizada nos experimentos de SPR.

5.1.2.2. Verificação do tamanho das vesículas por contrastação negativa.

Uma alíquota das vesículas obtidas como descrito em acima foi diluída 100 vezes em HEPES 10 mM, pH 7,4 e NaCl 150 mM e submetida à análise por contrastação negativa. Uma gota da suspensão de vesículas foi depositada sobre grade de cobre, revestida com filme de formvar. Após 3 minutos o excesso do líquido foi retirado, aproximando da borda da grade um pedaço de papel de filtro, com o cuidado de não deixar secar completamente o filme. Uma gota de acetato de uranila 3% foi pingada sobre a grade e após 30 segundos o excesso do reagente foi retirado com papel de filtro e a grade foi seca em contato com o ar. Este material foi observado no Microscópio Eletrônico de Transmissão Zeiss 900.

5.1.2.3. Ensaio de ligação de *Psd1* à vesículas lipídicas por Ressonância Plasmônica de Superfície (SPR).

A Ressonância Plasmônica de Superfície (SPR) foi introduzida na década de 1990 como uma tecnologia de ponta em biosensores de afinidade para análises de interações biomoleculares. SPR é um fenômeno elétrico-óptico obtido da interação da luz com uma superfície metálica. Sob certas condições a energia carregada pelos fótons da luz é transferida para a nuvem de elétrons, formando os chamados plasmons, sobre a superfície do metal. Essa transferência de energia ocorre somente em um específico comprimento de onda ressonante da luz. No ângulo correspondente à ressonância plasmônica de superfície, ocorre, na superfície do metal, a diminuição da refletividade devido ao aumento da absorção da energia da luz incidente (Englebienne P. e cols., 2003).

A FIGURA 5.1 mostra como o fenômeno de SPR tem aplicabilidade como biosensor. Quando a luz polarizada é desviada por um prisma para uma parte do sensor

chip contendo uma película fina de metal no topo que neste caso é composta de ouro, a luz será refletida pela película do metal, agindo como um espelho. Ao mudar o ângulo de incidência da luz e monitorar a intensidade de luz refletida, a intensidade de luz refletida atinge um mínimo (ângulo A). Neste ângulo de incidência, a luz excitará os elétrons da superfície do metal formando plasmons e, causando uma diminuição da intensidade da luz. O ângulo em que ocorre a perda máxima da intensidade de luz refletida é chamado de ângulo da ressonância ou ângulo de SPR sendo, por exemplo, dependente dos índices de refração dos meios de comunicação em ambos os lados do metal. Qualquer alteração nas proximidades da superfície de metal do sensor chip, como adsorção de moléculas, causará alteração do ângulo ideal para formação de plasmon (ângulo B) observado pelo aumento de intensidade de luz detectada (Schasfoort R. B. M. and Tudos A. J., 2008). Esta variação com relação ao ângulo de ressonância e a intensidade de luz tem sido explorado com sucesso por SPR.

A cinética de interação em SPR tem como princípio básico medir a afinidade de um par de ligantes em que um deles está imobilizado na superfície (ligante, FIGURA 5.2) e outro ligante (analito, FIGURA 5.2) deve ser exposto ao primeiro de forma e com concentração constante. Neste sistema, na associação a concentração do analito é mantida pela injeção constante do mesmo armazenado no sistema (FIGURA 5.3). O fluxo constante utilizado para a injeção visa manter a concentração solúvel do analito dentro da câmara sempre igual, independentemente da quantidade de analito ligado ao ligante imobilizado na matriz do chip. Logo, o real objetivo é encontrar uma situação em que podemos mensurar a velocidade da associação (k_a) e da dissociação (k_d) da interação, de preferência obtendo a resposta na situação de equilíbrio, isto é, em que quantidade de analito associando ao ligante é igual à quantidade de analito dissociando do ligante.

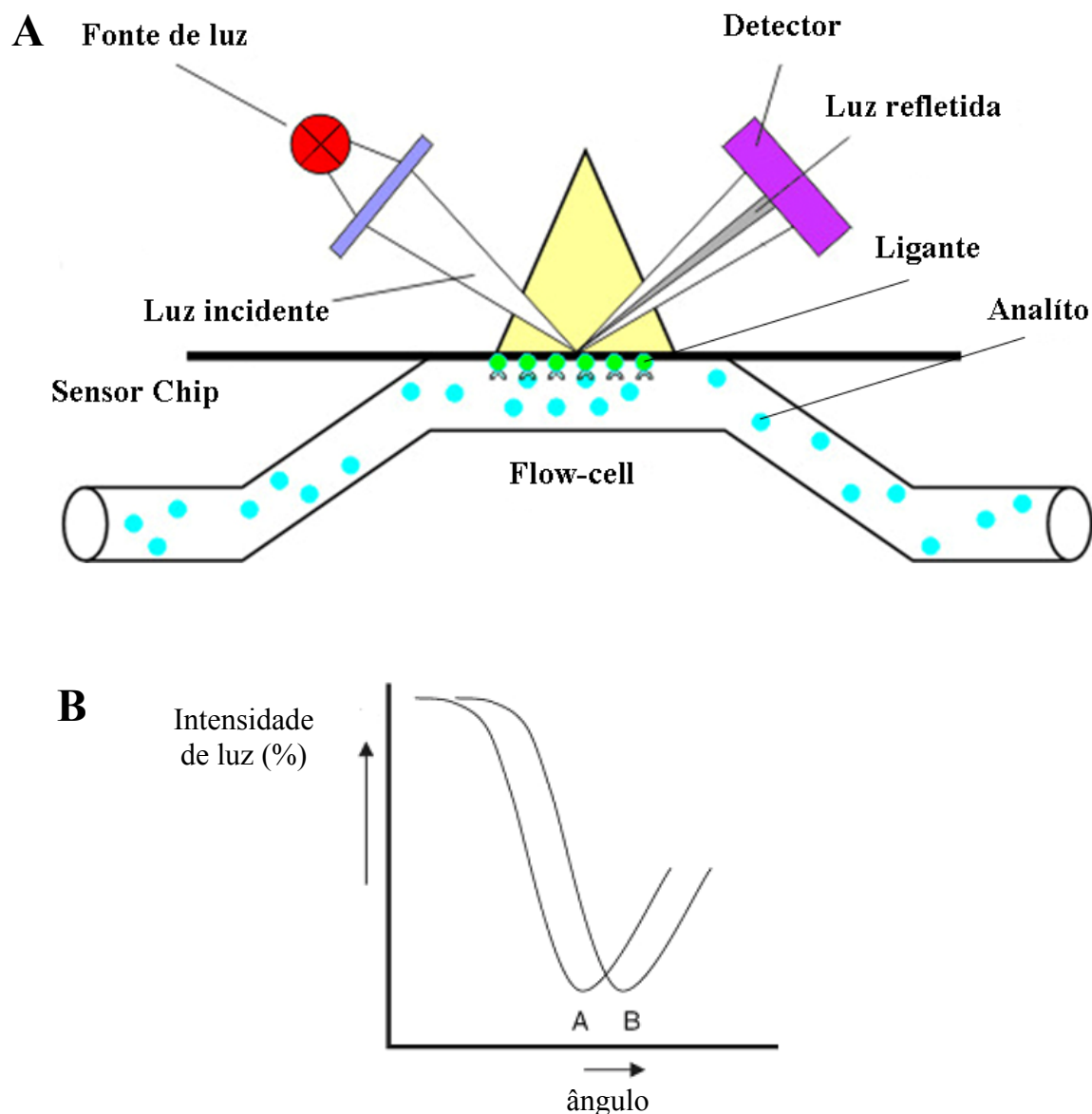


Figura 5.1: esquema experimental da excitação em SPR. A - O sensor chip que apresenta uma fina camada de metal é representado sobre o prisma (triângulo amarelo). A luz polarizada incide no metal após ser desviada pelo prisma e atinge o metal no ângulo φ e a intensidade da luz refletida é medida no detector. B – em um ângulo A (linha A), a excitação dos plasmons de superfície ocorre, resultando numa diminuição da intensidade da luz refletida. O ângulo de mínima intensidade de luz refletida é o ângulo de ressonância plasmônica de superfície. A mudança do índice de refração na superfície do metal, por exemplo, pela adsorção do analito, causará uma mudança no ângulo de ressonância (linha B) evidenciado pelo aumento da intensidade de luz que chega ao detector. Adaptado do livro Handbook of Surface Plasmon Resonance, Schasfoort R.B.M. and Tudos A. J., 2008.

Por outro lado, a dissociação consiste na utilização somente do tampão de corrida para observação da dissociação, e desse modo o fluxo constante também é importante porque evita o acúmulo do analito não ligado na câmara, assim toda a dissociação é medida considerando sempre zero a concentração de analito solúvel na câmara (Schasfoort R. B. M. and Tudos A. J., 2008).

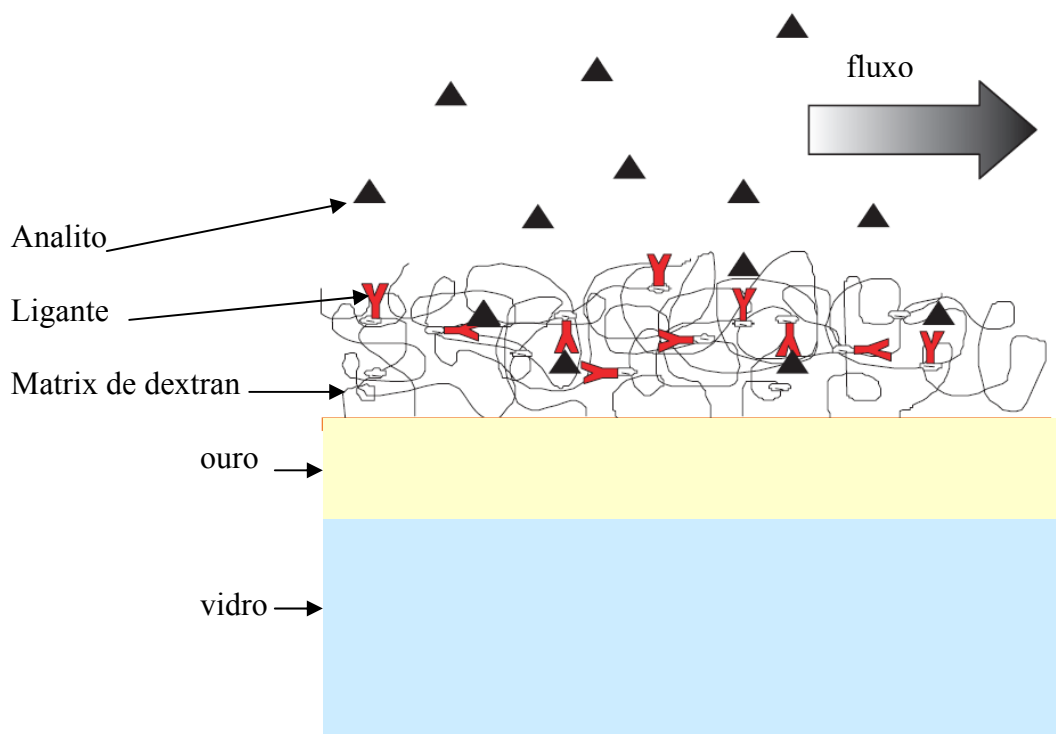


Figura 5.2: Esquema mostrando os planos no chip sensor para SPR. A superfície do chip voltada para o interior da câmara possui uma matriz capaz de imobilizar o ligante de forma permanente. A interação ocorre de maneira dinâmica uma vez que o analito (que interage com o ligante) é adicionado ao sistema constantemente durante a injeção (fase de associação) e posteriormente o desligamento entre o par ligante-analito é observado utilizando somente tampão de corrida (fase de dissociação) (FIGURA 5.2). Seta cinza indica direção do fluxo. Modificado do livro handbook of Surface Plasmon Resonance, Schasfoort R. B. M. and Tudos A. J., 2008.

Enquanto o índice de refração do prisma não pode ser alterado, o índice de refração da vizinhança imediata a superfície metal pode ser alterado por adsorção de material. Nessas condições de mudança da SPR, a alteração do ângulo de SPR

(FIGURA 5.1, linha B) fornece informações da cinética de adsorção de um determinado material na proximidade da superfície do metal (FIGURA 5.3).

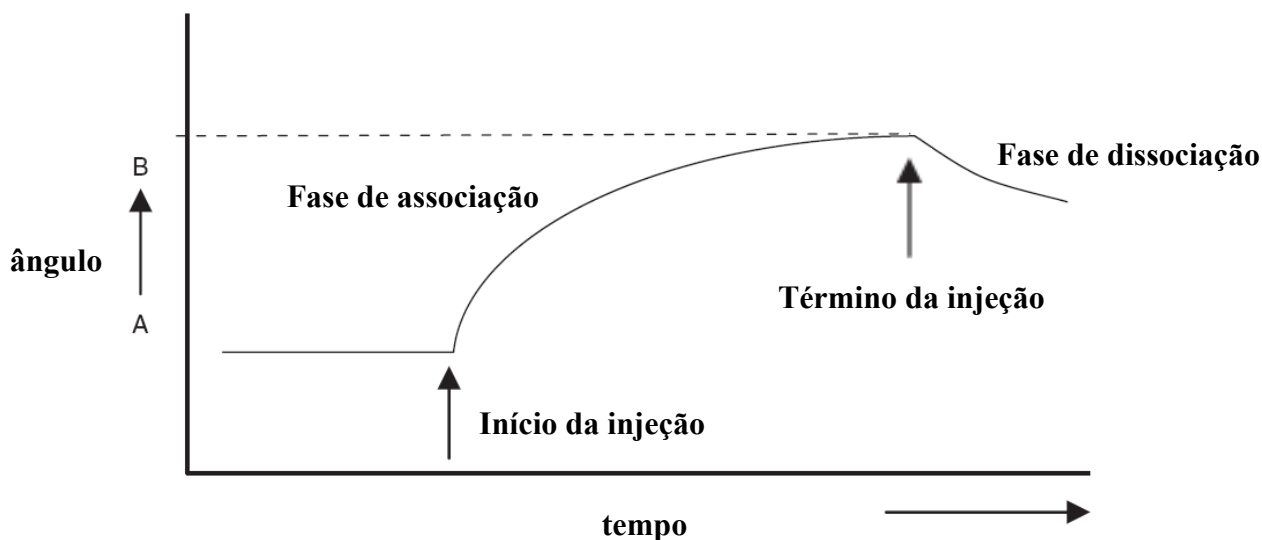


Figura 5.3: Sensograma obtido do esquema experimental do método de excitação em SPR. Note que a mudança do ângulo A para o ângulo B é expressa em unidades de resposta. A fase de associação sempre ocorre com injeção de amostra com fluxo e concentração constante. A fase de dissociação sempre ocorre com tampão de corrida e observa-se o retorno do ângulo B para o ângulo A. Adaptado do livro Handbook of Surface Plasmon Resonance, Schasfoort R. B. M. and Tudos A. J., 2008.

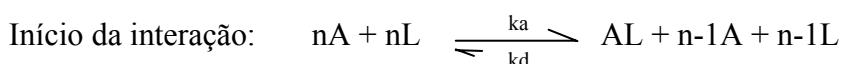
Não somente o fluxo deve ser considerado como interferente em SPR, outros fatores podem influenciar a resposta como a distancia entre o ligante (e por consequência a distancia onde ocorrerá a interação ligante-analito) e a superfície do metal. Quanto maior a distancia entre o ligante e a superfície, menor é a interferência na formação do plasmon de superfície o que acarreta numa menor resposta. A FIGURA 5.2 exemplifica como ocorre a disposição de uma proteína imobilizada (ligante) em uma matriz de dextran fixa na superfície de ouro. Note que a disposição do ligante não é homogenia, com moléculas imobilizadas no inicio da cadeia de dextran (próximas a superfície de ouro) e outras ao longo da cadeia de dextran ficando mais distantes da superfície metálica. Normalmente o valor observado de interação é uma média das interações que podem ocorrer livremente tanto próximo, quanto mais afastados da

superfície metálica, a menos que o analito tenha problemas de difusão pela matriz de dextran. Isso ocorrendo, uma maior fração de analito estará ligada ao ligante presente no final da cadeia de dextran, o que prejudica muito a análise da interação porque a resposta obtida é menor não só pela distância, mas também pelo número total de interações formadas (Schasfoort R. B. M. and Tudos A. J., 2008).

A análise das curvas de interação pode ser realizada a partir de diversos parâmetros da ligação, sendo os mais importantes: k_a (constante de velocidade de associação), k_d (constante de velocidade de dissociação), R_{eq} (resposta máxima obtida em uma curva de associação que atinge uma situação de equilíbrio) e R_{max} (número máximo de ligantes na superfície do chip); lembrando que a razão k_d/k_a informa o KD (constante de dissociação).

A constante de velocidade de associação (k_a) mede o número de complexos AB sendo formados a partir dos ligantes A e B (equação 1) por unidade de tempo, assim como a constante de dissociação (k_d) mede o número de complexo sendo desfeitos por unidade tempo. Em SPR há a vantagem de observar esse fenômeno em tempo real.

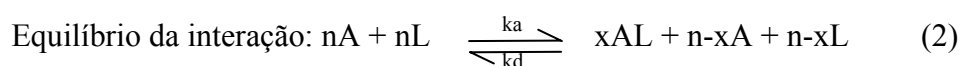
Equação 1



R_{eq} é um bom indicador sobre a razão k_a/k_d numa determinada concentração. No início de injeção, o número de ligantes livres é maior do que o número de ligantes ocupados (uma vez que não há ligantes ocupados até o momento da injeção) a constante determinante do equilíbrio é k_a (equação 1). Conforme vão sendo ocupados os ligantes por moléculas no analito, o número de ligantes disponíveis diminui e outro fator começa a trabalhar no sentido de antagonizar k_a , o k_d . O equilíbrio ocorre quando após algum

tempo de injeção e uma parte dos ligantes estão ligados ao analíto, o número de ligantes livres sendo ocupados por analíto é igual ao número de analíto desligando de ligantes na superfície, numa determinada concentração do analíto sempre mantida constante (equação 2).

Equação 2



Ou ainda, as constantes podem ser descritas pela equação:

$$k_d = RU_0^{(-k_d(t_x - t_0))} + RU_x.$$

$$Req = k_a \times [] \times R_{max} / (k_a([]) + k_d) = k_a \times [] (R_{max} - Req)$$

No início da associação, $k_a \gg k_d$, a velocidade de associação (α) tem a seguinte relação:

$$\alpha = k_a \times [] \times R_{max}.$$

A quantidade de resposta obtida pela interação durante o equilíbrio (xAL , equação 2) indica a grandeza de k_a frente k_d . Quanto maior for Req , maior será a relação k_a/k_d , quando comparamos nas mesmas condições e mesma concentração de analíto injetado em superfícies com ligantes diferentes. Lembremos que ao tratarmos de Req , não podemos inferir que k_a em uma situação é maior do que em outra situação, sem levarmos em consideração k_d . Se numa mesma condição duas superfícies apresentarem o mesmo k_a , quem possui o menor k_d terá um maior Req . Ou ainda, caso uma superfície tenha proporcionalmente o dobro do valor de k_a que uma segunda

superfície, porém se o valor de k_d também for o dobro, ambas apresentaram Req muito próximos, se não iguais.

Para efeito de comparação, vamos considerar que quanto maior o valor de Req , maior a razão k_a/k_d e por consequência menor a constante de dissociação (KD) que é expressa pelo inverso da razão k_a/k_d , k_d/k_a . Quanto menor KD , maior a afinidade do par ligante-analito.

O sistema tem sido utilizado para medir diversos pares de ligantes, proteína-proteína, proteína-DNA, proteína-lípido, droga-proteína, droga-lípido dentre outros. Para cada tipo de interação há uma superfície, obtida comercialmente, desenvolvida para imobilizar o ligante, e um protocolo de imobilização específico para cada superfície e tipo de ligante é utilizado.

Nesta tese, nós realizamos a interação *Psdl* e mutantes pontuais com vesículas lipídicas. O chip comercial (L1) possui uma superfície de ouro e, ligada a essa superfície um polímero de carboximetil dextran que possui na outra extremidade uma cadeia carbônica com pelo menos 10 carbonos. Essa última orienta-se no sentido da extensão da cadeia, permitindo a ligação estruturas lipídicas, vesículas principalmente. A cadeia carbônica pode se inserir na estrutura lipídica o suficiente para mantê-la estável na superfície do chip. Note que essa superfície imobiliza o ligante (a estrutura lipídica) de forma estável, porém não covalente. A estrutura é estável porque o lipídio é muito pouco solúvel no tampão aquoso para o qual o aparelho está configurado. Outro fator importante é o tamanho desta estrutura lipídica por dois motivos: 1- estruturas muito grandes que promovem a interação distante da superfície de ouro diminuindo a sensibilidade do sistema; 2- estruturas muito grandes dificultam a compactação e cobertura da superfície, deixando expostas as cadeias carbônicas hidrofóbicas da matriz,

capazes de ligar inespecificamente à proteínas. A literatura indica que estruturas com 50 nm ou menor são ideais para este experimento.

O sistema BIACORE X foi previamente equilibrado com tampão de corrida contendo HEPES 10 mM, pH 7,4, na presença NaCl 150 mM, a temperatura de 25° C. 10 µL de CHAPS 20 mM foram injetados com fluxo constante de 2 µL/minuto por 5 minutos para limpeza da superfície. Em seguida com mesmo fluxo, foram injetados 20 µL da preparação de vesículas (tópico 5.1.2.1) no tampão acima descrito por 10 minutos, para imobilização destas vesículas na superfície do chip L1 (BIACORE). Após o término da injeção, o sistema permaneceu equilibrando ainda com o mesmo fluxo de 2 µL/minuto, por 30 minutos a 60 minutos, então o fluxo foi alterado para 30 µL/minuto. Foram realizadas 5 lavagens (protocolo de limpeza automático realizado pelo sistema) para limpeza dos lipídeos do sistema e também ajuda na estabilização da superfície lipídica com rápidos fluxos de 200 µL/minuto. Antes de iniciar a interação da *Psd1* nativa ou uma das mutantes, realizamos a injeção de 100 µL do tampão de corrida para verificação do sistema. O sistema é monitorado de forma a se obter uma linha de base com variação menor que 0,3 unidades de resposta por minuto e a variação após injeção de tampão de corrida menor que 5 unidades de resposta.

Foram injetados 100 µL de *Psd1*, *Psd1Gly12Glu* ou *Psd1His36Lys*, nas concentrações de 0,5 µM até 28 µM em tampão de corrida, no fluxo de 30 µL/min por 3,3 minutos e após término da injeção foi medida a dissociação por 5 minutos. Terminado a dissociação, o fluxo foi alterado novamente para 2 µL/minuto e 10 µL de CHAPS 20 mM foi injetado para remoção das vesículas.

5.1.3. Ensaio antifúngico

Os testes de inibição de crescimento dos fungos foram realizados em microplacas de 96 poços, onde cada poço recebeu o equivalente a 5 µL da proteína teste (*Psd1*, *Psd1Gly12Glu* e *Psd1His36Lys*) ou do antifúngico de referência (itraconazol), para uma concentração final entre 0,125µM e 20 µM, e 100 µL de uma suspensão de células de *Candida albicans* ou *Candida albicans* ΔGCS1 (1×10^4 células/mL), em fase exponencial de crescimento (após crescimento prévio de 24 horas) em meio YPD modificado (extrato de levedura 5 g/L, peptona 10 g/L, glicose 10 g/L e ajustado para pH 7,0 com hidróxido de potássio 5M).

As células utilizadas neste experimento foram inoculadas em 10 mL de meio YDP modificado e crescidas por 24 horas, 25° C e sob agitação de 200 RPM em frasco de 50 mL. Após esse tempo, o número de células foi estimado em câmara de Neubauer sendo as mesmas diluídas em YPD modificado para realização do teste. As placas foram mantidas entre 24 e 36 horas em cuba úmida a 25° C. Ensaios controles foram realizados em paralelo, onde a proteína teste foi omitida (cultura sem antifúngico), ou somente meio de cultura na ausência de fungo ou culturas na presença de itraconazol. O crescimento foi verificado pela absorvância das microculturas a 540 nm em um leitor automático de microplacas. A porcentagem de inibição foi obtida a partir da comparação entre culturas com determinada concentração de antifúngico, e culturas sem antifúngico (0 % de inibição) e meio de cultura sem fungo (100 % de inibição).

5.2 Resultados

Para avaliar a importância dos resíduos Gly12 e His36 de *Psd1* na interação com o CMH bem como para sua atividade biológica objetivamos expressar em larga escala as mutantes pontuais *Psd1*Gly12Glu e *Psd1*His36Lys

Logo, o primeiro passo foi a transformação de *Pichia pastoris* GS115 com os plasmídeos pPIC9*Psd1*Gly12Glu e pPIC9*Psd1*His36Lys amplificados em bactéria *E.coli* DH5- α . Após seleção em meio MD sem histidina, pelo menos cinco colônias de cada transformação foram crescidas em 5 mL de BMG, para análise da produção das proteínas de interesse no meio BBS acrescido de 0,7 % metanol. O sobrenadante após 72 horas da indução de expressão da proteína de interesse na presença de metanol foi analisado por gel SDS poliacrilamida 18 %. A FIGURA 5.4 mostra a análise da expressão da proteína *Psd1*His36Lys de cinco colônias selecionadas (#1 - #5). 15 μ L de sobrenadante de cada amostra foram analisados por eletroforese em gel SDS poliacrilamida 18 % corado por prata onde cada linha representa o sobrenadante de uma colônia (#1 - #5). O resultado apresentado mostra que 4 das 5 colônias (#2, #3, #4 e #5) apresentavam níveis detectáveis de uma proteína de cerca de 5 kDa, massa molecular correspondente a da proteína de interesse, com destaque para as colônias #3 e #5 que apresentaram níveis superiores da proteína de interesse representadas pela presença de uma banda mais intensa. A colônia #3 foi a escolhida para expressão em maior escala (100 mL). O mesmo tipo de avaliação e seleção foi realizado para a escolha da *Pichia pastoris* recombinante secretora de *Psd1*Gly12Glu.

Uma vez selecionadas as colônias produtoras de *Psd1*Gly12Glu e *Psd1*His36Lys, o protocolo de expressão em escala piloto, utilizado rotineiramente no laboratório para a proteína *Psd1*, foi aplicado (vide materiais e métodos Parte I). Para purificação das proteínas mutantes, a partir do sobrenadante também foi utilizado o

mesmo protocolo utilizado para a purificação de *Psd1* nativa, cromatografia catiônica, seguida de cromatografia de fase reversa (vide materiais e métodos Parte I). O rendimento de produção das proteínas *Psd1*Gly12Glu e *Psd1*His36Lys foi 30 mg e 55 mg por litro de meio de cultura (respectivamente), semelhante ao obtido para proteína *Psd1* (50 mg por litro de meio de cultura).

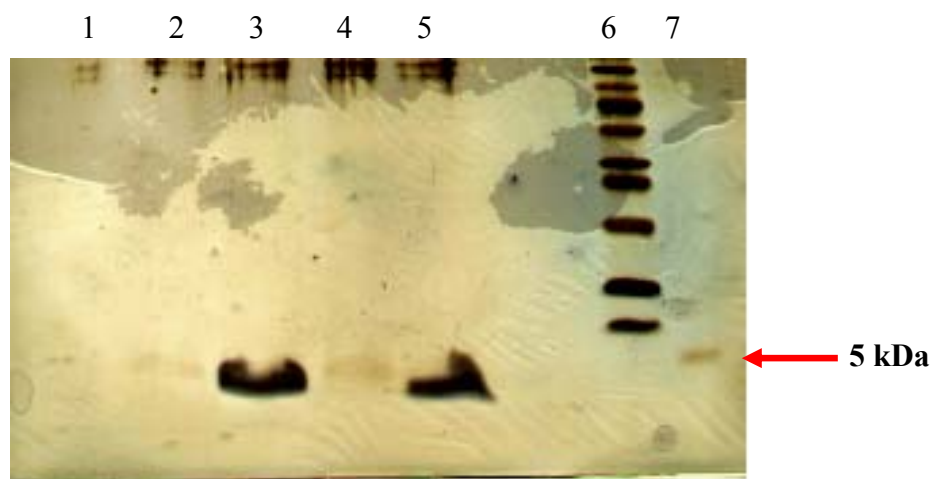


Figura 5.4: Seleção de colônia de *Pichia pastoris* GS115 produtora de *Psd1*His36Lys através da análise do conteúdo protéico dos sobrenadantes de 5 colônias em gel de poliacrilamida 18 % com SDS e coloração por prata. Cada linha indica um sobrenadante recolhido após expressão de 72 horas das transformantes #1-#5. Linhas 1-5: *Psd1*His36Lys colônias #1-#5, linha 6: PageRuler™ Unstained Protein Ladder range 10 kDa - 200 kDa, linha 7: *Psd1* recombinante pura. A seta vermelha indica a proteína *Psd1* pura com peso aproximado de 5 kDa.

As seqüências primárias das proteínas obtidas, *Psd1*Gly12Glu e *Psd1*His36Lys, foram confirmadas através de seqüenciamento dos fragmentos obtidos após digestão das mesmas com tripsina, seguido de cromatografia líquida de fase reversa acoplada a um espectrômetro de massa - ESI-TOF-MS.

Uma vez confirmadas as seqüências de aminoácidos das proteínas de interesse, partimos para responder nossas perguntas: Qual a afinidade da interação *Psd1* e glicohexosil ceramida (CMH)? Os resíduos Gly12 ou His36 são importantes para esta interação e essas modificações são capazes de alterar a atividade biológica?

Para responder a primeira pergunta, vesículas de PC ou CMH ou ainda uma mistura de PC:CMH (7:3, M/M), com diâmetro inferior a 50 nm obtidas por sonicação de ponteira e cujo tamanho foi aferido por contrastação negativa (FIGURA 5.5), foram imobilizadas em chip L1 para realização dos experimentos de interação com *Psd1*, *Psd1Gly12Glu* e *Psd1His36Lys*.

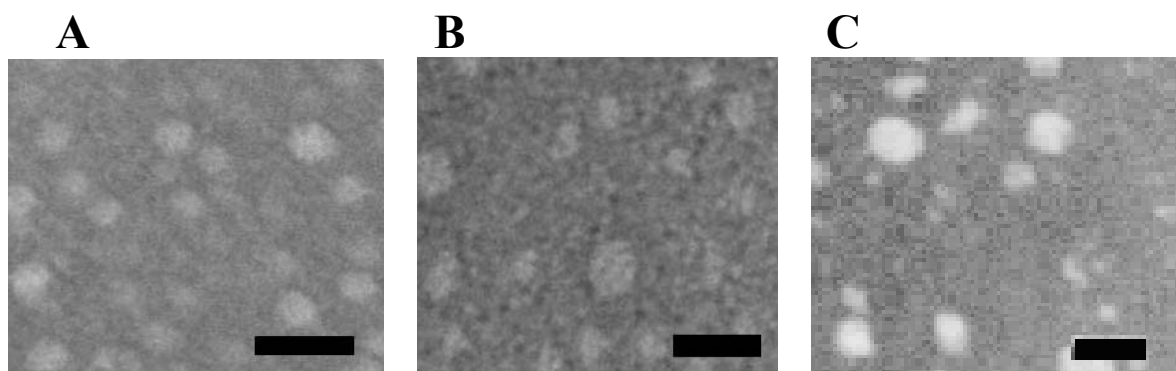


Figura 5.5: microscopia de contrastação negativa das SUVs utilizadas nos experimentos de SPR. A – SUV composta de PC, B - SUV composta de PC:CMH (7:3, M:M), C – SUV composta de CMH. Barras = 50 nm.

A ativação da superfície do chip L1 ocorreu através da injeção da solução CHAPS 20 mM (FIGURA 5.6, ponto 1) para limpeza da mesma. Uma vez a superfície ativada, as SUVs, na FIGURA 5.6 são SUVs compostas de PC:CMH (7:3, M/M), foram injetadas com fluxo constante de 2 μ L/minuto por 10 minutos (20 μ L de volume total) (FIGURA 5.6, ponto 2). Como observados a imobilização foi bem sucedida atingindo um valor aproximado de 28.000 unidades de resposta contra uma resposta inicial de 23.500 unidades de resposta, representando um aumento de 4.500 unidades de resposta (FIGURA 5.6, ponto 3). O excesso de lipídeos da superfície foi removido pela passagem do tampão de corrida pelo sistema por um tempo não inferior a 30 minutos e não superior 60 minutos.

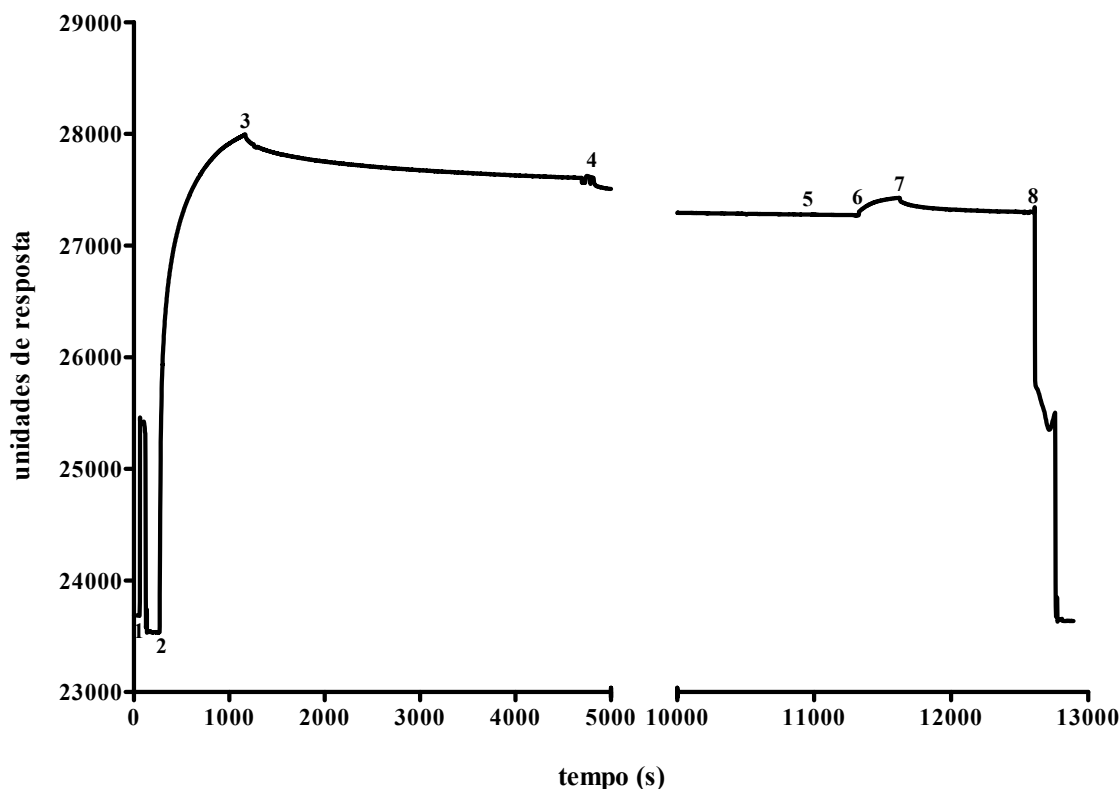


Figura 5.6: Sensograma resumido com os passos utilizados na medida de interação *Psd1* com SUVs compostas de PC:CMH (7:3, M/M), no caso a vesícula mista de PC:CMH, por SPR. A superfície foi ativada/limpa com injeção de 10 μ L de CHAPS (1) para em seguida imobilizar SUVs compostas de PC:CMH (neste exemplo) com a injeção de 20 μ L da preparação de PC:CMH (2). Quando a injeção da preparação de lipídeos termina (3) a superfície recebeu o equivalente a 4.500 unidades de resposta, quantidade suficiente para cobrir toda a superfície. Após 60 minutos o fluxo é alterado para 30 μ L por minuto (4), o sistema limpo e estabilizado com cinco repetições do protocolo de lavagem do sistema. Depois da estabilização da superfície (5) iniciamos a injeção (6) de *Psd1* 28 μ M e medimos a associação até o fim da injeção (7). Terminada a injeção de proteína, utiliza-se somente tampão da corrida medida da dissociação por pelo menos 5 minutos e regeneração da superfície com nova adição de 10 μ L de CHAPS (8).

Após este tempo, o fluxo foi alterado para 30 μ L por minuto (FIGURA 5.6, ponto 4) e o sistema limpo e estabilizado após cinco repetições do protocolo de lavagem do sistema. A superfície foi então estabilizada alcançando variações inferiores a 0,3 unidades por minuto FIGURA 5.6, ponto 5). A injeção de 100 μ L de *Psd1* 28 μ M foi realizada (FIGURA 5.6, ponto 6) com fluxo de 30 μ L por minuto por 3,33 minutos (FIGURA 5.6, ponto 7) com a obtenção da curva da cinética de associação entre *Psd1* e SUVs compostas de PC:CMH. Ao término da injeção, o sistema retorna a passar o

tampão de corrida sendo possível a obtenção da cinética de dissociação entre *Psd1* e SUVs compostas de PC:CMH por pelo menos 5 minutos. A superfície do chip é então regenerada com a remoção das estruturas lipídicas pela adição de 20 μL de solução CHAPS 20 mM com fluxo de 2 μL por minuto.

O sensograma da FIGURA 5.7 apresenta a interação de concentrações crescentes de *Psd1* (3,5 μM – 28 μM) com uma superfície contendo SUVs compostas de PC ligadas ao chip L1. Como visto a proteína *Psd1* foi capaz de interagir de forma concentração-dependente com esta superfície. Concentrações menores que 3.5 μM não resultaram em curvas de interação reprodutíveis devido principalmente a pequena resposta obtida nestas associações (dados não mostrados).

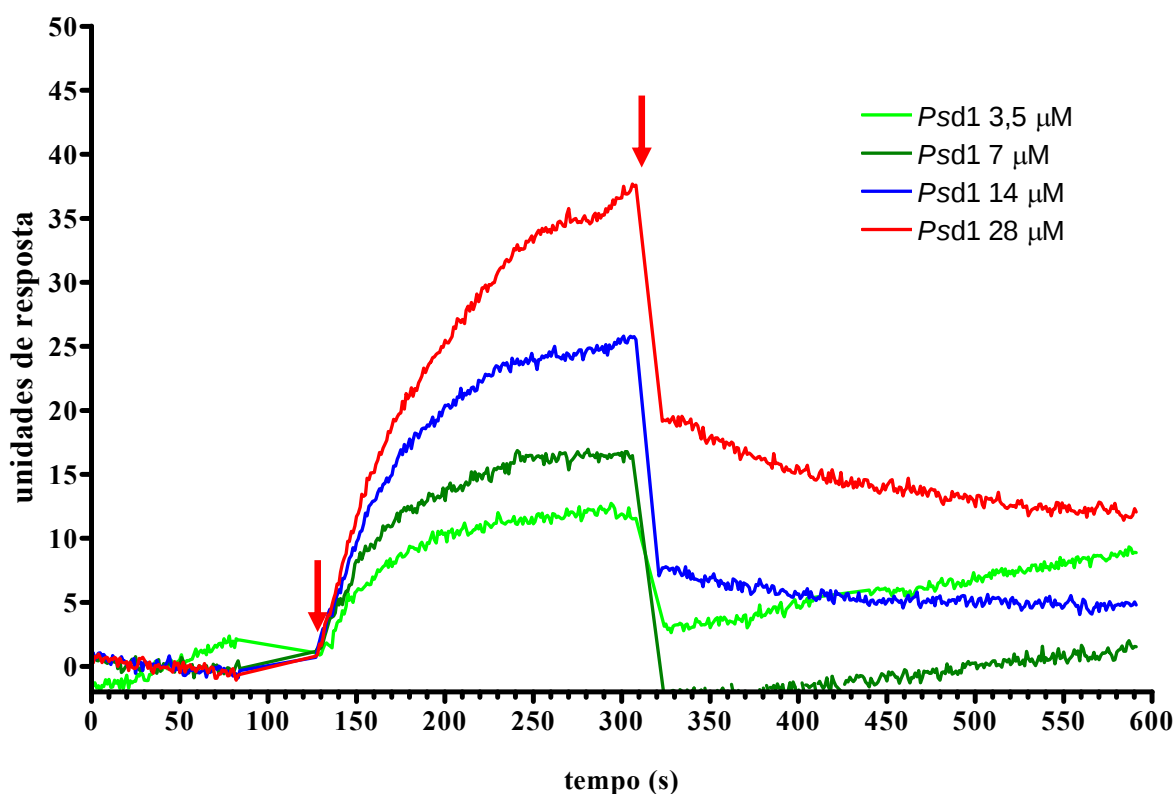


Figura 5.7: Sensograma da cinética de associação e dissociação de diferentes concentrações de *Psd1* contra SUVs compostas de PC por SPR. As setas vermelhas indicam o início (127 segundos) e término (308 segundos) da injeção de *Psd1*. A associação de *Psd1* e PC está compreendida entre o início e o final da injeção de *Psd1*. A dissociação entre *Psd1* e PC pode ser observada logo após o término da injeção.

Essa interação não apresenta alta especificidade uma vez que a resposta máxima atingida no equilíbrio foi de aproximadamente 35 unidades para a concentração de 28 μM de *Psd1* (FIGURA 5.7).

A partir destes resultados calculamos a velocidade de associação a partir a inclinação da reta dos 10 segundos iniciais da associação de *Psd1* com SUVs compostas de PC. Os valores de r^2 para as retas obtidas para cada concentração de proteína (3,5 μM , 7 μM , 14 μM e 28 μM) indicam um bom ajuste aos pontos experimentais exceto para a concentração mais baixa de *Psd1* com r^2 igual a 0,63 (TABELA 5.1).

Os resultados mostram ainda que há um pequeno incremento na velocidade de associação (inclinação da reta) com o aumento da concentração, corroborando com a baixa afinidade mostrada na curva de interação.

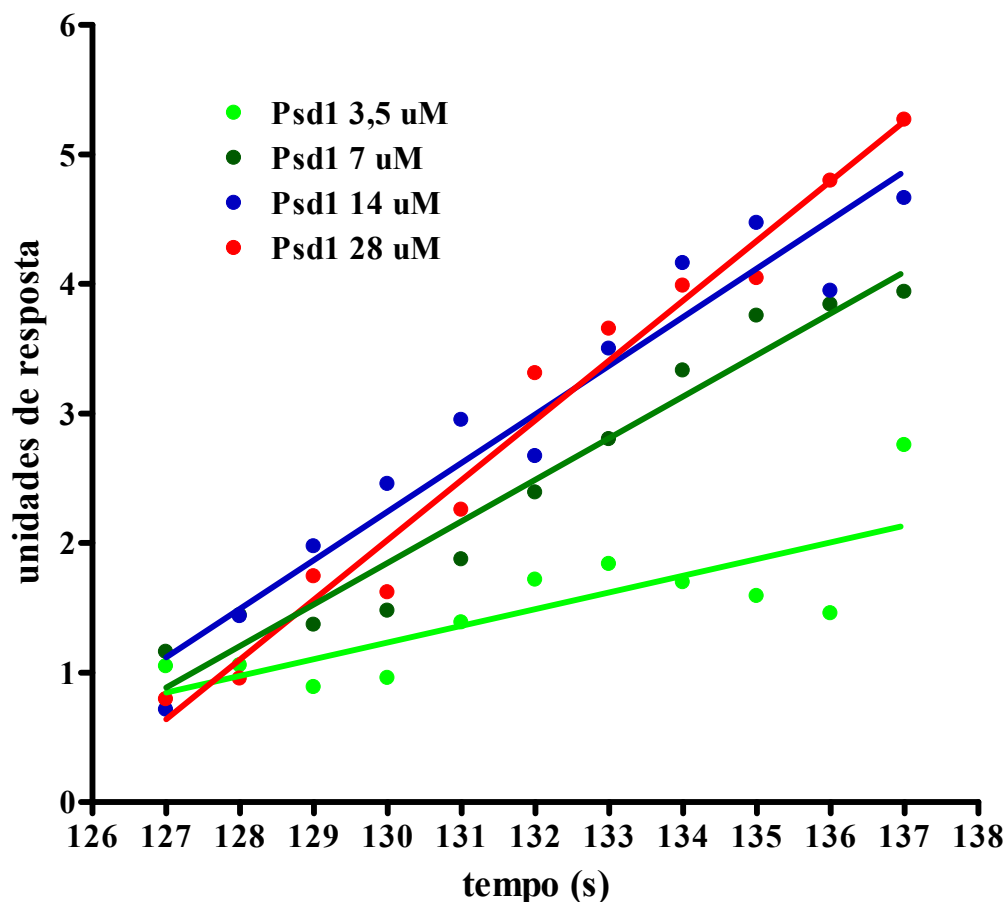


Figura 5.8: Velocidade de associação (inclinação da reta) da interação de *Psd1* com SUVs compostas de PC considerando os pontos obtidos nos primeiros 10 segundos da curva de associação. O início da associação das concentrações de 3,5 μ M - 28 μ M de *Psd1* ocorrem com o tempo de 127 segundos.

Tabela 5.1: tabela de valores da velocidade de associação à LUV contendo PC pela concentração de *Psd1*.

Concentração (μ M)	Velocidade de associação (RU/s)	Erro	r^2
3,5	0,13	0,03	0,63
7	0,32	0,02	0,95
14	0,38	0,03	0,93
28	0,46	0,02	0,98

Valores obtidos a partir dos pontos experimentais de associação da interação entre *Psd1* e SUVs compostas de PC (FIGURA 5.9). As concentrações de *Psd1* utilizadas foram 3,5 μ M, 7 μ M, 14 μ M e 28 μ M.

Na FIGURA 5.9 está mostrado o sensorgrama da interação de concentrações crescentes de *Psd1* (3,5 μ M – 28 μ M) com uma superfície contendo SUVs compostas de PC:CMH na proporção molar de 7:3. A proteína *Psd1* foi capaz de interagir de forma concentração-dependente com esta superfície assim como com PC (FIGURA 5.7), porém a resposta observada no equilíbrio foi bem maior. Na concentração de 7 μ M de *Psd1* foi possível observar uma resposta máxima de aproximadamente 63 unidades de resposta (FIGURA 5.9), resposta esta quatro vezes maior do que a observada na interação com SUVs compostas de PC (16 unidades de resposta). A comparação dos sensorgramas na concentração de 14 μ M *Psd1* apresentou uma razão quatro vezes maior para PC:CMH (93 unidades de resposta, FIGURA 5.9) em relação a PC (25 unidades de resposta, FIGURA 5.8). A mesma comparação realizada na concentração de 28 μ M mostra uma relação de três a quatro vezes maior na interação de *Psd1* quando SUVs contendo PC:CMH foram utilizadas (117 unidades de resposta, FIGURA 5.9) quando comparado na presença de somente PC (35 unidades de resposta, FIGURA 5.8). Isto mostra que a presença de CMH na membrana aumenta a afinidade de *Psd1* pela mesma, uma vez que a presença de três moléculas de CMH em cada dez moléculas lipídicas presentes na vesícula aumenta a resposta máxima de interação (em unidades de resposta) em torno de quatro vezes pela superfície lipídica.

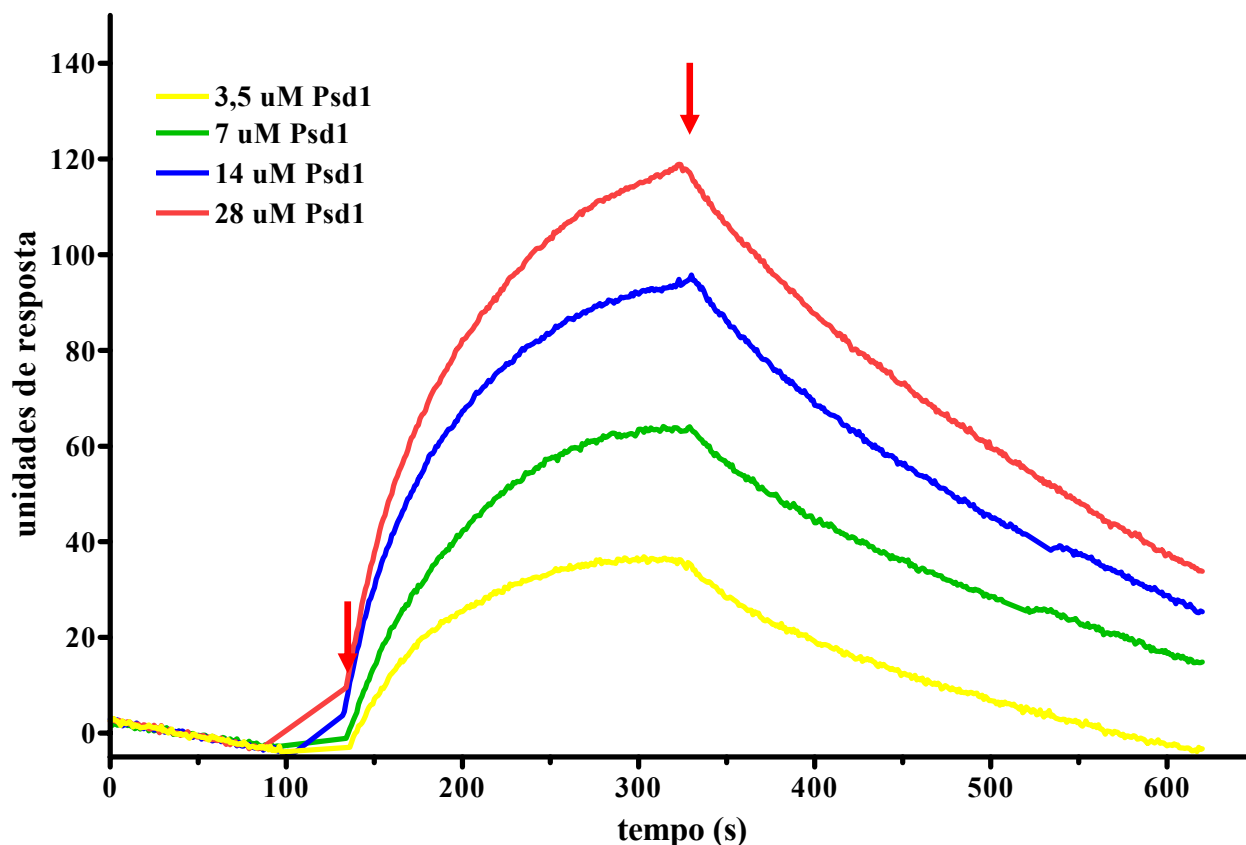


Figura 5.9: Sensograma da cinética de associação e dissociação de diferentes concentrações de *Psd1* contra SUVs compostas de PC:CMH (7:3) por SPR. As setas vermelhas indicam o início (137 segundos) e término (325 segundos) da injeção de *Psd1*. A associação de *Psd1* e PC:CMH está compreendida neste período. A dissociação entre *Psd1* e PC:CMH pode ser observada logo após o término da injeção.

A velocidade de associação nos 10 segundos iniciais da injeção de *Psd1* e SUVs compostas de PC:CMH mostra que há um incremento na inclinação da reta com o aumento da concentração de *Psd1* (FIGURA 5.10 e TABELA 5.2), assim como demonstrado na interação *Psd1* com SUVs compostas de PC.

A observação das retas obtidas para cada concentração de proteína (3,5 μ M, 7 μ M, 14 μ M e 28 μ M) indica um bom ajuste aos pontos experimentais, indicado pelo r^2 obtido para cada reta (TABELA 5.2). As velocidades de associação (inclinações da reta) na interação entre *Psd1* e SUVs compostas de PC:CMH (TABELA 5.2) foram valores significativamente maiores quando comparados com os valores obtidos na interação entre *Psd1* e PC (TABELA 5.1).

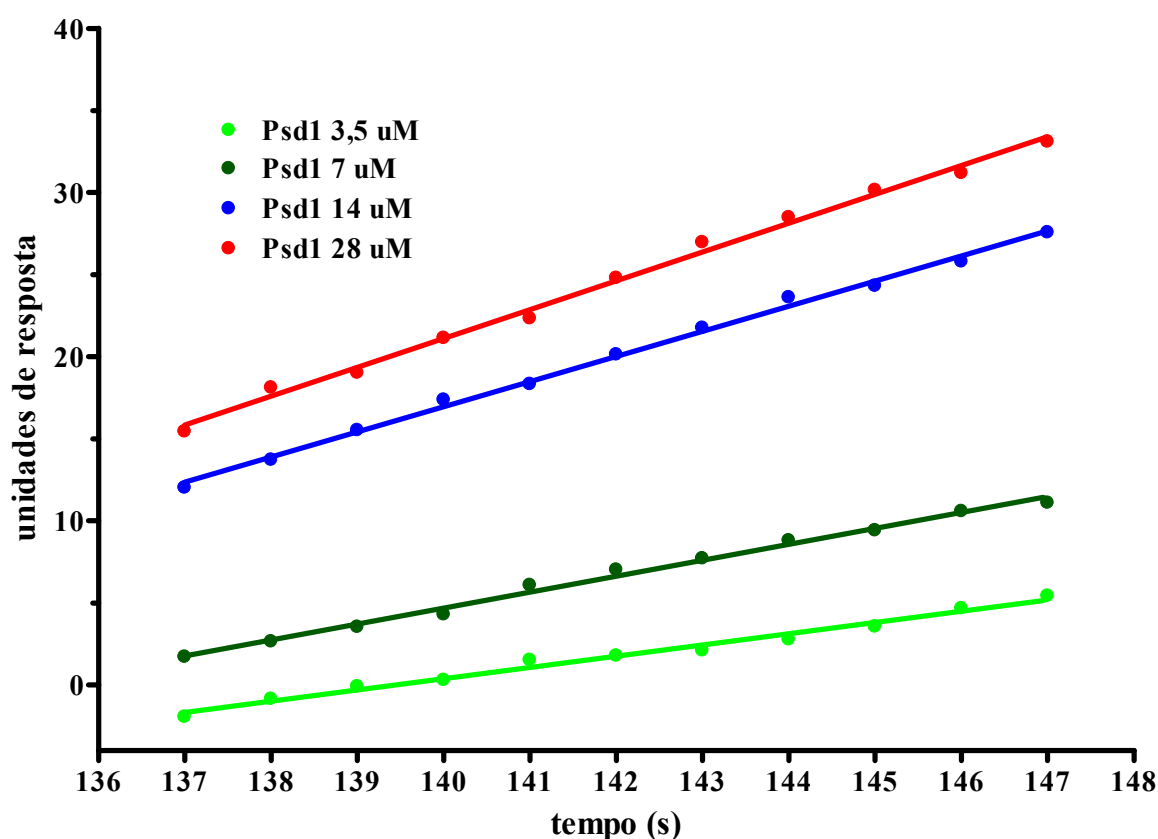


Figura 5.10: Velocidade de associação (inclinação da reta) da interação de *Psd1* com SUVs compostas de PC:CMH considerando os pontos obtidos nos primeiros 10 segundos da curva de associação. O início da associação das concentrações de 3,5 μ M - 28 μ M de *Psd1* ocorre com o tempo de 137 segundos.

Tabela 5.2: tabela de valores da inclinação da reta de associação pela concentração de *Psd1*.

Concentração (μ M)	Velocidade de associação (RU/s)	Erro	r^2
3,5	0,69	0,03	0,99
7	0,97	0,03	0,99
14	1,53	0,03	0,99
28	1,76	0,04	0,99

Valores obtidos a partir dos pontos experimentais de associação da interação entre *Psd1* e SUVs compostas de PC:CMH (FIGURA 5.11). As concentrações de *Psd1* utilizadas foram 3,5 μ M, 7 μ M, 14 μ M e 28 μ M..

Esses dados mostram uma grande diferença de afinidade de *Psd1* pelas SUVs compostas de CMH e a SUVs compostas somente de PC, em que todas as

concentrações de proteína o valor de inclinação da reta é sempre superior nas interações com vesículas contendo CMH. Não só isso, o aumento de concentração leva a um aumento da diferença do valor de inclinação da reta, onde a concentração mais baixa de *Psd1* mostrada na comparação, 7 μM , possui uma diferença na ordem de cinco vezes entre a vesícula com e sem CMH. Na concentração de 14 μM a ordem de diferença aumenta para nove vezes e na concentração de 28 μM aumenta para onze vezes.

O sensorgrama da FIGURA 5.11 apresenta a interação de concentrações crescentes de *Psd1* (0,5 μM – 14 μM) com uma superfície contendo SUVs compostas de CMH. Como observado, a proteína *Psd1* foi capaz de interagir de forma concentração-dependente com esta superfície, assim como foi capaz de interagir nas condições anteriores, contudo a resposta observada foi muito superior até mesmo quando comparada as SUVs compostas de PC:CMH. O sensorgrama de interação de 7 μM *Psd1* com SUVs compostas CMH indica uma resposta no equilíbrio de aproximadamente 775 unidades (FIGURA 5.12) contra 63 unidades observados na interação *Psd1* e SUVs compostas de PC:CMH (FIGURA 5.9) e contra 16 unidades observados na interação *Psd1* e SUVs compostas de PC (FIGURA 5.7). A observação da interação na concentração de 14 μM deixa ainda mais evidente a diferença de afinidade de *Psd1* frente as três superfícies testadas. Com uma resposta em torno de 1540 unidades, a interação entre *Psd1* e SUVs compostas de CMH supera a resposta obtida com SUVs compostas de PC:CMH (93 unidades), e SUVs compostas de PC (25 unidades). A razão da resposta observada na interação *Psd1* e CMH puro pela resposta na interação de *Psd1* e PC:CMH, nas concentrações de 7 μM e 14 μM foi de dezesseis vezes. Se levarmos em conta a razão de interação de *Psd1* com PC, ao invés de PC:CMH, nas mesmas concentrações de *Psd1*, o valor observado foi próximo a sessenta vezes.

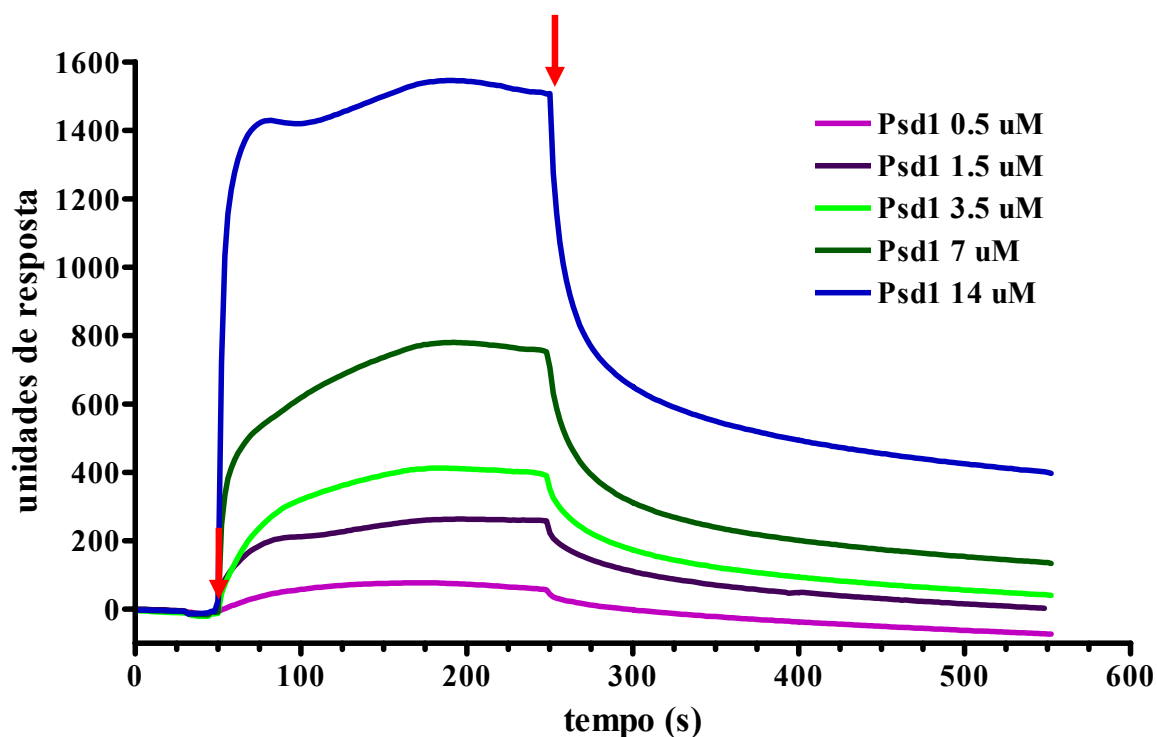


Figura 5.11: Sensograma da cinética de associação e dissociação de diferentes concentrações de *Psd1* contra SUVs compostas de CMH puro por SPR. As setas vermelhas indicam o início (50 segundos) e término (244 segundos) da injeção de *Psd1*. A associação de *Psd1* e CMH está compreendida neste período. A dissociação entre *Psd1* e CMH pode ser observada logo após o término da injeção.

Uma vez mais, as velocidades de associação obtidas para cada concentração de proteína (0,5 μM , 1,5 μM , 3,5 μM e 7 μM) nos 10 primeiros segundos da associação indicam um bom ajuste aos pontos experimentais, exceto pela resposta na concentração de *Psd1* de 7 μM , indicado pelo r^2 obtido para cada reta (FIGURA 5.12; TABELA 5.3).

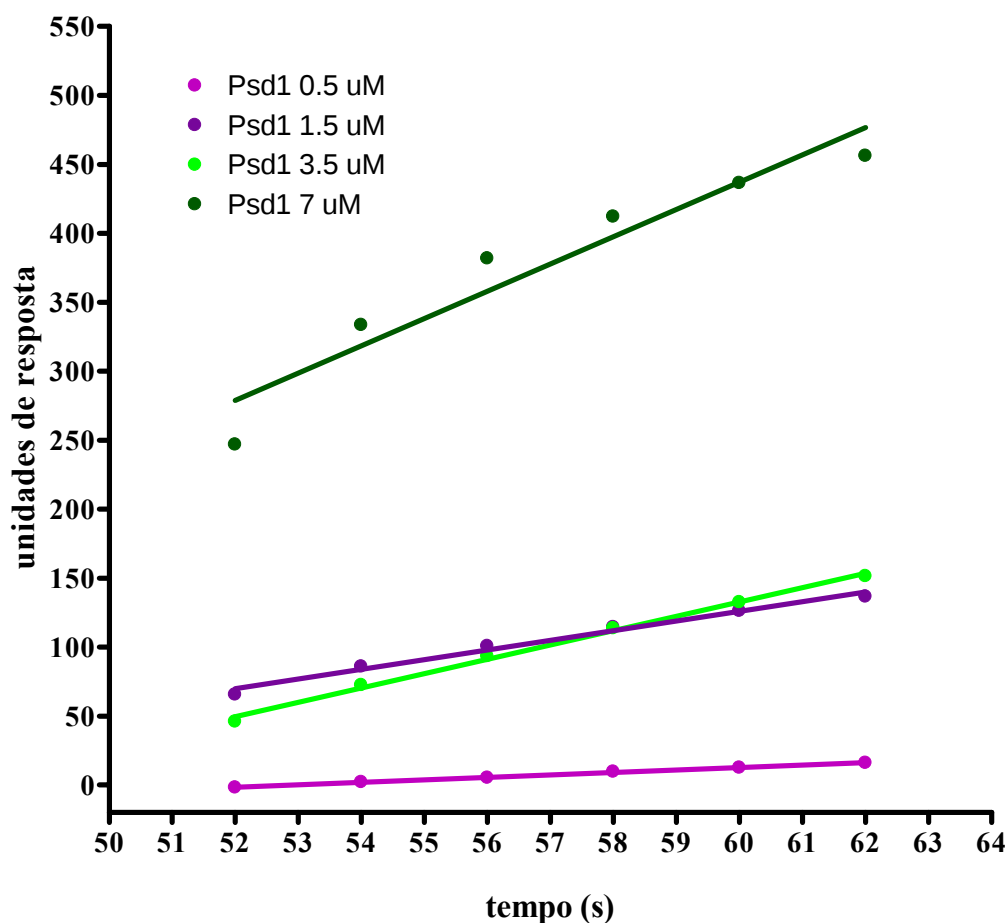


Figura 5.12: Velocidade de associação (inclinação da reta) da interação de *Psd1* com SUVs compostas de CMH considerando os pontos obtidos nos primeiros 10 segundos da curva de associação. O início da associação das concentrações de 0,5 μ M - 7 μ M de *Psd1* ocorrem com o tempo de 137 segundos.

Tabela 5.3: tabela de valores da inclinação da reta de associação pela concentração de *Psd1*.

Concentração (μ M)	Velocidade de associação (RU/s)	Erro	r^2
0,5	1,79	0,03	0,99
1,5	7,0	0,4	0,99
3,5	10,4	0,3	0,99
7	20	3	0,84

Valores obtidos a partir dos pontos experimentais de associação da interação entre *Psd1* e SUVs compostas de CMH (FIGURA 5.12). As concentrações de *Psd1* utilizadas foram de 0,5 μ M, 1,5 μ M, 3,5 μ M e 7 μ M.

Esses dados mostram uma grande diferença de afinidade de *Psd1* pela vesícula contendo somente CMH em relação a vesícula contendo PC. Em todas as concentrações de proteína testadas as velocidades de associação foram superiores quando SUV compostas de CMH eram o alvo da interação para *Psd1*. Esta preferência já havia sido observada para vesículas de PC enriquecidas com o monoglicosilceramida CMH (FIGURA 5.9) em comparação com vesículas de PC na ausência de CMH (FIGURA 5.7).

A FIGURA 5.13 ilustra a relação entre a resposta no equilíbrio (Req) obtida nas interações entre *Psd1* e as vesículas PC, PC:CMH e CMH em função da concentração de *Psd1*.

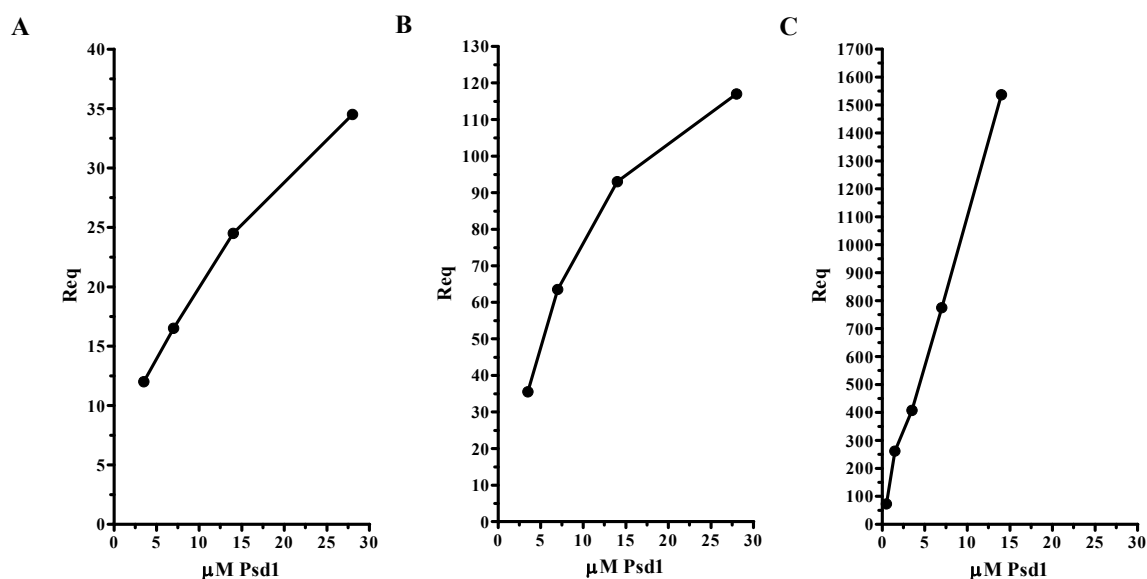


Figura 5.13: gráficos das respostas no equilíbrio (Req) versus concentração de *Psd1* contra PC (A), PC:CMH (B) e CMH(C).

Se observarmos os valores de Req de resposta para *Psd1* para cada uma das superfícies lipídicas (FIGURA 5.13) notaremos que na presença de SUVs compostas somente ou enriquecidas com CMH os valores de Req são superiores aqueles obtidos na ausência de CMH (SUVs compostas de PC somente). Vale ressaltar ainda que os

maiores valores de Req obtidos na presença de CMH puro em relação a mistura com PC não se devem somente ao fato da presença de um menor número de ligantes disponíveis no último caso. Isso, porque, a inclinação da reta da associação no início da associação do par *Psd1*-CMH é vinte vezes maior do que do par *Psd1*-PC:CMH enquanto a razão molar é somente pouco mais de três vezes.

Outra observação importante é a proximidade entre a resposta do equilíbrio (Req) e resposta máxima (Rmax) em que todos os sítios de interação estão ocupados. As curvas de Req de *Psd1* da interação com as SUVs compostas de PC:CMH e PC apresentam tendência a saturação (FIGURA 4.13A e B) e determinação do Rmax, diferente da curva de Req de *Psd1* da interação com as SUVs compostas de CMH.

Como forma de identificar a importância do aminoácido Gly12 presente na alça 1 (Ala7Asn17) e His36 na volta 3 (His36-Trp38) para interação de *Psd1* com CMH, as mutantes *Psd1*Gly12Glu e *Psd1*His36Lys foram utilizadas nos ensaios de SPR.

A FIGURA 5.14 mostra o sensorgrama da interação das proteínas *Psd1*, *Psd1*Gly12Glu e *Psd1*His36Lys na concentração de 1,5 μ M com vesículas de CMH. Todas as proteínas foram capazes de interagir com CMH, porém apresentaram respostas muito diferentes quando comparadas entre si. *Psd1* apresentou um Req em torno de 260 unidades de resposta, superior as proteínas *Psd1*Gly12Glu e *Psd1*His36Lys que apresentaram Reqs inferiores com unidades de resposta de 65 e 160, respectivamente (FIGURA 5.15).

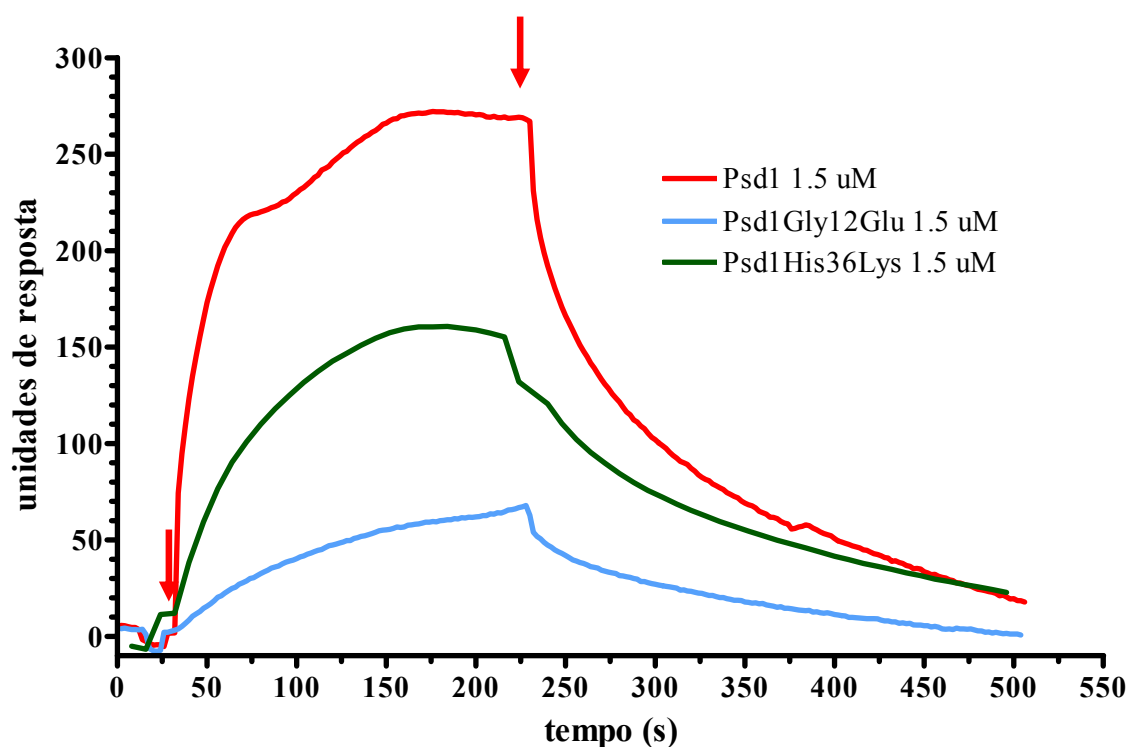


Figura 5.14: Sensorgrama da interação de 1,5 μ M das proteínas *Psd1*, *Psd1Gly12Glu* e *Psd1His36Lys* contra SUVs compostas de CMH. As setas vermelhas indicam o início (50 segundos) e término (244 segundos) da injeção de *Psd1*, *Psd1Gly12Glu* e *Psd1His36Lys*.

Em um sistema onde a única alteração é a substituição de um elemento do par ligante-analito, mantendo-se todas as outras variáveis constantes inclusive as quantidades de ligante e analito, quanto maior o valor de R_{max} , menor é o KD e maior é a afinidade. Logo, a ordem crescente da afinidade para o ligante CMH é $KD_{Psd1} < KD_{Psd1His36Lys} < KD_{Psd1Gly12Glu}$. Isto indica que a substituição do resíduo de glicina presente na posição 12 por ácido glutâmico ou na posição 36 por lisina prejudica a interação da proteína com CMH.

Resumindo os resultados até aqui, a defensina *Psd1* interage especificamente com a monoglicosilceramida (CMH) através da alça 1 e da volta 3 (FIGURAS 2 e 3, parte II). Por SPR, essa interação observada em relação ao CMH mostra que esta afinidade é muito maior em relação ao outro lipídeo testado (PC) e maior até que a afinidade em relação as SUVs mistas compostas de PC:CMH. Esta interação é

dependente dos aminoácidos Gly12 e His36 presentes na alça 1 e na volta 3, respectivamente. A mutação pontual dos aminoácidos nestas posições levou a diminuição da afinidade da defensina pelo CMH.

A importância da presença do cerebrosídeo CMH para atividade de *Psd1* foi também mensurada através da medida da atividade antifúngica dessa defensina contra o fungo *Candida albicans* selvagem em comparação com a cepa de *Candida albicans* Δ GCS1. Esta última é incapaz de sintetizar glicosilceramidas devido à incapacidade de produzir a enzima Glicosilceramida sintase codificada pelo gene GCS1 (Leipelt M. e cols. 2001).

A FIGURA 5.15 comparara a sensibilidade dos fungos *Candida albicans* e *Candida albicans* Δ GCS1 a ação antifúngica da proteína *Psd1*. Como podemos notar a proteína *Psd1* apresenta atividade inibitória aproximada de 60 % para o crescimento do fungo *Candida albicans* na concentração de 10 μ M enquanto a concentração capaz de inibir aproximadamente 100 % do crescimento foi de 20 μ M.

A ausência de glicosilceramidas na cepa *Candida albicans* Δ GCS1 ocasiona uma menor sensibilidade a *Psd1* visto que, as concentrações de 10 μ M e 20 μ M de *Psd1* foram capazes de inibir somente 30 % e 70 % do crescimento do fungo, respectivamente. Concentrações iguais ou menores que 5 μ M de *Psd1* não foram capazes de inibir mais que 20 % do crescimento dos fungos *Candida albicans* e *Candida albicans* Δ GCS1 (FIGURA 5.15).

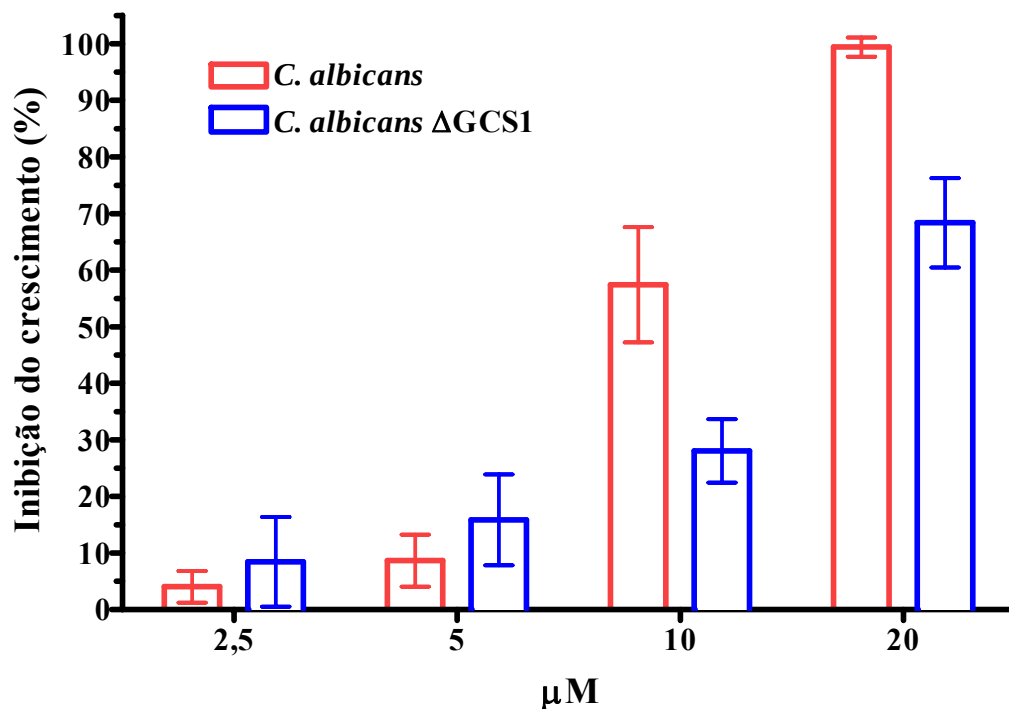


Figura 5.15: Curva de inibição de crescimento dos fungos *Candida albicans* (vermelho) e *Candida albicans* ΔGCS1 (azul) pela proteína Psd1. Resultados representativos de quatro experimentos independentes feitos em duplicata.

Esses resultados indicam que a presença do CMH tem relação direta na atividade antifúngica uma vez que sua ausência resultou em uma redução de 60 % para 30 % da atividade antifúngica da proteína Psd1.

Quando avaliada a atividade das proteínas Psd1Gly12Glu e Psd1His36Lys frente ao fungo *Candida albicans* confirmamos a importância dos resíduos de glicina na posição 12 (Gly12) e histidina na posição 36 (His36) para a atividade da proteína Psd1. A proteína Psd1Gly12Glu não apresentou atividade antifúngica detectável em concentrações iguais ou menores que 20 μM (FIGURA 5.16). A mudança de Gly12 para Glu diminuiu a atividade antifúngica na concentração de 20 μM de 95 % de inibição de crescimento observado para a proteína nativa, para menos de 10 % indicando a importância funcional do resíduo Gly12.

A proteína *Psd1His36Lys* também apresentou baixa atividade antifúngica se comparada a proteína nativa *Psd1*. A concentração de 20 μM de *Psd1His36Lys* foi capaz de inibir 25 % Do crescimento do fungo *Candida albicans*, 4 vezes menos que a proteína nativa (< 95 %).

A diferença de atividade inibitória encontrada para a proteína *Psd1His36Lys*, em relação a *Psd1Gly12Glu* (de 25 % para 5 %) pode ser explicada pela menor afinidade desta proteína pelo CMH alvo, onde o R_{max} de *Psd1His36Lys* foi quase 3 vezes maior que o de *Psd1Gly12Glu* (FIGURA 5.16).

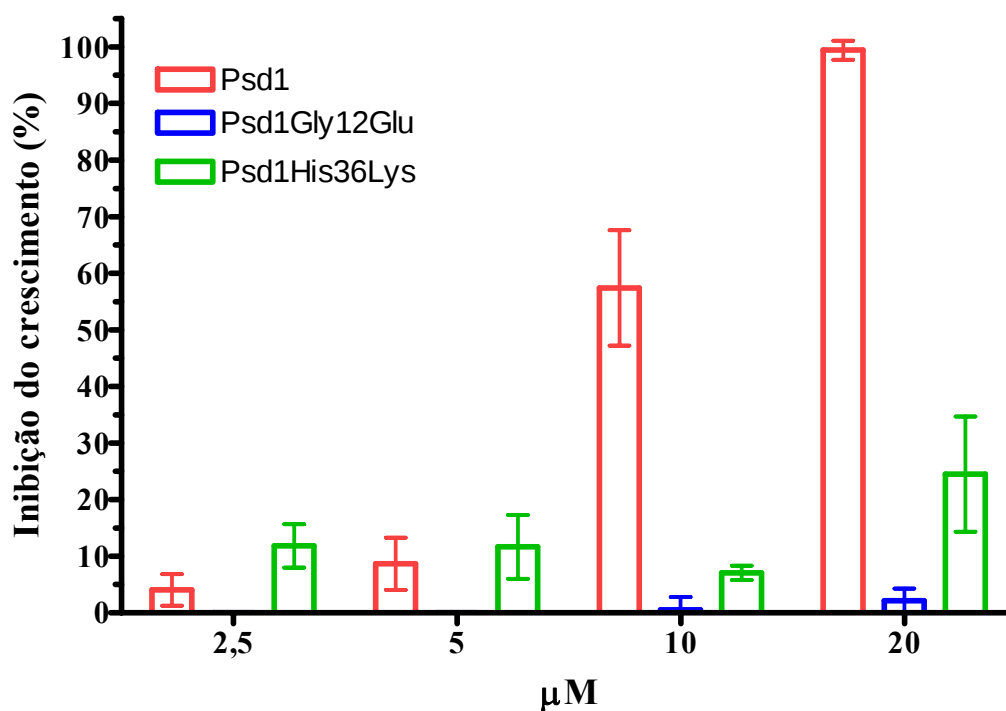


Figura 5.16: Curva de inibição de crescimento dos fungos *Candida albicans* pelas proteínas *Psd1*, *Psd1Gly12Glu* e *Psd1His36Lys*.

A interação específica de *Psd1* com o monohexosilceramida (CMH) isolado de *Fusarium solani* descrita na Parte II por NMR foi reconfirmada por SPR. A diferença de afinidade das SUVs compostas de CMH em relação as SUVs compostas de PC não deixa dúvida quanto a isso. A que intriga é a grande diferença de afinidade encontrada

entre as interações de *Psd1* com PC:CMH e CMH puro. Esta diferença pode indicar que a partir de uma concentração mais alta de CMH há um aumento da ligação de *Psd1* não explicada somente pelo aumento do número de ligantes.

O CMH tem relação direta com a atividade antifúngica de *Psd1*. Sua ausência na composição lipídica do fungo *Candida albicans* acarreta em redução da sensibilidade, sem aboli-la totalmente.

O envolvimento da alça 1 e da volta 3 na atividade antifúngica de *Psd1* foi avaliada pela mutação pontual do resíduo de aminoácido na posição 36 (volta 3), que está envolvido diretamente com a interação com CMH (Parte II), reduz tanto a afinidade por CMH quanto a atividade biológica. A mesmo acontece com substituição do resíduo de aminoácido na posição 12 (alça 1). A glicina nesta posição permite que a alça 1, e por consequência toda a região, movimentos intramoleculares (Parte II, FIGURA 1B) necessários para assumir diferentes estados conformacionais, dentre eles a(s) de maior afinidade por CMH. Estes resultados explicam a maior redução encontrada tanto na afinidade por CMH quanto na atividade biológica se comparada a mutante na posição 36.

6. Discussão

O conteúdo lipídico de células fúngicas compreende principalmente componentes de membranas e estoques lipídicos. Os componentes de membranas determinam a estrutura e propriedades de permeabilidade da membrana que delimita organelas, compartimentos de processos metabólicos, além disso providenciam locais de inserção e fixação de proteínas. Lipídeos de membrana de fungos incluem fosfoacilgliceróis, glicosilacilgliceróis e esfingolipídios (Prasad e Ghannoum, 1996). A diversidade e a versatilidade dos fungos para a síntese desses lipídeos ainda têm sido exploradas de forma limitada (Leipelt e cols., 2001).

Esfingolipídios são moléculas polares que se orientam de maneira a definir a interface das fases aquosa e lipídica na formação das membranas, estabilidade que pode ser também futuramente modificada pela presença de esteróis. A grande diversidade de esfingolipídios, particularmente glicoesfingolipídios em que o açúcar é conjugado com o grupo hidroxil primário da base N-acetilada, tem sido investigada em espécies fúngicas. Longas cadeias de ácidos hidróxi-graxos (C_{14-22}) de leveduras e de fungos filamentosos se encontram geralmente associadas com esfingolipídeos de parede celular, membrana plasmática ou vesículas secretoras (Prasad e Ghannoum, 1996).

Ceramidas e cerebrosídeos (monoglicosilceramidas) constituem aproximadamente 0,2 % da massa de peso seco do fungo *Fusarium oxysporum*, sendo 30 % desta massa de cerebrosídeos. Os ácidos hidróxi-esteárico e hidróxi-palmitico são os principais ácidos graxos encontrados em ambos ceramidas e cerebrosídeos (Prasad R. and Ghannoum M. A, 1996). O cerebrosídeo CMH (monohexosilceramida) que está presente na maioria dos fungos filamentosos é estruturalmente diferente do encontrado em células de mamíferos, chamada esfingomielina. Ambas CMH e esfingomielina são

sintetizadas a partir da ceramida e estão relacionadas tanto com o crescimento celular como com a atividade de proteínas na membrana.

Estruturas lipídicas e esteróis apresentam um papel chave na organização da bicamada lipídica, onde interações energeticamente desfavoráveis presentes na região hidrofóbica dos lipídeos resultam numa linha de tensão que induz uma separação de fases: lipídios saturados (dentre eles esfingolipídios) e esteróis são seqüestrados dentro do domínio chamado líquido-ordenado, freqüentemente chamando “lipid raft”, distintos dos lipídeos insaturados presentes nos domínios líquido-desordenados (FIGURA 6.1). Os “lipid rafts” foram implicados em vários processos biológicos, desde organização lateral de proteínas até sinalização e regulação da tensão da membrana plasmática (Ursell e cols., 2009). Estes “lipid rafts” são domínio capazes de se locomover por toda a membrana ou até acumular em regiões para desempenhar determinada função.

Os fungos apresentam esfingolipídios estruturalmente diferentes dos encontrados em células de mamíferos e plantas (Dickson R. C. e Lester R. L., 1999). CMH de fungos apresentam base esfingóide C19 conservada com um grupamento metil na posição C9 e duas insaturações nas posições 4 e 8. Possui ainda na cadeia N substituída e um grupo hidroxil na posição 2 desta cadeia. A diferença da estrutura encontrada nas células de plantas e mamíferos é a base esfingóide, sendo que as plantas possuem a fitoesfigosina e mamíferos só possuem a insaturação na posição 4 da base esfingóide. Por esse motivo, CMHs presentes em fungos são candidatos a alvos para moléculas/drogas antifúngicas.

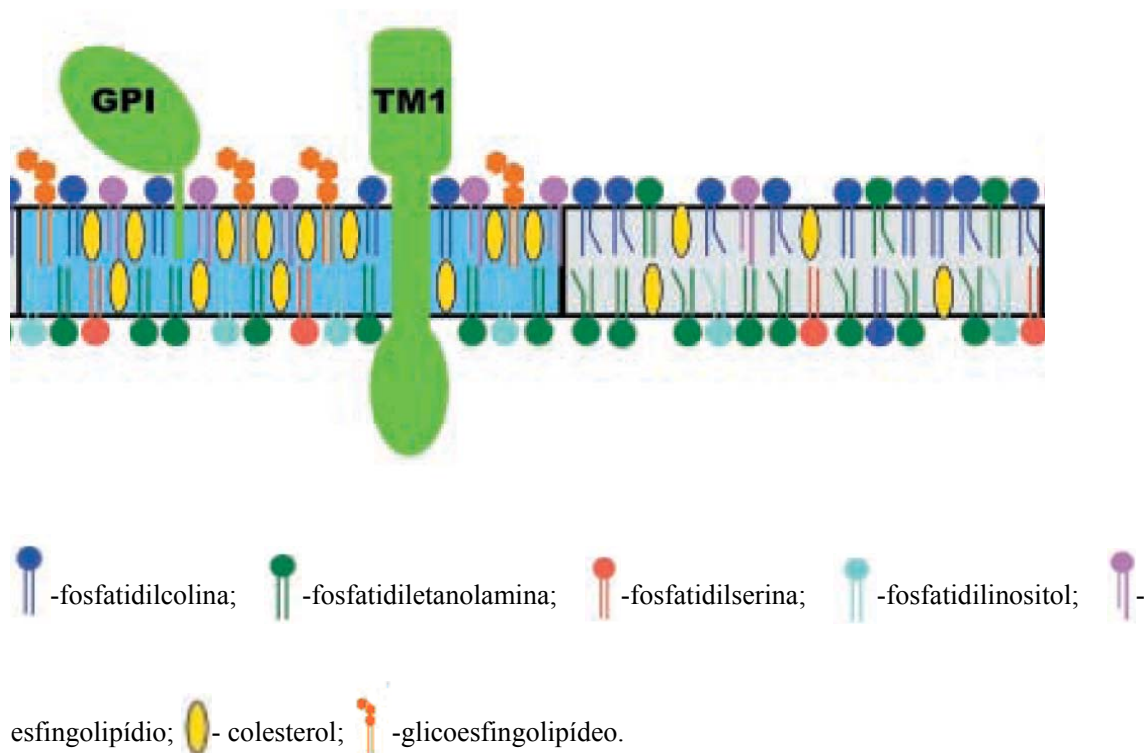


Figura 6.1: Esquema resumido da estrutura de um “lipid raft”. Os “lipid rafts” (caixa azul) são regiões especializadas de membrana contendo concentrações altas de esteróis, esfingolipídios e glicoesfingolipídeos. Eles também são enriquecidos em fosfolipídios que contêm cadeias acil saturadas (linhas retas da representação do lipídeo). Esta composição resulta em separação lateral de fase e a geração de um território de líquido-ordenado. A membrana plasmática líquido-desordenada (caixa cinza) contém menos esteróis, esfingolipídios e glicoesfingolipídeos, e mais fosfolipídios com cadeias acil insaturadas. Como resultado, é mais fluido que os “lipid rafts”. Uma grande variedade de proteínas está contida nestes últimos: proteínas ancoradas por glicosilfosfoinositol (GPI) e proteínas transmembranas (TM) são um bom exemplo. Adaptado de Pike L. J. e cols., 2003.

A maior atividade apresentada por *Psd1* contra determinados fungos, ou até mesmo a especificidade de tipo celular mostrada por nosso grupo (Almeida M. S. e cols., 2000) pode ser explicada por sua afinidade por membranas contendo o cerebrosídeo CMH, isolado de *Fusarium solani* e descrito por Duarte e cols. (1998), como presente principalmente em parede celular. A CMH também está presente em membrana celular e em vesículas secretoras, estruturas lipídicas importantes. Rittershaus P. C. e cols. (2006) mostraram que a presença da enzima glicosil ceramida

sintase (GCS) é um fator essencial para o sucesso da infecção pelo fungo *Cryptococcus neoformans*, por garantir sua sobrevivência durante a fase inicial de colonização no pulmão do hospedeiro. A cepa de *Cryptococcus neoformans* deficiente na enzima GCS é incapaz de colonizar o ambiente no espaço extracelular no pulmão, caracterizado pelo pH levemente alcalino.

Dados do nosso grupo mostram ainda que, a CMH apresenta estreita relação com o mecanismo de defesa da planta *Pisum sativum* contra o fungo *Fusarium solani* da qual a CMH foi isolada. Uma vez que plantas são expostas à moléculas de CMH, ocorre o aumento da expressão de mRNA de *Psd1*, de forma similar ao que ocorre quando há a infecção com o fungo *Fusarium solani* (Almeida M. S. e cols., 2002). Adicionalmente, trabalhos de outros grupos demonstraram que defensinas de tabaco, rabanete e dália são capazes de se ligar a parede celular (van der Weerden e cols., 2008), promover permeabilização de membrana (Thevissen e cols., 1996, 1999, van der Weerden e cols., 2008) e até mesmo promover o efluxo de K^+ (Thevissen e cols., 1996).

A atividade da defensina Rs-AFP2 foi totalmente dependente da presença de glicosil ceramida (CMH) como descrita por Thevissen K. e cols. (2004). A deleção do gene que codifica a enzima GCS nas leveduras *Pichia pastoris* e *Candida albicans* gerou cepas resistentes à ação antifúngica da proteína Rs-AFP2. Outro resultado mostrado foi a permeabilização de células de *Pichia pastoris* parentais, mas não ocorrendo o mesmo com células Δ GCS (Thevissen e cols., 2004)

De acordo com o exposto acima, o envolvimento do CMH encontrado em *Fusarium solani* foi testado em relação à atividade antifúngica de *Psd1*, principalmente com relação à localização desses lipídeos no fungo e suas diferenças estruturais que os diferenciam dos encontrados nas células de mamíferos. Ensaio de interação da defensina *Psd1* com vesículas multilamelares (MLV) (obtidas com sonicação em

banho) e vesículas (obtidas por filtração em poro de 100 nm, LUV) foram realizados para avaliar a capacidade de ligação da defensina *Psd1* a lipídeos de membrana.

Mostramos na parte I desta tese que as MLVs compostos de PC ou PC:CMH (9:1, M/M) contendo também a sonda radioativa [125 I]TID-PC incorporadas são capazes de ligar a *Psd1* de forma detectável, uma vez que após ativação por luz UV foi observada a presença da sonda radioativa covalentemente ligada a proteína *Psd1*. A posição da sonda na membrana (na extremidade da cauda apolar do fosfolípido PC) exigia que a interação proteína-membrana fosse capaz de expor à sonda a proteína, seja por diminuir a integridade da membrana, seja por acomodação e penetração da proteína na superfície lipídica, ou ainda por favorecer algum tipo de rearranjo dos lipídeos. Para as composições de lipídios testadas, a proteína foi marcada de forma similar, não havendo diferenciação de ligação (FIGURA 3.5). Estes resultados nos mostraram a capacidade de interação da proteína *Psd1* com as superfícies lipídicas para possível formação de poros ou inserção na bicamada lipídica e até mesmo para translocação da bicamada, porém sem mostrar especificidade ao componente de membrana CMH.

Esses dados de interação com membranas, juntamente com dados anteriores do nosso grupo que mostraram que *Psd1* foi capaz de promover o estreitamento e extravasamento do conteúdo citoplasmático de hifas de *Fusarium solani* após segundos de exposição sem, no entanto, observar tal efeito em todas as hifas expostas à proteína. Em torno de metade das hifas ocorre o estreitamento e extravasamento e em quase todas as hifas (~ 100 %) observa-se uma diminuição significativa da taxa de crescimento medida em $\mu\text{m}/\text{min}$ (Cabral K. S., tese de doutorado, 2003). O efeito de diminuição do crescimento é acompanhado do aparecimento de *Psd1* no citoplasma em poucas horas (Lobo D. S. e cols., 2007), e isso pode ter relação direta com a interação, inserção e até translocação da proteína pela membrana.

Com o objetivo de melhor caracterizar a interação de *Psd1* na presença de LUVs compostas de PC ou PC:CMH foi utilizado experimentos de perturbação do deslocamento químico (CSP). O deslocamento químico é uma propriedade física do núcleo, em se tratando de RMN, que define a localização deste núcleo no espectro de ressonância em relação a uma referencia. (Wuthrich, 1986). A unidade de deslocamento químico utilizada é ppm (partes por milhão), que significa a frequência do átomo em determinado campo magnético em função da intensidade desse campo magnético. O deslocamento químico é alterado (perturbado) como consequência de mudanças estruturais depois de um evento químico ou físico, como no exemplo desta tese, em que prótons amídicos de cada aminoácido de *Psd1* experimentariam ambientes químicos diferentes, em solução na presença ou ausência LUVs de PC ou de PC:CMH (9:1). Esta técnica permite a observação da alteração de ambiente químico sentido pelo próton amidico, e desta forma fornecer dados dos aminoácidos que na presença de LUVs observaram esta mudança de ambiente e por consequência a mudança de deslocamento químico. A forte interação de *Psd1* com as duas LUVs (PC e PC:CMH) pode ser observada pela grande variação de CSP de resíduos positivos (Arg11, His23 e Lys27) que formam uma superfície capaz de interagir com ambas as LUVs. A análise explica os dados observados na parte I (figura 3.5), em que ambas as composições de MLVs foram similarmente marcadas, nos levando a concluir que se tratava de uma interação não específica. Entretanto, foram observados valores de CSP para aminoácidos de *Psd1*, principalmente na alça 1 (Asp8 e Gly12 - Cys20) e na volta 3 (Asn37 - Lys39) (FIGURA 6.2), que na presença de LUVs de PC:CMH apresentaram-se pelo menos 2 vezes superiores aos encontrados nas presença de LUVs contendo somente PC (para maiores detalhes observe a FIGURA 6.2B, em que as cadeias laterais desses aminoácidos estão destacadas em vermelho). Ainda, a razão de relaxação de *Psd1* na

presença LUVs de PC:CMH apontam para uma diminuição das mudanças conformacionais na alça 1 e na volta 3, indicando que essa região de *Psd1* participa da interação com CMH.

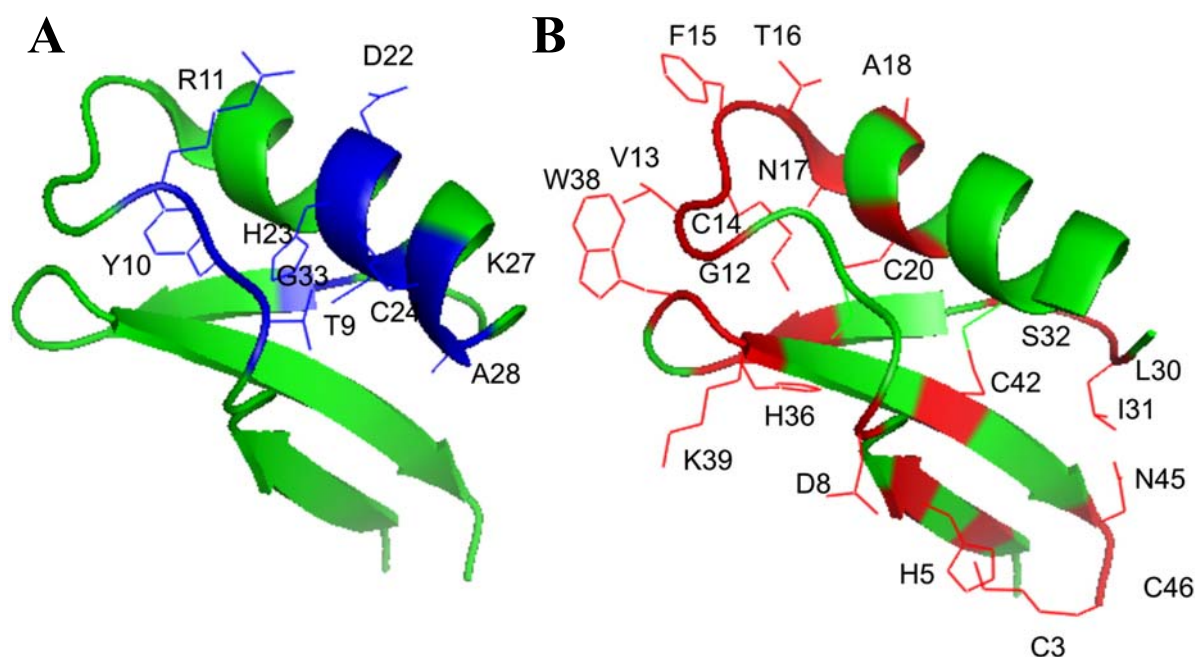


Figura 6.2: Estrutura tridimensional de *Psd1* indicando os aminoácidos que participam da interação inespecífica com a membrana (A, em azul) e os aminoácidos que participam da interação específica com CMH (B, em vermelho).

As mesmas regiões da alça 1 e volta 3 que tiveram CSP mais alterado e estão alteradas na figura 6.2B apresentaram também alteração da razão de relaxação $R2/R1$. Sabemos que a proteína *Psd1* livre em solução apresenta uma estrutura bem rígida, visto o alto número de NOEs e conseqüente convergência da estrutura calculada por RMN e pela média dos valores de parâmetro de ordem (grau de liberdade) obtidos para *Psd1* ($S^2 = 0,85$, sendo o máximo possível igual a 1,0) (Almeida M. S. e cols., 2002; Medeiros L. N. e cols., 2009). A avaliação de movimentos intramoleculares em *Psd1* apontam para a alça 1 e volta 3 como regiões de alta taxa de troca conformacional uma vez que

apresentam altos valores para a constante de troca conformacional (Rex entre 8,0 e 12,00, sendo a média da proteína em torno de 2,5, FIGURA 1B, PARTE II) explicando o porque da baixa convergência apresentada por essas regiões quando da determinação de sua estrutura por NMR em solução (Almeida M. S. e cols., 2002). Vale ainda ressaltar o valor do parâmetro de ordem $DE S^2 = 0,59$ para o resíduo de glicina na posição 12 presente na alça 1, conferindo uma flexibilidade para a região compreendida pela alça 1.

A busca de regiões de proteínas com mudanças conformacionais tem sido usada como suporte para determinação de sítios ativos ou regiões de interação. Mais de 400 trabalhos envolvendo dinâmica molecular e NMR examinaram o efeito da interação de um determinado ligante sobre a dinâmica do esqueleto da proteína parceira. Esses trabalhos revelaram o papel de dinâmicas sobre a afinidade, especificidade e até efeitos de cooperatividade da ligação nas interações com pequenas moléculas (ADP, palmitoil-CoA, retinol, por exemplo), DNA, metais (Ca^{++} , Zn^{++} , por exemplo) conforme descrito por Jarymowycz V. A. e Stone M. J.(2006).

Eventos de ligação são caracterizados pela formação de novas interações, como ligações de hidrogênio, interações de van der Waals e hidrofóbicas, que dão origem a um reconhecimento específico entre a proteína estudada e seu ligante. Embora essas interações sejam favoráveis termodinamicamente, elas passam por um processo de perda de interações favoráveis entre a superfície de ligação e o solvente e perda da entropia rotacional e translacional associada à interação biomolecular. Nesse sentido, a flexibilidade na superfície de ligação pode ser reduzida no complexo de ligação de forma a otimizar a força de novas interações. Um exemplo disso foi o estudo da interação entre A enzima dihidrofolato redutase (DHFR), um análogo do ácido fólico (E) e $NADP^+$, em que a ligação DHFR-E não altera significativamente os movimentos

internos e somente com a formação do complexo DHFR-E-NADP⁺ que a proteína exibe significativas mudanças em sua dinâmica que poder ser racionalizadas em mudanças nas conformações da enzima durante a atividade enzimática (Jarymowycz V. A. e Stone M. J., 2006).

Nossos dados mostram que os movimentos intramoleculares são os de interação entre de *Psd1* e CMH. Foram exatamente as regiões da alça 1 e volta 3 que mostraram variações na razão R2/R1 quando na interação com CMH. A avaliação de movimentos intramoleculares de *Psd1* foi simplificada pela razão entre as constantes de velocidade de relaxação transversal pela de velocidade de relaxação longitudinal (R2/R1) porque fornecem informações mais rápidas e confiáveis sobre trocas conformacionais do que a aproximação realizada por Lipari G. e Szabo A., (1992). A FIGURA 1B (parte II) mostra o gráfico da razão R2/R1 da proteína livre em solução abaixo do gráfico de Rex também para a proteína livre. O grau de reprodutibilidade foi considerado satisfatório e o mesmo tipo de análise foi utilizado na comparação com *Psd1* agora na presença de CMH.

A comparação da razão R2/R1 para *Psd1* na presença de vesícula contendo CMH em relação à proteína livre em solução confirmou o envolvimento da alça 1 e da volta 3 na interação com CMH. Três aminoácidos da alça 1 (Cys14, Phe15 e Asn17) e três aminoácidos da volta 3 (His36, Asn37 e Trp38) tiveram seus movimentos intramoleculares modificados na presença de CMH (FIGURA 3, parte II). Isto relaciona as trocas conformacionais da alça 1 e da volta 3 com a ligação da molécula alvo no fungo, o CMH.

Possivelmente, a interação por carga domina a aproximação da proteína *Psd1* a membrana do fungo, porém uma vez que a proteína encontra a molécula de CMH presente nesta membrana, ocorre a ligação e reorientação da proteína na superfície, que

explica a mudança representada na FIGURA 6.1A com a alteração de CSP dos aminoácidos Arg11, His23 e Lys27 em azul para a representada na FIGURA 6.1B, em que foi observada diferença nos valores de CSP em que *Psd1* esta na presença de PC:CMH dos valores observados para a mesma proteína na presença de PC nos resíduos de Gly12, Val 13, Cys14, Phe 15, Thr16, Ala18, Ser19, His36, Trp38 e Lys39. Esta reorientação pode ter ocorrido devido a interação específica de *Psd1* com CMH, e para que isso aconteça a proteína precisa encontrar a conformação na região da alça 1 e da volta 3 capaz de interagir, e ao fazer isso assume menos conformações como visto na FIGURA 2 da PARTE II.

Um segundo modelo de membranas miméticas, micelas de DPC, foi ainda utilizado para descrever a interação de *Psd1* com CMH, porque fornece algumas vantagens como a medida da dinâmica de troca conformacional na ordem de μ s e maleabilidade frente a vesículas uni ou multilamelares. Enquanto a troca de moléculas em LUVs é fortemente reduzida por conta da baixa solubilidade de fosfolípidios em meio aquoso, em micelas a instabilidade favorece a integração proteína-detergente, sendo muito utilizada para estudos com proteínas, principalmente as integrais. (Ollivon e cols., 2000)

A defensina *Psd1* manteve sua estrutura na presença do detergente DPC como verificado pelo espectro de HSQC (experimentos de CSP de *Psd1* na presença de micelas de DPC ou DPC:CMH e *Psd1* livre em solução, FIGURA 4 da PARTE II). Nesta situação, a interação de *Psd1* com DPC foi muito similar a proteína *Psd1* na presença ou não de CMH, porém pelo observado para os valores de deslocamento químico (CSP) a região da alça 1 e a volta 3, tem seu deslocamentos mudados se comparado a *Psd1* livre em solução. As propriedades físicas das micelas favoreceram a orientação da região da alça 1 e volta 3 da proteína à membrana, em detrimento das

demais orientações que foram observadas quando a proteína estava na presença de LUVs, o que pode ser explicado pelo fato das LUVs serem muito estáveis de forma a resistirem melhor a ação direta da proteína, se comparadas a micelas. A forte interação com micelas é um dado muito importante porque corrobora com os dados de MLVs utilizando a sonda [125 I]TID-PC. Em ambas as situações, ocorrem a integração maior de *Psd1* com a membrana artificial, seja MLV ou micela, do que ocorreu com LUV. A orientação da proteína em micelas fornece informações sobre a orientação e posição da mesma quando inserida em uma membrana, seja somente a camada externa ou mesmo a bicamada. Experimentos realizados em colaboração com Renata Angeli e Prof Fabio Almeida, do CNRMN, mostraram a interação do peptídeo sintético pepLoop1 (Gly12-Ser19) semelhante a alça 1 de *Psd1*, diferindo somente pela substituição da Cys14 por Ser com CMH. Foi observado que o CMH incorporado a micelas de DPC foi capaz de interagir com os resíduos correspondentes aos Phe15 e Thr16 na alça 1 através da observação de NOEs, que tem origem no acoplamento dipolar entre diferentes núcleos, que envolve a transferência de magnetização entre os spins acoplados pelo espaço sendo muito limitado pela distância (Medeiros L. N. e cols., 2009).

A quantificação da ligação de *Psd1* em SUVs contendo CMH por ressonância plasmônica de superfície (SPR) foi o próximo passo dado no sentido de caracterizar a ligação da alça 1 e da volta 3 de *Psd1*, porque permite uma medida de interação entre estas duas moléculas, fornecendo informações do processo de associação, equilíbrio e dissociação. A afinidade de *Psd1* por CMH foi comparada através da interação da proteína com SUVs contendo CMH ou PC:CMH (7:3) ou PC, além de determinar a magnitude da importância da alça 1 e da volta 3 através da medida da interação de mutantes pontuais para os resíduos de glicina na posição 12 e histidina na posição 36 por ácido glutâmico e lisina, respectivamente. A constante de dissociação (KD) é

normalmente a variável escolhida para comparação entre interações, uma vez que é resultado da razão da constante de dissociação k_d e da constante de associação k_a . Porém, em situações em que a cinética de interação não corresponde ao modelo de interação 1:1 de Langmuir, este não poderá ser aplicado, como em interações em que há mais de um sítio de interação, efeito cooperativo, analito ou ligante bivalente, dentre outros. Nesses casos, outras constantes ajudam a descrever a interação e, com devido cuidado, também servem como parâmetro de comparação. A inclinação da reta da curva de associação nos segundos iniciais pode ser considerada como diretamente proporcional ao produto $k_a \times \text{concentração} \times R_{\text{max}}$. As interações em que há mais de um sítio de interação, portanto mais de um k_a (k_{a1} , k_{a2} ,), a medida da inclinação da associação fornece informações sobre o k_a mais relevante para a associação.

Nossos resultados mostram que a proteína *Psd1* foi capaz de se ligar de forma concentração-dependente acarretando em um aumento da inclinação da reta relacionada ao aumento da concentração de *Psd1* em todas as superfícies testadas PC, PC:CMH e CMH, FIGURAS 5.9, 5.11 e 5.13. A inclinação da reta obtida na interação de *Psd1* com vesículas de CMH apresentou notória diferença quando comparada com as outras situações experimentais PC e PC:CMH. Adicionalmente a diferença na quantidade de proteína adsorvida a superfície no equilíbrio (R_{eq}) quando na superfície do chip esta imobilizada SUVs de PC, ou de PC:CMH, ou de CMH, numa mesma concentração indica um acúmulo de proteína com o aumento de CMH confirmando que este último é o alvo preferencial para que *Psd1* na membrana do fungo. Se tomarmos o R_{eq} ou a inclinação inicial da associação como referências, a afinidade de *Psd1* por CMH esta em torno de 50 vezes. Esses dados não só confirmam como quantificam a afinidade de *Psd1* por CMH. A medida do KD, bem como k_a e k_d não foi possível até o momento devido a grande complexidade que envolve a interação. A razão desta dificuldade reside

provavelmente no efeito de transporte de massa. Afinidades mais altas (pico a nanomolar) apresentam problemas em suas cinéticas devido a incapacidade do aparelho de manter a concentração constante, subestimando o valor de k_a e R_{max} principalmente.

A importância do CMH para atividade antifúngica de *Psd1* foi verificada no intuito de se fazer correspondência entre a afinidade de *Psd1* por CMH e sua atividade inibitória do crescimento. A cepa *Candida albicans* $\Delta GCS1$, deficiente em CMH foi caracterizada por Leipelt M. e colaboradores no ano de 2008 que mostraram que essa cepa não possuía quantidade de CMH detectável por TLC em sílica gel. Para suprir a falta do CMH que é componente essencial para o crescimento celular, a cepa $\Delta GCS1$ sintetiza um glicosil esterol que cumpre o papel pertence ao CMH. A redução da atividade antifúngica de *Psd1* nas células de *Candida albicans* $\Delta GCS1$ em comparação a cepa selvagem foi a prova biológica de que CMH é uma molécula importante pela sensibilidade do fungo a *Psd1*, e a redução da atividade antifúngica de *Psd1* em 50 % é prova disso. Resta saber que outro componente do fungo poderia ainda ser o alvo da ligação de *Psd1* para explicar a inibição encontrada. Essa cepa de *Candida albicans* $\Delta GCS1$ é um interessante modelo que deve ser melhor explorada pelo nosso grupo, uma vez que através de seu uso poderemos estudar em que ações a interação de *Psd1* com CMH estão envolvidas, como por exemplo, no acúmulo na parede/membrana celular, no acesso ao citoplasma, e no efeito observado de estreitamento e extravazamento na célula.

Outro objetivo desta tese foi o de relacionar a alça 1 e da volta 3 de *Psd1* com a afinidade caracterizada por CMH. Após a avaliação dos dados encontrados de dinâmica molecular de *Psd1* em solução em que estas regiões se destacaram como regiões de movimentos intramoleculares, dois resíduos em especial pareceram importantes e por

esse motivo foram pontualmente mutados: um resíduo apresenta movimentos intramoleculares relacionados a flexibilidade da região e em ensaios de CSP interagem diretamente com CMH, o resíduo de glicina na posição 12 (Gly12); o outro também possui movimentos intramoleculares, porém mais lentos e relacionados com mudanças conformacionais, e realmente se destaca na interação com CMH, observado os experimentos de CSP e razão R2/R1, o resíduo de histidina na posição 36 (His36).

A substituição do resíduo de histidina na posição 36 por lisina levou a uma diminuição da afinidade por CMH bem como uma drástica diminuição da atividade antifúngica quando comparada com a proteína nativa (FIGURA 5.15 e 5.17, respectivamente, PARTE III). Vale ressaltar que o resíduo His36 apresentou redução significativa da R2/R1 quando a defensina *Psd1* se encontrava na presença de LUVs contendo o CMH comparada à proteína livre em solução, indicando que este resíduo, e esta região, apresentam redução da mudança de conformações devido a interação direta da região com CMH (FIGURA 3 da PARTE II). Outro ponto importante foi que a substituição da histidina por lisina não afetou tanto a distribuição de cargas na superfície daquela região, o que indica que coordenações entre o resíduo de histidina e o CMH são prevaletentes para interação do que a carga da cadeia lateral.

A modificação do resíduo de glicina na posição 12 para ácido glutâmico foi ainda mais drástica para afinidade de *Psd1* com CMH quando comparado com a mutante *Psd1*His36Lys e com *Psd1* nativa como mostrado na FIGURA 5.15. O resíduo de glicina é um aminoácido sem cadeia lateral ($\text{CHH}(\text{COORaa})(\text{NHRaa})$) que na família das defensinas de plantas é muito conservada na alça 1 (com exceção para a defensina *PhD1* que não apresenta o resíduo de glicina nesta posição), e apresenta um alto grau de liberdade ao próton amídico ($S^2 = 0,51$), que é resultado direto de movimentos intramoleculares rápidos, ou o também chamado de flexibilidade.

Mudanças no resíduo de glicina que confere flexibilidade a alça 1 para o ácido glutâmico deverá afetar bastante os movimentos intramoleculares o que refletirá na afinidade por CMH e na atividade biológica, o que se confirma com os resultados apresentados. Essa mutação diminuiu em mais de 4 vezes a afinidade por CMH e mais importante, aboliu a atividade antifúngica contra *Candida albicans*.

As mutações pontuais demonstraram também que as modificações na alça 1 e na volta 3 prejudicam ainda mais a atividade antifúngica do que a ausência de CMH na célula do fungo. Tal afirmação pode ser feita com base nos resultados obtidos em que a ausência de CMH permitiu o máximo de 70 % de inibição que é bem mais do que os 25 % de inibição obtidos com *Psd1His36Lys* e próximo a zero de inibição para *Psd1Gly12Glu*, o que pode indicar que esta região está envolvida em outros mecanismos que levam a atividade antifúngica além da interação com CMH.

A interação específica com o componente do fungo deve ser futuramente estudada para determinação de seqüências mínimas de interação, de atividade, ou ainda tendo como objetivo um aumento na especificidade. Os dados obtidos com o peptídeo pepLoop1 (FIGURA 7, parteII) possibilitou um grande avanço nesse sentido, uma vez que demonstramos sua capacidade de reconhecer e de se estruturar durante interação com o CMH.

A literatura demonstra alguns casos de fragmentos de diversas proteínas com atividade antifúngica, como histonas, hemoglobina e até albumina. Dentre esses trabalhos, o realizado com a defensina *Rs-AFP2* serve melhor aos nossos interesses porque busca seqüências dentro das proteínas capazes de mimetizar a atividade da proteína inteira. Os peptídeos foram sintetizados e a atividade antifúngica foi avaliada como forma de seleção para posterior estudo. Dentre os peptídeos sintetizados, somente um apresentou comparável atividade antifúngica à proteína inteira, a sequência que

compreendeu as fitas β -2 e β -3. Este peptídeo, além de possuir atividade antifúngica comparável, observou-se a redução da atividade na presença de cátions tal qual a proteína inteira. Esta região é bem diferente da que descrevemos nesta tese, até porque não nos baseamos na atividade do fragmento e sim na capacidade de ligação ao CMH.

Apesar de não ter sido determinada a atividade antifúngica do peptídeo pepLoop1, o reconhecimento de um alvo específico de fungo como nesta tese está mais do que acreditada tanto para peploop1 quanto para *Psd1*. Esta especificidade da proteína, ou do peptídeo, poderá ser explorada futuramente como ou na construção de quimeras de CTP (cell-targeting peptides) ou CPPs (cell-penetrating peptides) (Vives E. e cols., 2008).

CTPs são peptídeos que reconhecem especificamente células quaisquer com alta especificidade e afinidade. CPPs são moléculas muito eficientes no direcionamento de várias moléculas para o interior da célula. Um fragmento da alça 1 seguida do fragmento da volta 3, provavelmente ligadas por ponte dissulfeto, ou ainda um fragmento da alça 1 como pepLoop1 ou menor, poderiam ser utilizadas para reconhecimento de fungos por reconhecerem o CMH. A capacidade de internalização desta proteína sintética, da alça 1 seguido da volta 3 ou somente a alça 1, será objeto de análises futuras. A proteína *Psd1* inteira ou ainda parte dela pode ser uma CPP, carreando especificamente para dentro da célula fúngica um fator cujo o mecanismo seja nocivo para esta, por exemplo, a ativação da apoptose (caso seja ligada a proteína inteira ou um fragmento ativo de um fator pró-apoptótico). Por causa da sua natureza altamente catiônica, os CPPs são altamente eficientes em mediar a entrada “*in vitro*” de várias moléculas para o interior de células, mas com a mediação “*in vitro*” o uso parece mais complicado por causa da completa falta de especificidade, e acabando sendo dispersada e encontrada em células por todo o corpo independente do modo da

administração (Vives E. e cols., 2008). O fato da proteína *Psd1* reconhecer especificamente o glicolípido (CMH) pode ser uma vantagem na comparação de CPPs como agentes antifúngicos. Pode-se também adicionar a sequência de um CPP a sequência de *Psd1* na esperança dele melhorar o acesso ao citoplasma de células normais.

A interação com membranas de *Psd1* respondeu nossos questionamentos, que agora passaram a outras, devido principalmente ao exposto nesta tese. Porém, como também exposto, os esfingolípídeos, dentre eles o CMH, concentra-se em microdomínios junto ergosterol, e outros lipídios saturados. O entendimento da dinâmica de interação de um modelo mais realístico com vários componentes formando uma membrana artificial. A análise de dados de interação de *Psd1* com vesículas lipídicas de outras composições, como por exemplo, vesículas mistas contendo esfingomielina em vez de CMH. Este pode ser um bom parâmetro de comparação, por conta de alguma semelhança estrutural. A adição de esteróis (colesterol e ergosterol) a vesículas também pode ser interessante. Esteróis possuem uma cadeia carbônica curta e muito hidrofóbica, que em membranas são responsáveis por reduzir a compactação da membrana ao diminuir as interações hidrofóbicas no interior da bicamada. Estão presentes em “lipids rafts” exatamente por permitir uma melhor disposição dos lipídeos diminuindo a compactação (domínio rico em lipídeos saturados) e acomodação de proteínas de membrana. É factível imaginar que a presença de ergosterol deixaria a membrana menos rígida podendo facilitar a interação de *Psd1* com CMH.

Como a interação de *Psd1* com CMH na membrana do fungo serve como um dos pilares da atividade antifúngica, um modelo de ação em que a proteína aja sobre a membrana pode ser esboçado. Sabe-se hoje que proteínas antimicrobianas, com tamanho da até 23 aminoácidos e estrutura em α -hélice, uma vez ligados a membrana

celular bacteriana são capazes que procurar e interagir com lipídeos aniônicos. Depois de interagir com lipídeo em questão, ocorre a concentração em um ponto qualquer da membrana destes lipídeos formando a separação de fase lateral, que perturba outros domínios. Somado a isso, o aumento da permeabilidade provocado pelo descrito acima leva a formação de uma fase de defeitos críticos (Epand R. M. and Epand R. F., 2009)

Baseado nisso, imaginar *Psd1* interagindo com a membrana do fungo, e uma vez na membrana ligar-se ao CMH (PARTE I), e mudar sua orientação (PARTE II) no momento que encontra o CMH para promover o agregamento de moléculas de CMH, formando a separação de fase lateral. Essa separação de fase atrapalha todo o funcionamento dos outros microdomínios por interferir na composição lipídica destes últimos, que contém canais de íons, receptores, sinalizadores, dentre outros, até atingir a fase de defeitos críticos. Também permite a partir daí, a entrada de moléculas como a própria *Psd1* e busca dos alvos intracelulares. Esta interação depende muito da alça 1 e a volta 3 para que haja a interação com o CMH (PARTE III) além do próprio CMH..

7. Referências

1. Aerts A. M., François I. E. J. A., Cammue B. P. A. and Thevissen K. . The mode of antifungal action of plant, insect and human defensins. Cellular and Molecular Life Sciences, v. 65 (13), p. 2069-2079, 2008.
2. Aerts A. M., Carmona-Gutierrez D., Lefevre S., Govaert G., François I. E. J. A., Madeo F., Santos R., Cammue B. P. A. and Thevissen K. The antifungal plant defensin *Rs*-AFP2 from radish induces apoptosis in a metacaspase independent way in *Candida albicans*. FEBS Letters, v. 583 (15), p. 2513-2516, 2009.
3. Almeida M. S., Cabral K. S., Zingali R. B. and Kurtenbach E. Characterization of two novel defense peptides from pea (*Pisum sativum*) seeds. Archives of Biochemistry and Biophysics, v. 378, p. 278-86, 2000.
4. Almeida M. S., Cabral K. S., Medeiros L. N., Valente A. P., Almeida F. C. and Kurtenbach E. cDNA cloning and heterologous expression of functional cysteine-rich antifungal protein *Psd1* in the yeast *Pichia pastoris*. Archives of Biochemistry and Biophysics, v. 395, p. 199-207, 2001.
5. Almeida M. S., Cabral K. M., Kurtenbach E., Almeida F. C. and Valente A. P. Solution structure of *Pisum sativum* defensin 1 by high resolution NMR: plant defensins, identical backbone with different mechanisms of action. Journal of Molecular Biology, v. 315, p. 749-757, 2002.
6. ANVISA. Nota Técnica de Esclarecimento sobre o Risco de Consumo de Frutas e Hortaliças Cultivadas com Agrotóxicos, <http://www.anvisa.gov.br/>, áreas de atuação, Agrotóxicos e Toxicologia, Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA), 2007.

7. Barreto-Bergter E., Pinto M. R. and Rodrigues M. L. Structure and biological functions of fungal cerebrosides. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 76 (1), p. 67-84, 2004.
8. Broekaert W. F., Terras F. R., Cammue B. P. A. and Osborn R. W. Plant defensins: Novel antimicrobial peptides as components of the host defense system. *Plant Physiology*, v. 108, p. 1353-1358, 1995.
9. Bruix M., Jiménez M. A., Santoro J., Gonzalez C., Colilla F. J., Mendez E. and Rico M. Solution structure of gamma 1-H and gamma 1-P thionins from barley and wheat endosperm determined by ¹H-NMR: A structural motif common to toxic arthropod proteins. *Biochemistry*, v. 32, p. 715-721, 1993.
10. Cabral K. M. S., Almeida M. S., Valente A. P., Almeida F. C. L. and Kurtenbach E. Production of the active antifungal *Pisum sativum* defensin 1 (Psd1) in *Pichia pastoris*: overcoming the inefficiency of the STE13 protease. *Protein Expression and Purification*, v. 31 (1), p. 115-122, 2003.
11. Carvalho Ade. O. and Gomes V. M. Plant defensins - Prospects for the biological functions and biotechnological properties. *Peptides*, v. 30, p. 1007-1020, 2009.
12. Chen S. C. A. and Sorrell T. C. Antifungal agents. *Medical Journal of Australia*, v. 187, p. 404-409, 2007.
13. Colilla F. J., Rocher A. and Mendez E. Gamma-Purothionins: amino acid sequence of two polypeptides of a new family of thionins from wheat endosperm. *FEBS Letters*. v. 17 (270), p. 191–194, 1990.
14. Dickson R. C. and Lester R. L. Yeast sphingolipids. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1426, p. 347-357, 1999.

15. Duarte R. S., Polycarpo C. R., Wait R., Hartmann R. and Bergter, E. B.
Structural characterization of neutral glycosphingolipids from *Fusarium* species.
Biochimica et Biophysica Acta, v. 1390, p. 186-196, 1998.
16. EIBE, European Initiative for Biotechnology Education. Transgenic plants:
economy, environment and ethics. Unit. 10, 1998.
17. EIBE, European Initiative for Biotechnology Education. Biotechnology and the
developing countries. Unit. 15, 1999.
18. Englebienne P., Van Hoonacker A. and Verhas M. Surface plasmon resonance:
principles, methods and applications in biomedical sciences. *Spectroscopy*, v.
17, p. 255–273, 2003.
19. Epand R. M. and Vogel H. J. Diversity of antimicrobial peptides and their
mechanism of action. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1462, p. 11-28, 1999.
20. Epand R. M. and Epand R. F. Lipid domains in bacterial membranes and the
action of antimicrobial agents. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1788, p. 289–
294, 2009.
21. Fant F., Vranken W., Broekaert W. and Borremans F. Determination of the
three-dimensional solution structure of *Raphanus sativus* antifungal protein 1 by
¹H NMR. *Journal Molecular Biology*, v. 279, p. 257-270, 1998.
22. Fant F., Vranken W. V. and Borremans F. A. M. The three-dimensional
structure of *Aesculus hippocastanum* antimicrobial protein 1 determined by ¹H
NMR. *Proteins: Structure and Function Genetics*, v. 37, p. 388-403, 1999.
23. Ferket K. K. A., Levery S. B., Park C., Cammue B. P. A. and Thevissen K.
Isolation and characterization of *Neurospora crassa* mutants resistant to
antifungal plant defensins. *Fungal Genetics and Biology*, v. 40, p. 176-185,
2003.

24. Fujimura M., Ideguchi M., Minami Y., Watanabe K. and Tadera K. Amino Acid Sequence and Antimicrobial Activity of Chitin-Binding Peptides, Pp-AMP 1 and Pp-AMP 2, from Japanese Bamboo Shoots (*Phyllostachys pubescens*). *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, v. 69 (3), p.642-645, 2005.
25. Henzler-Wildman K. and Kern D. Dynamic personalities of proteins. *Nature*, v. 450, p. 964-972, 2007.
26. James L. C. and Tawfik D. S. Conformational diversity and protein evolution – a 60-year-old hypothesis revisited. *TRENDS in Biochemical Sciences*, v. 28 (7), p. 361-368, 2003.
27. Jang H., Ma B. and Nussinov R. Conformational study of the protegrin-1 (PG-1) dimer interaction with lipid bilayers and its effect. *BioMed Central Structural Biology*, v. 7 (21), 2007. <http://www.biomedcentral.com/1472-6807/7/21>.
28. Janisiewicz W. J., Pereira I. B., Almeida M.S., Roberts D.P., Wisniewski M. and Kurtenbach E. Improved biocontrol of fruit decay fungi with *Pichia pastoris* recombinant strains expressing *Psd1* antifungal peptide. *Postharvest Biology and Technology*, v. 47 (2), p. 218-225, 2008.
29. Janisiewicz W. J. and Korsten L. Biological control of postharvest disease of fruits. *Annual Review of Phytopathology*, v. 40, p. 411-441, 2002.
30. Janssen B. J. C., Schirra H. J., Lay F. T., Anderson M. A. and Craik D. J. Structure of *Petunia hybrida* Defensin 1, a novel plant defensin with five disulfide bonds. *Biochemistry*, v. 42, p. 8214-8222, 2003.
31. Jarymowycz V. A. and Stone M. J. Fast time scale dynamics of protein backbones: NMR relaxation methods, applications, and functional consequences. *Chemical Reviews*, v. 106, p. 1624-1671, 2006.

32. Jenssen H., Hamill P. and Hancock R. E. W. Peptide Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 19 (3), p. 491–511, 2006.
33. Kagan B. L., Selsted M. E., Ganz T. and Lehrer R. I. Antimicrobial defensin peptides form voltage-dependent ion-permeable channels in planar lipid bilayer membranes. *Process National Academy Science (USA)*, v. 87, p. 210-214, 1990.
34. Kasahara K. and Sanai Y. Functional roles of glycosphingolipids in signal transduction via lipid rafts. *Glycoconjugate Journal*, v. 17, p. 153-162, 2000.
35. Kobayashi Y., Takashima H., Tamaoki H., Kyogoku Y., Lambert P., Kuroda H., Chino N., Watanabe T. X., Kimura T., Sakakibara S. and Moroder L. The cysteine stabilized α -helix: a common structural motif of ion channel blocking neurotoxic peptides. *Biopolimers*, v. 31, p. 1213-1220, 1991.
36. Landon C., Vovelle F. and Sodano P. The active site of drosomycin, a small insect antifungal protein, delineated by comparison with the modeled structure of Rs-AFP2, a plant antifungal protein. *Journal of Peptide Research*, v. 56, p. 231-238, 2000.
37. Lay F. T., Schirra H. J., Scanlon M. J., Anderson M. A. and Craik D. J. The three-dimensional solution structure of *NaD1*, a new floral defensin from *Nicotiana glauca* and its application to a homology model of the crop defense protein alfAFP. *Journal of Molecular Biology*, v. 325 (1), p. 175-188, 2003.
38. Leipelt M., Warnecke D., Zähringer U., Ott C., Müller F., Hube B. and Heinz E. Glucosylceramide synthases, a gene family responsible for the biosynthesis of glucosphingolipids in animals, plants, and fungi. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 276 (36), p. 33621–33629, 2001.

39. Lin K. F., Lee T. R., Tsai P. H., Hsu M. P., Chen C. S. and Lyu P. C. Structure-based protein engineering for α -amylase inhibitory activity of plant defensin. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, v. 68 (2), p. 530-540, 2007.
40. Lipari G. and Szabo A. Model-Free Approach to the Interpretation of Nuclear Magnetic Resonance Relaxation in Macromolecules. 1. Theory and Range of Validity. *Journal of American Chemistry Society*, v. 104, p. 4546-4559, 1982.
41. Liu Y. J., Cheng C. S., Lai S. M., Hsu M. P., Chen C. S. and Lyu P. C. Solution Structure of the Plant Defensin *VrD1* From Mung Bean and Its Possible Role in Insecticidal Activity Against Bruchids. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, v. 63, p. 777–786, 2006.
42. Lobo D. S., Pereira I. B., Fragel-Madeira L., Medeiros L. N., Cabral L. M., Faria J., Bellio M., Campos R. C., Linden R. and Kurtenbach E. Antifungal *Pisum sativum* defensin 1 interacts with *Neurospora crassa* cyclin F related to the cell cycle. *Biochemistry*, v. 46 (4), p. 987–996, 2007.
43. Maertens J., Raad I., Petrikos G., Boogaerts M., Selleslag D., Petersen F. B., Sable C. A., Kartsonis N. A., Ngai A., Taylor A., Patterson T. F., Denning D. W. and Walsh T. J. Efficacy and safety of caspofungin for treatment of invasive aspergillosis in patients refractory to or intolerant of conventional antifungal therapy. *Clinical Infectious Diseases*, v. 39 (11) p. 1563-1571, 2004.
44. Matsuzuki K., Sugishita K., Ishibe N., Ueha M., Nakata S., Miyajima K. and Epand R. M. Relationship of membrane curvature to the formation of poro by magainin 2. *Biochemistry*, v. 25, p. 11856-11862, 1998.
45. Medeiros L. N. Dissertação de mestrado – Título: Interação da defensina *Psd1* com membranas lipídicas: estudos de dinâmica molecular por ressonância

- magnética nuclear e citotoxicidade. Curso de Química Biológica/IBqM/CCS/UFRJ, 15 de setembro de 2004..
46. Medeiros L. N., Angeli R., Sarzedas C. G., Barreto-Bergter E., Valente A. P., Kurtenbach E. and Almeida, F. C.L. Backbone dynamics of the antifungal *Psd1* pea defensin and its correlation with membrane interaction. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, In Press, 2009.
 47. Mendonça-Hagler L., Souza L., Aleixo L. and Oda L. Trends in biotechnology and biosafety in Brasil. *Environmental Biosafety Research*, v. 7, p. 115-121, 2008.
 48. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, <http://www.agricultura.gov.br/>, estatísticas, índices agrícolas, agrotóxicos.
 49. Ministério da Saúde. <http://portal.saude.gov.br/saude/>, Cidadão, Orientação e Prevenção, DST-AIDS.
 50. Oakley B. R., Kirsch D. R. and Morris N. R. A simplified ultrasensitive silver stain for detecting proteins in polyacrylamide gels. *Analytical Biochemistry*, v.105 (2), p.361-363, 1980.
 51. Ollivon M., Lesieur S., Grabielle-Madelmont C. and Paternostre M. Vesicle reconstitution from lipid-detergent mixed micelles. *Biochimica et Biophysica Acta*, v.1508, p. 34-50, 2000.
 52. Osborn R. W., De Samblanx G. W., Thevissen K., Goderis I., Torrekens S., Van Leuven F., Attenborough S., Rees S. B. and Broekaert W. F. Isolation and characterisation of plant defensins from seeds of Asteraceae, Fabaceae, Hippocastanaceae and Saxifragaceae. *European Journal of Biochemistry*, v. 368, p. 257-262, 1995.

53. Petersen P. E. Policy for Prevention of Oral Manifestations in HIV/AIDS: The Approach of the WHO Global Oral Health Program. *Advances in Dental Research*, v. 19, p. 17-20, 2006.
54. Pike L. J. Lipid rafts: bringing order to chaos. *Journal of Lipid Reseach*, v. 44, p. 655-667, 2003.
55. Pinto M. R., Barreto-Bergter, E. and Taborda C. P. Glycoconjugates and polysaccharides of fungal cell wall and activation of immune system. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 39, p.195-208, 2008.
56. Prasad P. A., Coffin S. E., Leckerman K. H., Walsh T. J. and Zaoutis T. E. Pediatric Antifungal Utilization: New Drugs, New Trends. *Pediatric Infectious Disease Journal*, v. 27 (12), p. 1083-1088, 2008.
57. Prasad R. and Ghannoum M. A. *Lipids of Pathogenic Fungi*. CRC press, Inc., 1^a Ed., 1996.
58. Rotem S. and Mor A. Antimicrobial peptide mimics for improved therapeutic properties. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1788, p. 1582–1592, 2009.
59. Sawai M. V., Jia H. P., Liu L., Aseyev V., Wiencek J. M., McCray P. B. Jr., Gans T., Kearney W. R. and Tack B. F. The NMR structure of human β -defensin-2 reveals a novel alpha-helical segment. *Biochemistry*, v. 40, p. 3810-3816, 2001.
60. Schasfoort R. B. M. and Tudos A. J. *Handbook of Surface Plasmon Resonance*. Published by The Royal Society of Chemistry, Cambridge CB4 0WF, UK, 2008.
61. Schaügger, H. and von Jagow, G. Tricine-sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Analytical. Biochemistry*, v. 166, p. 368–379, 1987.

62. Segura A., Moreno M., Molina A., and Garcia-Olmedo F. Novel defensin subfamily from spinach (*Spinacia oleracea*). European of Journal Biochemistry, v. 435, p. 159-162, 1998.
63. Steinbach W. J. and Walsh T. J. Mycoses in Pediatric Patients. Infectious disease clinics of North America, v. 20 (3), p. 663-678, 2006.
64. Swathi Anuradha T., Divya K., Jami S. K. and Kirti P. B. Transgenic tobacco and peanut plants expressing a mustard defensin show resistance to fungal pathogens. Plant Cell Reports, v. 27 (11), p. 1777-1786, 2008.
65. Tavares L. S., Santos M. O., Viccini L. F., Moreira J. S., Miller R.N. and Franco O. L. Biotechnological potential of antimicrobial peptides from flowers. Peptides, v. 29 (10), p. 1842-51, 2008.
66. Tavares P. M., Thevissen K., Cammue B. P. A., François I. E. J. A., Barreto-Bergter E., Taborda C. P., Marques A. F., Rodrigues M. L. and Nimrichter L. In Vitro Activity of the Antifungal Plant Defensin RsAFP2 against *Candida* Isolates and Its In Vivo Efficacy in Prophylactic Murine Models of Candidiasis. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v. 52 (12), p. 4522-4525, 2008.
67. Terras F. R., Schoofs H. M., De Bolle M. F., Van Leuven F., Rees S. B., Vanderleyden J., Cammue B. P. and Broekaert, W. F. Analysis of two novel classes of plant antifungal proteins from radish (*Raphanus sativus* L.) seeds. The Journal of Biological Chemistry, v. 267, p. 15301-15309, 1992.
68. Terras F. R., Torrekens S., Van Leuven F., Osborn R. W., Vanderleyden J., Cammue B. P. and Broekaert W. F. A new family of basic cysteine-rich plant antifungal proteins from Brassicaceae species. European of Journal Biochemistry, v. 316, p. 233-240, 1993.

69. Thevissen K., Ghazi A., De Samblanx G. W., Brownlee C., Osborn R. W. and Broekaert W. F. Fungal membrane responses induced by plant defensins and thionins. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 271, p. 15018-15025, 1996.
70. Thevissen K., Terras F. R. and Broekaert, W. F. Permeabilization of fungal membranes by plant defensins inhibits fungal growth. *Applied Environment Microbiology*, v. 65, p. 5451-5458, 1999.
71. Thevissen K., Cammue B. P., Lemaire K., Winderickx J., Dickson R. C., Lester R. L., Ferket K. K., Van Even F., Parret A. H. and Broekaert W. F. A gene encoding sphingolipid biosynthesis enzyme determines the sensitivity of *Saccharomyces cerevisiae* to an antifungal plant defensin from dahlia (*Dahlia merckii*). *Process National Academy Science (USA)*, v. 97, p. 9531-9536, 2000.
72. Thevissen K., Warnecke D. C., François I. E. J. A., Leipelt M., Heinz E., Ott C., Zähringer U., Thomma B. P. H. J., Ferket, K. K. A. and Cammue B. P. A. Defensins from insects and plants interact with fungal glucosylceramides. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 279, p. 3900-3905, 2004.
73. Thevissen K., Francois I. E. J. A., Aerts A. M. and Cammue B. P. A. Fungal Sphingolipids as Targets for the Development of Selective Antifungal Therapeutics. *Current Drug Targets*, v. 6, p. 923-928, 2005.
74. Thevissen K., Kristensen H. H., Thomma B. P. H. J., Cammue B. P.A. and Francois I. E. J. A. Therapeutic potential of antifungal plant and insect defensins. *Drug Discovery Today*, v. 12 (21/22), p. 966-971, 2007.
75. Thomma B. P. H. J., Cammue B. P. A. and Thevissen K. Plant defensins. *Planta*, v. 216, p. 193-202, 2002.
76. UNAIDS/WHO. AIDS epidemic update 2007.

77. UNAIDS/WHO. HIV-related opportunistic diseases: UNAIDS Technical Update. 1998.
78. Ursella T. S., Klug W. S. and Phillips R. Morphology and interaction between lipid domains. *Process National Academy Science (USA)*, v. 106 (32), p. 13301–13306, 2009.
79. van der Weerden N. L., Lay F. T. and Anderson M. A. The Plant Defensin, *NaD1*, Enters the Cytoplasm of *Fusarium oxysporum* Hyphae. *Journal Biological Chemistry*, v. 283 (21), p. 14445-14452, 2008.
80. Vivès E., Schmidt J. and Pèleguin A. Cell-penetrating and cell-trageting peptides in drug delivery. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1786, p. 126-138, 2008.
81. Wuthrich, K. *NMR of Proteins and Nucleic Acids*. Wiley, John & Sons, Incorporated, 1^a Ed., 1986.
82. Yarden O., Ebbale D. J., Freeman S., Rodriguez R. J. and Dickman M. B. Fungal Biology and Agriculture: Revisiting the Field. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v. 16 (10), p. 859–866, 2003.
83. Yokoyama S., Kato K., Koba A., Minami Y., Watanabe K. and Yagi F. Purification, characterization, and sequencing of antimicrobial peptides, Cy-AMP1, Cy-AMP2, and Cy-AMP3, from the Cycad (*Cycas revoluta*) seeds. *Peptides*, v. 29 (12), p. 2110-2117, 2008.
84. Zasloff M. Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: Isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor. *Process National Academy Science (USA)*, v. 84, p. 5449-5453, 1987.
85. Zasloff M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. **Nature**, v. 415, p. 389-395, 2002.

Anexo I

LC/MS data for sample *Psd1*

The following is a manual inspection of the LC/MS data for sample *Psd1*. We “extracted” the ions predicted to be present in peptides produced in the tryptic digestion *Psd1*.

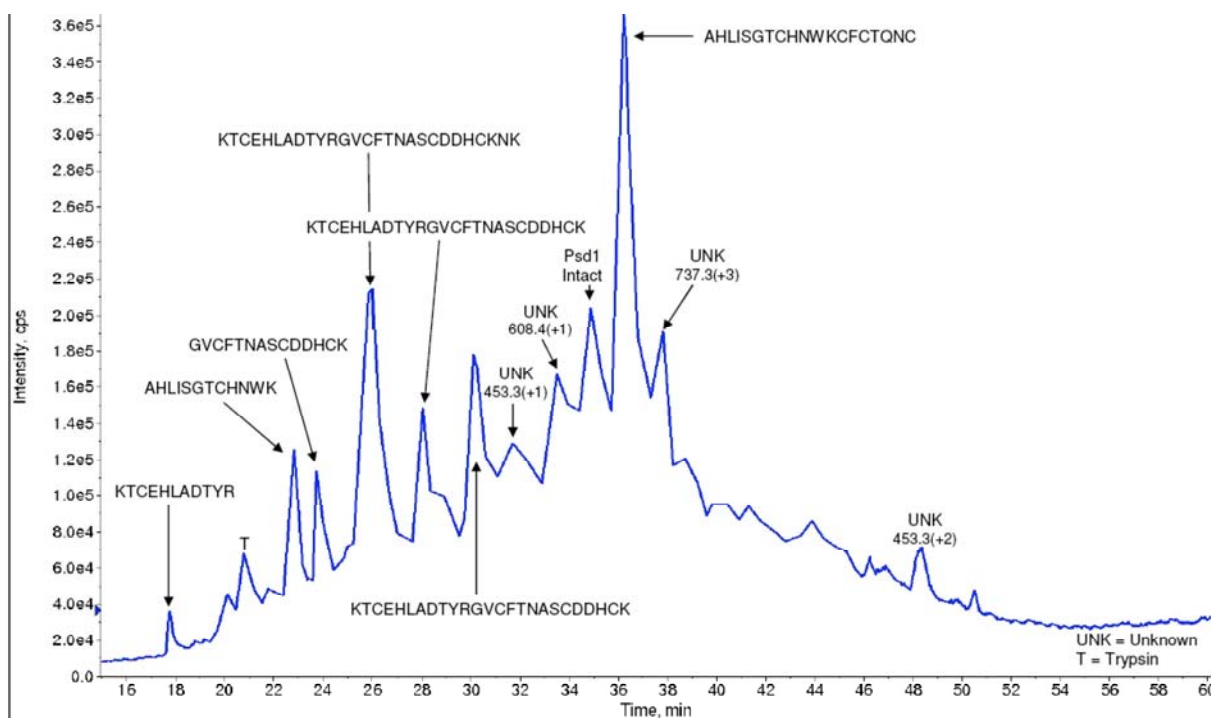


Figure1: This is the total ion chromatogram for the tryptic-digested sample *Psd1*. All ionizable material is detected in this plot; therefore it is analogous to a UV trace. Peptide peaks identified in the subsequent data are labeled. We detected *Psd-1* wild type only.

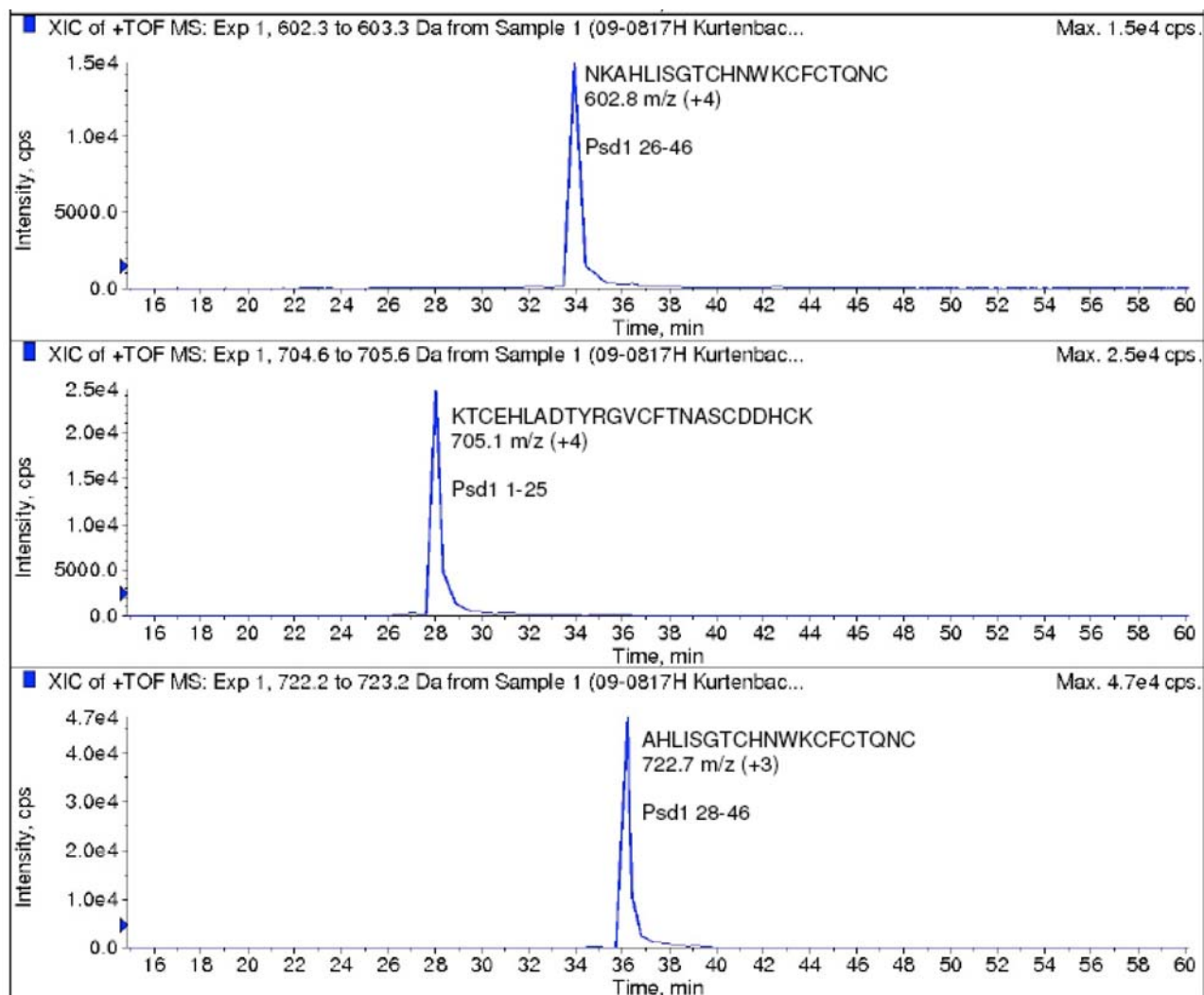


Figure 2: Upper panel is the total ion chromatogram for the tryptic-digested sample *Psid1*. The lower three panels are the “extracted ion currents” for *Psid1* peptide 26-46, *Psid1* peptide 1-25 and *Psid1* peptide 28-46.

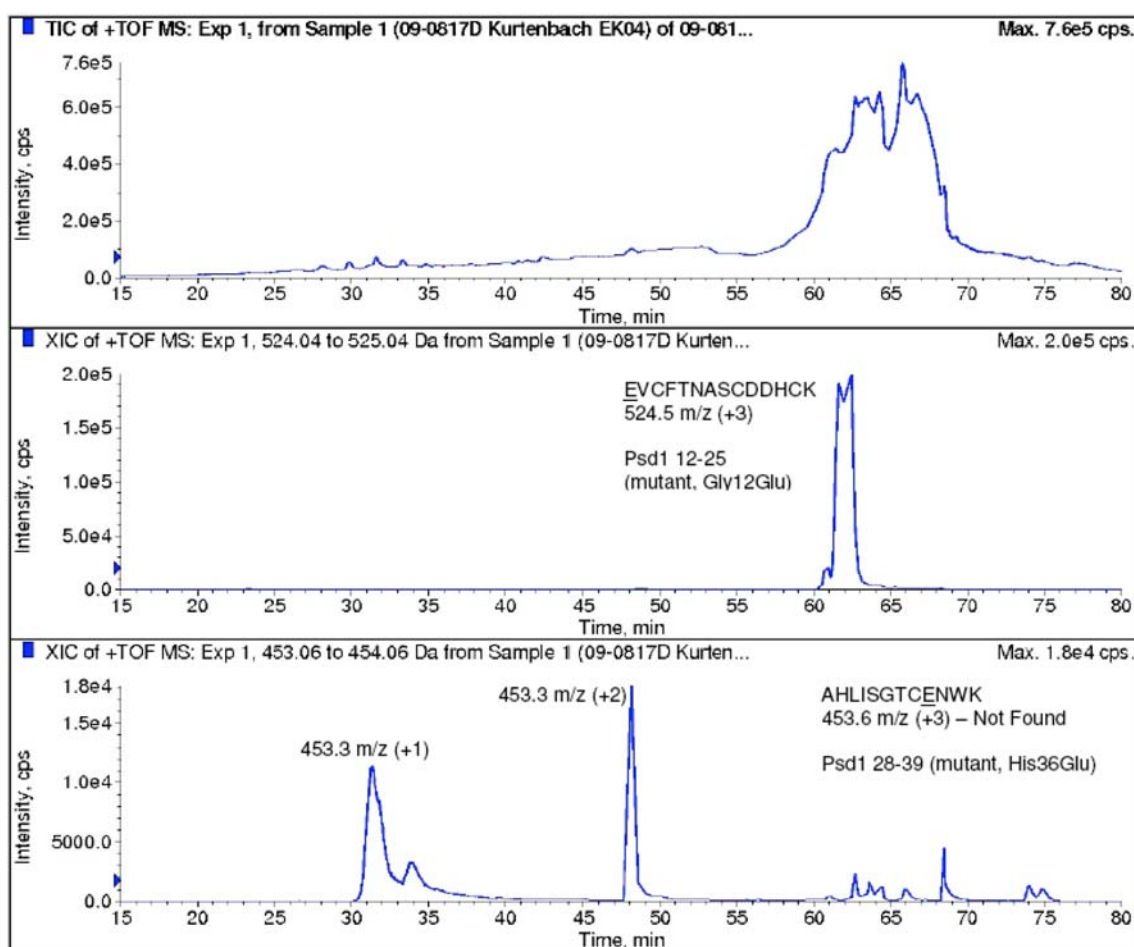


Figure 3: The top panel is the total ion chromatogram for the tryptic digested sample *Psd1Gly12Glu*. The middle panel is the extracted ion chromatogram specific for the major peptide ion of the Gly12Glu mutant defensin-1 peptide 12-25. The peptide was found in high yield, as judged by the ion intensity of $\sim 2.0 \times 10^5$ (see vertical scale). The bottom panel is the extracted ion chromatogram specific for the major peptide ion (+3 charged with a mass of 453.6 amu) of the His36Glu mutant defensin-1 peptide 28-39. This peptide was not found. The peaks detected were unrelated ions of a different charge and mass.

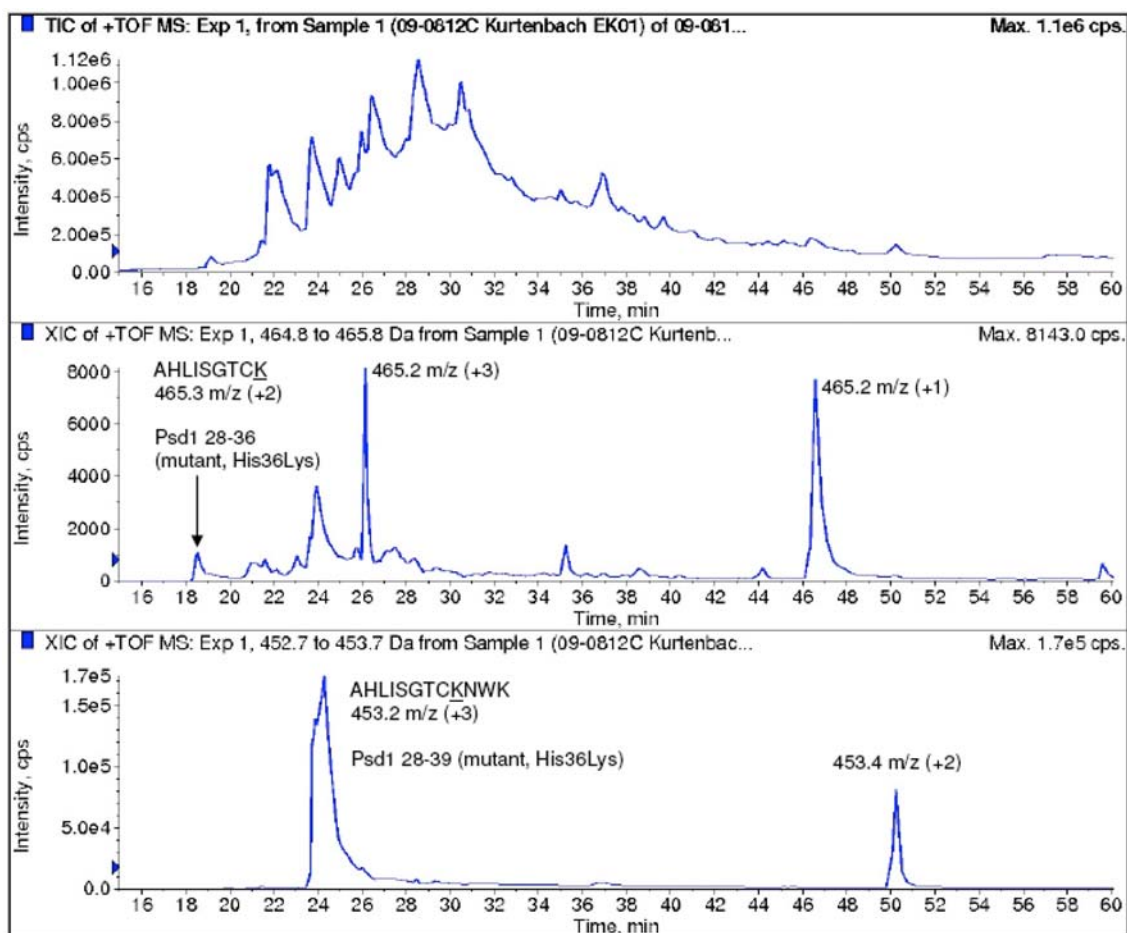


Figure 4: The following data is a manual inspection of the LC/MS data for sample *Psd1His36Lys*. We “extracted” the ions predicted to be present in peptides produced in the tryptic digestion, with special attention to the peptide that should contain the His36Lys mutation. We did find the mutation, it is the peak eluting at ~24 minutes in the chromatogram below. The peptide we found was AHLISGTCKNWK (+3 ion with $m/z = 465.2$) representing positions 28-39.

Nome: Luciano Neves de Medeiros
Nascimento: 04/06/1978
Naturalidade: Petrópolis/RJ - Brasil

FORMAÇÃO ACADÊMICA/TITULAÇÃO

1995 – 1997 Curso técnico/profissionalizante em Técnico em Química.
Colégio Estadual D Pedro II, CEDP, Petrópolis - RJ, Brasil.
1998 – 2002 Graduação em Farmácia.
Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFRJ, Rio de Janeiro - RJ, Brasil.
2002 – 2004 Mestrado em Química Biológica.
Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFRJ, Rio de Janeiro - RJ, Brasil

PRODUÇÃO CIENTÍFICA, TECNOLÓGICA E ARTÍSTICA/CULTURAL **PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA**

Artigos completos publicados em periódicos

- 1 **MEDEIROS, L. N.** ; Angeli R ; Barreto-Bergter E ; Valente, A. P. ; Kurtenbach, E. ; Almeida, F. C. L. Backbone dynamics of the antifungal Psd1 pea defensin and its correlation with membrane interaction (accepted). *Biochimica et Biophysica Acta. Biomembranes*, 2009, In press.
- 2 Medeiros, M ; Belmonte, R ; Soares, B ; **MEDEIROS, L. N.** ; Canetti, C ; FreiredeLima, C ; MayaMonteiro, C ; Bozza, P ; Almeida, I ; Masuda, H. Arrest of oogenesis in the bug *Rhodnius prolixus* challenged with the fungus *Aspergillus niger* is mediated by immune response-derived PGE2. *Journal of Insect Physiology*, v. 55, p. 151-158, 2009. .
- 3 De-Paula, V. S. ; Razzera, G. ; **MEDEIROS, L.** ; Miyamoto, C. A. ; Almeida, M. S. ; Kurtenbach, E. ; Almeida, F. C. L.; Valente, A. P. Evolutionary relationship between defensins in the Poaceae family strengthened by the characterization of new sugarcane defensins. *Plant Molecular Biology*, v. 68, p. 321-335, 2008.
- 4 Lobo, Denise S. ; Pereira, Iuri B. ; Fragel-Madeira, Lucianne ; **MEDEIROS, Luciano N.** ; Cabral, Luiz M. ; Faria, Jane ; Bellio, Maria ; Campos, Reinaldo C. ; Linden, Rafael ; Kurtenbach, Eleonora . Antifungal Defensin 1 Interacts with Cyclin F Related to the Cell Cycle. *Biochemistry (Easton)*, v. 46, p. 987-996, 2007.
- 5 Bouts, D ; Melo, A ; Andrade, A ; SilvaNeto, M ; PaivaSilva, G ; Sorgine, M ; DaCunhaGomes, L ; Coelho, H ; Furtado, A ; Aguiar, E ; **MEDEIROS, L. N.** ; Kurtenbach, E.; Masuda, H . Biochemical properties of the major proteins from *Rhodnius prolixus* eggshell. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v. 37, p. 1207-1221, 2007.
- 6 Arentis, A. L. ; Almeida, M. S. ; Cabral, K. M. S. ; **MEDEIROS, L. N.** ; Kurtenbach, E. ; Coelho, M. A. Z. Expression of *Pisum sativum* defensin 1 (*Psd1*) in shaking flasks and bioreactor cultivations of recombinant *Pichia pastoris* at different pHs. *Brazilian Journal of Chemical Engineering, Brazil*, v. 21, n. 02, p. 155-164, 2004.
- 7 Almeida, M ; Cabral, K. M. S. ; **MEDEIROS, L. N.** ; Valente, A. P. ; Almeida, F. C. L. ; Kurtenbach, E. . cDNA Cloning and Heterologous Expression of Functional Cysteine-Rich Antifungal Protein Psd1 in the Yeast *Pichia pastoris*., *Archives of Biochemistry and Biophysics, Estados Unidos*, v. 395, n. 2, p. 199-207, 2001.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)